



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultad de Medicina

Departamento de Biología Celular, de Fisiología y de Inmunología

**CARACTERIZACIÓN Y VALIDACIÓN
MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS
TUMORES MAMARIOS EXPERIMENTALES.
MODULACIÓN POR LOS LÍPIDOS DE LA DIETA**



Irmgard Costa Trachsel



Grup Multidisciplinari per a
l'Estudi del Càncer de Mama

Bellaterra, abril de 2014



Universitat Autònoma de Barcelona

**CARACTERIZACIÓN Y VALIDACIÓN
MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS
TUMORES MAMARIOS EXPERIMENTALES.
MODULACIÓN POR LOS LÍPIDOS DE LA DIETA**

Memoria presentada por **IRMGARD COSTA TRACHSEL** para optar al grado de **Doctor en Medicina**.

Este trabajo se ha realizado bajo la dirección del **Prof. Eduard ESCRICH ESCRICHE**, en el Departamento de Biología Celular, de Fisiología y de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, estando adscrita al programa de Doctorado de Biología Celular.

Irmgard Costa Trachsel

Eduard ESCRICH ESCRICHE

Barcelona, mayo 2014

Este trabajo ha sido cofinanciado, en parte, mediante ayudas del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Educación y Ciencia/Economía y Competitividad (AGL2006-0769/AGL2011-24778), la Fundación Patrimonio Comunal Olivarero (FPCO2008-165.396), la Agencia para el Aceite de Oliva del Ministerio de Medio Ambiente y de Medio Rural y Marino (AAO2008-165.471), la Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español (OIP2009-165.646) y los Departamentos de Salud y de Agricultura, Alimentación y Acción Rural de la Generalitat de Catalunya (GC2010-165.000).

Los patrocinadores no han participado en el diseño del estudio, en la obtención de los datos, ni en el análisis o la interpretación de los resultados.

Als meus pares

A l'Albert

A la Marina

"És, doncs, sols per l'amor que ens creixen
roses als dits i se'ns revelen els misteris;
i en l'amor tot és just i necessari"

L'amor, Miquel Martí i Pol

Agradecimientos:

Una vez finalizada esta Tesis Doctoral, quisiera recordar y agradecer a todas las personas que me han acompañado durante este largo trayecto. Este trabajo ha estado presente durante muchos años de mi vida y, por ello, ha compartido muchas de mis vicisitudes. Debo decir que no ha sido una tarea fácil, y que he pasado momentos complicados, pero la ayuda de todos vosotros ha sido esencial para culminar la elaboración de este proyecto.

En primer lugar, quisiera agradecer a mi Director de Tesis, el Dr. Eduard Escrich Escriche, Profesor Titular del Departamento de Biología Celular, de Fisiología y de Inmunología de la Universitat Autònoma de Barcelona i Director del Grup Multidisciplinari per a l'Estudi del Càncer de Mama, por haberme permitido colaborar en este proyecto de investigación, que es suyo, formando parte de un grupo de trabajo multidisciplinar ejemplar. A lo largo de todos estos años he podido constatar su clarividencia mental y vital, así como su espíritu luchador, exigente y positivo, que me han servido, en momentos concretos, como referencia en mi vida personal y profesional. Espero que esta relación, franca y productiva, perdure en el tiempo. Moltes gràcies, Eduard, per compartir amb mi els teus coneixements, per la teva confiança i el teu suport.

Asimismo, quiero dar las gracias a mis compañeras y compañeros del “Grup Multidisciplinari per a l'Estudi del Càncer de Mama”, en especial a la Dra. Montserrat Solanas y a la Dra. Raquel Moral, por su impagable compañerismo y su ejemplo de seriedad, constancia y honradez; así como a todos los que han formado parte, en algún momento, de este proyecto: la Dra. Gemma García, la Dra. Laura Grau, la Dra. Elena Vela y el Dr. Toni Hurtado; a la Dra. Raquel Escrich, con la que he coincidido en el mismo período de tiempo en la defensa de nuestras Tesis Doctorales, por su ayuda y su soporte profesional y personal durante la fase final de este trabajo; y a los últimos en incorporarse al grupo: Cristina de Miguel, Txell Pelicano, Cristina Rodríguez, Isabel Sospedra, Xavi Franco y Miguel Ángel Manzanares. Ha sido un placer compartir con vosotros estos años y veros crecer. También, quiero agradecer a la Dra. María del Carmen Ruiz de Villa, del Departamento de Bioestadística de la Universitat de Barcelona y miembro del grupo, por su importante colaboración, disponibilidad y dedicación en el tratamiento estadístico de los datos obtenidos.

Ahora ya llevo unos años en el Servicio de Patología del Hospital Parc Taulí, que se ha convertido en mi proyecto profesional. Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Mercè Rey

por permitirme desarrollar y finalizar sin problemas este trabajo, facilitándome la conciliación con mis deberes profesionales, en todos los momentos en que lo he requerido, así como por los ánimos y la comprensión mostrada, especialmente, durante el trayecto final; a todos y a todas mis compañeros y compañeras del Servicio: a Carmen, por compartir despacho y mucho más (¡es un regalo tenerte tan cerca y haber podido disfrutar contigo este momento tan especial de tu vida!); a Neus, por escucharme y ayudarme cuando más lo he necesitado; a Javier, por su amistad y por transmitirme sus conocimientos en Patología Mamaria; a Tona, Empar, M^a Ángeles, Rut, Mariona, M^a Rosa y Àlex por permitirme aprender de ellos y por ser ejemplos de dedicación en lo que les apasiona; todos vosotros sois un innegable pilar del Servicio; a Olga, Mari Carmen, Jose, Dani, Tere, Rosa, Maribel, Luís, Cati, Anna Ferran, Anna Galcerán, Henar, Joana, Eva, Carla, Emi, María, Susana, Josep y Rubén, por vuestra capacidad en solucionar mis incidencias laborales y por los momentos deliciosos que me regaláis; y a todos los residentes con los que he coincidido, en especial a los últimos: Esther, Anna, Marta, Onica, Lina, Rodolfo y Rosa, por ser un aliciente indispensable para seguir progresando. Gracias a todos y a todas por vuestro compañerismo, vuestra profesionalidad y seriedad en el trabajo y en la vida. Quisiera expresaros en estas líneas mi más sincera amistad.

Esta Tesis Doctoral empezó estando yo en el Hospital de Granollers. Allí tengo grandes amigos e inmejorables compañeros. Muchas gracias a todas y a todos: a la Dra. Mariana Bernet por ayudarme a iniciar este proyecto y creer en mí; y a todos los miembros del Servicio de Anatomía Patológica que compartieron conmigo aquellos años. No éramos muchos, así que puedo citaros a todos: Jordi, Àngel, Remei, Eulàlia, Josa, M^aÀngels, Patricia, Asun, Núria, Clara, Eva, Sílvia y Toni. ¡Aún conservo la carpeta que me regalasteis para empezar a archivar artículos!

Gracias a mis amigas y amigos, a los de siempre y a los más recientes. A mis amigas de la Facultad: Ana, Aurora, Elo, Lucila, Mar, María José, Mireia, Miriam, Iciar y Quima, a las que no puedo ver mucho pero que han marcado mi vida. A Caroline Le Bousse-Kerdiles por haber sido mi primera maestra del buen hacer profesional y por continuar siendo mi amiga. A Ana Chivite por soportarme durante los años de residencia y por su inquebrantable y sincera estima. A Vicky, Maite y Elena por sus locuras, por hacerme reír y por llorar conmigo. A Salva por estar siempre allí. A Paquí por su ayuda desinteresada en momentos difíciles; gracias por preocuparte tanto por mí. A Carlos y a María por formar parte de tantas épocas de mi vida, desde hace ya muchos años. A Francesca y a Jaume por saber que siempre puedo contar con vosotros. A Mireia Gimeno por su amistad y por las horas compartidas organizando los horarios escolares de nuestros hijos. A mis amigas y amigos del Club Esquí

Terrassa, que cada vez sois más, por ayudarme a desconectar de los problemas diarios y permitirme ser yo misma, especialmente a Carme Vizcaíno por demostrarme siempre su amistad.

También quiero agradecer a Sally el sincero amor que brinda a mi familia. Por su generosidad, honradez y por cuidarnos tanto y tan bien.

Moltes gràcies papà i mamà. Sempre he pogut comptar amb vosaltres i sentir la vostra estimació quan més ho he necessitat. Gràcies mamà per ser el pal de paller de la nostra família. Gràcies papà per conservar sempre els teus principis ètics i morals a pesar de les circumstàncies de la vida i per haver-me transmès la teva fe. Moltes gràcies a tots dos per impulsar i ajudar-me a desenvolupar la meva vocació en la Medicina. Gràcies Mònica per ser una germana excepcional i sempre disposada a donar-me un cop de mà; i Josep, Marc i Ferran que, tot i ser els meus germans petits, us preocupeu per mi. Vosaltres sou les meves arrels, d'on vinc. Junts hem viscut moltes coses i estic segura de que en viurem moltes més, d'alegres i felices. Hem plantat un arbre ben ferm que ha resistit moltes tempestes i molts vendavals. Gràcies Eduard i Montse per estimar tan a la Mònica i al Marc; i Marc, Helena, Marta i Anna per ser els millors cosins que la Marina podria tenir.

Vull donar les gràcies al Quimo per la seva generositat i bondat. Has estat al nostre costat quan més ho hem necessitat. Gràcies, també, Xavier, Magda i Marta per saber que sempre esteu a mà; i als meus nebots i neboda més grans: Àlvar, Ignasi, Martí, Òscar i Susanna per ser els joves que heu arribat a ser, un extraordinari exemple per a la Marina.

Finalment, vull agrair a l'Albert, el meu espòs, el seu amor, el seu suport i la seva incondicional confiança en mi. Fa ja molts anys que estem junts i hem viscut grans experiències plegats. La vida ens ha posat proves que hem sabut superar i estic segura que arribarem junts a la meta. I a la persona més important de la meva vida, el meu vertader tresor, la Marina, que va arribar del fred i m'ha donat tanta escalfor. Tu ets el meu motor i la meva gasolina. Amb tu he conegut i he sentit l'amor incondicional. Gràcies per entendre les meves absències i la meva poca paciència, per ser tan madura i responsable i per pensar que sóc la millor mama del món. Aquesta Tesi està especialment dedicada a tu.

A la memòria de l'Enric i de la Pilar. Sempre us tenim presents.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Índice de Figuras	4
Índice de Tablas.....	6
I – INTRODUCCIÓN	7
A – GLÁNDULA MAMARIA NORMAL: DESARROLLO Y MORFOLOGÍA	9
1. HUMANA	9
2. RATA.....	14
B – CÁNCER DE MAMA	19
1. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA.....	20
a. Factores endocrinos.....	21
b. Factores genéticos y epigenéticos	25
c. Factores ambientales	31
2. ESTADIOS DE LA CARCINOGENESIS	33
3. PATOGENESIS DEL CÁNCER DE MAMA.....	35
a. HUMANO.....	35
b. RATA.....	37
C – MODELO EXPERIMENTAL	39
1. CARACTERÍSTICAS DEL MODELO UTILIZADO.....	39
2. FACTORES QUE INFLUENCIAN LA RESPUESTA TUMORIGÉNICA	40
a. Especie seleccionada	40
b. Dosis del carcinógeno	40
c. Diferenciación glandular	41
D – LÍPIDOS DE LA DIETA Y CÁNCER DE MAMA	43
1. INFLUENCIA SOBRE LAS ETAPAS DE LA CARCINOGENESIS.....	45
2. INFLUENCIA SOBRE LOS NIVELES HORMONALES.....	46
3. MODIFICACIONES DE LA MEMBRANA CELULAR.....	47
4. EFECTOS SOBRE LOS MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	49
5. EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	51
6. INFLUENCIA SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	53
7. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO.....	54

E – CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA: DIFERENCIACIÓN Y PROLIFERACIÓN	56
1. HUMANA.....	56
a. Características histopatológicas del cáncer de mama y factores pronósticos morfológicos.....	57
b. Caracterización molecular. Clasificación pronóstica y predictiva del cáncer de mama.....	65
2. RATA.....	67
F – <i>c-Ha-ras</i> Y CÁNCER DE MAMA	76
II – <u>OBJETIVOS</u>	83
III – <u>RESULTADOS</u>	89
ARTÍCULOS ESPECÍFICOS DEL ESTUDIO MORFOLÓGICO	91
<u>ARTÍCULO 1</u> : Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7, 12 dimethylbenz(α)anthracene in the rat: A comparative analysis with human breast tumors.	
I. Costa , M. Solanas, E. Escrich.	
<i>Archives of Pathology and Laboratory Medicine</i> , 2002, <u>126</u> : 915-927.....	93
Antecedentes, resumen de los resultados y datos adicionales	109
<u>ARTÍCULO 2</u> : High fat corn oil diet promotes the development of high histologic grade rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not.	
I. Costa , R. Moral, M. Solanas, E. Escrich.	
<i>Breast Cancer Research and Treatment</i> , 2004, <u>86</u> : 225-235	119
Antecedentes, resumen de los resultados y datos adicionales	133
<u>ARTÍCULO 3</u> : High corn oil and extra virgin olive oil diets and experimental mammary carcinogenesis: clinicopathological and immunohistochemical p21Ha-Ras expression study.	
I Costa , R. Moral, M. Solanas, FJ. Andreu, MC. Ruiz de Villa, E. Escrich.	
<i>Virchows Archiv</i> , 2011, <u>458</u> : 141-151	141
Antecedentes, resumen de los resultados y datos adicionales	155

ARTÍCULOS DE APLICACIÓN E INTEGRACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO MORFOLÓGICO	165
<u>ARTÍCULO 4</u> : Deregulated expression of the PCPH proto-oncogen in rat mammary tumors induced with 7,12-dimethylbenz(α)anthracene. M. Solanas, E. Escrich, A. Rouzaut, I. Costa , A. Martínez, V. Notario. <i>Molecular Carcinogenesis</i> 2002; <u>33</u> : 219-227.....	169
Antecedentes, resumen de los resultados y datos adicionales	181
<u>ARTÍCULO 5</u> : 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. M. Solanas, A. Hurtado, I. Costa , R. Moral, J.A. Menéndez, R. Colomer, E. Escrich. <i>International Journal of Oncology</i> 2002; <u>21</u> : 745-753.....	183
Antecedentes, resumen de los resultados y datos adicionales	195
<u>ARTÍCULO 6</u> : Identification of novel differentially expressed genes by the effect of a high-fat n-6 diet in experimental breast cancer. E. Escrich, R. Moral, G. Garcia, I. Costa , J.A. Sánchez, M. Solanas. <i>Molecular Carcinogenesis</i> 2004; <u>40</u> : 73-78.....	199
Antecedentes, resumen de los resultados y datos adicionales	207
<u>ARTÍCULO 7</u> : Are the olive oil and other dietary lipids related to cancer? Experimental evidence. E. Escrich, M. Solanas, R. Moral, I. Costa , L. Grau. <i>Clinical and Translational Oncology</i> 2006; <u>8</u> : 868-883.....	211
Antecedentes y resumen de los resultados	229
<u>ARTÍCULO 8</u> : Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer. E. Escrich, R. Moral, L. Grau, I. Costa , M. Solanas. <i>Molecular Nutrition and Food Research</i> 2007; <u>51</u> : 1279-1292	231
Antecedentes y resumen de los resultados	247
<u>ARTÍCULO 9</u> : Differential expression of H19 and vitamin D3 up-regulated protein 1 as a mechanism of the modulatory effects of high virgin olive oil and high corn oil diets on experimental mammary tumors. M. Solanas, R. Moral, G. García, L. Grau, E. Vela, R. Escrich, I. Costa , E. Escrich. <i>European Journal of Cancer Prevention</i> 2009; <u>18</u> : 153-161	249
Antecedentes y resumen de los resultados	261

ARTÍCULO 10: Diets high in corn oil or extra-virgin olive oil provided from weaning advance sexual maturation and differentially modify susceptibility to mammary carcinogenesis in female rats.

R. Moral, R. Escrich, M. Solanas, E. Vela, **I. Costa**, MC. Ruíz de Villa, E.

Escrich. *Nutrition and Cancer* 2011; 63: 410-420 263

Antecedentes, resumen de los resultados y datos adicionales 277

IV – DISCUSIÓN..... 285

A – ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE LAS LESIONES MAMARIAS EXPERIMENTALES Y DEL EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LOS CARCINOMAS DE MAMA EN EL MODELO EXPERIMENTAL INDUCIDO CON DMBA EN LA RATA 288

1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL MODELO EXPERIMENTAL (Objetivo “a”)..... 290

2. EFECTO DE LAS DIETAS RICAS EN PUFA N-6 (ACEITE DE MAÍZ) Y EN ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA EN LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL CÁNCER DE MAMA EXPERIMENTAL (Objetivo “b”) 297

B – ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS DIETAS HIPERLIPÍDICAS SOBRE LA EXPRESIÓN DE p21Ha-Ras EN LOS ADENOCARCINOMAS DE MAMA EXPERIMENTALES (Objetivo “c”) 302

C – APLICACIÓN DEL ESTUDIO MORFOLÓGICO PROPUESTO PARA EL ADENOCARCINOMA DE MAMA DE LA RATA INDUCIDO CON DMBA EN DIFERENTES TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS CON DICHO MODELO EXPERIMENTAL (Objetivo “d”)..... 310

1. ESTUDIOS CLÍNICOS..... 310

2. ESTUDIOS MOLECULARES Y BIOLÓGICOS 314

a. Alteración de la expresión de PCPH en la glándula mamaria virgen y lactante de la rata y en los tumores inducidos con DMBA 314

b. Identificación de genes expresados diferencialmente por efecto de los lípidos de la dieta en el cáncer de mama experimental..... 317

c. Efecto diferencial de las dietas hiperlipídicas ricas en aceite de oliva y en aceite de maíz sobre la expresión de H19 y VDUP-1 318

ÍNDICE

d. Modulación de la susceptibilidad de la glándula mamaria a la transformación maligna secundaria a los cambios en la maduración sexual inducidos por los lípidos de la dieta	319
D – INTEGRACIÓN DE LOS RESULTADOS MORFOLÓGICOS EN EL ESTUDIO DE LÍPIDOS DE LA DIETA Y CÁNCER DE MAMA (Objetivo “e”)	324
V – <u>CONCLUSIONES</u>	329
VI – <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	335

ÍNDICE

ABREVIATURAS:

GMECM	“Grup Multidisciplinari per a l’Estudi del Càncer de Mama”
IARC	“International Agency for Research in Cancer”
WHO/OMS	“World Health Organisation”/Organización Mundial de la Salud

GRUPOS EXPERIMENTALES

C / LFCO / LF	grupo experimental control (dieta normolipídica)
HFCO ₁	grupo experimental de dieta hiperlipídica de aceite de maíz desde el destete
M / HFCO _p HCO / HFCO	grupo experimental de dieta hiperlipídica de aceite de maíz desde la inducción con DMBA (HCO desde el destete en Artículo 10)
O / HFOO _p HOO / HFOO	grupo experimental de dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra desde la inducción con DMBA (HOO desde el destete en Artículo 10)
MO	grupo experimental de dieta hiperlipídica, con dieta rica en aceite de maíz desde la inducción hasta los 86 días de edad y luego la dieta rica en aceite de oliva

DIETAS

Dieta <i>m3</i>	dieta experimental normolipídica
Dieta <i>M20</i>	dieta experimental hiperlipídica de aceite de maíz
Dieta <i>mO20</i>	dieta experimental hiperlipídica de aceite de oliva virgen

PARÁMETROS CLÍNICOS

PND	día posnatal
VTM	volumen tumoral medio
VTT	volumen tumoral total

ESTUDIO MORFOLÓGICO

CGA	campos de gran aumento
H&E	hematoxilina y eosina
GH	grado histológico
NGS	“Nottingham Grading System”
SBS	“Scarff Bloom Richardson”

VARIOS

ABs	yemas alveolares (“alveolar buds”)
ADN	ácido deoxiribonucleico
ADN-LI	índice de marcaje de ADN
ADNc	ácido deoxiribonucleico complementario
AKT/PKB	proteína quinasa B
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATPasa	adenosin trifosfatasa
BRCA	“Breast Cancer”
CD	“cluster of differentiation”
CDK	quinasa dependiente de ciclina
CK	citoqueratina
CLA	ácido linoleico conjugado
COX	ciclooxigenasa
CYP	citocromo P450

DAG	diacilglicerol
DBD	dominio de unión al ADN
DHA	ácido docosahexaenoico
DHEA	dehidroepiandrosterona
DMBA	7,12-dimetilbenz-(α)antraceno
E ₂	17 β -estradiol
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico
EPA	ácido eicosapentaenoico
ER	receptor de estrógenos (también RE)
ERK	“extracellular signal-regulated kinase”
FFA	ácidos grasos libres
FGF	factor de crecimiento fibroblástico
GAP	“GTPase activating protein”
GDI	“guanine nucleotide dissociation inhibitor”
GDP	guanina difosfato
GDS	“guanine nucleotide dissociation stimulator”
GLA	ácido gamma linolénico
GLUT	“glucose transporter”
GnRH	hormona liberadora de gonadotrofinas
GST	glutatión-S-transferasa
GTP	guanina trifosfato
GTPasas	guanina trifosfatasa
hCG	hormona gonadotropina coriónica
HMGCoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzimaA
hPL	hormona del lactógeno placentario
HER2	“Human Epidermal Growth Factor Receptor 2”
HNF-4	receptor nuclear hepático 4
IDC	carcinoma ductal infiltrante (“invasive ductal carcinoma”)
IDPs	proliferaciones intraductales
IGF	factor de crecimiento parecido a Insulina
IL	interleuquina
IP ₃	inositol-trifosfato
KiSS1	kisspeptina hipotalámica
LCIS	carcinoma lobulillar “in situ” (“lobular carcinoma in situ”)
LOX	lipooxigenasa
LXRs	receptores X hepáticos
MAPK	“mitogen-activated protein kinase”
Mek	“MAPK extracellular signal-regulated kinase”
MMPs	metaloproteinasas de la matriz
MMR	“miss-match repair”
mSR	receptores de estrógenos asociados a membrana
MUFA	ácido graso monoinsaturado
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
N-CAM	·neural cell adhesión molecule”
NER	reparación por escisión de nucleótidos
NK	“natural killer”
NF κ B	factor nuclear κ B
NOS	No especificado (“not otherwise specified”)
OA	ácido oleico

OEA	oleiletanolamida
OFA	“Oncins France Strain A”
OMS	Organización Mundial de la Salud (WHO “World Health Organization”)
PA	ácido fosfatídico
PC	fosfatidilcolina
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDK1	quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositol
PGE	prostaglandina E
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina
PIF	inhibidor de la secreción de prolactina
PI3K	fosfatidil inositol 3-quinasa
PIP ₂	fosfatidilinositol 4,5-difosfato
PKA	proteína kinasa dependiente de AMP cíclico
PKC	proteína kinasa C
PLA	fosfolipasa A
PLC	fosfolipasa C
PLD	fosfolipasa D
PPARs	receptores activados por proliferadores peroxisomales
PR	receptor de progesterona (también RP)
pRb	proteína Rb fosforilada
PRL	prolactina
PTPasas	tirosina fosfatasas
PUFA	ácidos grasos poliinsaturados
RA	receptor de andrógenos
Rb	retinoblastoma
RE	receptor de estrógenos
ROS	especies reactivas del oxígeno
RSK	quinasa S6 ribosomal
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa
RP	receptor de progesterona
RXR _s	receptores del ácido retinoico
SD	Sprague-Dawley
SERMs	“Selective Estrogen Receptor Modulators”
SOS	“son of sevenless”
SRE	“steroid response elements”
SREBP	“sterol-regulatory element-binding protein”
SRU	“steroid response units”
STAT3	transductor de señal y activador de la transcripción 3
TDs	ductos terminales (“terminal ducts”)
TDLU	unidad ductulo-lobulillar terminal (“terminal ductal lobular unit”)
TEBs	yemas terminales (“terminal ends buds”)
TGF	factor de crecimiento transformante
TIMPs	inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz
TNF	factor de necrosis tumoral (“tumor necrosis factor”)
TRX	tioredoxina
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular
VER	“base-excision repair”
VDUP1	proteína 1 suprarregulada por la vitamina D3
VNTR	número de repeticiones variables en tándem

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Desarrollo de la glándula mamaria humana	9
Figura 2: Desarrollo de la glándula mamaria de la rata virgen nulípara.....	14
Figura 3: Estructura de una yema terminal (TEB).....	16
Figura 4: Topografía de la glándula mamaria de la rata	17
Figura 5: Tasas de incidencia por países de cáncer de mama en mujeres	20
Figura 6: Carcinogénesis mamaria.....	34
Figura 7: Diferenciación de la glándula mamaria y susceptibilidad al carcinógeno	43
Figura 8: Efecto de las dietas hiperlipídicas en la tumorigénesis mamaria	56
Figura 9: Vías de señalización mediada por Ras	79

Figuras adicionales (A) a los artículos (descritas en el texto de los apartados correspondientes del capítulo de “Resultados”):

Artículo 1:

Figura A1: Áreas glandulares/cribiformes (H&E x40).....	113
Figura A2: Grado nuclear I (H&E x200).....	113
Figura A3: Grado arquitectural III (H&E x40).....	113
Figura A4: Pleomorfismo nuclear y nucleolos (H&E x200)	113
Figura A5: Necrosis tipo comedo (H&E x100)	113
Figura A6: Infiltrado linfoplasmocitario denso (H&E x100)	113
Figura A7: Infiltrado eosinofílico (H&E x200).....	114
Figura A8: Patrón cribiforme predominante (H&E x40).....	114
Figura A9: Patrón cribiforme y papilar mixto (H&E x40)	114
Figura A10: Nodularidad tumoral (H&E x40).....	114
Figura A11: Nódulos tumorales expansivos (H&E x40).....	114
Figura A12: Reacción estromal desmoplásica (H&E x200).....	114
Figura A13: Patrón ductal y reacción estromal desmoplásica (H&E x200).....	115
Figura A14: Dediferenciación (H&E x200)	115
Figura A15: Focos de carcinoma en lesiones benignas (H&E x100).....	115
Figura A16: Nidos de carcinoma separados por tejido fibroso (H&E x100)	115
Figura A17: Secreción citoplasmática en carcinoma (H&E x200).....	115
Figura A18: Patrón microcribiforme (H&E x100)	115
Figura A19: Infiltrado mastocitario en carcinoma de bajo grado arquitectural y nuclear (H&E x200).....	116
Figura A20: Fibroadenoma pericanalicular (H&E x40)	116
Figura A21: Fibroadenoma pericanalicular (H&E x100)	116
Figura A22: Fibroadenoma intracanalicular (H&E x40)	116
Figura A23: Fibroadenoma intracanalicular (H&E x100).....	116
Figura A24: Adenoma (H&E x100)	116
Figura A25: Adenoma (H&E x200)	117
Figura A26: Fibroma (H&E x100)	117
Figura A27: Hiperplasia lobulillar (H&E x100)	117
Figura A28: Hendiduras foliáceas en tumor “phyllodes-like” (H&E x40).....	117
Figura A29: Estroma celular en tumor “phyllodes-like” (H&E x200).....	117
Figura A30: Figuras de mitosis en estroma de tumor “phyllodes-like” (H&E x200) .	117

Artículo 2:

Figura A31: HFCO _p , grados arquitectural y nuclear elevados (H&E x400).....	139
Figura A32: HFCO _p , actividad mitótica (H&E x400).....	139
Figura A33: HFCO _p , necrosis tumoral (H&E x40)	139
Figura A34: HFCO _p , infiltrado inflamatorio (H&E x100)	139
Figura A35: HFCO _p , invasión de tejidos adyacentes (H&E x40)	139

Figura A36: HFCO _p , reacción desmoplásica (H&E x200)	139
Figura A37: HFOO _p , grados arquitectural y nuclear bajos (H&E x400)	140
Figura A38: HFOO _p , actividad mitótica (H&E x400)	140
Figura A39: HFOO _p , patrón papilar (H&E x100)	140
Figura A40: HFOO _p , márgenes tumorales nodulares (H&E x40)	140
Figura A41: HFOO _p , márgenes tumorales nodulares (H&E x100)	140
Figura A42: HFOO _p , cambio secretor (H&E x200)	140
<u>Artículo 3:</u>	
Figura A43: Poca expresión de p21Ha-Ras	161
Figura A44: Abundante expresión de p21Ha-Ras	161
Figura A45: B411/A4 RAS total: 18%	162
Figura A46: B435/A2 RAS total: 38,13%	163
Figura A47: B398/A4 RAS total: 82,52%	164
<u>Artículo 4:</u>	
Figura A48: Expresión del ARNm de <i>PCPH</i> en los tumores mamarios por efecto de una dieta rica en n-6 PUFA	182
<u>Artículo 5:</u>	
Figura A49: Imágenes representativas de los tumores de cada grupo experimental ..	198
<u>Artículo 6:</u>	
Figura A50: Imágenes grupo C y HCO	209
<u>Artículo 10:</u>	
Figura A51: 36 PND no ovulación	281
Figura A52: 51 PND ovulación	282
Figura A53: Estructuras mamarias en tejido montado en fresco	283

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Composición característica de los aceites de oliva virgen y de maíz	45
Tabla 2: Grado histológico del carcinoma de mama (Elston y Ellis, 1991)	58
Tabla 3: Clasificación de los tumores de glándula mamaria de la rata (J. Russo y I. Russo)	72

Tablas adicionales (A) a los artículos (especificadas en el texto de los apartados correspondientes del capítulo de “Resultados”):

Artículo 2:

Tabla A1: Incidencia tumoral y patología mamaria.....	134
Tabla A2: Lesiones epiteliales proliferativas mamarias	135
Tabla A3: Distribución de los grados histológicos de los carcinomas de mama experimentales entre diferentes grupos dietéticos, en cuanto a aporte de grasas, en una nueva serie experimental.....	138

Artículo 3:

Tabla A4: Estudio inmunohistoquímico de p21Ha-Ras (series A y B)	159
Tabla A5: Correlación expresión de p21Ha-Ras y grado histológico (serie A)	159
Tabla A6: Correlación expresión de p21Ha-Ras y grado nuclear y arquitectural (serie B).	159
Tabla A7: Correlación expresión de p21Ha-Ras y mitosis (serie B).....	160

Artículo 5:

Tabla A8: Parámetros clínicos (I)	195
Tabla A9: Parámetros clínicos (II).....	196

Artículo 9:

Tabla A10: Resultados del estudio de la expresión de H19, IGF2, VDUP1 y TRX ..	261
---	-----

Artículo 10:

Tabla A11: Resultados del estudio clínico y morfológico de la glándula mamaria.....	278
--	-----

I – INTRODUCCIÓN



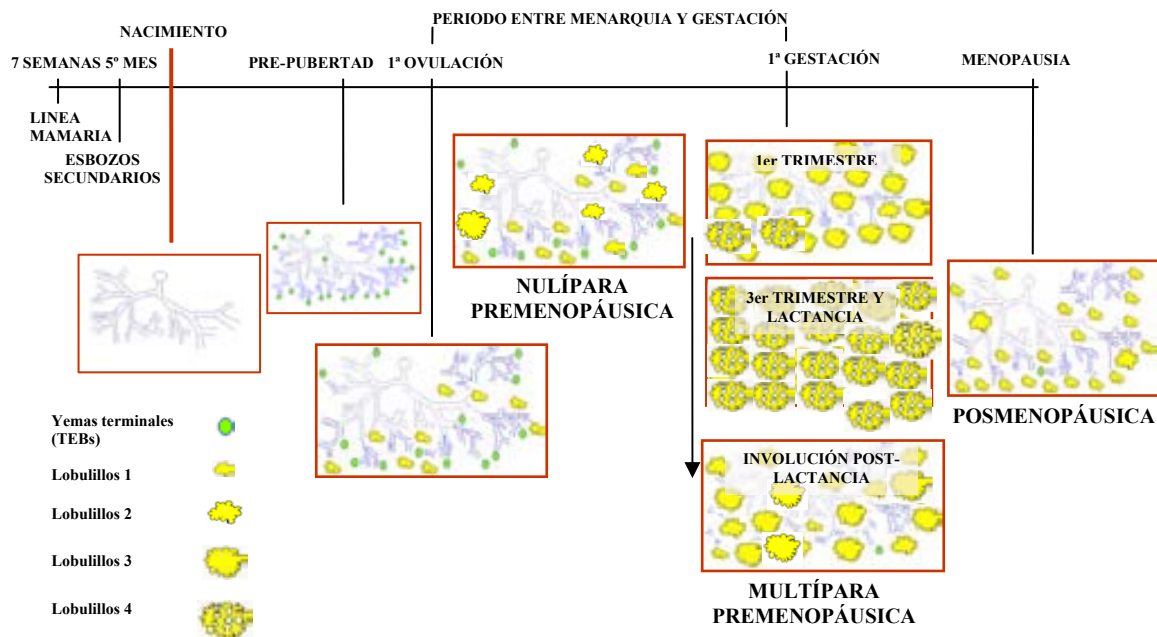
A. GLÁNDULA MAMARIA NORMAL: DESARROLLO Y MORFOLOGÍA

El desarrollo y la función de las glándulas mamarias, humana y de la rata, dependen de múltiples requerimientos hormonales, de componentes de la matriz extracelular y de factores de crecimiento. A pesar de ello, se reconocen algunas diferencias entre ambas especies.

1. HUMANA

El desarrollo de la glándula mamaria humana se esquematiza en la Figura 1.

Figura 1: Desarrollo de la glándula mamaria humana



Embriológicamente, la glándula mamaria deriva de un esbozo ectodérmico, conocido como línea o banda mamaria, que aparece hacia la 5ª semana de vida como un par de áreas de engrosamiento de la epidermis que se extienden desde las axilas a la región inguinal. Hacia la 7ª semana de vida, las líneas mamarias involucionan restando como dos masas epiteliales sólidas en la región torácica que empiezan a crecer hacia el mesénquima subyacente. En esta fase intervienen la testosterona, que determina el patrón de crecimiento mamario masculino, el estradiol y las hormonas lactógenas ([583], [585], [1030]). Hacia el quinto mes de vida fetal, se forman los esbozos secundarios de los que se originan los ductos galactóforos que desembocan en el pezón ([585], [3303]). Esta etapa parece estar controlada por el estradiol y la progesterona de la placenta y la prolactina fetal. En el recién nacido, la glándula mamaria consiste en un sistema rudimentario ramificado de ductos que permanece quiescente hasta la pubertad. El crecimiento de la mama será isométrico con la proliferación del tejido estromal y proporcional al crecimiento medio del cuerpo ([583], [586], [1030], [2633]). Poco antes de

la menarquia, y con el inicio de la maduración folicular en el ovario, el parénquima mamario entra en una fase de crecimiento, con división de la estructura tubular y aparición de los ductos mamarios primarios y secundarios, que terminan en unas formaciones bulbosas o yemas terminales ([3503], [7671]). Con las primeras ovulaciones, estas formaciones inmaduras dan lugar a las yemas alveolares o ductulillos, que se disponen alrededor de un ducto, constituyendo los lobulillos tipo 1, que representan la unidad funcional básica de la mama humana o unidad ductulo-lobulillar terminal (“terminal ductal lobular unit” o TDLU). Cada lobulillo tipo 1 contiene de 6 a 11 ductulillos. Durante la etapa fértil de la mujer, se observan dos formas adicionales de lobulillos, el tipo 2 y el 3, cuya transición se asocia a formación de nuevas yemas alveolares (hasta 47 en el tipo 2 y hasta 80 en el tipo 3), con un incremento en el tamaño lobulillar. Los lobulillos tipo 1 y 2 se observan predominantemente en mujeres nulíparas, mientras que la progresión a lobulillo tipo 3 es estimulada por la gestación ([3165], [3503]). El desarrollo de los lobulillos está regulado por los cambios hormonales que acontecen durante cada ciclo menstrual y, en especial, durante el embarazo. Así, durante la fase folicular se produce un crecimiento activo del sistema glandular, que alcanza un máximo en la fase luteal y va seguido de una rápida involución. El balance entre proliferación e involución en edades reproductivas tempranas favorece la proliferación, con una progresión de la población celular en cada ciclo ovulatorio ([2631], [2633], [2638], [3123], [3332]). Los cambios cíclicos en los niveles de estrógenos y progesterona ováricos durante cada ciclo menstrual y su acción sinérgica son necesarios para el crecimiento armónico de la glándula mamaria ([2631], [4577]). Los estrógenos controlan la proliferación celular, induciendo la síntesis de receptores de progesterona en las células que contienen receptores de estrógenos y la secreción de prolactina hipofisaria y estimulando a células epiteliales del lobulillo que presentan sus receptores a producir factores de crecimiento que, a su vez, inducen la proliferación de las células vecinas ([2633], [3965], [6797]). En cuanto a la progesterona, el mecanismo subyacente no está claro y parece que actuaría mediando la regulación de genes del ciclo celular, de factores de crecimiento y de sus receptores ([3332]). En esta fase de la mamogénesis intervienen, además, prolactina, insulina, cortisol, tiroxina, hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y hormona de crecimiento, que interactúan entre ellas y cuyas acciones pueden ser directas y/o indirectas a través de factores de crecimiento ([583], [586], [1030], [2631], [2632], [2639], [3332], [3334], [3372]). Entre ellos están el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante α (TGF- α), la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y el factor de crecimiento parecido a Insulina I (IGF-I) ([2630], [2633], [2638], [3164]). Diversos factores

de crecimiento median sus efectos sobre el crecimiento a través de cambios en el “turnover” de los componentes de la matriz extracelular secretados por las células ([2633]), como las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y sus inhibidores (TIMPs) ([3372]). El tejido adiposo mamario también posee 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 mamaria normal ([2633]).

La mama humana adulta normal consta de 15 a 25 ductos galactóforos que drenan los lóbulos mamarios que conforman la glándula mamaria. Los lóbulos mamarios están constituidos, a su vez, por numerosos lobulillos. Los ductos galactóforos nacen en el pezón, descienden una corta distancia, donde se expanden como ampollas (senos lactíferos), ramificándose en conductos más delgados que conducen a los lobulillos. En el pezón se observan, además, los tubérculos de Montgomery, que corresponden a glándulas sebáceas modificadas, asociados a la porción terminal de los ductos galactóforos. Éstos están revestidos, en la zona próxima a la apertura al pezón, por un epitelio escamoso queratinizante, extensión del epitelio escamoso de la piel. Entre las células epiteliales de las partes externas de los conductos galactóforos y de la piel del pezón y la areola se encuentran melanocitos dendríticos que confieren a estas zonas una pigmentación más oscura que la de la epidermis que los circunda. Los ductos mamarios distales a los galactóforos muestran dos capas de células: una interna de células epiteliales luminarias y otra externa, mioepitelial. La capa de células mioepiteliales es discontinua en las zonas más distales y se apoya en una membrana basal que, a su vez, está rodeada por fibras elásticas, ausentes en los ductos y ductulillos intralobulillares ([3923]). Estudios de caracterización fenotípica de las células que revisten los lobulillos mamarios han demostrado una heterogeneidad celular considerable, con presencia de células que expresan citoqueratinas (CK) de alto (CK5/6/14) y bajo peso molecular (CK8/18/19) y marcadores de diferenciación a músculo liso, como la actina músculo liso específica (“smooth muscle” o sm-actina). Parece ser que las células que expresan CK5/6/14 serían precursoras comunes, diferenciándose progresivamente, por un lado, hacia una vía epitelial luminar (CK8/18/19 positiva) y, por otro lado, hacia células mioepiteliales que expresan sm-actina, y se localizan tanto en la capa luminar como en la capa basal del ductulillo mamario ([7266]). El tejido conectivo intralobulillar es un tejido especializado, hormono-sensible, de fibras de colágena distribuidas sobre una matriz mucopolisacárida ácida, con fibroblastos, ocasionales linfocitos y macrófagos, pero sin grasa, y muestra mayor vascularización que el tejido conectivo interlobulillar que es hipocelular y densamente colagenizado. A partir de los 18 años, el tejido conectivo interlobulillar

evoluciona progresivamente a fibroadiposo. Pueden observarse ganglios linfáticos intramamarios, normalmente menores de 5 mm de diámetro ([3923]).

Durante el embarazo ocurre la expansión plena del sistema lobulilloalveolar, necesaria para la secreción de leche, alcanzándose el estado de máxima diferenciación de la glándula mamaria ([453], [583], [1030], [2631], [2632], [2636], [2637]). A lo largo del primer trimestre de gestación, se observa una proliferación y una ramificación de los elementos distales del árbol ductal, con aparición de numerosos lobulillos tipo 3 ([2633], [3503]). El epitelio glandular proliferante empieza a sustituir al tejido conectivo y adiposo y se produce un nuevo desarrollo de la vascularización. En el segundo trimestre, se observa diferenciación de los ductulillos a acinos o alvéolos, con capacidad de secreción láctea, constituyendo los lobulillos tipo 4 que aumentan progresivamente y se hacen más secretores ([3503]). Durante el último trimestre, se produce un rápido desarrollo lobulilloalveolar, el flujo sanguíneo mamario aumenta y las células mioepiteliales se hipertrofian. El crecimiento inicial del sistema ductal depende de los estrógenos, en sinergia con la hormona de crecimiento y el cortisol, mientras que la diferenciación del sistema lobulilloalveolar requiere de los estrógenos y la progesterona en presencia de la prolactina ([2632], [3332]). En las primeras fases del embarazo, el cuerpo lúteo materno es mantenido por la hormona gonadotropina coriónica (hCG), secretada por el trofoblasto primitivo, y produce progesterona, 17-hidroxiprogesterona, estradiol, inhibina y relaxina. A partir de la novena semana de gestación, el sincitiotrofoblasto placentario se convertirá en el principal productor de gran parte de estas hormonas, sintetizando progesterona, estriol, hCG y hormona del lactógeno placentario (hPL). La hCG se considera la principal responsable de la diferenciación glandular, al ejercer un efecto inhibitorio directo sobre la proliferación del epitelio mamario humano de forma directa e, indirectamente, al inducir la síntesis de inhibina, al activar genes reguladores de la apoptosis y al incrementar la capacidad de reparación del ADN ([2406], [3165], [3370], [3400]). La hPL regula el metabolismo materno, aumentando la concentración de glucosa y ácidos grasos libres, y presenta propiedades lactógenas, además de un leve efecto tipo hormona de crecimiento ([2632], [2634]). La prolactina es la hormona clave que controla la producción de la leche. Al inicio del embarazo, la principal fuente de prolactina es la decidua, que alcanza un valor máximo en el segundo trimestre, mientras que la prolactina hipofisaria materna y fetal aumenta progresivamente hasta alcanzar, al término del embarazo, niveles diez veces superiores a los de la mujer no embarazada. Este incremento en la secreción de prolactina hipofisaria resulta de la inhibición de los elevados niveles de estrógenos y progesterona sobre el factor

hipotalámico inhibidor de la secreción de prolactina (PIF) o dopamina ([2636], [2637]). La prolactina induce proliferación y diferenciación de células mamarias indiferenciadas para formar células alveolares presecretoras y células mioepiteliales y regula la síntesis de las proteínas (caseína y α -lactalbúmina) y las grasas de la leche. Además, se requieren otras hormonas, como glucocorticoides suprarrenales, hormona de crecimiento, hormona paratiroidea, tiroxina, insulina y los factores de crecimiento IGF-I e IGF-II, para proporcionar los aminoácidos, los ácidos grasos, la glucosa y los minerales imprescindibles para la formación de leche ([2634]). Durante el embarazo, la inhibición de los estrógenos y progesterona, a nivel periférico, de las acciones lactogénicas de la prolactina y de la hPL impiden la secreción láctea ([3332]). Las células epiteliales de los acinos y los ductos intralobulillares muestran vesículas y gotas de grasa intracitoplasmáticas y secreción en la luz, aumentando el tamaño de los lobulillos ([2633]). Las células adiposas pueden perder progresivamente sus reservas de grasa durante las últimas fases del embarazo y de la lactancia; por lo general no desaparecen aunque estén vacías y pueden volver a acumular grasa una vez que ha cesado la lactancia.

Después del parto y tras la eliminación de la placenta se produce una caída brusca de los niveles de estrógenos y progesterona, permitiendo a la prolactina ejercer su papel lactogénico ([3332], [3503]). A los 3 ó 4 días después del parto, las mamas comienzan a secretar grandes cantidades de leche en lugar del escaso calostro de los primeros días. Durante la lactancia se para la maduración folicular y la ovulación. El estado hormonal que estimula y mantiene la lactancia está garantizado por un reflejo neurohormonal inducido por el efecto mecánico de la succión que permite la secreción de prolactina. En las primeras semanas posparto, los niveles plasmáticos basales de prolactina son elevados, disminuyendo hasta niveles normales a partir de la sexta semana, permaneciendo el efecto estimulador de la succión. La cantidad de prolactina liberada está determinada por la intensidad y la duración de esta estimulación y, su efecto, por un aumento progresivo del número de sus receptores en las células alveolares ([2631], [2634]). El mismo reflejo producido por la succión provoca la estimulación de la secreción de la oxitocina hipotalámica, que contrae a las células mioepiteliales que rodean los acinos, forzando la eyección láctea. Además, podría inducir indirectamente la relajación y la apertura de los conductos de mayor tamaño ([3302], [3335]).

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

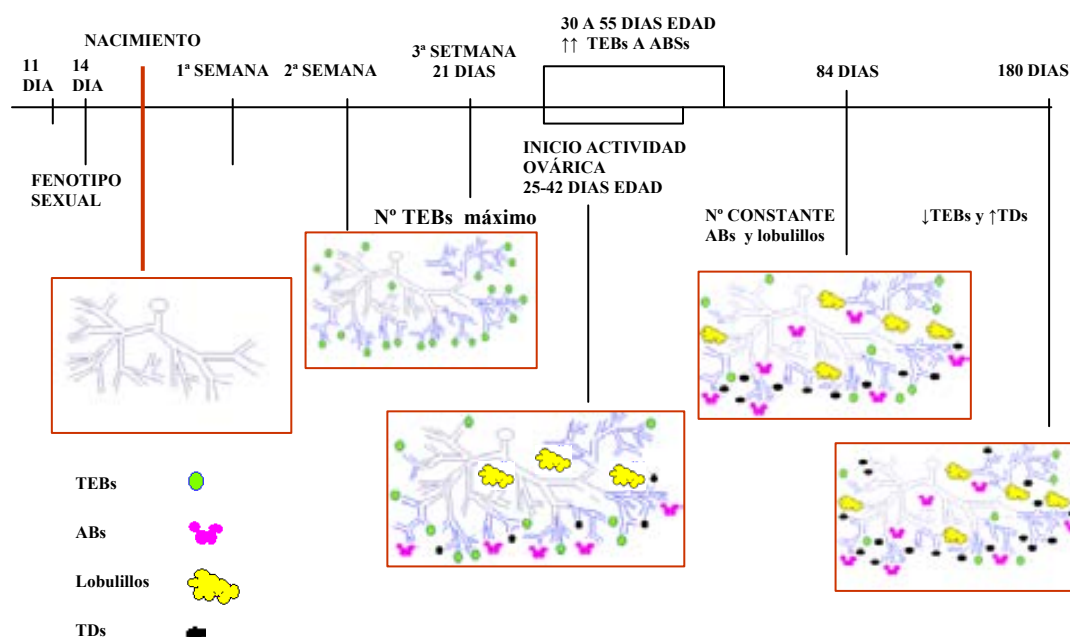
ha observado sobreexpresión de genes proapoptóticos, como *bcl-xs*, *p53*, *c-fos*, *c-jun* o *bax*, regulada por factores de crecimiento y equilibrada por los TIMPs ([3104], [3105]). La mayoría de los lobulillos regresan, retornando a lobulillos tipo 3 y 2. El lobulillo tipo 3 es la estructura glandular predominante en las mamas de mujeres premenopáusicas multíparas [3165], ([3503]). Las gestaciones repetidas extienden la diferenciación lobulillar.

Después de la menopausia, la caída de las hormonas ováricas causa la involución progresiva de los tejidos epitelial y conectivo. El componente ductulo-lobulillar se atrofia, la matriz fibrosa se hace más densa y el parénquima es sustituido por tejido adiposo y conectivo ([2632]). La mayoría de los lobulillos adquieren la apariencia morfológica de los tipos 1. La actividad proliferativa de estos lobulillos tipo 1 es menor en las glándulas mamarias de mujeres posmenopáusicas multíparas que en las nulíparas, lo que indica que la gestación puede imprimir cambios permanentes en las características biológicas de estas estructuras ([3165], [3923], [3924]). Como se comentará en el apartado B.3.a de la “Introducción”, el grado de diferenciación al cual llega la glándula mamaria durante el embarazo es un factor importante que se opone a la transformación neoplásica del órgano, lo que determina una diferencia fundamental entre las mujeres nulíparas y las que han tenido por lo menos un hijo, en cuanto a factores de riesgo de cáncer mamario ([603], [861], [2226], [7671]).

2. RATA

El desarrollo de la glándula mamaria de la rata hembra virgen nulípara se esquematiza en la Figura 2.

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

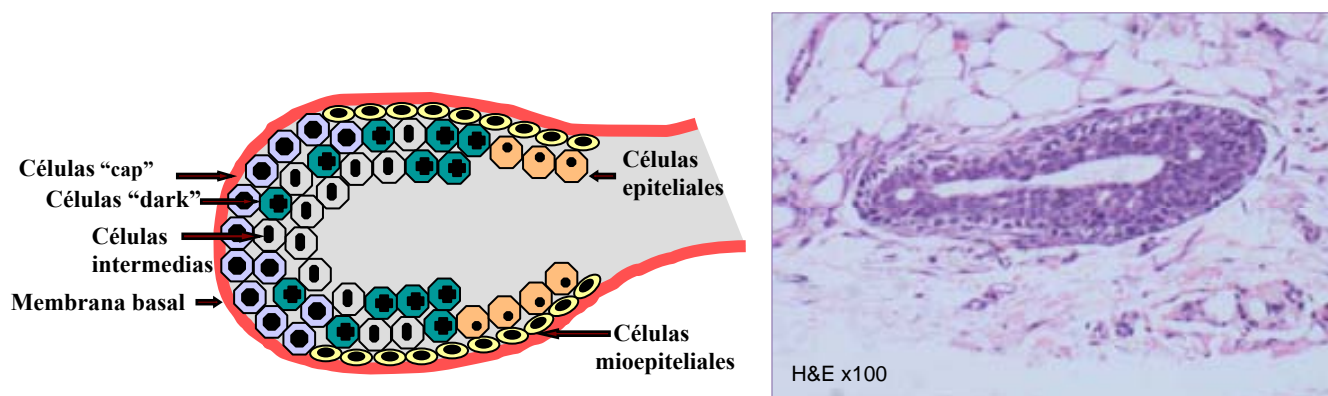


La rata posee 6 pares de glándulas mamarias distribuidas subcutáneamente a lo largo de dos líneas ventrolaterales, desde la región cervical a la inguinal: un par en la región cervical, dos en la región torácica, dos en la abdominal y uno en la inguinal ([1141]). La única porción externamente visible en la rata hembra es el pezón, mientras que el macho no posee pezones y, normalmente, presenta cuatro pares de glándulas rudimentarias. El primer esbozo de glándula mamaria aparece sobre el día 11 de gestación como dos estructuras de crecimiento alargadas de ectodermo que se extienden ventralmente desde la región cervical hasta la inguinal y que inducen, a su vez, el crecimiento del mesénquima subyacente. Hacia el día 14 de gestación, el fenotipo sexual de la glándula mamaria se halla determinado. En los machos, la testosterona secretada por el teste no permite el desarrollo de la glándula mamaria, que sí se desarrolla en la hembra con la aparición de los ductos galactóforos primordiales ([2633]). Al nacer, las glándulas mamarias de las ratas hembras constituyen parches de color claro en la piel, con pezones rudimentarios. En la época lactante, factores de crecimiento presentes en la leche materna, como el EGF, intervienen en el crecimiento y desarrollo de la mama de estos animales. 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 nº de ramas secundarias y terciarias aumentarán con la edad del animal ([3122]). Así, entre el nacimiento y la primera semana de vida, se observa un ducto galactóforo con 3 a 5 ramificaciones a ductos secundarios, que hacia la segunda semana de vida mostrarán seis generaciones de ramificaciones que acaban en las yemas terminales (o “terminal end buds” – TEBs), considerados los centros de crecimiento activo y el elemento primitivo del parénquima mamario. El nº de TEBs es máximo cuando la rata tiene 21 días de edad. A partir de aquí, y coincidiendo con el período prepuberal y el inicio de la actividad ovárica, los TEBs inician la diferenciación y septación a 3 a 5 yemas alveolares (o “alveolar buds” - ABs). Esta diferenciación progresiva de los TEBs a ABs se acentuará en cada ciclo estral, que se inicia cuando el animal tiene de 25 a 42 días de edad, y éstos, a su vez y en los sucesivos ciclos estrales, iniciaran el desarrollo lobulillar, con aparición de lobulillos tipo 1 y 2 ([3165]). En las ratas vírgenes este proceso continúa durante la maduración sexual hasta que se consigue un nº constante de ABs y lobulillos, que acontece hacia los 84 días de edad, pudiendo observarse una disminución discreta a partir de los 180 días de edad del animal ([943]). Un nº elevado de TEBs sufrirá hipoplasia en la rata virgen, constituyendo los ductos terminales (TDs). Por lo tanto, la glándula mamaria de una rata virgen joven, en relación a una rata virgen adulta, contiene mayor número de TEBs, menor número de TDs y similar cantidad de ABs y lobulillos. Estos componentes estructurales de la

mama permanecerán inalterados mientras la rata siga virgen. En la hembra no gestante, el desarrollo de la glándula mamaria está controlado por el ovario que depende, a su vez, de las gonadotrofinas hipofisarias. Éstas interactuarán con la hormona de crecimiento (GH) y la prolactina para modular la esteroidogénesis ovárica, así como la secreción de glicoproteínas no esteroideas, como la inhibina. Parece ser que los estrógenos son los responsables del crecimiento de los ductos mamarios y la progesterona del desarrollo lobulilloalveolar. Los estrógenos actuarían a través de un efecto mitogénico directo e indirecto, a través de la estimulación de la secreción de factores de crecimiento (como EGF) de origen mamario o extramamario ([2633], [3966]). El desarrollo ductal requiere, además, de la insulina y la GH hipofisaria, que a su vez actúa directamente o a través de su mediador local, el IGF-I. Por otro lado, los estrógenos estimulan la secreción de la prolactina hipofisaria e inducen los receptores de progesterona, potenciando el desarrollo lobulilloalveolar.

Desde el punto de vista histológico, los ductos mamarios están revestidos por dos capas de células, una interna epitelial y otra externa mioepitelial que descansa sobre la membrana basal. Los ductos mayores y galactóforos presentan un revestimiento epitelial pseudoestratificado, de células cuboideas. Los TEBs, tal como se muestra en la Figura 3, están constituidos por 4 o 6 capas de células, fenotípicamente diferentes. En la superficie basal de la parte más distal de los TEBs se hallan las células “cap”, que carecen de estigmas de diferenciación y que representan una población celular pluripotencial capaz de diferenciarse a células epiteliales y mioepiteliales ([3122]). Se observan, además, otros tipos de células como las intermedias que, a diferencia de las células oscuras o “dark” que son más numerosas en los lobulillos, no presentan estigmas de actividad secretora.

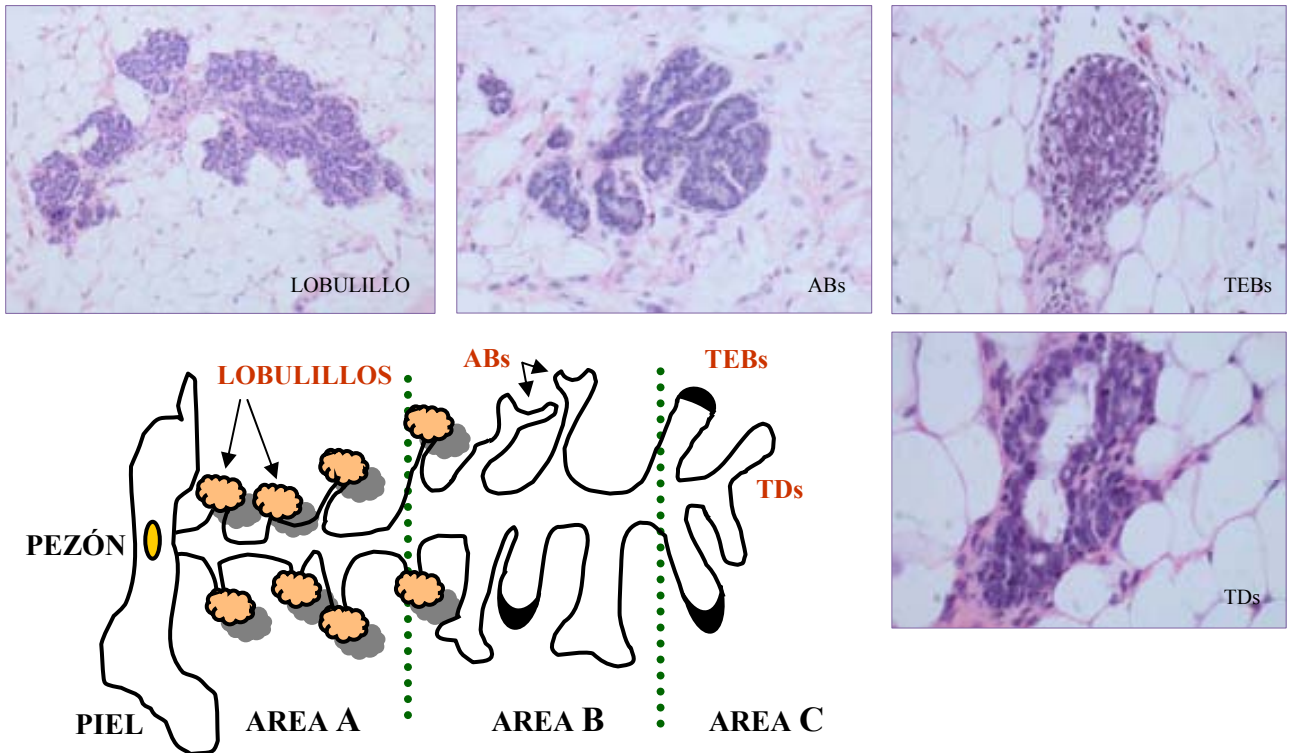
Figura 3: Estructura de una yema terminal (TEB)



Se reconocen diferentes áreas topográficas en la mama de la rata que difieren en su morfología, características quinéticas, respuesta a estímulo hormonal y potencial

carcinogénico ([3573]). Estas áreas, esquematizadas en la Figura 4, resultan de dividir en tres tercios el parénquima mamario, a través del eje longitudinal, y ayudan a comprender el proceso de desarrollo y diferenciación mamario.

Figura 4: Topografía de la glándula mamaria de la rata



El área A es la más próxima al pezón, constituida por ductos galactóforos principales y secundarios, la B es la intermedia, con ductos de menor tamaño y la C es la más alejada del pezón, rica en estructuras ductales terminales. Durante el proceso de maduración lobulilloalveolar se describe un gradiente de desarrollo mamario. Así, el nº de TEBs disminuye marcadamente en las zonas A y B, en las que predominan los lobulillos y los ABs, respectivamente, pero no en la C, en la que predominan los TEBs y TDs, de crecimiento activo. Aunque todas las glándulas mamarias están constituidas por las tres zonas descritas, la cantidad y el tamaño de cada una de ellas difieren según la localización anatómica. Así, las glándulas torácicas, especialmente el tercer par, tienen más y mayores TEBs que las abdominales ya que muestran un enlentecimiento en la diferenciación que desaparece con la edad del animal ([2952], [3503]).

Al igual que en la mama humana, se reconocen diferentes lobulillos que maduran de estructuras menos complejas, los lobulillos tipo 1 (con 6-10 ductulillos), a lobulillos tipo 2 (con 22-32 ductulillos) y a tipo 3 (con 53-90 ductulillos). El desarrollo glandular dependerá de diversos factores, como el nº 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. Durante la gestación, diferentes estímulos hormonales, entre ellos la prolactina, los estrógenos, la progesterona y la inhibina ováricas, así como la producción de hCG y hPL por el embrión que se desarrolla, contribuyen a desarrollar la glándula mamaria. Los lobulillos durante la gestación y la lactancia son de tipo 3 y 4, con numerosos acinos. Esta diferenciación es mayor en el área A y, en segundo lugar, en el área B del parénquima mamario. Aquellos animales que han completado la gestación muestran, además, extenso desarrollo lobulillar en la zona C ([3573]). La relaxina hipofisaria también estimula el desarrollo de los lobulillos y su capacidad de lactogénesis, y juega un papel importante en el desarrollo de los pezones durante la segunda mitad de la gestación. Al final de la gestación, la glándula mamaria está constituida por lobulillos con actividad secretora.

La lactancia, que dura unas 3 semanas, retrasa la reiniciación del ciclo estral y la ovulación. Los niveles de prolactina y del ARNm de su receptor aumentan en las glándulas mamarias. Con el destete, los niveles de prolactina vuelven a la normalidad y el folículo ovárico se desarrolla hasta un estadio preovulatorio, secretando 17β -estradiol en cantidades suficientes para inducir la secreción preovulatoria de gonadotropinas que reiniciarán el ciclo estral normal. La glándula mamaria disminuye de peso y tamaño y gran parte del parénquima es reemplazado por grasa, con colapso de los alvéolos secretores y eliminación activa de las células y secreciones por macrófagos. A pesar de que la involución de la glándula mamaria es aparentemente completa a los 10 días del destete, la arquitectura de la glándula mamaria restará permanentemente modificada. Las glándulas mamarias de un animal que ha completado totalmente la gestación y la lactancia retienen gran nº de ABs y lobulillos, resultado de la hipoplasia de los lobulillos de la gestación. Se ha descrito que a los 40-42 días posdestete, las glándulas mamarias de una rata múltipara, en comparación con las de una rata nulípara, no tienen TEBs y sólo ocasionales TDs. El nº de ABs es similar, mientras que el nº de lobulillos es aproximadamente 4 veces mayor que el de una rata virgen adulta.

Se reconocen diferencias biológicas entre las distintas estructuras anatómicas de la glándula mamaria de la rata. La determinación del índice de marcaje de ADN (ADN-LI) revela que el 100% de los TEBs presentes en una rata nulípara joven y adulta contienen células proliferando que incorporan el precursor marcado, siendo el porcentaje de células marcadas inferior en las ratas vírgenes adultas (14,8% versus 34,4%). El ADN-LI de los TDs se halla también reducido en las ratas vírgenes adultas, en relación con las jóvenes. En las glándulas en reposo de las ratas múltiparas, sólo un 8% de los ocasionales TDs contienen células marcadas, con un ADN-LI muy bajo. En relación a los ABs, las ratas vírgenes jóvenes y adultas tienen el 50% y el 5% de sus ABs marcados, respectivamente, mientras que

en las glándulas en reposo de las ratas multíparas, sólo el 0.9% se marcan, con un ADN-LI bajo. Las estructuras lobulillares no incorporan el precursor de ADN ([3122]).

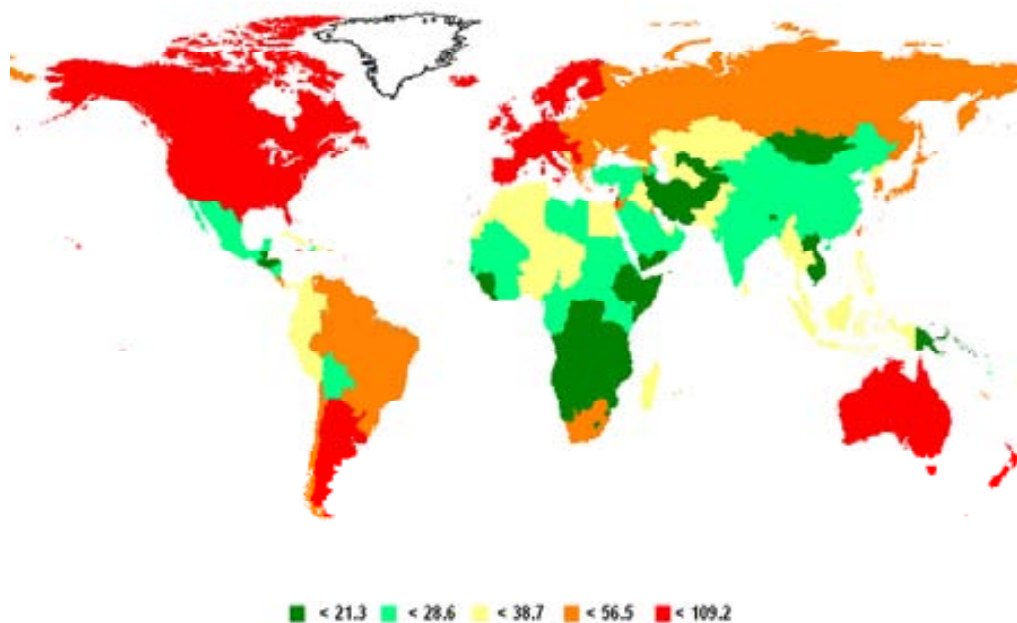
Como se verá en el próximo apartado, el conocimiento de los múltiples factores implicados en el desarrollo y la función de la glándula mamaria normal resulta fundamental para comprender los mecanismos por los cuales se producen los procesos patológicos neoplásicos en este órgano.

B. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente entre las mujeres en todo el mundo ([6691], [7519]) y el responsable de aproximadamente 1 de los 10 millones de neoplasias diagnosticadas cada año en ambos sexos y el 23% de todos los tipos de cáncer ([4647]). En España representa el 25%, y, en Cataluña, el 28%, de todo el conjunto de neoplasias malignas en mujeres ([3412], [4333]). En los países más desarrollados, se ha constatado un aumento acelerado de la incidencia en los últimos 20 años, que se ha atribuido a una mayor exposición a factores de riesgo y a la introducción de métodos diagnósticos que permiten detectar tumores incipientes ([4333], [4472], [7519]). Es, además, la primera causa de muerte por cáncer en este sexo, ocasionando 1 de cada 3 muertes por cáncer en el grupo de mujeres de edades entre 35 y 64 años ([3908], [4473], [4647], [7108]). Se ha detectado una tendencia al incremento de las tasas de mortalidad por cáncer de mama en el grupo de mujeres mayores de 50 años, con un descenso en las menores de 40 años, probablemente debido a la detección precoz y a los avances terapéuticos introducidos en las últimas décadas. Por otra parte, los estudios epidemiológicos muestran variaciones geográficas importantes de la incidencia del cáncer de mama, que es más elevada en países occidentales que en los subdesarrollados ([6093], [7108]) (Figura 5). Así, las tasa brutas de incidencia de cáncer de mama más altas a escala mundial corresponden a la población blanca de Estados Unidos. Los registros poblacionales de Israel, Canadá y diversos países europeos están en la lista de las áreas de tasas de incidencia más elevadas, mientras que las más bajas se registran en África y Asia y en la población no judía de Israel. En España la incidencia es más baja que en otros países de Europa, aunque se ha registrado un aumento del número de casos desde la década de 1980 hasta el año 2000 ([7672]). De hecho, según los últimos datos publicados, en España, el cáncer de mama es el que presenta mayor incidencia y mortalidad ([www.globocan.iarc.fr]). En relación a Cataluña, la incidencia de esta enfermedad ha aumentado en los últimos años, aunque en el contexto europeo sigue siendo de los más bajos ([7673], [7674]).

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

Figura 5. Tasas de incidencia por países de cáncer de mama en mujeres. Globocan, 2008 ([7108])



1. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer representa un desorden del crecimiento celular, caracterizado por una proliferación incontrolada de las células de un determinado tejido, sin relación con las demandas fisiológicas del órgano del que forman parte, y que, además, muestran capacidad de invadir y destruir los tejidos adyacentes y diseminarse a distancia, con la consiguiente evolución fatal a corto, medio o largo plazo, según el tipo de cáncer. En la mama se reconocen diversas neoplasias que se originan de los distintos tejidos que la configuran y que se clasifican siguiendo criterios fundamentalmente histológicos. El cáncer que se origina del tejido epitelial o glandular es el carcinoma, constituye el grupo de neoplasias malignas más frecuente de la mama y es sobre el que se refieren la mayor parte de los estudios. El cáncer de mama es un proceso neoplásico de etiología multifactorial. Diversos factores, actuando de forma simultánea y/o secuencial, regulan las distintas etapas de la carcinogénesis mamaria. La naturaleza de estos factores es variada y se pueden clasificar en tres grupos: endocrinos, genéticos y ambientales. Estos factores no actúan aisladamente, sino que muestran una clara interdependencia entre ellos.

a. FACTORES ENDOCRINOS

La etiología y la progresión del cáncer de mama tienen un fuerte componente hormonal. Evidencias tales como que la nuliparidad, una primera gestación tardía, la menarquia precoz y la menopausia tardía se asocian a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama apoyan este papel hormonal ([3950], [3966], [5975]). Estudios experimentales muestran que los estrógenos, fundamentalmente 17β -estradiol (E2) y estrona, y los andrógenos, a concentraciones fisiológicas, así como las dosis farmacológicas de progesterona, y la insulina y la prolactina, estimulan la proliferación de las células tumorales mamarias. En cambio, los estrógenos y los andrógenos a dosis farmacológicas y las dosis fisiológicas de progesterona son inhibidores. El efecto bifásico de los estrógenos podría estar mediado por la acción de la prolactina, estimulada por niveles bajos de estrógenos e inhibida por dosis elevadas. En mujeres obesas y posmenopáusicas, la conversión en el tejido adiposo de los andrógenos suprarrenales a estrógenos, por una aromatasa, explicaría, entre otros, el mayor riesgo de padecer cáncer de mama en estas mujeres ([4595]). Además, se ha observado que el embarazo ejerce un efecto protector si precede a la transformación de la glándula mamaria y un efecto estimulador si es posterior. El efecto protector del embarazo, así como el de la hormona gonadotropina coriónica humana, está relacionado con la diferenciación de la glándula mamaria asociada con la depresión de la proliferación celular y la síntesis de inhibina por las células epiteliales ([1718], [2406], ([3370]). Aunque clásicamente se ha considerado que los estrógenos ejercían un papel fundamentalmente promotor de la carcinogénesis mamaria, algunos trabajos experimentales indican que también podrían intervenir en la iniciación, actuando como cocarcinógenos, potenciando o facilitando la acción del agente carcinogénico ([2363], [3321], [3326], [4505]). En este sentido, se ha descrito un aumento en la tasa de proliferación por acción de los estrógenos, de manera que estas hormonas pueden aumentar la proliferación de células susceptibles a carcinógenos, o pueden promover que un clon de células iniciadas se desarrolle en un tumor detectable. Además, se ha demostrado que los estrógenos son agentes genotóxicos directamente a través de sus metabolitos y/o, indirectamente, mediante la síntesis de especies oxígeno reactivas (“reactive oxygen species” ROS), que pueden producir daño oxidativo en las macromoléculas celulares (lípidos, proteínas, ADN) ([4680]).

La determinación de los receptores esteroideos ha permitido clasificar los tumores mamarios, según su contenido en receptores de estrógenos (RE) y/o de progesterona (RP), en hormonodependientes (RE+RP+, RE+ RP- y RE- RP+) y hormonoindependientes (RE-RP-). La mayoría de los tumores mamarios experimentales presentan uno o ambos tipos de

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

RE_α se encuentra implicado en la iniciación y progresión en cáncer de mama, siendo el principal mediador endógeno de la acción rápida de E₂ dirigida hacia la proliferación celular, mientras que el papel de RE_β en el efecto proliferativo de E₂ no es bien conocido ([5782]) y se postula un posible papel supresor, modulando los efectos de RE_α al heterodimerizar con éste, ejerciendo un papel protector contra el desarrollo del cáncer ([4505], [5659], [5895]). Estudios en humanos han detectado un aumento de RE_α en la transición de tejido normal a maligno, mientras que los niveles de RE_β disminuyen durante la progresión del cáncer de mama ([6845]). En relación a la progesterona, elevadas cantidades de esta hormona, en combinación con el estradiol, tienen una actividad proliferativa

importante en glándula mamaria adulta de roedores y humanos, mediada por RP ([5655], [6818]). Aun así, en general, la síntesis de RP, así como la mayor prevalencia de RP-B, son de buen pronóstico, mientras que la pérdida de RP o una elevada penetrancia de RP-A indican mayor agresividad tumoral y mayor probabilidad de metástasis ([5660], [6812]).

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

La regulación del crecimiento de los tumores mamarios hormonodependientes es compleja. Por una parte, son diversas las hormonas que regulan la producción de receptores esteroideos. Por otra parte, los estrógenos controlan la expresión de diversos genes que participan en el ciclo celular, la regulación de la sensibilidad de las células tumorales a hormonas y factores de crecimiento y la producción de estos últimos ([1870], [2393], [3965]). En este sentido, los esteroides, tras la unión a sus receptores intracelulares específicos y mediante la unión a secuencias reguladoras del ADN (“steroid response elements” -SRE- y “steroid response units” -SRU-) específicos, regulan de forma rápida la expresión, entre otros, de los protooncogenes nucleares *c-fos*, *c-jun* y *c-myc*, implicados en el crecimiento y la diferenciación celular. Los productos de estos genes de respuesta rápida (“early genes”) son proteínas de unión al ADN (factores de transcripción) que, a su vez, controlan la expresión de genes de respuesta tardía (“late genes”) que codifican para proteínas estructurales. Los receptores esteroideos activados también pueden actuar directamente sobre éstos últimos en conjunción con el producto de los “early genes”. Además, se ha descrito un mecanismo de acción independiente de estrógenos en el que otros estímulos pueden activar el receptor, como factores de crecimiento, neurotransmisores y moléculas de señalización ([5672]). Finalmente, algunos de los efectos inmediatos producidos por los estrógenos en algunas células podrían ser iniciados por la unión a RE asociados a membrana (mSR), encontrados en las caveolas de

la membrana ([5889]). Estos RE, unidos a los a E2, activan proteínas G iniciando así múltiples vías de transducción de señales ([5892]). Se ha sugerido una función como agentes “centinela” de la respuesta hormonal, iniciando rápidamente una respuesta que prepara a la célula para decidir si está en condiciones de iniciar la síntesis de ARNm y proteínas en respuesta a estas hormonas ([4716], [4718], [4719]). La acción de los esteroides es específica del tejido y/o del tipo celular y requiere la participación de otras proteínas nucleares reguladoras (no histonas), que modifican el estado de la cromatina, reúnen la maquinaria transcripcional y facilitan la transcripción de los genes ([2349], [2645], [3403], [5673]).

En los tumores experimentales hormonodependientes, los estrógenos estimulan la síntesis de su receptor y la del RP ([494], [1110], [5265], [6794]), y aumentan la producción de prolactina en la hipófisis ([683]) que, a su vez, estimula los RE de la glándula mamaria, pero no en el útero ([467], [468], [470]). La insulina también es estimuladora del RE ([460]). En sentido contrario, altas dosis de estrógenos interfieren sobre la acción periférica de la prolactina ([475]) y de la insulina ([460]). La progesterona tiene un efecto antiestrogénico inhibiendo la síntesis del RE y la de su propio receptor, favoreciendo la transformación de E2 en estrona por estimulación de la enzima 17 β -dehidrogenasa ([490], [493], [1110], [3321]), y bloqueando el efecto estimulador de la prolactina sobre la síntesis del RE ([470]). El crecimiento tumoral mamario inducido por los estrógenos parece efectuarse a través de factores de crecimiento secretados por las células ([1585], [2428]), aumentando los factores estimuladores –EGF/TGF α e IGF-I-, e inhibiendo los que lo frenan -TGF β -. A su vez, el EGF es capaz de regular negativamente los niveles del RE, así como la síntesis de los RP, estimulada por estradiol ([1669]). El fenotipo EGFR (receptor de EGF) +/RE- se asocia con una mayor agresividad del tumor mamario y se considera un factor de mal pronóstico ([1572], [2421], [3404]).

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

los tumores hormoindependientes presentan elevados niveles de dichos polipéptidos, constitutivamente aumentados.

Finalmente, debe considerarse el papel de las hormonas exógenas en el cáncer de mama, en particular el de las fuentes exógenas de estrógenos, conocidos como xenoestrógenos o disruptores endocrinos, que al ser ingeridos o absorbidos alteran la homeostasis del sistema endocrino ([7681]). Pueden distinguirse: fitoestrógenos y micoestrógenos como los lignanos, presente en el aceite de oliva, y la genisteína, presente en la soja; 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 (en pesticidas), alkifenólicos (en detergentes, plásticos, espermicidas, etc.) y bisfenol-A y/o derivados ([4506], [4651], [4653], [4662], [4713], [7678], [7679], [7681]). La estimación del riesgo de padecer cáncer de mama por la exposición a hormonas exógenas es difícil, ya que el periodo de latencia entre la exposición y la aparición de los síntomas de la enfermedad es largo. Entre ellos, destacan los SERMs, que 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 que a muy altas concentraciones posee un efecto estimulador del cáncer de mama ([2363], [3326]). El tamoxifeno reduce la mortalidad y recurrencia del cáncer de mama en el 25 y 50% de los casos, respectivamente, en mujeres RE+, aunque una tercera parte de éstas no responden a dicho tratamiento ([4505]).

b. FACTORES GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS

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

La carcinogénesis es un proceso altamente complejo que resulta, principalmente, de la acumulación de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas, entre las que se halla la inactivación de genes supresores y la activación de protooncogenes, de forma secuencial y simultánea ([2444], [3973], [7688]). Las proteínas codificadas por los protooncogenes son componentes de las vías de transducción de señales mitogénicas: factores de crecimiento (como PDGF β /*v-sis*), receptores de membrana de factores de crecimiento (como EGFR/*v-erbB*), proteínas citoplasmáticas transductoras de señales (como la familia de GTPasas, que incluye *c-Ha-ras*) y factores de transcripción (como *c-myc*, *c-fos* y *c-jun*) ([1576], [1881]). Estos genes pueden transformarse en oncogenes mediante activación, con una ganancia de función permanente, lejos de cualquier tipo de control ([1975], [2393], [4202]). Dicho proceso puede producirse por distintos mecanismos, que en el cáncer de mama suele corresponder a amplificaciones, especialmente de los protooncogenes de las familias de *erbB*, *ras* y *myc* ([2390], [3408]), mientras que las mutaciones puntuales y las translocaciones específicas son más raras ([1948]). Los oncogenes participan en las diferentes etapas de la carcinogénesis, siendo necesaria la cooperación entre varios de ellos para conducir a las células a la inmortalización y transformación tumorigénica ([1975], [2393], [4202]). En cambio, los genes supresores codifican proteínas que controlan el ciclo celular inhibiendo la proliferación, inducen a las células a la diferenciación terminal, participan en la reparación de las lesiones del ADN y/o inducen la muerte celular programada o apoptosis cuando las lesiones del ADN son serias. Entre ellos, se reconocen *p53*, *Rb*, *BRCA1*, *BRCA2* y el gen de la poliposis adenomatosa cólica *APC*. Las mutaciones de estos genes comportan pérdida de función, facilitando la formación de tumores al liberar a las células de las restricciones normales para proliferar, de la posibilidad de reparar el ADN y de inducir la apoptosis ([2846]). Son fundamentalmente mutaciones puntuales y deleciones de parte del cromosoma que los contiene ([1948]). Mientras que las mutaciones que conllevan la activación de protooncogenes son dominantes y se producen en las células somáticas, la inactivación de los genes supresores es normalmente recesiva y requiere una nulicigosidad funcional o ausencia de la proteína normal. En este caso, las mutaciones se producen habitualmente, en primer lugar, en la línea germinal, otorgando a los individuos una predisposición al desarrollo tumoral que se hereda como un típico carácter mendeliano autosómico, y, en segundo lugar, en las células somáticas por pérdida de la heterocigosidad, ligadas al cáncer familiar ([2493], [2606]).

Otros genes involucrados en la carcinogénesis son los que intervienen en la regulación del ciclo celular y que codifican diferentes ciclinas y quinasas ciclina-

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

Según Hanahan y Weinberg ([3973]), la célula tumoral adquiere seis capacidades biológicas durante el proceso de carcinogénesis: 1) autosuficiencia en el crecimiento; 2) insensibilidad a las señales inhibidoras del crecimiento; 3) evasión de la apoptosis; 4) potencial de replicación ilimitado; 5) angiogénesis sostenida e 6) invasión y metástasis, que implican alteraciones de los genes anteriormente mencionados. Así, la célula tumoral es capaz de sintetizar o de inducir la síntesis de factores de crecimiento (como PDGF y TGF α); de presentar alteraciones de la expresión o activación de receptores para dichos factores (como EGFR y ErbB2/HER2) o de algunos componentes de la vía de señalización intracelular mitogénica (proteínas Ras estructuralmente alteradas que generan un flujo de señales mitogénicas hacia la célula sin necesidad de estimulación de sus reguladores “upstream”) ([1576], [1881], [3973], [5484]). Además, la célula tumoral puede evadirse de las señales antiproliferativas, como con la proteína Rb (retinoblastoma) fosforilada (pRb), p107 y p130 ([3973]). Pero, además, es necesaria una desregulación de la apoptosis que, reducida, junto con un aumento de la tasa de proliferación celular serían los fenómenos responsables de crear un “escenario” suficiente para el desarrollo del cáncer ([4061], [5576]). Asimismo, para que el crecimiento sea ilimitado es necesaria la inmortalización o evasión de la senescencia, a través de la incapacitación de las proteínas supresoras de tumores pRb y p53, y el mantenimiento de los telómeros ([3973]). De hecho, las mutaciones en el gen *p53* representan uno de los cambios genéticos más comunes identificados en el cáncer de mama ([3144], [4061], [4595], [5576], [7683]). Por otro lado, la célula tumoral se caracteriza por una tasa de mutabilidad elevada, por el aumento de la sensibilidad a agentes mutagénicos o mediante la

alteración de los mecanismos reparadores del genoma, confiriendo así inestabilidad genómica. La pérdida del ADN telomérico en los tumores también genera una situación de inestabilidad genómica, en la que se producen amplificaciones y deleciones de segmentos cromosómicos. Los defectos en el mantenimiento del genoma y la reparación confieren ventajas selectivas, y por lo tanto útiles para la progresión tumoral ([7349], [7682]). De igual manera, los tumores pueden alterar la transcripción génica favoreciendo la expresión de factores proangiogénicos, como VEGF y/o FGF, en detrimento de los antiangiogénicos, como la trombospondina-1 y el interferón- β ([3973], [4722]), favoreciendo la vascularización y el crecimiento tumoral. Finalmente, los tumores malignos deben adquirir la capacidad de invadir los tejidos adyacentes y metastatizar, colonizando otros tejidos, sin límite de nutrientes ni espacio. Para ello deben alterar la expresión/función de moléculas de adhesión célula-célula y célula-substrato, como E-cadherina, β -catenina, N-CAM e integrinas, proteasas degradadoras de la matriz extracelular, como las MMPs, etc ([3973], [4723]).

En una revisión posterior ([7349]), estos autores añaden dos características nuevas de la célula tumoral: la capacidad de evadir la destrucción del sistema inmune y la reprogramación del metabolismo energético tumoral; y señalan el papel del microambiente tumoral y la contribución al mismo de diferentes tipos celulares (las propias células tumorales, pero también células “normales” inflamatorias, endoteliales y estromales acompañantes), en la adquisición de estas habilidades tumorales. La actividad del sistema inmunológico constituye un importante impedimento en la formación y progresión tumoral, reconociendo y eliminando a la mayoría de incipientes células cancerosas o a los tumores emergentes en varios tipos de cáncer ([7684], [7685], [7686]). De acuerdo con esto, los tumores que terminan por aparecer, obviarían la vigilancia por parte del sistema inmunitario o bien evitarían ser eliminados por él de distintas maneras, como sería paralizando los linfocitos T CD8⁺ y las células “natural killer” (NK) o secretando factores inmunosupresores como el TGF- β ([7693], [7694]). Por otra parte, la inflamación contribuiría a la formación tumoral aportando moléculas bioactivas al microambiente tumoral, por ejemplo factores de crecimiento que mantendrían las señales proliferativas o enzimas modificadoras de la matriz extracelular que facilitarían la angiogénesis, la invasión y la metástasis ([7368], [7695], [7696], [7697]). Análogamente, durante el crecimiento del tumor, éste necesita, además de la proliferación celular, una serie de reajustes del metabolismo para poder abastecer las necesidades energéticas del crecimiento y división celular. Se produce un aumento marcado de la captación y utilización de la glucosa, aumentando la expresión de sus transportadores, principalmente GLUT1 ([7698], [7699], [7700]).

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

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

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

Por último, hay que señalar que existen muchos datos que indican que es necesaria la afectación de varios genes para producir cáncer. La agresividad biológica final del tumor, y por lo tanto el comportamiento clínico y el pronóstico de la enfermedad, dependerá del tipo y de la cantidad de mutaciones, así como de la importancia de los genes afectados.

c. FACTORES AMBIENTALES

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

Entre los nutrientes que juegan un papel en la relación cáncer y nutrición destacan los lípidos de la dieta y una de las asociaciones más estudiada ha sido con el cáncer de mama. Desde que en 1942 Tannenbaum ([1663]) demostró que la incidencia de cáncer mamario espontáneo era más elevada en ratones alimentados con una dieta suplementada con grasas, numerosos estudios epidemiológicos y experimentales han puesto de manifiesto la relación existente entre los lípidos de la dieta y el cáncer de mama ([1700], [1829], [2608], [2642]). Entre los primeros, por un lado, se recogen estudios descriptivos de correlación y de migración y retrospectivos que sugieren una asociación positiva entre el consumo de grasa “per capita” y las tasas de mortalidad por estos cánceres, especialmente referido a grasas animales y saturadas, destacando los valores medios observados en países con dieta mediterránea, como España, Grecia e Italia, que se caracterizan por el consumo de aceite de oliva ([868], [2242], [2419]). Por otro lado, los estudios analíticos, caso-control y de cohorte prospectivos no muestran resultados tan evidentes, probablemente por deficiencias metodológicas, como el bajo número de

efectivos en estos ensayos. La agrupación de varios de ellos, mediante técnicas de metaanálisis, ha permitido reanalizar los datos con mayor consistencia y, en muchos casos, la relación entre lípidos de la dieta y cáncer de mama ha quedado manifiesta ([868], [1660], [1829], [2608], [2642], [3568], [3672], [3840], [3860], [4539], [7692]). Recientemente, el proyecto prospectivo multicéntrico EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) ha mostrado que la ingesta elevada de grasas, independientemente del tipo, está asociado con elevado riesgo de cáncer de mama ([6321]). Estos estudios tienen ciertas limitaciones ya que no consideran otras características que pueden diferir entre distintas poblaciones y que pueden contribuir al desarrollo de cáncer de mama, y la mayoría de ellos no diseccionan los efectos independientes producidos por factores asociados, como es la concentración y el tipo de grasas, el aporte calórico, etc. ([2045], [2608]). En cambio, los estudios experimentales, aunque puedan presentar alguna limitación en la extrapolación directa de los resultados a la situación humana, permiten obtener resultados más claros y reproducibles. Así, estos estudios han demostrado que el papel que ejercen los lípidos de la dieta en la estimulación del cáncer de mama depende del tipo y de la cantidad de grasa ingerida, así como del hecho de su presencia en ciertas fases críticas de la carcinogénesis y del estado de diferenciación de la glándula mamaria ([3338], [5816], [7145]). En general, las dietas hiperlipídicas actúan fundamentalmente en la promoción 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, tal como se tratará en el apartado D de la “Introducción” ([1829], [2289], [4540]). Además, parece existir un requerimiento mínimo de ácidos grasos poliinsaturados a partir del cual el efecto de la grasa dependería de la cantidad total de lípidos de la dieta. Concretamente, por encima del 4-5% de ácidos grasos poliinsaturados, respecto al total de calorías, el rendimiento de la carcinogénesis inducida con dimetilbenz(α)antraceno (DMBA) se incrementa proporcionalmente a la cantidad de grasa total de la dieta ([2045], [3568]).

Una cuestión aún en debate es la que concierne al efecto de las calorías como el único causante de la capacidad de los lípidos de la dieta a estimular la tumorigénesis mamaria. Los estudios epidemiológicos han demostrado una asociación positiva entre el aporte calórico de las dietas y las tasas de mortalidad por cáncer de mama, lo que coincide con los resultados experimentales en los que se observan que las dietas hipercalóricas estimulan el desarrollo tumoral ([868], [920]). Por tanto, una parte del efecto estimulador de las dietas ricas en grasas podría ser atribuido a su elevado contenido en calorías. A pesar de que algunos autores no encuentran a las dietas hiperlipídicas hipocalóricas promotoras de la carcinogénesis mamaria

([1973]), el hecho de que sólo ciertos tipos de tumores se estimulen por las dietas ricas en grasas y de que en el cáncer de mama se haya demostrado una distinta eficacia de los diferentes tipos de lípidos, a pesar de proporcionar un aporte calórico equivalente, indica que existe también un mecanismo de acción específico de las grasas e independiente del aporte calórico ([1700], [1962]). Por contra, la restricción calórica tiene un efecto inhibitorio indiscriminado sobre la carcinogénesis, lo que sugiere que el mecanismo de acción de las calorías es inespecífico ([868], [3673]).

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 posmenopáusicas, mientras que se ha sugerido que podría disminuir dicho riesgo en mujeres premenopáusicas, aunque los resultados no son concluyentes ([1700]). Estudios caso-control también han sugerido una asociación entre el peso en el momento del nacimiento y el riesgo de cáncer de mama. Por otro lado, diferentes estudios observacionales han mostrado una asociación positiva entre el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer de mama ([6093]). En cuanto al consumo de tabaco, éste ha sido claramente asociado con otros tipos de cáncer, pero la relación con el de mama ha mostrado resultados inconsistentes. No obstante, las evidencias apuntan a un aumento del riesgo tras un largo periodo de hábito tabáquico, inicio antes del primer embarazo a término, y en fumadores pasivos ([7675]). La actividad física, por otra parte, ha mostrado una asociación inversa con el riesgo de cáncer de mama, sobretudo en mujeres posmenopáusicas, al mantener el peso corporal y al influir en otros sistemas, como el endocrino y el inmunológico ([6093]).

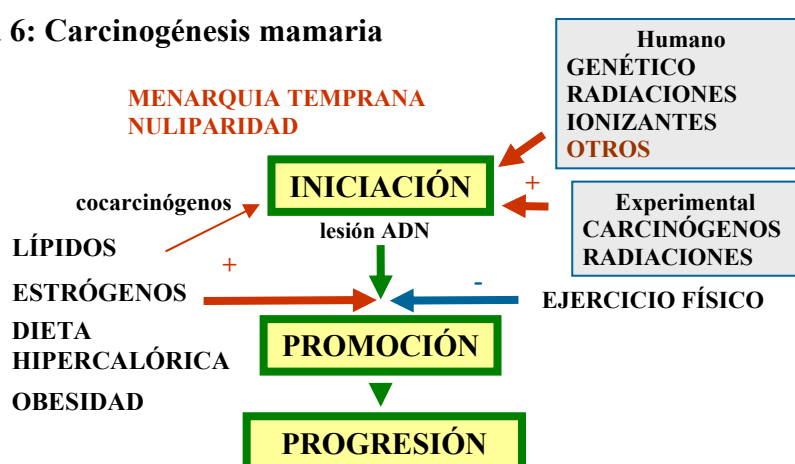
Por último, se ha sugerido que otros factores tales como radiaciones ionizantes, metales como el cadmio, xenoestrógenos y otros disruptores endocrinos (dietilestilbestrol, bisfenol A, parabenos, alquilfenoles, dioxinas, pesticidas), y diversos compuestos químicos (solventes orgánicos, aminas aromáticas,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

2. ESTADIOS DE LA CARCINOGENESIS

La carcinogénesis se considera un proceso evolutivo que contiene múltiples etapas que reflejan alteraciones genéticas que conducen a la transformación neoplásica progresiva. Los conceptos de iniciación, promoción y progresión tumoral provienen de estudios sobre carcinogénesis en modelos animales y, aunque representan una simplificación del proceso real, son muy útiles para entender la historia natural del cáncer ([7265]).

Así, el punto de inicio de la transformación neoplásica corresponde a la fase de la iniciación. La iniciación tumoral se produce por mutaciones esporádicas o heredadas, inducidas por agentes genotóxicos endógenos o exógenos (productos químicos como las aflatoxinas, radiaciones físicas como los rayos X, agentes biológicos como el virus del papiloma humano) que activan o inactivan genes celulares involucrados en la proliferación, diferenciación o apoptosis. Las más importantes son las mutaciones puntuales, la amplificación génica y el daño clastogénico que incluye deleciones, roturas, translocaciones y recombinaciones cromosómicas. Los cambios epigenéticos que modifican la expresión génica, como las alteraciones en los patrones de metilación del ADN, también pueden ser iniciadores de la carcinogénesis. Además, los agentes cocarcinógenos también pueden participar, facilitando o estimulando la acción genotóxica de los carcinógenos y/o interfiriendo con la reparación del ADN. El siguiente eslabón es la promoción tumoral, donde las células inicialmente transformadas pueden aumentar el daño genético y proliferar en respuesta a diversos estímulos o promotores (hormonas, nutrientes, drogas, etc.) que facilitarían el crecimiento final y la expansión clonal de las células anómalas. Estos promotores interactúan con receptores intracelulares o de membrana, modifican componentes y funciones celulares, alterando así la información genética celular. Además, el aumento de la proliferación celular facilita la aparición de nuevas mutaciones. Finalmente, en la última fase de progresión tumoral, la célula sufre alteraciones genéticas adicionales, con inestabilidad genómica marcada, y adquiere dos características esenciales de malignidad: la capacidad de infiltrar los tejidos adyacentes y de metastatizar. Estos estadios se esquematizan en la Figura 6.

Figura 6: Carcinogénesis mamaria



Aunque clásicamente se reconocen factores iniciadores (genéticos, como las alteraciones inducidas por el 7,12-dimetilbenz(α)antraceno -DMBA- sobre el ADN), que provocan el paso de célula normal a transformada, y otros promotores (como los lípidos de la

dieta) que llevan a la célula transformada hasta el estadio clínico de tumor, la separación entre factores iniciadores y promotores no está clara. Así, cabe pensar que determinadas alteraciones estructurales en el ADN causadas por agentes genotóxicos puedan tener efectos específicos sobre la expresión génica, alterando así los sistemas de respuesta celular a las señales extracelulares; asimismo, los efectos promotores de determinados factores ambientales podrían incidir sobre los mecanismos de reparación del ADN y apoptosis, alterando la tasa de mutación. Finalmente, considerando, por un lado, el aumento de la esperanza de vida de la población y, por otro lado, la existencia de cánceres latentes clínicamente silentes, se puede considerar que en el cáncer humano, los estadios de la promoción y la progresión, que son los que configuran y modulan la evolución clínica de la enfermedad, tienen más relevancia que los factores iniciadores que la han provocado. Por lo tanto, enlentecer la carcinogénesis y retrasar la aparición clínica del tumor, conociendo y actuando sobre los distintos factores que intervienen en estas fases, son estrategias muy valiosas que deben considerarse seriamente como acciones de prevención del cáncer.

3. PATOGÉNESIS DEL CÁNCER DE MAMA

a. HUMANO

El lobulillo tipo 1 o TDLU es la estructura donde se inicia el carcinoma ductal convencional de mama. Estudios comparativos entre mamas analizadas procedentes de autopsias rutinarias y mamas portadoras de carcinoma o contralaterales a las afectadas por neoplasia han constatado que los lobulillos de tipo 1 y la presencia de atipia o carcinoma son más frecuentes en las segundas. Además, estudios “in vitro” demuestran que la transformación neoplásica de células en cultivo, obtenidas de las distintas estructuras anatómicas de la mama humana, expuestas a carcinógenos, únicamente se observa en las células epiteliales de tejidos mamarios ricos en lobulillos 1 y 2 ([3165]). El lobulillo tipo 3 daría lugar a lesiones benignas como los fibroadenomas o hiperplasias lobulillares y ductales usuales, mientras que los adenomas lactantes nacerían de los lobulillos tipo 4 y el papiloma intraductal, de ductos extralobulillares cercanos al pezón ([3165], [3503], [3966]).

Como se ha comentado previamente en el apartado A.1 de la “Introducción”, el lobulillo 1 es la estructura predominante en la glándula mamaria en mujeres nulíparas de cualquier edad (50 a 60% de las estructuras lobulillares), seguido por el lobulillo tipo 2 (30 a 35%) y por el tipo 3 (5-10%). En la mujer múltipara es esta última estructura la más abundante en la mama (entre el 80 y 100% del componente lobulillar total). La actividad proliferativa de los lobulillos tipo 2 y 3 es de 5 a 20 veces menor que la de los lobulillos tipo

1 y de hasta 60 veces menor que la de las estructuras más primitivas (TEBs) ([3503]). Por lo tanto, la transformación neoplásica de la glándula mamaria humana dependería de la fase de desarrollo y diferenciación de la mama, relacionado con la tasa de proliferación celular “in vivo”. En este sentido, estudios epidemiológicos señalan que el periodo existente entre la menarquia y el primer embarazo a término, la etapa más rica en lobulillos tipo 1, es el de máxima susceptibilidad para el inicio del cáncer de mama. La protección contra el cáncer de mama atribuida a la gestación, en concreto cuando ocurre antes de los 24 años de edad, se debe, entre otros factores, al aumento del compartimento lobulillar maduro, mientras que la menarquia precoz, la nuliparidad o el primer embarazo en edades más avanzadas son factores de riesgo reconocidos para desarrollar cáncer de mama, ya que comportan una diferenciación tardía o insuficiente de la glándula mamaria y una ampliación del periodo de máxima susceptibilidad ([3165]). La presencia de lobulillos tipo 1 en la mama de las mujeres menopáusicas explicaría el desarrollo de neoplasia en mujeres mayores, aunque la transformación maligna podría haber ocurrido previamente y que el tumor se manifieste clínicamente en edad más avanzada.

El cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea que incluye una amplia variedad de entidades que exhiben comportamientos clínicos diversos, como se comentará en el apartado E.1 de la “Introducción”. Recientemente, se ha comprobado que estas entidades están definidas a nivel molecular por determinadas alteraciones genéticas que afectan procesos celulares y que han permitido entender mejor el desarrollo y la evolución de las neoplasias de mama ([7263], [7264]). Históricamente, la progresión del cáncer de mama se había visto como un proceso “multi-step”, similar al modelo de Vogelstein descrito en la carcinogénesis cólica ([7262]), de una única vía que progresa desde la mama normal a la hiperplasia, carcinoma “in situ”, carcinoma invasor y metástasis ([7261]). Estudios moleculares, basados especialmente en estudios de expresión génica, de hibridación genómica comparativa o de secuenciación genética, han permitido, por un lado, ampliar los conocimientos sobre las lesiones precursoras del cáncer de mama y, por otro lado, han redefinido el modelo de progresión de la carcinogénesis mamaria. En este sentido, se reconocen distintas vías patogénicas que llevan al carcinoma invasor ([7260]). Así, parece existir una rama para los carcinomas de bajo grado, que incluye el carcinoma ductal infiltrante bien diferenciado, el carcinoma tubular, el carcinoma lobulillar infiltrante clásico, y en la que lesiones como la atipia del epitelio plano, la hiperplasia ductal y lobulillar atípicas, el carcinoma intraductal de bajo grado y el carcinoma lobulillar “in situ” comparten anomalías moleculares. Concretamente, estas entidades se caracterizan por presentar

expresión de receptores hormonales, pocas alteraciones cromosómicas, a excepción de pérdidas recurrentes de 16q, y ausencia de expresión de citoqueratinas basales (CK5/6) o de sobreexpresión de HER2, lo que sugiere que forman parte de la vía de progresión de estos cánceres [7423]. Por otro lado, la rama de los carcinomas de alto grado, que incluye a los carcinomas ductales infiltrantes pobremente diferenciados, tanto aquellos que se caracterizan por sobreexpresar HER2, como los que exhiben citoqueratinas basales, se caracterizan por mostrar genotipos muy complejos, con ganancias y pérdidas de material de muchos cromosomas y amplificaciones de genes. Las lesiones precursoras en este grupo, aunque no están bien definidas, no incluyen las anteriormente descritas en la rama de bajo grado y parecen corresponder a hiperplasias apocrinas atípicas y a adenosis microglandulares ([7258], [7259]). Existen una serie de carcinomas de características moleculares intermedias, como el carcinoma lobulillar pleomórfico y el carcinoma ductal infiltrante moderadamente diferenciado, en los que las vías de progresión son menos evidentes. Asimismo, los cambios genéticos observados en las lesiones proliferativas benignas son raros y diferentes a los descritos en el carcinomas. En cuanto a la célula de origen, la carcinogénesis mamaria recapitula los estadios de diferenciación de la célula epitelial normal, de tal manera que la mayoría de los carcinomas de mama derivan de la célula luminal diferenciada, que expresa CK8/18/19, posiblemente a través de eventos mutacionales que pueden haber ocurrido en etapas previas en la línea diferenciación glandular, mientras que una pequeña proporción (5-10%) deriva de la célula progenitora que expresa citoqueratinas basales (CK5/6) o de una célula intermedia, CK5/6 y CK8/18/19 positiva. Finalmente, las células que integran la línea mioepitelial, y que coexpresan marcadores de músculo liso, serían el origen de las lesiones mioepiteliales de mama, como el carcinoma adenoide-quístico o el adenomioepitelioma ([7257]). Estudios moleculares adicionales han ampliando y clarificando estas vías de progresión del cáncer de mama, así como el papel de las células progenitoras “stem” como precursoras y como verdaderas dianas terapéuticas en los tumores más agresivos ([7423], [7614], [7615]).

b. RATA

Los TEBs y los TDs son la estructura diana del carcinógeno y origen de los carcinomas mamarios experimentales de rata ([1520], [1524]). Estudios realizados por Russo y cols. constatan que a los 14 días de administración del carcinógeno, los TEBs, en lugar de diferenciarse normalmente a ABs o involucionar a TDs, crecen y se agrandan al proliferar las células epiteliales luminarias, constituyendo las proliferaciones intraductales (IDPs) ([995], [3966]). Se reconocen dos tipos de IDPs: los [i] o iniciados, que no despiertan reacción

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

En conclusión, los resultados expuestos indican, por un lado, que el grado de diferenciación que exhibe la glándula mamaria en el momento en el que un agente etiológico actúa es de extrema importancia en el inicio de la carcinogénesis, ya que se requiere de una

estructura diana adecuada, y, por otro lado, señalan la existencia de dos vías patogénicas diferentes e independientes para las lesiones malignas y las benignas.

C. MODELO EXPERIMENTAL

La utilización de modelos experimentales “in vivo”, y en especial los modelos murinos, constituye una importante herramienta en el estudio de la patología mamaria, al responder cuestiones específicas de la biología del cáncer de mama y aportar información que no podría obtenerse en la población humana. Los modelos más utilizados para el estudio de la carcinogénesis mamaria son los de la rata. Varias cepas de rata desarrollan tumores espontáneos y responden a una gran variedad de carcinógenos químicos y a radiación ionizante con la inducción de tumores mamarios hormonodependientes o independientes. En el presente trabajo se ha escogido el modelo inducido en ratas Sprague-Dawley con 7,12-dimetilbenz(α)antraceno (DMBA), administrado por instilación gástrica, que provoca tumores mamarios de características similares a los de los humanos ([905], [906], [1438]).

1. CARACTERÍSTICAS DEL MODELO UTILIZADO

El método utilizado es el de Huggins y cols. ([439], [443]), modificado ([1299]). El carcinógeno empleado es un hidrocarburo aromático policíclico, el 7,12-dimetilbenz(α)antraceno (DMBA) que, administrado correctamente por instilación buco-gástrica y a la dosis óptima (según la descrita en el método anteriormente referenciado, no superior a 20 mg/rata), presenta, en relación con otros carcinógenos químicos, una serie de ventajas: 1) efectos extratumorales moderados, 2) mortalidad postinducción prácticamente nula, 3) practicabilidad de la técnica –única dosis del carcinógeno-, 4) alto rendimiento en la producción específica de tumores mamarios y 5) abundante información bibliográfica.

El DMBA es un compuesto lipófilo que requiere activación metabólica para actuar como carcinógeno ([4537]). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos se activan principalmente por las enzimas citocromo P450 pertenecientes a la familia tipo 1 (CYP1). Las formas moleculares intermediarias del proceso de oxidación que catalizan son especies electrofílicas reactivas (los metabolitos carcinogénicos), capaces de interactuar con macromoléculas celulares, como ácidos nucleicos y proteínas ([7701]). Hasta el momento, se han descrito tres vías metabólicas principales del DMBA: 1) monoxigenación y formación de diol-epóxidos, considerado el mecanismo dominante de metabolización del DMBA ([1425], [2388]), 2) oxidación por transferencia de un electrón y formación de radicales catiónicos y 3)

oxidación dependiente de NADPH y formación de *o*-quinonas ([6769]). Los complejos formados por la unión directa de los metabolitos generados por estos mecanismos y el ADN constituyen los denominados aductos. Estos complejos pueden ser estables y permanecer en el ADN, a menos que se reparen por los mecanismos de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER), o depurinizantes, generándose un sitio apurínico en el ADN que, en los ciclos de replicación celular siguientes, terminará produciendo una transversión A→T o G→T ([4080], [4081]). Los lugares apurínicos, creados principalmente por aductos inestables, parece ser que son el tipo de daño genómico más mutagénico producido por el DMBA. Si los aductos no son eliminados ni el ADN reparado se constituyen lesiones premutagénicas que preceden la iniciación tumoral ([4047]). Los metabolitos reactivos también pueden generar daño oxidativo ([6769]). La formación de aductos específicos parece ser dependiente de la dosis de carcinógeno, del tiempo de exposición y del método de administración ([4048], [4080], [4175], [4176], [4177]).

2. FACTORES QUE INFLUENCIAN LA RESPUESTA TUMORIGÉNICA

El cáncer mamario experimental es el resultado de la interacción de un carcinógeno con la glándula mamaria. Los factores críticos que determinan la respuesta tumorigénica en el modelo experimental inducido con DMBA son: la especie animal, la dosis de carcinógeno y el grado de diferenciación de la glándula mamaria en el momento de instilación gástrica.

a. ESPECIE SELECCIONADA

La rata es el animal que mejor se ajusta a las necesidades del modelo experimental ya que: 1) cumple las condiciones mínimas de semejanza para que los resultados puedan ser útiles a la hora de abordar el problema en humanos, a pesar de la distancia de especie y de las diferencias en la carcinogénesis, 2) posibilita un ensayo útil y practicable, 3) es uno de los animales de laboratorio que, tras la inducción con el carcinógeno, posee la propiedad de la hormonodependencia de los tumores mamaros, 4) presenta, hasta los 8 meses aproximadamente, una incidencia de tumores espontáneos muy baja y, además, éstos son fundamentalmente benignos ([447]), mientras que los malignos espontáneos son raros, lo que reduce los problemas de interpretación, 5) la vida media de la rata es de 30-48 meses y el tiempo de latencia de la inducción tumoral es breve (20-40 días), lo que permite estudiar muchas generaciones de ratas en un mismo periodo generacional humano. Una de las ratas más utilizadas en las investigaciones oncológicas son, por sus propiedades, las de la raza Sprague- Dawley (SD, CFE u OFA) ([446]).

b. DOSIS DEL CARCINÓGENO

La latencia tumoral está, en general, inversamente relacionada con la dosis de carcinógeno, mientras que la incidencia tumoral y el nº de tumores están directamente relacionados con aquélla, especialmente si se usan puntos finales del experimento relativamente tempranos ([906], [3122]). También se ha constatado una relación entre la dosis del carcinógeno y los efectos tóxicos del DMBA. Dosis de 20 mg/animal son las óptimas para ensayar agentes inhibidores y dosis de 2,5 a 5 mg/animal para agentes promotores. Más de 20 mg/animal no mejoran la eficacia del método y, en cambio, aumentan la mortalidad postinducción y los efectos extratumorales del carcinógeno (leucopenia, alteraciones del crecimiento, etc.). La administración oral del carcinógeno mediante instilación gástrica mediante una única dosis es la más efectiva y cómoda y obtiene los mejores resultados que con cualquier otro sistema: baja mortalidad secundaria al carcinógeno, desarrollo rápido de tumores mayoritariamente mamarios, alta incidencia y alto contenido tumoral. La histología tumoral y el número de tumores malignos por rata también están influidos por la dosis del carcinógeno. Así, a mayor dosis de carcinógeno se disecan un mayor nº de tumores malignos sobre el total de inducidos. En cambio, el nº de tumores benignos por rata no parece depender de la dosis del carcinógeno ([2952], [3503]).

c. DIFERENCIACIÓN GLANDULAR E HISTORIA REPRODUCTIVA

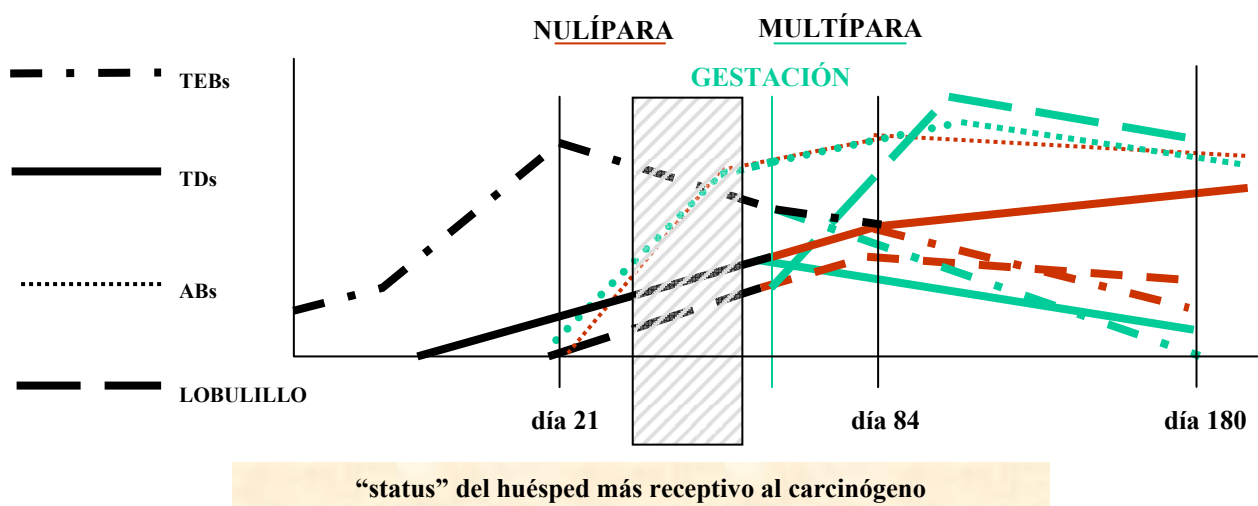
La susceptibilidad de la glándula mamaria de la rata a los carcinógenos químicos depende del estado en que se encuentre el animal en el momento de la administración del carcinógeno. En general, los estudios que utilizan el DMBA realizan la inducción en animales hembras de 50-55 días de edad. A esta edad, poco tiempo después de la edad media de la pubertad, se dan una serie de características que hacen a la rata más receptiva a los efectos carcinogénicos del DMBA. En primer lugar, las hormonas ejercen un efecto permisivo o promotor sobre el crecimiento de los tumores y su mantenimiento, una vez que el carcinógeno ha actuado ([472]). En segundo lugar, la glándula mamaria exhibe un alto contenido de TEBs activos que, como se ha comentado en el apartado B.3.b, son la estructura diana del carcinógeno. Los TEBs son la estructura mamaria con la mayor tasa de proliferación, con la menor fracción de pérdida celular y en la que las células epiteliales necesitan menos tiempo para completar el ciclo celular (11 horas frente a 20,81 y 28,18 en TDs y ABs, respectivamente). Estas características comportan una menor capacidad de reparar el ADN dañado y de eliminar los aductos entre el DMBA y el ADN. Las células de los TEBs producen, además, “in vitro”, más metabolitos epóxidos del DMBA que las de los ABs y lobulillos ([3122], [3165], [3966]). La disminución de TEBs en animales mayores de 55 días se acompaña de una menor incidencia de tumores, así como de un menor nº de

tumores/animal ([3122], [3503]). Las ratas vírgenes o nulíparas tienen, en relación con las ratas múltiparas, un alto contenido en yemas terminales (TEBs). Los conductos terminales que han sufrido atrofia (TD) son también estructuras indiferenciadas y son susceptibles de transformación neoplásica. Las ratas múltiparas poseen estructuras más diferenciadas, como las yemas alveolares (AB) y lobulillos, con baja actividad sintética de ADN, menor capacidad de captación de DMBA, mayor capacidad de reparar el ADN dañado y de eliminar los aductos entre el DMBA y el ADN, ya que la duración de la fase G₁ del ciclo celular es mayor. Por ello, cuando se administra el carcinógeno a estos animales, estas estructuras no desarrollan carcinomas ([3122]). La mayoría no se modifican o evolucionan a lesiones benignas ([3165]). La susceptibilidad de la glándula mamaria a la carcinogénesis inducida por DMBA es, por lo tanto, edad-dependiente y máxima (100% de incidencia, con múltiples tumores por animal) cuando el carcinógeno se administra a ratas vírgenes de 45 a 60 días de edad, que es cuando la glándula mamaria exhibe una alta densidad de TEBs altamente proliferativos. Dicha etapa se asocia, por un lado, a organogénesis activa, en la que la glándula mamaria sintetiza mayor cantidad de ADN que se ligará a los metabolitos reactivos del DMBA y, por otro lado, a mayor activación del DMBA ([2952]). La mayor cantidad de TEBs en las glándulas mamarias de la región torácica explica la mayor incidencia de tumores en esta localización ([1520], [1524], [3122], [4537]).

J. Russo y I. Russo mostraron que la gestación a término confiere a la glándula mamaria de la rata mayor resistencia a la carcinogénesis inducida por DMBA y que los animales que no amamantan son más susceptibles a desarrollar tumores benignos ([3573], [3966]). En este sentido, la lactancia materna comporta una disminución del tamaño del compartimento proliferativo y una elongación de la fase G₁ del ciclo celular de las células epiteliales de los ABs y lobulillos. La interrupción de la gestación no confiere ningún tipo de protección a la carcinogénesis. Asimismo, cuando el carcinógeno es administrado previo a la fecundación y a la gestación se acompaña de una aceleración del desarrollo tumoral, probablemente por los cambios hormonales inducidos por ésta. Por otro lado, la administración de progesterona o pautas combinadas de estrógenos y progesterona, o el tratamiento con hCG, reducen considerablemente la incidencia tumoral ya que confieren mayor diferenciación mamaria en el momento de la inducción. La glándula mamaria que ha regresado tras la gestación y lactancia permanece resistente a la carcinogénesis química lo que indica que no es únicamente el “status” hormonal de la rata la responsable de dicha resistencia, sino también cambios estructurales y quinéticos permanentes mediados por las hormonas de la gestación y lactancia y que permanecen tras el retorno de los niveles

hormonales al estado fisiológico no gestante ([3573]). En la Figura 7 se exhiben las diferencias en la densidad entre las diversas estructuras de la glándula mamaria a lo largo de la vida del animal.

Figura 7: Diferenciación de la glándula mamaria y susceptibilidad al carcinógeno



Por lo tanto, la susceptibilidad de la glándula mamaria a la carcinogénesis experimental está modulada por: 1) la presencia de TEBs, 2) el tamaño del compartimiento proliferativo, 3) el grado de unión del carcinógeno al ADN y 4) la capacidad de las células de reparar el ADN dañado por el carcinógeno ([2952], [3165]) que, a su vez, dependen de la diferenciación de la glándula mamaria ([3122]). En definitiva, el carcinógeno requiere de un estado estructural adecuado, y el tipo de lesión inducida dependerá del área de la glándula mamaria afectada por el carcinógeno. Existen, además, otros factores adicionales, como la dieta administrada, factores endocrinos o genéticos del animal que pueden influenciar la respuesta tumorigénica.

D. LÍPIDOS DE LA DIETA Y CÁNCER DE MAMA

Como se ha especificado anteriormente, estudios realizados en humanos y en modelos animales indican que los lípidos de la dieta influyen en el desarrollo del cáncer de mama. Los lípidos actúan fundamentalmente durante la promoción tumoral y su efecto depende tanto del tipo como de la cantidad de grasa ingerida ([2289], [3421], [3568], [3615], [3977], [4350]). En general, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de la familia n-6, fundamentalmente el ácido linoleico (18:2n-6), presentes en aceites vegetales como los de maíz y girasol, son los principales promotores de la carcinogénesis ([1358], [3568], [3672], [4324]). Es de destacar el

ácido γ -linolénico (18:3n-6) (GLA), presente en el aceite de primula, que supone una excepción dentro de esta familia, ya que posee propiedades antiproliferativas ([3980], [3982]). Además, el ácido linoleico conjugado (CLA), término en el que se engloban diversos isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico, y presente en la carne y en los productos lácteos derivados de rumiantes, podría tener un efecto inhibitor del cáncer de mama ([3195], [3205], [3445], [4538], [4543]). Por otro lado, los PUFA de cadena larga de la familia n-3, el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), presentes en el pescado azul y sintetizados a partir del ácido α -linolénico (18:3n-3), presente en algunos aceites vegetales como el de canola, soja o lino, serían inhibidores del crecimiento tumoral mamario ([1486], [3568], [3615], [4324], [4353]). En cuanto a las grasas saturadas, de procedencia animal, y los lípidos insaturados *trans*, presentes en la margarina y productos de pastelería y panadería, que se originan tras los procesos de manufacturación de varios productos de aceites vegetales, también son promotores, pero menos potentes que los PUFA de origen vegetal, y, además, podrían actuar como cocarcinógenos durante la iniciación ([920], [1486], [3205]). Finalmente, los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), fundamentalmente el ácido oleico (18:1n-9), principal componente de la fracción saponificable del aceite de oliva (~79%) y que también se encuentra en las grasas de origen animal (~30-55%) y en otros aceites vegetales (~25-75%), no muestran unos efectos claros. Por un lado, varios estudios epidemiológicos han mostrado que las tasas de incidencia de cáncer de mama en los países de la zona mediterránea, donde el consumo de aceite de oliva es elevado, son inferiores a la de los países del norte de Europa y América ([3853], [3860], [4743], [6051]). Por otro lado, los resultados de los estudios experimentales son contradictorios, habiéndose observado desde una ausencia de efecto promotor, un débil efecto promotor, a un efecto protector del cáncer de mama ([3022], [3060], [3205], [3568], [3839], [3840], [4351], [5321], [7144]). Probablemente, las diferencias recogidas pueden estar relacionadas con las distintas variedades de aceite de oliva, que contienen cantidades diferentes de ácido oleico y de otros componentes minoritarios bioactivos, como los antioxidantes y el escualeno (que se hallan en mayor cantidad en el aceite de oliva virgen extra que en otros tipos), y que como tales pueden ejercer efectos quimiopreventivos en el cáncer, y por la abundancia de otros nutrientes (cereales, legumbres, pescado, etc.) que caracterizan a la dieta mediterránea ([3864]).

Los aceites más consumidos en nuestro medio son el de maíz y el de oliva que, tal y como se especifica en la Tabla 1, presentan diversos componentes y en diferente proporción

de ácidos grasos, así como componentes no lipídicos, en el caso del aceite de oliva, cuyo papel en la carcinogénesis mamaria se tratará en los siguientes apartados.

Tabla 1: Composición característica de los aceites de oliva virgen y de maíz

Composición en ácidos grasos (g/100g)		
Ácido graso	Aceite de oliva	Aceite de maíz
Ácido palmítico (16:0)	8,7	12,6
Ácido palmitoleico (16:1n-7)	1,1	0,2
Ácido esteárico (18:0)	1,9	1,9
Ácido oleico (18:1n-9)	78,7	24,1
Ácido linoleico (18:2n-6)	8,3	60,1
Ácido linolénico (18:3n-3)	0,9	1
Ácido eicosapentaenoico (20:5n-3)	0,03	-
Ácido docosahexaenoico (22:6n-3)	0,05	-
Componentes de la fracción no saponificable del aceite de oliva virgen (aprox.2%)		
Ésteres no glicéridos		
Alcoholes alifáticos		
Alcoholes derivados del triterpeno		
Esteroles (β -sitosterol, campesterol, estigmasterol,...)		
Hidrocarburos (escualeno, β -caroteno, licopeno,...)		
Pigmentos (clorofilas,...)		
Fenoles lipofílicos (tocoferoles y tocotrienoles)		
Fenoles hidrofílicos (ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, secoiridoides, lignanos y flavonas)		
Compuestos volátiles		

Los mecanismos por los cuales los lípidos de la dieta pueden modular la carcinogénesis mamaria no han sido totalmente determinados pero, a partir de los datos experimentales, se podrían establecer a varios niveles, entre los que destacan: 1) las etapas de la carcinogénesis, 2) los niveles hormonales, 3) la membrana celular, 4) la transducción de las señales mitogénicas, 5) la expresión génica, 6) la proliferación celular y 7) el sistema inmunitario. Probablemente, “in vivo”, los lípidos actúan a través de todos estos mecanismos de una forma integrada, simultánea y/o secuencial. Este tema ha sido especialmente estudiado por el grupo investigador y objeto de varias publicaciones, entre ellas los Artículos 4, 6, 7, 8, 9 y 10 de este trabajo.

1. INFLUENCIA SOBRE LAS ETAPAS DE LA CARCINOGENESIS

Aunque la mayoría de los trabajos experimentales señalan que las grasas actúan fundamentalmente como promotores del cáncer de mama, también existen evidencias de su posible papel durante la iniciación. Por un lado, pueden actuar como cocarcinógenos, facilitando la acción genotóxica de diversos agentes, al alterar la accesibilidad del carcinógeno, la reparación del ADN y/o el proceso de transcripción de determinados genes, que resultan de modificaciones de la estructura y la función de la cromatina [(920), [1937],

[2572], [4861]). Por otro lado, estudios experimentales demuestran que las dietas hiperlipídicas pueden producir cambios estructurales y biológicos en la glándula mamaria que afectan la susceptibilidad a la transformación maligna inducida por los carcinógenos ([3195], [3581]).

Otro aspecto a considerar es la posible acción iniciadora de las sustancias que acompañan a las grasas de la dieta, como contaminantes alimentarios -pesticidas, toxinas, hidrocarburos aromáticos policíclicos-, aditivos, hormonas, etc, o la posibilidad de que los lípidos pudieran activar determinadas sustancias exógenas carcinogénicas, o modular la producción endógena de sustancias capaces de dañar el ADN ([860], [943], [1029]). Pero el principal mecanismo a través del cual los lípidos de la dieta pueden estimular la iniciación de la carcinogénesis es la peroxidación lipídica y el subsecuente daño oxidativo en el ADN, que afectaría la proliferación celular y presentaría capacidad mutagénica. El control y la susceptibilidad de este proceso influirían en los efectos de las diversas grasas en el cáncer de mama ([2949], [3421], [3568], [4546], [6198]). Por otro lado, existen diversos trabajos que parecen demostrar que las sustancias antioxidantes son protectoras del cáncer de mama, entre otros factores, por la capacidad de reducir la peroxidación lipídica ([884], [1093], [4888]). En este sentido, el aceite de oliva podría proteger del daño oxidativo, y, por ello, asociarse a un efecto antitumoral, por ser el ácido oleico menos susceptible a la oxidación que el ácido linoleico y por la riqueza de sus componentes antioxidantes (α -tocoferol –vitamina E-, y los componentes fenólicos, como oleuropeína, hidroxitirosol y lignanos) ([3018], [3229], [3621], [4743], [4802], [4883]).

2. INFLUENCIA SOBRE LOS NIVELES HORMONALES

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

Los lípidos de la dieta podrían ejercer sus efectos sobre el cáncer de mama, a través de los estrógenos, por diversos mecanismos. Por un lado, un aumento de la síntesis de estrona por el tejido adiposo, a partir de andrógenos suprarrenales y ováricos, mediante aromatasas, podría ser el resultado de una ingesta excesiva de grasas que conduzca a un aumento del número de adipocitos ([824], [3615]). Este hecho se asocia con las mayores tasas de cáncer de

mama en mujeres posmenopáusicas y obesas ([5367], [5368]). Por otro lado, los PUFA n-6 pueden aumentar la estrogenicidad a tres niveles: 1) desplazando los estrógenos de su proteína transportadora, incrementando los niveles de hormona libre ([3421], [3568]); 2) aumentando la afinidad de los estrógenos hacia su receptor; y 3) inhibiendo la capacidad de la enzima 17 β -deshidrogenasa, impidiendo el paso de estradiol (el estrógeno más activo) a estrona ([976], [2206]). Además, se ha observado que un incremento en el consumo de EPA, a través de la ingesta de pescado, disminuiría la producción local de los estrógenos, a través de una disminución de la actividad de aromatasa P450 ([4546]). Por otra parte, el aumento de la ingesta de grasas causa un incremento de la secreción biliar, cuyos ácidos biliares y derivados del colesterol pueden ser transformados a estrógenos por ciertas bacterias de la flora intestinal ([1666]). En este sentido, el efecto protector del aceite de oliva podría explicarse, al menos en parte, por la actividad moduladora de la biosíntesis de ácidos biliares y los efectos antiestrogénicos de dos de sus componentes, el escualeno y los lignanos, respectivamente ([3619], [4743]). Otros mecanismos que parece que podrían intervenir en la estrogenicidad de los PUFA n-6 de la dieta son una expresión incrementada del ARNm del RE α y una disminución del ARNm del receptor de andrógenos (RA) ([3568], [4542]). A pesar de las relaciones sugeridas anteriormente, no se han encontrado diferencias consistentes en los niveles de esteroides gonadales ni en el de sus receptores por efecto de la dieta hiperlipídica ([918], [934], [1046], [1678], [2265]).

Otras hormonas que se han relacionado con los lípidos y el cáncer de mama son la prolactina, la insulina, la tiroxina, la hormona de crecimiento, la corticosterona y la leptina, aunque los estudios no son concluyentes ([807], [922], [934], [1077], [1442], [1560], [2264], [2834], [3013], [3615]).

3. MODIFICACIONES DE LA MEMBRANA CELULAR

La composición en lípidos polares (fosfolípidos, esfingomielina y cardiolipina en la mitocondria) y el contenido en colesterol de las membranas celulares están finamente regulados y puede variar en función de los lípidos que habitualmente se ingieren ([1047], [2264], [3185]). Los cambios en su perfil lipídico pueden modificar el comportamiento celular mediante la influencia en la fluidez y estructura de la membrana, las vías de transducción de señales y el grado de peroxidación lipídica de las membranas celulares ([2009], [4541]). Las membranas celulares parecen mantener relativamente constante sus niveles de ácidos grasos saturados y monoinsaturados dentro de un amplio rango de variación en la dieta de estos ácidos grasos. La composición de la membrana es más sensible a los

niveles de PUFA n-6 y n-3 de la dieta, y especialmente a los PUFA n-3 y a la ratio n-3/n-6, probablemente porque ambos PUFA no pueden ser sintetizados “de novo” por los animales superiores ([4818], [6338]). Por un lado, elevadas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares se han asociado a una mayor tasa de proliferación celular ([1355], [4324]). Por otro lado, los cambios en la fluidez de la membrana plasmática pueden afectar la movilidad lateral de proteínas específicas integrales y unidas a membrana (receptores, transportadores, enzimas), su conformación e interacción con otros componentes de membrana que podrían producir cambios funcionales ([2264], [2276]). En este sentido, se ha descrito que las dietas ricas en distintos ácidos grasos modifican la densidad y/o conformación de los canales de sodio ([1518]), cambios en la actividad de la enzima ATPasa Na^+ - K^+ dependiente ([1383]) y la adenilato ciclasa ([1347]), así como la afinidad de los receptores de membrana por el ligando, como en el caso del receptor de insulina ([1560], [2264], [4818], [4822]). Además, determinados lípidos específicos de membrana pueden regular la función de proteínas anfitrópicas, que a su vez regulan proteínas implicadas en la transducción de señales generadas en las membranas, como las GTPasas Ras, citidiltransferasa, proteína quinasas C (PKC), etc. ([1940], [2612], [4804]), así como diversas proteínas de la matriz extracelular y citoesqueléticas, como vinculina, α -actinina, profilina y gelsolina, que intervienen en procesos fundamentales como la división, migración, adhesión celular o interacciones célula-célula ([2613], [2614]). En este sentido, las propiedades protectoras descritas para el ácido oleico podrían deberse a regulación de la localización y la función de la proteína G ([5051]). Asimismo, la susceptibilidad a peroxidación lipídica en las membranas celulares, mayor en los PUFA que en los ácidos grasos monoinsaturados o saturados, causa estrés oxidativo y alteración de las vías de señalización.

Además, se ha sugerido un papel de los lípidos de la dieta en la organización de los microdominios de la membrana plasmática, en concreto los conocidos como balsas lipídicas o “lipid rafts” y, en especial, las caveolas ([5449], [5451], [6336]). Estas estructuras, que se caracterizan por su composición lipídica rica en colesterol, esfingolípidos y lípidos que contienen cadenas de ácidos grasos saturados, están implicadas en procesos como la transducción de señales, la endocitosis, la transcitosis, el tráfico de colesterol, la adhesión y la señalización celular ([4541], [4547], [4615], [4914], [5449], [5451], [6339], [7249]), lo que explica su implicación en diversos tipos de patologías, entre ellas el cáncer ([4744], [6290]). La función de los “lipid rafts” en la transducción de señales podría ser la de concentrar los receptores para que éstos interactúen con sus ligandos y efectores de ambos lados de la membrana ([4216]). En este sentido, se ha descrito la localización de algunos de los

componentes de la vía de señalización intracelular mediada por la proteína Ras en estos microdominios de membrana ([4198], [5465], [5481]). En colon de ratones se ha observado una disminución de la activación de la proteína Ha-Ras por efecto de los PUFA n-3 de la dieta, en comparación con los lípidos n-6, asociada con cambios en la composición lipídica y proteica de las caveolas, así como un desplazamiento de la proteína, y, como consecuencia, la supresión de la vía de señalización Ras ([4614], [6339]). Por otra parte, existen evidencias de que la composición de fosfolípidos de la membrana nuclear interviene en la regulación de la funcionalidad de ésta y, en consecuencia, de procesos como la replicación y la transcripción del ADN o el transporte de ARN ([2264]).

Finalmente, las acciones estimuladoras de las grasas sobre el cáncer de mama también podrían estar relacionadas con los procesos de comunicación entre las células. En este sentido, concentraciones no citotóxicas de ácidos grasos poliinsaturados n-6 son capaces de bloquear la cooperación metabólica a través de las uniones intercelulares (“gap junctions”), dando lugar a un bloqueo de las transferencias de señales inhibitorias entre células tumorales, lo que conduce a una proliferación descontrolada de las células iniciadas y a la promoción del desarrollo tumoral ([1489], [4824]).

4. EFECTOS SOBRE LOS MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Los lípidos de membrana, por la acción de varias fosfolipasas (PLA₂, PLC, PLD) activadas por complejos agonista-receptor, pueden generar gran cantidad de moléculas bioactivas que actúan como segundos mensajeros o como moduladores dentro de la cascada de señalización intracelular ([2789], [4541]). Entre ellas, inositol-trifosfato (IP₃), diacilglicerol (DAG) y ácidos grasos libres (“free fatty acids”, FFA) que activan la proteína quinasa C (PKC), y ácido fosfatídico (PA) que actuaría, además, como coactivador de la vía de MAPK junto con Ras ([2260], [2430], [3695], [3701]). Por lo tanto, los cambios en las propiedades físico-químicas de la membrana que se puedan producir por modificaciones en la cantidad o el tipo de lípidos de la dieta, afectarán a la producción y composición de los segundos mensajeros, alterando la expresión génica y la función celular ([3947]). Se ha comprobado que algunas dietas hiperlipídicas incrementan el nivel de DAG y la cantidad de PKC asociada a la membrana ([1940], [1942], [2054]). Además, los FFA modifican las actividades de las fosfolipasas, PKC y otras quinasas, proteínas G, ciclasas, así como canales iónicos y la movilización del calcio ([2137], [2264], [2276], [2430], [2556]). Por el contrario, el ácido araquidónico inhibe algunas quinasas ([2137]). También se ha descrito que los PUFA

oxidados inhiben tirosina fosfatasa (PTPasas), y por tanto incrementarían en general la fosforilación de tirosinas de las proteínas celulares. En trabajos “in vitro” se ha comprobado que determinados metabolitos del ácido linoleico pueden inhibir la defosforilación del EGFR, aumentando así la cascada de señalización intracelular ([3535], [3824], [5612]), aunque los resultados preliminares no muestran modificación de la activación de EGFR por los lípidos de la dieta, en los adenocarcinomas mamarios experimentales [(6879)].

Los lípidos de la dieta pueden afectar la actividad de las proteínas Ras, reguladores críticos de la función celular, como el crecimiento, diferenciación y apoptosis, y cuya estructura y función se desarrollará en el apartado F de esta “Introducción”, aunque los mecanismos no son aún del todo conocidos. En este sentido, en el modelo de cáncer de colon inducido con azoximetano, una dieta rica en aceite marino disminuía el contenido de Ras unido a membrana, probablemente interfiriendo en las modificaciones postranslacionales de la proteína, mientras que una dieta rica en aceite de maíz aumentaba la localización de Ras en la membrana ([2955]). En cambio, otros autores han demostrado que los n-3 PUFA, en comparación con los n-6 PUFA, disminuyen la relación Ras membrana-citosol sin alterar la farnesilación ni la palmitoilación de la proteína ([3355]). Referente al aceite de oliva, los compuestos minoritarios como el hidroxitirosol o el escualeno, pueden influir en el metabolismo lipídico, disminuyendo los niveles intermediarios lipídicos requeridos para la prenilación de Ras, necesario para su activación en la membrana ([3229], ([3619], [3620], [3771], [5767])). Tal como se tratará más ampliamente en el apartado B de la “Discusión”, estudios llevados a cabo por el grupo investigador, del que la doctoranda forma parte, han demostrado que, en el cáncer de mama experimental, las dietas ricas en aceite de oliva virgen extra, en comparación con las dietas normolipídicas y las de alto contenido en aceite de maíz, regulan la activación de Ras, disminuyendo los niveles de Ras unido a GTP, pero no modifican su localización [(6879)].

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 ([3185]), que muestran diferentes efectos, en algunos casos, contrarios ([2050]). PGE₂, producto del ácido araquidónico, promovería la supervivencia celular, inhibiendo la apoptosis y estimulando la proliferación celular, y potenciaría la progresión tumoral, promoviendo la angiogénesis del tumor y las metástasis ([4324], [4546]). En este sentido, el efecto promotor tumoral de las dietas hiperlipídicas en el cáncer de mama se ha correlacionado con una mayor producción de estas prostaglandinas

([1107]). Los inhibidores de la síntesis de las prostaglandinas bloquean parcialmente el efecto promotor de las dietas hiperlipídicas ricas en PUFA n-6 en la carcinogénesis mamaria inducida por DMBA ([2245], [2265]). En relación a los lípidos n-3, CLA y ácido oleico, se ha postulado que su efecto protector se basaría en la utilización de las mismas enzimas de la síntesis de prostaglandinas que los n-6. Este hecho induciría un cambio en las proporciones de los tipos de eicosanoides sintetizados ([2245], [3185], [3198], [3564], [3567], [3568], [3569], [4546]).

5. EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Numerosos estudios han puesto en evidencia que diversos factores dietéticos pueden modular la expresión de genes específicos. Esta regulación podría efectuarse bien sobre la transcripción génica, o bien sobre los eventos postranscripcionales (procesamiento -“splicing” y “editing”-, estabilidad o traducción del ARNm) de genes ([2542], [2647], [4540]). Los lípidos de la dieta pueden afectar la expresión de genes implicados en el metabolismo de carbohidratos o lipídico, así como aquellos que regulan la proliferación y diferenciación celular y que pueden estar implicados en los procesos tumorigénicos ([4541]). Los efectos sobre la expresión génica pueden ser consecuencia de los cambios anteriormente mencionados sobre las membranas celulares y las vías de transducción de señales, o bien por efecto directo sobre los genes diana.

En cuanto al efecto sobre la expresión de genes implicados en el metabolismo, se conoce la supresión de la lipogénesis hepática por los ácidos grasos poliinsaturados de la dieta, concretamente de las familias n-3 y n-6 ([2422], [2542], [2549], [2617], [2618], [2646], [2892]). Se ha demostrado que los PUFA suprimen la expresión de diversos genes que codifican enzimas lipogénicos, entre ellos S14, acetil-CoA-carboxilasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, esteroil-CoA-desaturasa-1 y -2, y piruvato deshidrogenasa ([2422], [2543], [2545], [2546], [2547], [2549], [2617], [3929]). Asimismo, se ha demostrado un efecto de los PUFA sobre otros genes no lipogénicos como los de la lipasa pancreática ([2548]) y las proteínas transportadoras de glucosa -GLUT1 y GLUT2- ([2551]). Además, también se ha observado inducción génica por los PUFA, como por ejemplo en el caso del ácido araquidónico 20:4 (n-6), capaz de inducir el nivel del ARNm de *β-actina* ([2542], [2546]). Por último, cabe destacar el efecto de los ácidos grasos de cadena larga descrito en cultivos celulares de preadipocitos de ratón sobre la expresión de los genes *aP2*, que codifica para proteínas transportadoras de ácidos grasos, y *Fra-1*, que codifica para un factor de transcripción de la familia de Fos y Jun, que modula la expresión de *aP2* ([1918]). También

se ha constatado que los PUFA inducen la expresión de genes implicados en la oxidación lipídica y la termogénesis ([3844]). Los mecanismos moleculares por los cuales los PUFA regulan la expresión lipogénica hepática no están bien establecidos, pero su acción podría efectuarse principalmente como mediadores de la transactivación ([2415], [2422], [2541], [2547]). Los ácidos grasos o sus metabolitos podrían regular, directamente, la expresión de algunos genes uniéndose a varios receptores nucleares (receptores activados por proliferadores peroxisomales -PPARs- α , β y γ ; receptores del hígado -LXRs- α y β ; receptores del ácido retinoico -RXRs- α ; receptor nuclear hepático 4 -HNF-4- α y γ) y activando la acción de sus factores de transcripción, o, indirectamente, a través de cambios en la abundancia de éstos últimos, como en el caso de SREBP (“sterol-regulatory element-binding protein”) o el factor nuclear κ B (NF κ B)) ([3929], [4541], [4543], [4544], [4546], [4624]).

Por otro lado, se ha descrito que los PUFA pueden modificar la expresión de genes implicados en la transducción de señales, así como de algunas proteínas del citoesqueleto y la actividad de determinados factores de transcripción específicos codificados por protooncogenes ([1854], [4156]). Una de las vías de señalización más importantes en la célula tumoral es la vía ErbB-Ras-MAPK [(4244)]. Estudios en cultivo de células de cáncer de mama humano muestran aumentos del mensajero de *c-erbB2* por la acción de EPA ([1919]), y una represión transcripcional de este gen por la acción de CLA ([5149]), en presencia de elevados niveles de la proteína Ha-Ras. Trabajos del GMECM habían demostrado que la dieta rica en aceite de maíz aumenta el contenido relativo del transcrito de *c-erbB1*, enzimáticamente activo, mientras que la dieta rica en aceite de oliva lo disminuye, además de disminuir el ARNm de *c-erbB2* y la proteína p185ErbB2/HER2, lo que se relacionaría con el efecto protector de esta dieta ([6879]). Como se ha comentado anteriormente, las dietas hiperlipídicas modulan la actividad de Ras, pero no parecen modificar los niveles de ARNm de *c-Ha-ras1* ([3297], [3975]). Por otro lado, dietas con un alto contenido en aceite de pescado reducen de la expresión de *c-myc* en tumores mamarios de ratón ([1854]), mientras que una dieta rica en linoleico aumenta la expresión de *c-myc* en glándula mamaria normal y en tumores benignos de ratas químicamente inducidos ([2984]). Algunos resultados sugieren que los PUFA n-6 promocionarían la tumorigénesis de mama y colon debido a la sobreexpresión de los genes *ras*, *COX2* y, hasta cierto punto, *COX1* ([4546]), mientras que los PUFA n-3 ejercerían un efecto antitumoral como consecuencia de la inhibición de la expresión del gen *COX2* ([3616], [4324], [6793]). Otros estudios, en cambio, demuestran que el efecto sobre la expresión génica por parte de los lípidos se desarrollaría a través de sus metabolitos ([2272], [3558]), como los hidroperóxidos generados

a partir del ácido linoleico, que aumentan los niveles de expresión de COX2 y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en células de adenomas y carcinomas de colon humano ([4900]), y los niveles de ARNm de *c-fos*, *c-jun* y *c-myc* en células del músculo liso de la aorta ([3558]). En células Swiss3T3, la conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas estimula la síntesis de ADN, y la mitosis por activación de *c-fos* y *Egf-1* a partir de la vía metabólica regulada por la PKC ([2272], [3558]).

En cuanto a los genes supresores de tumores, en estudios “in vitro” con células mamarias, se ha descrito que la adición de ácido linoleico estimula la síntesis de ADN y disminuye los niveles de la proteína p53, mientras que el DHA induce la supresión de la proliferación celular y estimula la expresión de p53 ([2272], [3012]). En cáncer de colon se ha observado una menor actividad de p53 por efecto de una dieta al 10% en aceite de maíz como resultado de una sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-xL, y una desregulación de Bax ([4902]). También existen datos sobre la influencia de los lípidos en la expresión de BRCA1 y BRCA2, involucrados en el desarrollo normal de la glándula mamaria y en el cáncer de mama hereditario. Así, la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 tratada con ácido linoleico y estradiol muestra una disminución en la expresión del ARNm de *BRCA1* en comparación con el control o con células tratadas con ácido linoleico o estradiol por separado ([3857]). Por otra parte, en las líneas tumorales mamarias MCF-7 y MDA-MB231 un tratamiento con PUFA n-3 (EPA y DHA) aumenta la expresión de los ARNm de *BRCA1* y *BRCA2*, mientras que un tratamiento con ácido araquidónico no la modifica. En cambio, esta expresión no se ve alterada por estos lípidos en la línea celular mamaria normal MCF-10A ([4325]). El Artículo 6 de este compendio de publicaciones analiza el efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión génica, y se presentan y se discute en el apartado correspondiente.

6. INFLUENCIA SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

A pesar de que existen algunas discrepancias sobre el efecto “in vivo” de las dietas ricas en grasas sobre la proliferación celular, hay claras evidencias de esta acción “in vitro” ([921], [1355]). Así, se ha podido constatar que los ácidos grasos insaturados reducen significativamente el tiempo de duplicación de las células mamarias normales y tumorales en cultivo, provocando un aumento de la actividad mitótica celular ([918]). Como se ha comentado en el subapartado anterior, se ha descrito la regulación por ácidos grasos insaturados de la expresión de genes implicados en el ciclo celular, como por ejemplo *p53* y *c-fos* ([2227], [2272]), lo que podría modular la tasa de reparación del ADN. Otros estudios sugieren que el incremento en la proliferación y en el número de células en fase S del ciclo celular producido por el ácido linoleico resultaría de la modulación de las distintas vías

MAPK existentes en la célula ([4542]). Algunos autores han demostrado que los ácidos grasos de la familia n-6 reducirían la duración del ciclo celular, mientras que los de la familia n-3 inhibirían el crecimiento tumoral mamario ([3012], [3114], [3185], [3581], [4542]). En relación a los ácidos grasos monoinsaturados n-9, trabajos en líneas celulares de cáncer de mama han descrito una inhibición del crecimiento a elevadas concentraciones, mientras que a bajas concentraciones ($< 1 \mu\text{g/ml}$) se observa un efecto estimulador ([3569]).

Asimismo, también se ha apuntado la posibilidad de una interacción más o menos directa de determinados lípidos de la membrana nuclear con la maquinaria genética de replicación, transcripción y reparación del ADN. Concretamente, en *Escherichia coli* se ha observado que los fosfolípidos acídicos esterificados con ácidos grasos insaturados estimulan el inicio de la replicación del ADN cromosómico, por interacción con la proteína Dna I, y pueden inhibir la actividad de la enzima topoisomerasa I. Asimismo, se ha descrito que dichos fosfolípidos y la esfingosina podrían interaccionar con las histonas evitando su unión al ADN y, por tanto, facilitando el acceso de la maquinaria de replicación y transcripción al ADN. Finalmente, “in vitro” se ha observado que la actividad de las ADN polimerasas eucariotas puede modificarse por interacción con fosfatidilinositol, aunque el significado de este hallazgo se desconoce ([2571], [2572]).

7. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO

El proceso inflamatorio está reconocido como una característica importante en el desarrollo del cáncer ([7086], [7349]). Estos procesos están implicados en la tumorigénesis y en la progresión metastásica incluso en tipos de cáncer cuya etiología no incluye una inflamación preexistente o una infección, como suele ser el caso del cáncer de mama ([7368]). La activación de dichos mecanismos desencadena la estimulación de factores de transcripción en las células tumorales, como el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) y el factor nuclear kB (NF- κ B). Estos factores coordinan la producción de mediadores inflamatorios, incluyendo citoquinas y quimioquinas, facilitando con ello el reclutamiento y la activación de células mieloides (macrófagos, mastocitos, eosinófilos y neutrófilos). Las citoquinas y factores solubles producidos, activan estos mismos factores de transcripción en células inflamatorias, estromales y tumorales, resultando en la producción aumentada de mediadores de la inflamación y la generación de un microambiente inflamatorio asociado ([7086]).

Los lípidos de la dieta son capaces de modular la respuesta inmune y la producción de citoquinas inflamatorias. En general, los PUFA n-6 generan eicosanoides con efectos

proinflamatorios, mientras que los PUFA n-3 generan eicosanoides con efectos antiinflamatorios ([3504], [4546], [4547]). Por lo tanto, las dietas con una proporción de PUFA n-6:n-3 alta probablemente incrementan la generación de eicosanoides inflamatorios, mientras que dietas con una proporción baja de n-6:n-3 decrecerán su producción ([4541]). Es probable que las prostaglandinas estén implicadas en el efecto inmunosupresor de los lípidos ([921]). Por ejemplo, la PGE2 inhibe a macrófagos, células T y B, y estimula las células inmunosupresoras ([2085], [4155], [4547]), además de inhibir la producción de algunas citoquinas, como interleuquina (IL) 2 o interferón- β , y de estimular la de otras, como IL4, IL5 y IL10. Por otro lado, se ha observado una inhibición de la proliferación de linfocitos “in vitro”, una disminución en la secreción de TNF (“Tumor Necrosis Factor”), 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 n-3 PUFA ([4547]). Algunos receptores nucleares podrían ser los candidatos a mediar estos efectos sobre el sistema inmune. Así, la activación de PPARs por los ácidos grasos suprime la expresión de citoquinas y otras moléculas implicadas en la respuesta inflamatoria ([4155], mientras que los PUFA inhiben la activación de LXR α y LXR β ([4541]).

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

Por lo tanto, los lípidos de la dieta ejercen sus efectos sobre el cáncer de mama a través de estos diferentes mecanismos que actúan, probablemente y como ya se ha comentado, de forma simultánea, integrada y/o secuencial, así como de forma directa o indirectamente a partir de alteraciones previas sobre otras vías. Además, hay que destacar el papel de los componentes adicionales que se encuentran en los diferentes aceites de la dieta, especialmente en el de la oliva, que también intervienen en la modulación del cáncer. En la Figura 8, que se

exhibe a continuación, se esquematizan estos mecanismos interrelacionados, remitiéndose al texto para su mayor comprensión, centrados en los efectos de los lípidos de la dieta sobre el cáncer de mama y que son compatibles con una modulación positiva de la carcinogénesis mamaria por parte de los PUFA n-6 y una modulación negativa por parte de los PUFA n-3. En relación al aceite de oliva, menos estudiado, los mecanismos que se conocen apuntan más hacia un efecto protector.

Figura 8. Efecto de las dietas hiperlipídicas en la tumorigénesis mamaria



E. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA: DIFERENCIACIÓN Y PROLIFERACIÓN

1. HUMANO

Las lesiones mamarias incluyen diversas entidades, algunas tumorales, de diferente estirpe celular, y otras proliferativas, pseudo-tumorales y precursoras de neoplasias malignas.

La clasificación histológica propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS), consensuada en Lyon en 2002 ([7276]), y actualizada en 2012 [7603], describe las diferentes patologías reconocidas en la glándula mamaria. Esta clasificación pretende reconocer entidades clínico-patológicas que permitan delimitar grupos con valor pronóstico y predictivo. Además, recoge los parámetros morfológicos y moleculares adicionales con información complementaria pronóstica y predictiva. A continuación, se describirán, en primer lugar, las características morfológicas de estas lesiones, especialmente de las más frecuentes, remitiéndose al texto mencionado para mayor información y, en segundo lugar, las alteraciones moleculares halladas en los carcinomas de mama, que han permitido, por un lado, delimitar grupos pronósticos y predictivos más perfilados y, por otro lado, proponer una nueva clasificación de cáncer de mama, de acuerdo al transcriptoma.

a. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DEL CÁNCER DE MAMA Y FACTORES PRONÓSTICOS MORFOLÓGICOS

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. A pesar del innegable avance que han comportado los resultados de los estudios moleculares en el conocimiento y el manejo clínico del cáncer de mama, el estudio morfológico rutinario clásico de los tumores de mama mediante el microscopio óptico continúa siendo una herramienta imprescindible en el diagnóstico, clasificación y tratamiento de esta patología. 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. Estos últimos se caracterizan por la invasión de tejidos adyacentes y una marcada tendencia a metastatizar. Los carcinomas de mama exhiben una gran variedad de fenotipos morfológicos y algunos tipos histológicos específicos comportan significados pronósticos y clínicos particulares. El carcinoma ductal infiltrante (IDC o “invasive duct carcinoma”, “not otherwise specified” –NOS-), actualmente renombrado carcinoma invasor de “tipo no especial” [(7603)], es el tumor maligno de mama más frecuente y constituye del 65 al 80% de los carcinomas mamarios. Se define como un grupo heterogéneo de carcinomas que no muestran las características suficientes para ser incluidos dentro de los grupos histológicos específicos y, por lo tanto, es un diagnóstico de exclusión. Microscópicamente, adopta imágenes muy variables. Pueden presentar márgenes

expansivos o infiltrantes, formar estructuras tubulares y/o acinares o patrones trabeculares, sólidos o sincitiales, gran variedad de características citológicas, con citoplasmas escasos o abundantes y eosinófilos, núcleos uniformes o muy pleomórficos, con nucleolos prominentes y muy variable actividad mitótica. El estroma puede ser extremadamente fibroso, hialinizado, con focos de elastosis. Se puede observar necrosis focal que puede ser extensa y, en algunos casos, un infiltrado linfoplasmocitario evidente asociado. El carcinoma ductal infiltrante, así como los subtipos especiales, se gradúan en base a tres parámetros: formación tubular/glandular, pleomorfismo nuclear y actividad mitótica. La determinación del grado histológico ha evolucionado desde los primeros métodos descritos por Patey y Scarff [(7604)] y por Scarff, Bloom y Richardson ([3703]), hasta el modificado por Elston y Ellis ([7256]). Este último sistema de gradación, que se esquematiza en la Tabla 2, también conocido como el Sistema de Gradación de Nottingham (NGS o “Nottingham Grading System”), está recomendado por varias instituciones profesionales internacionales (World Health Organization [WHO], American Joint Committee on Cancer [AJCC], European Union [EU] and the Royal College of Pathologists [UKRCPath]) ([7276], [7606]) y ha demostrado una asociación significativa con la supervivencia de los pacientes con cáncer de mama invasor.

Tabla 2: Grado histológico del carcinoma de mama (Elston y Ellis, 1991) ([7256])

Formación tubular y/o acinar: (> 75% del tumor, 1 punto; 10-75%, 2 puntos; < 10%, 3 puntos)

Pleomorfismo nuclear: (núcleos uniformes en tamaño y forma, pequeños y cromatina dispersa, sin nucleolo prominente, 1 punto; núcleos más pleomórficos, con nucleolos y son de tamaño intermedio y variable, 2 puntos; núcleos grandes, de tamaños y formas diversas, con uno o más nucleolos prominentes y cromatina grosera, 3 puntos)

Número de mitosis: Localizar, revisando la preparación a bajo aumento (x100), las áreas mitóticamente más activas y contar solo las figuras de mitosis bien definidas, a gran aumento (campo de gran aumento –CGA– o x400); (0-9 mitosis/10 CGA (0.59 mm de diámetro de campo o 0.274 mm² de área de campo), 1 punto; 10-19 mitosis/10CGA, 2 puntos; ≥20 mitosis/10CGA, 3 puntos)

Grado final combinado: Resulta de sumar los puntos adjudicados a cada uno de los tres parámetros:

Si la suma final es 3-5 ⇒ grado 1 (carcinoma de bajo grado o bien diferenciado)

Si la suma final es 6-7 ⇒ grado 2 (carcinoma de grado intermedio o moderadamente diferenciado)

Si la suma final es 8-9 ⇒ grado 3 (carcinoma de alto grado o pobremente diferenciado)

Varios estudios han constatado que el Sistema de Gradación de Nottingham muestra un valor pronóstico similar al del estado de afectación ganglionar y mayor que al del tamaño tumoral ([7607], [7608]). Los carcinomas de alto grado o mal diferenciados se asocian con mayor frecuencia a metástasis ganglionares loco-regionales y a distancia, y a recurrencia tumoral, que los carcinomas de grado inferior. Además, el grado histológico se correlaciona con el intervalo libre de enfermedad y la supervivencia global, tanto en análisis univariados como multivariados ([4051], [4219], [4227], [4235], [4236], [7605], [7609], [7610]). Los tumores de alto grado histológico tienden a recidivar y metastatizar poco tiempo después del diagnóstico, mientras que los de bajo grado se asocian con pocos eventos tempranos y,

aquellos que evolucionan, lo suelen hacer tarde en el tiempo ([7605]). Por lo tanto, el grado histológico aporta una información pronóstica importante, así como una mayor comprensión de las estrategias terapéuticas del cáncer de mama, especialmente referente al posible beneficio de la quimioterapia adyuvante en algún subgrupo relevante ([7602]).

Cuando el carcinoma ductal infiltrante se asocia a patrones característicos de los carcinomas tipo especiales en más de la mitad del tumor pero menos del 90% del mismo, se describen como carcinomas mixtos. Asimismo, se reconocen otras variantes morfológicas como el carcinoma pleomórfico, el carcinoma con células gigantes osteoclasticas, con características coriocarcinomasas o melanóticas, menos frecuentes y algunas con efecto pronóstico adverso.

Los tipos histológicos específicos de carcinoma de mama son mucho menos frecuentes, muestran patrones morfológicos muy característicos y muchos de ellos comportan un valor pronóstico clínico determinado. El carcinoma lobulillar infiltrante representa del 3 al 5% de los carcinomas de mama invasores, aunque se ha detectado un aumento de la incidencia en mujeres de más de 50 años, que se podría atribuir al uso de terapia hormonal sustitutiva. Algunas series han descrito mayor frecuencia de multicentricidad y bilateralidad que en el carcinoma ductal infiltrante. La forma clásica está constituida por células uniformes pequeñas, no cohesivas, con baja actividad mitótica, que se disponen en fila india y con crecimiento targetoide alrededor de ductos y lobulillos, y se asocia con imágenes de carcinoma lobulillar “in situ” hasta en el 90% de los casos. Se reconocen otras variantes histológicas, como la alveolar, la pleomórfica, la sólida y la tubulo-lobulillar, que suelen asociarse a menor extensión ductular y multicentricidad y a peor pronóstico. El carcinoma lobulillar infiltrante es muy rico en receptores hormonales (en la práctica habitual, se considera que casi todos exhiben RE), especialmente en la variante clásica y alveolar. La ausencia de expresión de E-cadherina apoya el diagnóstico de carcinoma lobulillar infiltrante, aunque hasta el 15% de ellos pueden expresarla. El pronóstico del carcinoma lobulillar infiltrante es similar al del carcinoma ductal infiltrante, especialmente en los primeros 10 años después del diagnóstico, pero parece peor en la evolución a largo plazo. En cuanto al patrón metastásico, el carcinoma lobulillar infiltrante afecta con mayor frecuencia huesos, tracto gastro-intestinal, útero, meninges, ovarios y serosas, mientras que el carcinoma ductal infiltrante suele diseminarse a pulmón. El carcinoma tubular, se define como un carcinoma altamente diferenciado cuyas células se disponen en túbulos bien definidos, suele ser de pequeño tamaño, diagnosticarse en estadios iniciales y presentar un pronóstico extremadamente favorable. El carcinoma cribiforme exhibe un patrón cribiforme en >90% del

tumor y también se asocia a un pronóstico excelente y raramente a enfermedad ganglionar axilar o extramamaria. El carcinoma medular clásico es muy raro y, actualmente, se incluye dentro del grupo de carcinomas con características medulares, en el que se añaden el carcinoma medular atípico y un subgrupo de carcinoma invasores “tipo no especiales” [(7603)]. Se describe en mujeres relativamente jóvenes, muestra márgenes circunscritos y requiere, para el diagnóstico, cumplir una serie de criterios morfológicos estrictos, entre ellos un patrón de crecimiento sincitial, elevado grado nuclear y prominente infiltrado linfoplasmacitario, comportando mejor pronóstico que el carcinoma ductal infiltrante. Entre los carcinomas de mama productores de mucina, el carcinoma mucinoso o coloide se observa en mujeres de edad avanzada y suele presentar márgenes circunscritos y se caracteriza, histológicamente, por mostrar abundante mucina extracelular alrededor de las células tumorales invasivas y por una excelente evolución clínica a largo plazo. El cistadenocarcinoma mucinoso y el carcinoma de células en anillo de sello son menos frecuentes. Los tumores neuroendocrinos primarios de mama incluyen el tumor neuroendocrino bien diferenciado, el carcinoma de célula pequeña y el carcinoma de mama invasor con diferenciación neuroendocrina. El carcinoma papilar invasor, extremadamente raro, presenta un componente invasor con una morfología predominantemente papilar (>90%), y se asocia a comportamiento clínico favorable. El carcinoma micropapilar invasor adopta un patrón invasor micropapilar y se asocia a invasión vascular y a metástasis ganglionares, aunque no implica valor pronóstico independiente en cuanto a supervivencia. El carcinoma con diferenciación apocrina exhibe extenso cambio apocrino y su pronóstico viene determinado por los factores convencionales. El carcinoma metaplásico se considera un grupo de neoplasias que suelen comportar pronóstico adverso y que muestran áreas más o menos extensas de metaplasia no glandular, siendo la más frecuente la escamosa y la fusocelular, aunque pueden verse otros crecimientos heterólogos, como cartílago o hueso. Cuando el tumor está constituido exclusivamente por carcinoma escamoso, en ausencia de un primario extramamario, se describe el carcinoma escamoso primario de la mama. Otras formas específicas de carcinoma de mama, mucho menos frecuentes, son los tumores tipo glándula salival o de anejos cutáneos, el carcinoma adenoide quístico, el carcinoma mucoepidermoide, el carcinoma polimorfo, el carcinoma inflamatorio, así como el carcinoma secretor, el carcinoma oncócítico, el carcinoma sebáceo, el carcinoma rico en lípidos, el carcinoma de células claras rico en glucógeno, el carcinoma de células acinares, éstos últimos excepcionalmente raros.

Además del tipo y el grado histológico, existen otros parámetros microscópicos a los que se les atribuye valor pronóstico, como son el infiltrado inflamatorio en el estroma intra y peritumoral, la invasión vascular y linfática, la permeación perineural y la necrosis tumoral en el componente invasor. Así, la presencia de una prominente reacción linfoplasmocitaria se ha correlacionado, en algunos estudios, con un alto grado histológico ([4051], [4053], [4054]). Aunque algunos autores han notado un comportamiento adverso en los tumores con marcada respuesta linfoplasmocitaria ([4049], [4050], [4051], [4228]), otros no hallan diferencias significativas con los que la poseen leve ([4052]) y otros describen un efecto beneficioso ([3924]). Algunos estudios recogidos en la literatura sobre los subtipos de este infiltrado indican un predominio de linfocitos T supresores, lo que indicaría una respuesta inmune facilitadora del crecimiento y progresión tumoral ([4053], [4229]). La intensidad de la infiltración mastocitaria asociada al carcinoma no parece relacionada con el pronóstico del mismo ([3991]), aunque este hecho es discutible y algunos estudios asocian la presencia de abundantes mastocitos en el seno de un carcinoma con un pronóstico favorable ([3944]). La invasión linfática en la mama peritumoral es un factor pronóstico adverso independiente importante, particularmente en pacientes con carcinomas T1 (≤ 2 cm), ganglios linfáticos loco-regionales negativos (N0), tanto desde el punto de vista de supervivencia como de recurrencias, especialmente en mujeres no irradiadas ([4228], [4231], [4233], [4235], [4236], [4237]). En un 10 a un 15% de los casos no se acompaña de afectación ganglionar axilar ([4221]). La invasión vascular arterial o venosa varía entre diversas series entre el 4,7 al 47,2% de los carcinomas, en gran parte debido a la dificultad en identificar los vasos sanguíneos y a la metodología utilizada. El valor pronóstico está actualmente en discusión. Algunos estudios confieren peor pronóstico cuando se observa en pacientes con afectación axilar y otros únicamente en ausencia de metástasis ganglionares axilares ([4235]). En este contexto, también se ha analizado el papel de la densidad vascular en el tumor (angiogénesis) como favorecedor del crecimiento y la progresión tumoral ([4053], [4229], [4237], [4239]). La invasión perineural se halla en aproximadamente el 10% de los carcinomas invasores y no comporta valor pronóstico independiente ([4221]). La necrosis tumoral se asocia con un carcinoma pobremente diferenciado, así como con un comportamiento clínico adverso, que algunos estudios limitan dentro de los dos primeros años después del diagnóstico ([4049], [4051], [4225]). Por otro lado, el estroma que rodea a los carcinomas de mama es muy diverso en cuanto a calidad y cantidad, lo que puede condicionar la progresión tumoral ([4055]). Así, pueden observarse variantes de carcinoma extremadamente celulares, con escaso estroma, y otros, esclerosis, con marcada colagenización en el centro del tumor, que algunos autores han

reportado como un indicador pronóstico adverso independiente ([4049], [4220]). La elastosis estromal prominente no ha demostrado ser un factor pronóstico inequívoco e independiente ([4221]). Finalmente, la presencia de un extenso componente de carcinoma intraductal, especialmente de tipo comedo, asociado a carcinoma invasor incide en el riesgo de recidiva postmastectomía, particularmente cuando la indemnidad del margen de resección es desconocida ([4233], [4240]). No afecta, sin embargo, al riesgo de recurrencia en casos de mastectomía ([4233], [4221]). Su relación con la diseminación metastásica y con la supervivencia permanece incierta ([4051], [4240]).

Las lesiones proliferativas intraductales incluyen la hiperplasia ductal usual, la atipia del epitelio plano, la hiperplasia ductal atípica y el carcinoma ductal “in situ”. Diversos estudios clínicos, morfológicos y moleculares han demostrado que la hiperplasia ductal usual no es una lesión precursora del cáncer de mama, mientras que la atipia del epitelio plano y la hiperplasia ductal atípica se incluyen en el proceso de la carcinogénesis mamaria, concretamente en la de los carcinomas de bajo grado ([4410]). El carcinoma ductal “in situ”, más conocido como carcinoma intraductal, se considera la culminación del proceso de la carcinogénesis mamaria, previo a la invasión, que se inicia desde la proliferación del epitelio de los TDLUs, hasta que en algún momento sufre un cambio que le confiere carácter neoplásico. Este proceso progresivo y gradual, que se ha detallado en el apartado B.3.a, no es siempre constante. Así, el tiempo requerido es extremadamente variable e, indudablemente, el proceso puede frenarse e incluso revertir. Además, aunque el cambio se inicia en la TDLU, el calibre de los ductos involucrados en el momento del diagnóstico sugiere que los ductos extralobulillares se hallan afectados con mayor frecuencia. Es importante reconocer estas anomalías, frecuentemente asociadas a enfermedad fibroquística de la mama, ya que todas ellas se asocian con un riesgo aumentado de desarrollar carcinoma invasor. Este riesgo aumenta, con la progresión de la lesión y, así, es menor en los casos de atipia del epitelio plano y mayor en los casos de carcinoma intraductal. Los criterios utilizados para el diagnóstico de estas lesiones se basan principalmente en el grado de proliferación, arquitectura, atipia nuclear, celularidad y tamaño de la lesión. El carcinoma intraductal excluye específicamente la invasión del estroma mamario y también requiere gradación citohistológica basada en criterios nucleares y de patrón arquitectural y de ausencia o presencia de necrosis ([4241]). Así, se reconocen carcinomas intraductales de bajo grado, de grado intermedio y de alto grado, que a su vez forman parte de las diferentes vías de progresión del modelo de carcinogénesis mamaria ([7260]), tal como se ha comentado en el apartado B.3.a. Los patrones microscópicos clásicos (micropapilar, papilar, sólido, comedo y

cribiforme) pueden enmarcarse en los diferentes grados e implican un diferente riesgo de recurrencia. Los tumores con una lesión dominante no-invasiva pero con un foco microscópico de infiltración ≤ 1 mm se diagnostican como carcinomas microinvasores.

La neoplasia lobulillar incluye el carcinoma lobulillar “in situ” (LCIS o “lobular carcinoma in situ”) y la hiperplasia lobulillar atípica. Se ha descrito alta frecuencia de multicentricidad (hasta el 85% de los casos) y bilateralidad (hasta el 65% de los casos) y un riesgo aumentado de desarrollar un carcinoma invasor, particularmente de bajo grado, durante la vida de la paciente. El estudio microscópico revela la presencia de epitelio neoplásico llenando y expandiendo los acinos y ductos intralobulillares. Las células neoplásicas son pequeñas y redondas, con escaso citoplasma y núcleos “blandos”, sin nucléolo, aunque pueden observarse formas con mayor pleomorfismo celular y nuclear. Puede observarse extensión extralobulillar a ductos terminales en el 65 al 75% de los casos y esta afectación puede ser la única en las mujeres posmenopáusicas adoptando una posición subepitelial, atenuando el epitelio ductal.

Las neoplasias papilares intraductales incluyen el papiloma intraductal (central, periférico y atípico), el carcinoma papilar intraductal y el carcinoma papilar intraquístico. Los carcinomas de este grupo suelen exhibir características histológicas de bajo grado que se correlacionan con un pronóstico favorable.

Entre las proliferaciones epiteliales benignas destacan la adenosis, que se describe como un proceso proliferativo que afecta la TDLU, y sus variantes (adenosis esclerosante, adenosis apocrina, adenosis tubular, adenosis microglandular y adenosis adenomioepitelial); la cicatriz radial (cuyo potencial maligno viene determinado principalmente por el tipo de lesiones proliferativas ductales asociadas) y los adenomas. Entre estos últimos, el adenoma tubular es un tumor que se caracteriza histológicamente por una proliferación de ductos redondos u ovales, próximos entre sí, constituidos por una doble población de células, epiteliales y mioepiteliales. El adenoma lactante se diagnostica habitualmente durante la lactancia y suele desarrollarse sobre un adenoma tubular preexistente, con prominente cambio secretor. Otras variantes de adenoma, como el apocrino y el ductal, o el adenoma pleomórfico o tumor mixto de mama son menos frecuentes. El estudio a largo plazo de dichas lesiones no demuestra mayor riesgo de malignización. Dentro de este grupo de lesiones proliferativas, la adenosis microglandular, que histológicamente puede remedar un carcinoma infiltrante, se considera actualmente una lesión precursora del carcinoma de mama de alto grado, especialmente cuando se asocia a atipia citológica ([7258], [7259]). En el grupo de las

lesiones mioepiteliales, constituidas por una población mioepitelial de dominante a pura, se reconocen la mioepiteliosis, la adenosis adenomioepitelial, el adenomioepitelioma (benigno y maligno) y el mioepitelioma maligno. En la mama pueden aparecer tumores mesenquimales benignos y malignos similares a los que ocurren en los tejidos blandos (hemangiomas, miofibroblastomas, lipomas, fibromatosis, tumores neurales, rabdomiosarcomas, etc). Algunos, como el angiosarcoma, se observan con mayor frecuencia en la mama y pueden asociarse sincrónica o metacrónicamente a carcinoma. Se reconoce una forma de angiosarcoma posmastectomía (síndrome de Stewart-Treves), en áreas de linfedema crónico.

El fibroadenoma es el tumor más frecuente del grupo de las neoplasias mixtas de epitelio y tejido conectivo (tumores fibroepiteliales) y en las adolescentes y jóvenes. Macroscópicamente, se trata de lesiones redondas u ovals y de consistencia firme. Histológicamente, se reconoce un doble componente, epitelial y estromal, observándose ductos y lobulillos con diversos grados de hiperplasia epitelial y proliferación fibroblástica con depósito de colágena. Esta última se dispone normalmente alrededor de los primeros, distorsionándolos, adoptando predominantemente un patrón intracanalicular. Pueden observarse cambios fibroquísticos, en forma de metaplasia apocrina, adenosis esclerosante, etc., y, aunque se considera un tumor benigno, sin riesgo apreciable de malignización, se puede asociar, ocasionalmente, a carcinoma “in situ” e invasor, habitualmente lobulillar. Se describe una variante juvenil, descrito en niñas y jóvenes, que muestra un estroma hiper celular e hiperplasia epitelial, con diversos grados de atipia citológica. El tumor “phyllodes” es una neoplasia más o menos circunscrita constituida por un doble componente, epitelial y mesenquimal, con un crecimiento excesivo y una mayor celularidad del tejido fibroconectivo. Se asocia a actividad mitótica prominente en el estroma periductal. Se reconoce una forma benigna y otra maligna. Son tumores que requieren extirpación con márgenes quirúrgicos amplios, ya que tienden a recurrir. Las metástasis, en los casos malignos, son normalmente hematógenas y con frecuencia pulmonares. El hamartoma es un tumor benigno, bien delimitado, constituido por ductos y lobulillos y tejido fibroconectivo y fibroadiposo. Entre los tumores del pezón destacan la papilomatosis florida del pezón o adenoma del pezón y el adenoma siringomatoso como tumores benignos. La enfermedad de Paget del pezón se define como la presencia de células epiteliales glandulares malignas dentro del epitelio escamoso del pezón y se asocia, casi siempre, a carcinoma intraductal subyacente, con o sin componente infiltrante.

Finalmente, en la mama pueden aparecer linfomas, como enfermedad primaria o secundaria, siendo el más frecuente el linfoma difuso de células B grandes, y metástasis de

tumores primarios extramamarios. Entre los últimos, destacan el melanoma maligno, el rhabdomyosarcoma y carcinomas de ovario, riñón, gástricos, etc.

b. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR. CLASIFICACIÓN PRONÓSTICA Y PREDICTIVA DEL CÁNCER DE MAMA

Clásicamente, la detección de las anomalías moleculares en el cáncer de mama, en la práctica clínica, se ha realizado, con 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 y p185^{neu} o HER2, y menos establecidos, p53 y ki67 ([7594]). Como se ha comentado en el apartado B.1.a, los carcinomas de mama se clasifican en hormonodependientes y hormonoindependientes, según la expresión de RE y RP, con valor pronóstico y predictivo, especialmente con referencia a RE α . Por otro lado, se ha observado que el oncogén *c-erbB2* se halla amplificado en alrededor del 30% de los carcinomas de mama y que su determinación tiene importancia pronóstica y predictiva. En la práctica clínica, la sobreexpresión de la proteína p185^{neu}, codificada por *c-erbB2*, se suele determinar por técnicas inmunohistoquímicas cerradas (como el Herceptest o el Pathway) y la amplificación del gen por técnicas de hibridación “in situ”. La sobreexpresión de la proteína y/o la amplificación del gen se asocian a carcinomas de alto grado histológico, a extensión tumoral, a mayor afectación ganglionar axilar y a ausencia de expresión de receptores hormonales; y presenta valor pronóstico de supervivencia, especialmente en los casos con ganglios linfáticos positivos ([7272], [7274], [7594]). Además, su determinación permite seleccionar a las pacientes que podrían responder a trastuzumab, un anticuerpo monoclonal anti-HER2 desarrollado como droga anticancerosa, y a algunos agentes quimioterápicos como antraciclina y taxanos, y reconocer a las pacientes que serían resistentes a agentes alquilantes ([7268], [7274]). Respecto a *p53*, aproximadamente el 25% de los cánceres de mama muestran mutaciones en este gen que conllevan una proteína estable, pero inactiva, en las células tumorales. Estas mutaciones se asocian con un fenotipo tumoral más agresivo y una peor evolución y menor supervivencia ([7273]). Aunque las técnicas de inmunohistoquímica permiten detectar esta proteína mutada, el hecho de que el 20% de las mutaciones del gen no produzcan una proteína estable y de que, en algunas situaciones, la proteína no mutada pueda también acumularse, explica la poca aplicación de este estudio en la práctica, con finalidad pronóstica. En este sentido, los análisis de secuenciación del ADN para hallar las diferentes mutaciones del gen son más útiles [7594]). Finalmente, la positividad del ki67, que identifica

a las células en proliferación, se correlaciona con el grado de diferenciación tumoral, invasión vascular y metástasis en ganglios linfáticos ([7595]).

Las variaciones en los programas transcripcionales pueden explicar, en parte, la gran diversidad observada en la historia natural y respuesta al tratamiento del cáncer de mama y, a la vez, corresponderse con la diversidad fenotípica que exhiben estos tumores. En este sentido, estudios con “microarrays” de ADN complementario (ADNc) han permitido determinar grupos moleculares de cáncer de mama, según el patrón de genes expresados, e introducir una clasificación molecular de los cánceres de mama. Con esta premisa, Perou y cols. ([4593]) analizaron la expresión de 8102 genes en 65 muestras de tumores de mama de 42 pacientes, identificando un subgrupo intrínseco de 496 genes que mostraban variaciones significativas de expresión entre los diferentes tumores y que permitió agrupar las neoplasias en cuatro grupos según el perfil de expresión génica: el perfil luminal epitelial (que expresa RE y genes característicos de las células epiteliales luminares de la mama, con positividad para CK8/18 en el estudio inmunohistoquímico), el basal epitelial (que no expresa RE ni sobreexpresa HER2, y que en estudios inmunohistoquímicos muestra positividad para citoqueratinas basales CK5/6), el HER2 positivo o *c-erbB2* (con sobreexpresión del gen *c-erbB2* y niveles bajos de RE), y el normal “breast-like” (expresión de genes característicos de las células epiteliales basales y adiposas y baja expresión de genes característicos de las células epiteliales luminares). Posteriormente, esta clasificación molecular, por un lado, se ha refinado, delimitando más claramente los grupos moleculares y reconociéndose nuevos (en especial, los subtipos luminal A y B) y, por otro lado, se han establecido aplicaciones pronósticas y de respuesta al tratamiento relacionados con los subgrupos moleculares ([4594], [6897]). Finalmente, se han correlacionado estos hallazgos moleculares con los conocimientos morfológicos previos. Así, se reconocen, unánimemente, como grupos perfilados: el grupo luminal A (que expresa receptores de estrógenos y CK8/18; y que histológicamente suelen ser de bajo grado y que responden a hormonoterapia); el luminal B (con expresión de receptores de estrógenos, pero en niveles más bajos, que característicamente muestran expresión de genes relacionados con la proliferación celular, con expresión elevada de Ki67 en el estudio inmunohistoquímico, y expresión de CK8/18; y que histológicamente son de mayor grado, menos hormonosensibles y con peor pronóstico que el luminal A); y los grupos RE negativos, que se describen en carcinomas histológicamente mal diferenciados: el basal-“like” (con ausencia de sobreexpresión de HER2, con expresión de CK5/6 y 14, que responden a quimioterapia con antraciclinas y taxanos) y el HER2+ (con amplificación y sobreexpresión de *c-erbB2*, y que responden, además de a quimioterapia, a trastuzumab), 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”. Estos estudios moleculares han permitido demostrar que algunas de las entidades histológicas “especiales”, como el carcinoma lobulillar infiltrante, no se incluyen en un único subgrupo molecular, sino que se distribuyen en todos los subgrupos, mientras que otras, como el carcinoma micropapilar o el carcinoma medular, muestran un único perfil transcripcional específico ([7270], [7271], [7275]). Los patrones de expresión génica han permitido crear tests genómicos, comercialmente disponibles, con la intención de predecir la evolución clínica y la actitud terapéutica más adecuada en situaciones determinadas. Así, el MammaPrint (MammaPrint, Agendia) mide la expresión de 70 genes y calcula un “score” pronóstico que categoriza a los pacientes en grupos de bueno o pobre riesgo. Otro ensayo molecular, el Oncotype DX (Genomic Health) mide la expresión de RE y HER2, así como los transcritos regulados por RE y otros genes relacionados con proliferación, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa (RT-PCR). Los resultados permiten estratificar a los pacientes en un “score” que estima la probabilidad de recurrencia a los 10 años, y, concretamente, seleccionar a aquellas mujeres que se beneficiarían de un tratamiento quimioterápico adicional al tamoxifeno, en un determinado grupo de pacientes ([7267]). A pesar de todo esto, la estratificación de los subgrupos moleculares no es aún estable ni madura, observándose un no despreciable solapamiento entre ellos, por lo que su relevancia clínica es aún limitada. Por el momento, estudios más clásicos, como el estudio inmunohistoquímico y por hibridación “in situ” de HER2, el estatus de los receptores hormonales o la detección de alteraciones en *BRCA1*, son más útiles y manejables y tienen mayor valor predictivo en la toma de decisiones terapéuticas. De todos modos, y debido a las aportaciones que se han comentado, la contribución de la clasificación molecular del cáncer de mama es incuestionable y la integración de la firma genómica de los tumores de mama con las variables clínicopatológicas clásicas parece que pueden mejorar el manejo de estas pacientes. Además, conocer e incluir otras variables, como el “status” de mutación de genes o los cambios en el nº de copias de ADN de algunos genes, se requerirán para crear modelos pronósticos y grupos predictivos más robustos, especialmente en los cánceres de mama RE- ([7267], [7269]).

2. RATA

El análisis histopatológico de las lesiones de la glándula mamaria de la rata se inició con la introducción de los modelos experimentales que utilizaban estos animales para el estudio de la carcinogénesis mamaria. Desde entonces, se ha intentado comparar ambas

patologías para determinar las similitudes y diferencias y establecer una base sólida que permita extrapolar los resultados obtenidos en los modelos experimentales animales a la carcinogénesis humana ([1387], [1390]). Young y Hallowes fueron pioneros en estudiar extensamente las lesiones y tumores mamarios en dichos animales, describiendo las características macroscópicas y microscópicas, así como los hallazgos en el estudio ultraestructural ([1141]). Los tumores mamarios se observan como nódulos subcutáneos situados en las áreas de las glándulas mamarias, de consistencia firme, que protruyen bajo la piel, la estiran y pueden ulcerarla, dada la posición anatómica del animal. Al corte, son lobulados, blandos y rosados y pueden mostrar áreas de necrosis y hemorragia. Estos autores clasificaron las lesiones mamarias desarrolladas en estos animales en cuatro apartados: lesiones “tumor-like”, tumores fibroepiteliales benignos, tumores epiteliales malignos y tumores mesenquimales malignos. El primer grupo incluye la hiperplasia lobulillar o adenosis que se describe como un aumento en el nº, tamaño y complejidad de los lobulillos mamarios. El grupo de los tumores fibroepiteliales benignos incluye los adenomas, fibroadenomas y fibromas. Los adenomas están constituidos por una proliferación de los acinos del lobulillo que aumentan en nº pero no alteran su forma, recordando un lobulillo mamario mayor y con más acinos. Cuando el crecimiento glandular se acompaña de proliferación del tejido conectivo se consideran fibroadenomas. Macroscópicamente, éstos son más pálidos y de aspecto menos vascularizado que los carcinomas. Se reconocen dos tipos histológicos de fibroadenomas, los pericanaliculares y los intracaniculares, siendo los primeros los más frecuentes en la rata. Cuando el crecimiento del tejido fibroso es muy importante puede distorsionar marcadamente los acinos, que se observan separados por bandas de colágena, adoptando una apariencia muy similar a la de la adenosis esclerosante descrita en la mama humana. El tumor constituido por una proliferación de tejido fibroconectivo es un fibroma. En cuanto a los tumores epiteliales malignos, estos autores reconocen histológicamente varios tipos: adenocarcinoma, carcinoma papilar, carcinoma anaplásico, carcinoma cribiforme, comedocarcinoma y carcinoma escamoso. Así, los adenocarcinomas están constituidos por células epiteliales que configuran estructuras acinares alrededor de una luz, con formas y tamaños diversos, con patrón adenomatoso. Pueden presentar secreción luminal eosinofílica o basofílica o imágenes de debris celulares, o vacuolas de secreción que puede indicar secreción proteica o presencia de lípidos. A diferencia de las lesiones benignas en las que el epitelio muestra siempre una sola capa de células epiteliales y conserva la asociación con las células mioepiteliales y la membrana basal subyacente, los adenocarcinomas muestran normalmente más de una capa de células epiteliales alrededor de la luz. Los núcleos suelen ser grandes,

polimórficos, con nucléolos y figuras de mitosis. El crecimiento epitelial puede colapsar la luz y configurar estructuras sólidas. El estroma que rodea estas estructuras tumorales es escaso y contiene vasos capilares y células mononucleadas. Los carcinomas papilares muestran proyecciones papilares de células epiteliales dentro de espacios quísticos, con un eje fibroso central. Las papilas pueden ser muy complicadas y mostrar diversos puntos de unión con la pared de los quistes. El carcinoma anaplásico presenta escasa diferenciación histológica y está constituido por células muy pleomórficas. En el estudio realizado por estos autores se recoge raramente en forma pura. El carcinoma cribiforme está constituido por grupos de células que forman estructuras acinares redondas y pequeñas con secreción luminal, similar a una hiperplasia lobulillar pero con mayor variación del tamaño y forma de los espacios acinares y con aumento del grosor epitelial. El comedocarcinoma presenta grupos de células tumorales con necrosis central y normalmente se asocia con otras formas histológicas de carcinoma. El carcinoma escamoso se observa ocasionalmente en la glándula mamaria y podría nacer de focos de metaplasia escamosa presentes en algún quiste. Puede observarse cambio escamoso en los otros tipos histológicos, especialmente tras ulceración de la piel. En esta revisión se describe, además, el estroma que configura los tumores de la glándula mamaria, escaso en los adenomas, adenocarcinomas, carcinomas anaplásicos, cribiformes y comedocarcinomas, y más abundante y vascularizado en los carcinomas papilares. La infiltración celular puede ser muy densa por células mononucleadas como linfocitos, mastocitos y células plasmáticas, y puede incluir, además, eosinófilos, neutrófilos y macrófagos. Se introduce, asimismo, el concepto de diferenciación tumoral estructural y funcional. En cuanto a la diferenciación estructural, estos autores comentan la posibilidad de aplicar los grados histológicos de Bloom (1950), usados en aquel momento en los carcinomas de mama humanos, para graduar histológicamente los carcinomas de mama de la rata. En cuanto a la diferenciación funcional, y dado el carácter secretor de la glándula mamaria, ésta podría manifestarse en forma de vacuolas citoplasmáticas lipídicas, presentes en las células epiteliales de algunos tumores benignos o malignos. Además, análisis de inmunofluorescencia y ultraestructurales muestran la presencia de caseína en las células epiteliales de algunos de estos adenocarcinomas. Estos autores ya señalan las dificultades que puede comportar, en la glándula mamaria de la rata, el diagnóstico diferencial entre lesiones benignas y malignas. Por este motivo, definen unos criterios de malignidad que clasifican en macroscópicos, histológicos, citológicos y biológicos. Entre los macroscópicos y biológicos se señalan la consistencia, más elástica en los tumores benignos, la presencia de necrosis, la mayor velocidad de crecimiento y la capacidad de metástasis como marcadores de malignidad. Estos criterios, aunque útiles, no

son específicos, y, así, puede haber tumores malignos de crecimiento lento, variaciones en el ritmo de crecimiento, con enlentecimientos e incluso regresiones de algunos adenocarcinomas químicamente inducidos. Además, los carcinomas de rata, inducidos o espontáneos, raramente metastatizan. Entre los histológicos se destaca la uniformidad en la arquitectura acinar de los tumores benignos, a diferencia de la mayor variabilidad que exhiben los malignos. Así mismo, los tumores benignos o aquéllos malignos altamente diferenciados suelen crecer constituyendo estructuras lobulares con numerosos acinos, mientras que los malignos nacen de proliferaciones epiteliales dentro de los acinos y ductos (“epiteliosis”), que inician un crecimiento descontrolado que desemboca en carcinomas. Los tumores malignos, además, infiltran los tejidos adyacentes. Desde el punto de vista citológico, el pleomorfismo nuclear, el aumento de la relación núcleo/citoplasma y la elevada actividad mitótica se consideran característicos de los tumores malignos. En cuanto a los tumores mesenquimales malignos, los sarcomas, pueden aparecer “de novo” o ser secundarios a la transformación maligna del estroma de un fibroadenoma. Se describen, asimismo, ocasionales carcinosarcomas. Finalmente, estos autores al intentar correlacionar los hallazgos morfológicos descritos en la mama de la rata con los humanos constatan, entre otras, mayor agresividad histológica en los carcinomas de mama humanos que en los de la rata. Algunas formas observadas en la mama humana, como la enfermedad de Paget, no se describen en la rata. Asimismo, las metástasis, frecuentes en los carcinomas de mama humanos, son raras en la rata.

Altman y Goodman, al estudiar las enfermedades neoplásicas de la rata ([447]) señalan que los tumores mamarios son probablemente los tumores espontáneos más comunes de la rata, afectando principalmente a las hembras. La incidencia aumenta con la edad del animal, concretamente a partir de los 18 meses de vida. Desde el punto de vista histopatológico, la mayoría de los tumores mamarios espontáneos son fibroadenomas y menos del 10% corresponden a adenocarcinomas. También describen las características macroscópicas y microscópicas de estos tumores con resultados similares al estudio de Young y Hallowes. En relación a los carcinomas, se reconocen adenocarcinomas, carcinomas papilares, comedocarcinomas y carcinomas escamosos. Estos carcinomas pueden mostrar rasgos histopatológicos de elevado grado de malignidad, como anaplasia, pleomorfismo y elevado índice mitótico, conservando, sin embargo, márgenes bien circunscritos, moderada invasión y escasa tendencia a metastatizar. Estos autores matizan que las metástasis ocurren en fases avanzadas de la enfermedad y que el animal suele ser sacrificado antes de que esto suceda. Otra de las clasificaciones de los adenocarcinomas de mama desarrollados en la rata y, específicamente, en el modelo experimental inducido por DMBA en la rata es el descrito

por Peña y cols. ([3572]). Estos autores describen estos tumores con una cápsula de tejido conectivo que manda prolongaciones en el interior del tumor. El estroma es rico en colágeno, fibroblastos y células inflamatorias, entre las que señalan la presencia de mastocitos en diferentes estadios de degranulación. Reconocen cuatro tipos histológicos de adenocarcinoma: 1) El tipo A o mal diferenciado, caracterizado por mínima presencia de luces, adopta un patrón con extensas áreas sólida, en el que las células tumorales son inmaduras, con numerosas figuras de mitosis y de aspecto altamente maligno; 2) El tipo B o bien diferenciado, que corresponde al grupo más extenso de los tumores inducidos por DMBA, y que forma acinos con una o más capas de células epiteliales neoplásicas, generalmente cuboideas, con figuras de mitosis y de atipia inconstante; 3) El tipo C o atrófico, en el que los acinos aparecen dilatados y constituidos por una única capa de células aplanadas, con secreción intraluminal, y muy escasas figuras de mitosis; 4) El tipo D o secretor se caracteriza por contener numerosas vacuolas intracitoplasmáticas de distintos tamaños en las células epiteliales, positivas en tinciones para lípidos, con muy escasas figuras de mitosis y pocas células atípicas, y que suele aparecer en etapas avanzadas de las series experimentales.

Otros autores han aplicado técnicas complementarias en el diagnóstico de las lesiones mamarias de la rata para determinar la benignidad o malignidad de las mismas. Toth y cols. ([3964]), usando técnicas bioquímicas que permiten determinar la secreción tumoral (medición de la actividad de la lactodehidrogenasa y del patrón de los isoenzimas) y apoyándose en estudios histológicos, histoquímicos, citofotométricos y ultraestructurales complementarios, reconocen un grupo de tumores secretores como benignos y uno de no secretores como malignos, independientemente de la presencia o no de metástasis y del grado de diferenciación. Gijbels y cols. ([3624]) muestran una mayor frecuencia de aneuploidia entre los carcinomas de mama de la rata (34%), en relación con los tumores benignos (0%). Asimismo, estudian otros parámetros de malignidad, como el conteo mitótico y características morfométricas nucleares. Aunque algunos carcinomas muestran valores anormales en alguno o algunos de estos parámetros y permiten evaluar las lesiones de arquitectura poco definida y difíciles de catalogar histológicamente como benignas o malignas, cada parámetro analizado aisladamente es anormal en sólo una minoría de los tumores malignos. Estos autores concluyen que los carcinomas mamarios de la rata son, no sólo clínicamente sino también histológicamente, menos malignos que sus homólogos humanos. Asimismo, aconsejan estudios de citometría de flujo adicionales al estudio histológico de los tumores de mama de la rata para determinar con seguridad la benignidad o malignidad de éstos.

Russo y cols., en una revisión realizada en 1990 ([3503]) y actualizada posteriormente ([3963]), que recoge el trabajo llevado a cabo por su grupo sobre el estudio de la patología y patogénesis del cáncer de mama, señalan las similitudes histopatológicas entre los tumores de mama de la rata y los humanos, importante para validar los modelos experimentales que usan estos animales en el estudio de la carcinogénesis mamaria. Estos autores confirman que la mayoría de las lesiones mamarias halladas en la glándula mamaria de la rata se observan en la mama humana y realizan una clasificación de éstas paralela a la clasificación de la humana, que se exhibe en la Tabla 3. Así, se reconocen en la glándula mamaria de las ratas cuatro grandes grupos de lesiones mamarias: las neoplasias epiteliales, las neoplasias estromales, las neoplasias epiteliales-estromales y las lesiones no neoplásicas.

Tabla 3: Clasificación de los tumores de la glándula mamaria de la rata (J. Russo y I. Russo) ([3963])

1. Neoplasias epiteliales
 - a. Lesiones benignas
 - Papiloma intraductal
 - Cistadenoma papilar
 - Adenoma
 - tubular
 - lactante
 - b. Lesiones precancerosas: proliferaciones intraductales (IDPs)
 - c. Lesiones malignas
 - Carcinoma ductal “in situ”
 - Papilar
 - Sólido y cribiforme
 - Comedo
 - Carcinoma invasor
 - Papilar
 - Cribiforme
 - Comedo
 - Tubular
2. Neoplasias estromales
 - a. Benignas
 - Fibroma
 - b. Malignas
 - Fibrosarcoma
3. Neoplasias epiteliales-estromales
 - a. Benignas
 - Fibroadenoma
 - b. Malignas
 - Carcinosarcoma
4. Lesiones no-neoplásicas
 - Cambios quísticos
 - Ductal
 - Lobulillar

En el primer grupo se observan lesiones benignas, como los adenomas, que subclasifican en tubulares y lactantes y que se corresponden con los adenomas de la mama humana. Estas lesiones están constituidas por una proliferación de estructuras ductales o alveolares dispuestas en nidos sólidos separados por escaso tejido conectivo. Los alveolos

están revestidos por una sola capa de células epiteliales sin atipia. La variante lactante puede llegar a alcanzar 2 cm de diámetro y se caracteriza por la marcada secreción que distorsiona el contorno luminal de los acinos, en forma de vacuolas supranucleares y contenido intraluminal. Este grupo incluye además papilomas intraductales y cistadenomas papilares, variantes de una proliferación papilar intraductal con eje fibrovascular central y única capa de células epiteliales. Un segundo subgrupo, de lesiones precancerosas, incluye las proliferaciones intraductales (IDPs). Estas se observan como una proliferación epitelial en las estructuras ductales más distales, en forma de multiestratificación. Las células presentan núcleos grandes, con nucleolo prominente y cromatina granular. Estas lesiones se consideran la transición entre los TEBs normales y el carcinoma ductal “in situ”. Las IDPs evolucionan morfológicamente a carcinoma a través de proliferaciones micropapilares (patrón papilar), de aparición de pseudoluces (patrón cribiforme) o patrón de necrosis tipo comedo. Además, se objetiva progresivamente infiltrado linfoplasmocitario y reacción estromal en el tejido vecino.

En cuanto a las neoplasias epiteliales malignas, se introduce el término de carcinoma ductal en la glándula mamaria de la rata y se subclasifica en no invasor o “in situ” e invasor. Cada uno de éstos, se subclasifica a su vez, en cribiforme, comedo, sólido, papilar. En el grupo de los invasores se reconoce, además, el carcinoma tubular. Los carcinomas ductales “in situ” o intraductales, a diferencia del carcinoma invasor presentan una membrana basal bien definida. Los papilares se caracterizan por presentar proliferaciones epiteliales, formando papilas sin eje fibrovascular. Todos ellos están constituidos por células que muestran tamaño y forma uniformes. Los carcinomas invasores se caracterizan por invadir estructuras vecinas. Los carcinomas papilares se subclasifican en grado 1 y 2, según la intensidad de la proliferación epitelial y el pleomorfismo celular y presentan pocos ejes fibrovasculares. Los carcinomas cribiformes presentan diversos grados de pleomorfismo nuclear y se asocian a una intensa reacción desmoplásica del estroma. Los carcinomas comedo presentan las áreas típicas de necrosis localizada en el centro de estructuras ductales distendidas por una proliferación epitelial pleomórfica con áreas de colecciones de células invasivas. Se observan con frecuencia carcinomas que muestran áreas con diversos patrones (cribiforme, papilar y/o comedo). Los carcinomas tubulares están constituidos por estructuras tubulares bien definidas. Estos autores postulan que el probable origen de estos tumores son las yemas alveolares (ABs) o nacen sobre adenomas previos. Este origen difiere al del resto de carcinomas, que como se ha especificado anteriormente en el apartado B.3.b, se considera que nacen de estructuras más inmaduras. Los carcinomas ductales se desarrollan con mayor frecuencia en animales jóvenes y en las glándulas de localización torácica, mientras que los

tubulares aparecen mayoritariamente en las abdominales y en animales de edad avanzada ([3122]), probablemente debido al desarrollo glandular desigual que se observa entre ambas regiones, tal como se ha comentado anteriormente en el apartado A.2. En cuanto a las neoplasias estromales, se reconocen en la rata tumores benignos, como los fibromas, y malignos, como los fibrosarcomas. Los primeros son tumores bien circunscritos, no encapsulados y constituidos por una proliferación de fibroblastos dispuestos en haces entrecruzados y con abundante matriz colágena. La anaplasia nuclear y la prominente actividad mitótica en los fibroblastos caracterizan a los fibrosarcomas. En el grupo de las neoplasias epiteliales-estromales, se recogen, al igual que en la mama humana, fibroadenomas y carcinosarcomas. Los primeros se describen de forma similar a lo recogido anteriormente por Young y Hallowes ([1141]). Los segundos se consideran poco frecuentes y presentan características malignas en el componente epitelial y estromal. Dentro de las lesiones no neoplásicas, destacan aquéllas con cambio quístico, ductales y lobulillares, y las hiperplasias epiteliales. Las primeras son ductos con aumento de 10 a 100 veces del diámetro normal. Los quistes están revestidos por una sola capa de células epiteliales aplanadas y con células mioepiteliales basales. Muestran secreción eosinofílica central luminal, cristales de colesterol y focos de calcificación. Las de origen lobulillar se caracterizan por una disposición en racimo de uva con múltiples quistes pequeños que pueden confluir y formar otros de mayor tamaño. Estos autores también señalan que existen lesiones específicas de la mama humana no descritas en la rata, como la enfermedad de Paget del pezón, el carcinoma medular o el carcinoma lobulillar, “in situ” e infiltrante ([3503]). En cuanto al diagnóstico diferencial de las lesiones benignas y malignas, se reconocen unos criterios macroscópicos, histopatológicos y biológicos, similares a los descritos por Young y Hallowes. Entre los macroscópicos, la consistencia, normalmente elástica y más firme en los fibroadenomas que en los carcinomas; más blandos y con áreas de necrosis y hemorragia, y el crecimiento, más rápido en los tumores malignos. Estos criterios no son definitivos y presentan excepciones. Entre los histopatológicos, en primer lugar, la pérdida del patrón túbuloalveolar de la glándula mamaria normal en los tumores malignos, que se conserva, no obstante, en los fibroadenomas y adenomas. En segundo lugar, la presencia de células grandes, con pérdida de la relación núcleo-citoplasmática, con cromatina densa, elevado índice mitótico y nucléolo prominente en los carcinomas y la heterogeneidad celular en los tumores benignos, con presencia de los diferentes tipos de células epiteliales y de células mioepiteliales. Finalmente, la invasión del estroma y tejidos vecinos, como la grasa, la piel o el músculo adyacentes es el marcador definitivo de la malignidad de un tumor. Además, la reacción del estroma, en forma de

desmoplasia e infiltración inflamatoria, es más prominente en los tumores malignos que en los no invasores o benignos. Entre los biológicos, el criterio definitivo es la capacidad de metástasis ganglionar y a distancia de un tumor, normalmente a pulmones. Estos autores también constatan los escasos casos, recogidos en la literatura, de metástasis en los carcinomas de mama, espontáneos o inducidos, de estos animales. Este hecho podría atribuirse al corto periodo de vida que se les concede a estos animales en la mayoría de los trabajos experimentales, ya que sólo cuando el estudio se prolonga más de 2 años, esencialmente el tiempo vital estos animales, aparecen las metástasis. Probablemente, sería difícil mantener vivo al animal, con un tumor grande y necrótico, durante el período necesario para demostrar metástasis. También observan que el tipo histopatológico de carcinoma no parece afectar su capacidad metastásica, ya que las formas cribiforme, papilar y comedocarcinoma metastatizan con frecuencias similares. La transplantabilidad se considera otro criterio de malignidad en los tumores mamarios de la rata, así como la habilidad de las neoplasias en generar angiogénesis ([3963]). Estos autores también analizan la diferenciación celular estudiando la expresión por parte de las células epiteliales benignas y malignas, con técnicas de inmunohistoquímica, de proteínas expresadas por el epitelio mamario diferenciado, como son la caseína, la α -lactoalbúmina y la lactoferrina donde se distribuyen uniformemente, a diferencia del patrón de distribución más desorganizado e irregular de los carcinomas ([3503]).

Finalmente, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (“International Agency for Research in Cancer” –IARC/WHO-) ([7332]) publicó, en 1993, una clasificación internacional de los tumores de los roedores con el objetivo de mejorar la reproducibilidad de los resultados obtenidos en los modelos animales usados en el estudio de la carcinogénesis humana. En la parte correspondiente a la rata, los tumores de mama se incluyen dentro del sistema integumentario y se subclasifican en a) lesiones hiperplásicas y pre-neoplásicas, b) tumores benignos y c) tumores malignos. En el grupo de las lesiones hiperplásicas se reconocen la hiperplasia lobulillar, definida como un lobulillo agrandado por un aumento en el número y tamaño de los alveolos, y la hiperplasia focal con atipia, en la que se observa proliferación epitelial dentro de ductos y alveolos con atipia citológica. Dentro los tumores benignos se incluyen el adenoma -papilar, quístico, alveolar o tubular-, que normalmente se manifiesta como un nódulo macroscópico, bien delimitado del parénquima adyacente y que está constituido por estructuras epiteliales densas que distorsionan la arquitectura lobulillar; el fibroadenoma, que se subclasifica en adenomatoso y fibromatoso, según el componente tisular (epitelial o fibroso) predominante; y el tumor mixto benigno que contiene, además,

componente mesenquimal diferente al fibroso (cartilaginoso o hueso) y en el que se incluye el tipo adenolipoma. Finalmente, el adenocarcinoma, el adenocarcinoma sobre fibroadenoma y el tumor mixto maligno son los tumores que representan el grupo de neoplasias malignas. El adenocarcinoma implica pérdida del patrón alveololobulillar, pleomorfismo nuclear y evidente actividad mitótica, con o sin necrosis, hemorragia o ulceración. En esta clasificación ya se señala que el crecimiento infiltrativo es infrecuente. Se reconocen los subtipos alveolar, comedo, cribiforme, quístico, medular, papilar, escirro, sólido, de células fusocelulares y tubular. Mientras que se acepta que cualquier tumor adenomatoso con cambio carcinomatoso focal debe diagnosticarse como adenocarcinoma, el adenocarcinoma sobre fibroadenoma se considera una entidad aparte. En el tumor mixto maligno, al menos uno de los componentes tisulares debe mostrar características malignas, y cuando lo muestran los dos (epitelial y mesenquimal) se trata de un carcinosarcoma.

En resumen, la glándula mamaria de la rata puede desarrollar una gran parte de las lesiones observadas en la mama humana. No obstante, no existe en la literatura unanimidad en la nomenclatura, ni una clasificación que permita extrapolar fácilmente los resultados obtenidos en los estudios histopatológicos de trabajos que utilizan estos modelos animales, especialmente en lo que concierne a los adenocarcinomas.

F. ***c-Ha-ras* Y CÁNCER DE MAMA**

Una importante ruta de transmisión de señales activada por receptores de superficie es la ruta de Ras. Las proteínas Ras sirven como nodos de señalización activados en respuesta a diversos estímulos extracelulares. Una vez activa, dicha proteína interacciona con múltiples efectores que se encuentran por debajo en la vía intracelular (“downstream”) y que regulan las redes de señalización citoplasmáticas que controlan la expresión génica, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular. La superfamilia de genes *ras* comprende más de 150 miembros en humanos, que se agrupan en cinco familias: Ras, Rho, Rab, Ran y Arf ([4913], [5489]).

c-Ha-ras1 pertenece a la familia Ras que, al igual que el resto de los genes de la superfamilia, codifica pequeñas proteínas de unión a nucleótidos de guanina (GTP/GDP) asociadas a la membrana, guanina trifosfatasa (GTPasas), y con un papel fundamental en la transmisión de señales implicadas en el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación celular, en la organización del citoesqueleto y en el tráfico de la membrana ([2389], [2390], [2963], [4088]). En mamíferos, esta familia está formada por *c-Ha-ras1*, *c-Ki-ras2* y *N-ras*,

donde se expresan de forma ubicua, dando lugar a cuatro proteínas de 21 KDa: Ha-Ras, N-Ras, Ki-ras4A y Ki-ras4B, con un alto grado de homología de secuencia (>90%) que difiere sólo en el extremo carboxiterminal (C-terminal). Además, en humanos y murinos se han identificado los pseudogenes *c-Ha-ras2*, *c-Ki-ras1*, *N-ras1-2ep* y *N-ras6.1ep* ([1905]).

El gen *c-Ha-ras1* humano se localiza en el cromosoma 11 (11p15-p16) y el de rata, en el cromosoma 1 (1q41-q42). En humanos, los elementos reguladores de la expresión son una región de 350 pb en 5' y dos elementos en la región 3' (una región que contiene un número de repeticiones variables en tándem –VNTR- de un elemento de 28 pb y un exón alternativo conservado entre los exones III y IV) del gen ([2389], [2427]). El ARNm de este gen tiene un tamaño de 1.2-1.4 Kb. En células de ratón se ha descrito una especie adicional de 5 Kb ([2027]). En mamíferos, en general todos los genes *ras* se expresan a niveles bajos en prácticamente todos los tipos celulares. En ratón, *ras* se expresa durante todo el desarrollo embrionario y, en adultos, se expresa alguno de los tres genes *ras* en todos los tejidos ([2389], [2494]). En varios trabajos, se ha descrito que la regulación de *c-Ha-ras1* en la glándula mamaria normal está relacionada con el estado de diferenciación celular, siendo su expresión mínima durante el embarazo y la lactancia ([2494], [2859]).

c-Ha-ras1 codifica una proteína de 189 aminoácidos, caracterizada por unir nucleótidos guanina con una elevada afinidad y por tener actividad GTPasa intrínseca muy baja en relación con otras proteínas G. Todas las proteínas de la familia Ras se conocen como p21, ya que su peso molecular es de 21 KDa. Su función es clave en la transducción intracelular de señales actuando como interruptores moleculares, activos cuando están unidos a GTP e inactivos cuando están unidos a GDP. Estas proteínas se pueden dividir en tres regiones ([2389], [3439]): 1) un dominio catalítico donde se unen los nucleótidos guanina además de diversas proteínas reguladoras y se halla la actividad GTPasa, así como la región efectora que interviene en la interacción entre p21 y sus proteínas diana celulares o efectoras; 2) una región heterogénea responsable de la localización subcelular de la proteína; y 3) una caja CAAX en posición carboxiterminal que sufre modificaciones postraduccionales (farnesilaciones, carboximetilaciones,..., que comportan modificaciones lipídicas), que condicionan su hidrofobicidad y regulan el anclaje de la proteína a la cara interna de la membrana plasmática, lo que es necesario para su actividad biológica. Las proteínas Ras se localizan principalmente en la membrana plasmática, aunque también se encuentran en los endosomas, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi ([4138], [4304]).

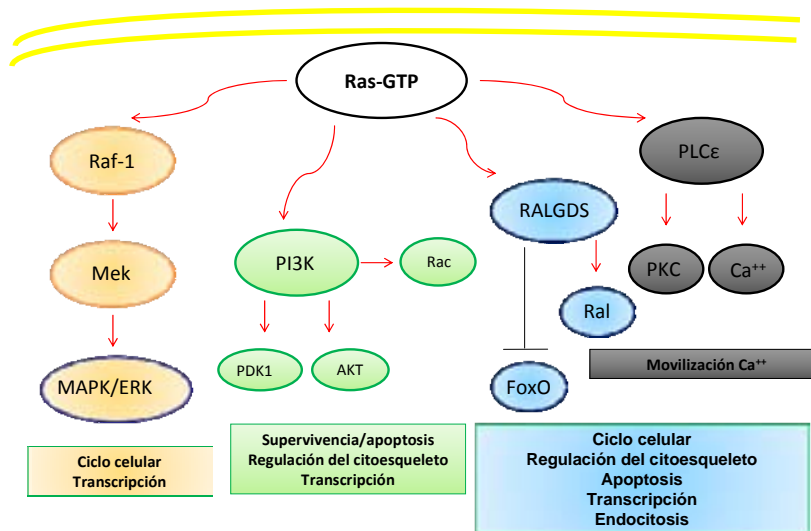
La regulación de Ras se realiza principalmente a nivel de la actividad proteica. Existen tres tipos de proteínas reguladoras de Ras: a) las que estimulan su baja actividad GTPasa intrínseca (GAP –“GTPase activating protein”- y neurofibromina – codificada por el gen supresor NF-1), b) las que regulan el intercambio de GDP por GTP (proteínas GDS –“guanine nucleotide dissociation stimulator”-, como SOS –“son of sevenless”), y c) las que inhiben la disociación de GDP (proteínas GDI –“guanine nucleotide dissociation inhibitor”-). La desregulación de la función de estas proteínas puede provocar la elevación constitutiva de Ras-GTP en ausencia de mutaciones activadoras ([1955], [2400], [3972]).

Cuando los factores de crecimiento actúan sobre su receptor de membrana, se obtiene un aumento rápido y transitorio de proteína Ras activada, ya sea por inhibición de la actividad GAP o por estimulación de la actividad GDS. La regulación negativa de GAP podría efectuarse, directamente, mediante su fosforilación por receptores con actividad tirosina quinasa activados por ligando o, indirectamente, fosforilando proteínas reguladoras asociadas a GAP como p62 y p190. La regulación positiva de GDS se llevaría a cabo mediante modificaciones postraduccionales, que activarían su función catalítica, o mediante la regulación de su asociación con la membrana. En este sentido, la proteína adaptadora de unión a receptor de factor de crecimiento Grb2 actúa como molécula adaptadora entre los receptores tirosina quinasa activados y Ras. A través de su unión a SOS, ésta se desplazaría hacia la membrana plasmática, quedando ligada al receptor, donde podría estimular la formación de Ras-GTP ([2402], [2705]).

Como se ha comentado, las proteínas Ras actúan como eje central de muchas vías de transducción desde las señales extracelulares hasta el núcleo, formando parte de una de las vías de señalización intracelular más importantes, la vía ErbB-Ras-MAPK. Su activación se observa en procesos de proliferación, diferenciación, senescencia o apoptosis, y es clave en la reorganización del citoesqueleto y mitogénesis ([2389], [2390], [2963], [4374]). La vía de la familia de las proteínas serina/treonina quinasas activadas por mitógenos (“mitogen-activated protein-kinase” o MAPKs) es uno de los sistemas efectores de Ras mejor caracterizados. Así, Ras activa el producto del protooncogén *raf-1*, que también es sustrato potencial de PKC (proteína quinasa C). Raf-1 activado, a su vez, activaría Mek (MAPK-“extracellular signal-regulated kinase” o ERK), activadora de las quinasas MAPK/ERK. Como resultado, se fosforilan y activan un gran número de sustratos, como los factores de transcripción Myc y Jun. Por otro lado, las MAPKs activarían otras quinasas críticas para la síntesis proteica, como la quinasa S6 ribosomal –RSK- y la proteína quinasa 2 activada por MAPK ([2402], [3439], [4146], [4551]). Además, Ras también puede activar otros efectores. Entre ellos, la subunidad

catalítica de la PI3K (fosfatidil inositol 3-quinasa), que conduce a la activación de quinasas de lípidos, como resultado de su translocación a la membrana y cambios conformacionales. En esta vía, PI3K controla la actividad de un gran número de enzimas "downstream" como PDK1 (quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositol) y AKT, también conocida como PKB. AKT/PKB muestra funciones antiapoptóticas por fosforilación a varias dianas que parecen ser parte de la vía de supervivencia inducida por Ras. Por otro lado, la activación de PI3K conduce a la estimulación de Rac, una proteína de la familia Rho, involucrada en la regulación del citoesqueleto de actina y regula la vía de factores de transcripción, como NF- κ B. Otro efector de Ras comprende 3 factores intercambiadores de las proteínas Ral: RALGDS (estimulador de la disociación de nucleótidos de guanina de Ral), RGL/RSB2 (genes relacionados RALGDS) y RGL2/RLF. A través de esta vía, Ras interviene en la regulación del ciclo celular y la apoptosis. Recientemente se sugirió que la PLC ϵ podría ser otro efector de Ras, que uniría Ras para la activación de PKC y la movilización de calcio ([4551]). Por lo tanto, las vías de señalización intracelular son muy complejas y proporcionan un mecanismo de regulación diferencial de la actividad mitogénica inducida por un amplio espectro de estímulos extracelulares que están relacionados con el estadio específico del ciclo celular. En la Figura 9 se esquematizan estos procesos.

Figura 9: Vías de señalización mediadas por Ras



En el proceso de señalización mediado por Ras es necesario considerar el hecho que sitúa las diferentes isoformas de Ras (p21Ha-, Ki-, y N-Ras) en distintas localizaciones de la membrana plasmática, como consecuencia de diferencias en los procesos de modificación postraduccional ([5439], [5760]). El resultado es que estas proteínas presentan distintas

secuencias de anclaje que las dirigen a diferentes dominios de la membrana, hecho que podría traducirse en la mediación de vías de señalización diferentes, desempeñando funciones específicas en la fisiología celular. De hecho, diversos trabajos sostienen que la microlocalización de las proteínas Ras en determinados microdominios de la membrana plasmática es crítica para la especificidad de la señalización ([5444]).

La familia Ras ha sido objeto de una exhaustiva investigación, debido en gran parte a su papel crítico en la oncogénesis humana ([3234], [7596]). La activación de cualquiera de los tres genes *ras*, principalmente por mutaciones puntuales, ha sido detectada, con diversas frecuencias, en una gran variedad de neoplasias humanas ([3971], [3973]). Estas mutaciones se asocian con alteraciones de aminoácidos que disminuyen la actividad GTPasa y/o aumentan la tasa de intercambio GDP/GTP, produciendo una cantidad anormalmente elevada de proteína activa, unida a GTP, en ausencia de señales extracelulares ([3234]). Los codones más mutados, 12, 13 y 61, corresponden al dominio catalítico de la proteína, concretamente a regiones esenciales para la interacción con GAP, a la cual se vuelve insensible ([1955], [3234]). También se han encontrado mutaciones activadoras en el exón no codificante y en el último intrón ([2394], [2627]). En total se encuentran alelos mutados de este gen en un 30% de los cánceres humanos, con un patrón de distribución de las diferentes isoformas y de las diversas sustituciones oncogénicas, en relación con los distintos tipos de cáncer. Así, las mutaciones de *c-Ki-ras* se detectan con mayor frecuencia en los carcinomas de páncreas, colon y pulmón, las de *c-Ha-ras* en tumores de piel y de cabeza y cuello, y las de *N-ras* en malignidades hematopoyéticas ([3234], [5484], [7596]). En el caso del cáncer de mama humano, la incidencia de mutaciones puntuales en *ras* es poco frecuente, menor al 5%, y, en estos casos, se correlaciona con peor pronóstico ([2626], [3234], [4088]). En cuanto a modelos animales experimentales, la inducción de la carcinogénesis mamaria con DMBA genera una transversión A→T (adenina→timina) en el codón 61 de *c-Ha-ras1* en el 8-21% de los tumores ([1808], [1809]). En los adenocarcinomas mamarios inducidos en rata con nitrosometilurea (NMU), un 86% de los tumores presentan la mutación en el codón 12 (transición G→A) ([571], [1937]). Además, se han descrito otras alteraciones como sobreexpresión, deleciones y amplificaciones de *c-Ha-ras1* ([1781], [2390], [2626]). En este sentido, diversos estudios han demostrado que más del 50% de los tumores mamarios malignos humanos y de los inducidos con DMBA en rata presentan niveles de ARNm o de proteína p21Ha-Ras moderadamente superiores a los hallados en la glándula mamaria normal ([2390], [4554], [5519]), mientras que los tumores mamarios benignos presentan niveles semejantes a los del tejido normal ([2858]), aunque su implicación en el desarrollo neoplásico está aún en debate. La sobreexpresión de Ras puede

producirse como consecuencia de la alteración de las secuencias reguladoras o por amplificación génica. En este sentido, por un lado, se han hallado en carcinomas mamarios humanos, sobreexpresión de *c-Ha-ras1* en ausencia de reorganizaciones genéticas o amplificación y de mutaciones puntuales del gen, lo que hace suponer que tal aumento de expresión pueda ser debido a mutaciones puntuales en genes celulares que regulan la expresión de dicho gen o en elementos reguladores cercanos al locus *c-Ha-ras1* ([2475]). Por otro lado, la amplificación significativa de los genes *ras* asociada a la sobreexpresión del producto protooncogénico se ha observado en diversos tumores humanos, aunque la incidencia no parece ser superior al 1% ([2390], [2397], [2398], [2399], [5519]).

Debido a que las mutaciones en el gen *ras* son poco frecuentes en el cáncer de mama, la atención se ha centrado en la “regulación al alta” de la actividad normal de la proteína, particularmente por receptores tirosina quinasa de factores de crecimiento que están sobreexpresados o desregulados en esta enfermedad ([4244]). En este tipo de cáncer, las tirosina quinasa regularían la activación de las proteínas Ras a través de diferentes mecanismos que incluyen el complejo Grb2-SOS y los otros modos de activar Ras, tal como se ha explicado en líneas anteriores de este mismo capítulo. Asimismo, alteraciones en el procesamiento postraduccional de Ras, descritas como modificaciones lipídicas de la proteína recién sintetizada, podrían afectar el anclaje de ésta a la membrana y el tráfico de la proteína recién sintetizada y procesada desde la superficie citosólica del retículo endoplásmico a la superficie interna de la membrana plasmática de la proteína y su localización en ésta, lo que representa un factor crítico para la actividad biológica de Ras ([4198], [4307], [4610]).

En última instancia, el fenotipo de la célula transformada por *ras* mutado o desregulado comporta promoción de la proliferación, inhibición de la apoptosis, alteración del metabolismo celular con aumento de la disponibilidad a glucosa, efecto proangiogénico, evasión a la respuesta inmune y adquisición de potencial metastásico, a través de diferentes vías y mecanismos, que han sido estudiados experimentalmente y que son secundarios a la alteración de las funciones de la proteína codificada por *ras* ([7596]). La manifestación del potencial oncogénico de Ras, a lo largo del proceso tumoral, parece depender del ambiente tisular, celular y subcelular, así como de la base genética de cada célula tumoral. El conocimiento de esta red compleja de vías de actuación permitirá, por un lado, avanzar en la comprensión de la oncogénesis mediada por Ras y, por otro lado, desarrollar nuevas estrategias terapéuticas diana dirigidas a este oncogén ([6390]).

INTRODUCCIÓN

II – OBJETIVOS



OBJETIVOS

Los trabajos reflejados en los artículos que se presentan en esta Tesis Doctoral se enmarcan dentro del proyecto de investigación sobre “Lípidos de la Dieta y Cáncer de Mama” que desarrolla el “Grup Multidisciplinari per a l’Estudi del Càncer de Mama” (GMECM). Las investigaciones se han realizado utilizando como soporte experimental el modelo de los tumores mamarios inducidos en ratas hembras Sprague-Dawley con el carcinógeno dimetilbenz(α)antraceno (DMBA). Dichos trabajos son el resultado de unos objetivos marcados previamente que se incluyen en los diferentes artículos que se presentan en este compendio de publicaciones. Estos objetivos son los siguientes:

a) Caracterizar histopatológicamente las lesiones de mama de las ratas del modelo experimental expuesto, en especial de los carcinomas, con una aproximación diferente a la realizada hasta el momento, aplicando la misma metodología que la usada en patología mamaria humana y que implica específicamente:

- Analizar diversos parámetros histopatológicos en los carcinomas de mama experimentales que permitan una descripción metódica y un análisis comparativo con los tumores de mama humanos.
- Proponer una clasificación histopatológica de las lesiones y tumores mamarios, extrapolable a la clasificación de los tumores de mama humanos.
- Crear un sistema de gradación de los carcinomas de mama, basado en el sistema humano y adaptado a las características de los tumores experimentales, que permita una evaluación objetiva de la agresividad morfológica

El objetivo final es validar y perfilar este modelo experimental de cáncer de mama, desde el punto de vista histopatológico, para el estudio del cáncer de mama humano.

Artículos:

Artículo 1: Histopathologic Characterization of Mammary Neoplastic Lesions Induced with 7, 12 Dimethylbenz(α)anthracene in the Rat: A Comparative Analysis with Human Breast Tumors. **I. Costa**, M. Solanas, E. Escrich. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 2002, 126: 915-927.

Artículo 2: High fat corn oil diet promotes the development of high histologic grade rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not. **I. Costa**, R. Moral, M. Solanas, E. Escrich. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2004, 86: 225-235.

- b) Estudiar el efecto de las dietas ricas en PUFA n-6 (aceite de maíz) y en aceite de oliva virgen extra (que incluye, además de MUFA n-9, numerosos componentes bioactivos) sobre la carcinogénesis mamaria experimental, en relación a una dieta normolipídica, desde una perspectiva histopatológica,** estableciendo las diferencias morfológicas entre los carcinomas de mama de los distintos grupos experimentales. En especial, se pretende evaluar las características relativas a la diferenciación y proliferación, analizando los parámetros histopatológicos mencionados en el objetivo previo, y aplicando el sistema de gradación histopatológica adaptado a estos tumores.

El objetivo final es estudiar si los efectos biológicos que un determinado factor nutricional, en este caso los lípidos de la dieta, ejercen sobre el cáncer de mama experimental pueden reflejarse en la morfología de éste y, en concreto, en el grado de agresividad histológica.

Artículos:

Artículo 2: High fat corn oil diet promotes the development of high histologic grade rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not. **I. Costa**, R. Moral, M. Solanas, E. Escrich. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2004, 86: 225-235.

Artículo 5: 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. M. Solanas, A. Hurtado, **I. Costa**, R. Moral, J.A. Menéndez, R. Colomer, E. Escrich. *International Journal of Oncology*, 2002, 21: 745-753.

- c) Analizar la influencia de las dietas hiperlipídicas sobre la expresión de p21Ha-Ras en los carcinomas de mama experimentales,** a través de la detección por inmunohistoquímica y de su evaluación cuantitativa y cualitativa. Los resultados se correlacionarán, por un lado, con la agresividad morfológica de los tumores y, por otro lado, con los descritos por el grupo de investigación en trabajos concomitantes que analizan diversas vías de señalización celulares efectoras de Ras.

El objetivo final es aportar una información molecular complementaria, a nivel morfológico, sobre los mecanismos de los efectos de los lípidos de la dieta en cáncer de mama.

Artículo:

Artículo 3: High corn oil and extra virgin olive oil diets and experimental mammary carcinogenesis: clinicopathological and immunohistochemical p21Ha-Ras expression

study. **I Costa**, R. Moral, M. Solanas, FJ. Andreu, MC. Ruiz de Villa, E. Escrich. *Virchows Archiv*, 2011, 458: 141-151.

d) Aplicar el análisis morfológico y el sistema de gradación descritos en diversos estudios llevados a cabo por el grupo investigador con el modelo experimental inducido con DMBA en la rata. En este apartado se incluyen algunos de los artículos presentados en este compendio de publicaciones como “artículos de aplicación e integración de los resultados del estudio morfológico” y que se basan en:

- Estudios clínicos, que analizan la influencia de estas dietas sobre el comportamiento clínico de los tumores de mama experimentales, a través de distintos parámetros clínicos.
- Estudios moleculares y biológicos, encaminados a descifrar el papel de algunos genes en el cáncer de mama y los mecanismos a través de los cuáles los lípidos de la dieta afectan esta neoplasia.

El objetivo final es demostrar que la aplicación de la aproximación morfológica descrita mejora y facilita el diagnóstico histológico de los tumores de mama de la rata. Por otra parte, que el sistema de gradación propuesto aporta información complementaria sobre la agresividad tumoral en los trabajos de investigación que utilizan este modelo experimental.

Artículos:

Artículo 4: Deregulated expression of the PCPH proto-oncogen in rat mammary tumors induced with 7,12-dimethylbenz(α)anthracene. M. Solanas, E. Escrich, A. Rouzaut, **I. Costa**, A. Martínez, V. Notario. *Molecular Carcinogenesis*, 2002, 33: 219-227.

Artículo 5: 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. M. Solanas, A. Hurtado, **I. Costa**, R. Moral, J.A. Menéndez, R. Colomer, E. Escrich. *International Journal of Oncology*, 2002, 21: 745-753.

Artículo 6: Identification of novel differentially expressed genes by the effect of a high-fat n-6 diet in experimental breast cancer. E. Escrich, R. Moral, G. García, **I. Costa**, J.A. Sánchez, M. Solanas. *Molecular Carcinogenesis*, 2004, 40: 73-78.

Artículo 9: Differential expression of H19 and vitamin D3 up-regulated protein 1 as a mechanism of the modulatory effects of high virgin olive oil and high corn oil diets on experimental mammary tumors. M. Solanas, R. Moral, G. García, L. Grau, E. Vela, R. Escrich, **I. Costa**, E. Escrich. *European Journal of Cancer Prevention*, 2009, 18: 153-161.

Artículo 10: Diets high in corn oil or extra-virgin olive oil provided from weaning advance sexual maturation and differentially modify susceptibility to mammary carcinogenesis in female rats. R. Moral, R. Escrich, M. Solanas, E. Vela, **I. Costa**, MC. Ruíz de Villa, E. Escrich. *Nutrition and Cancer*, 2011, 63: 410-420.

- e) **Integrar los resultados de los estudios morfológicos expuestos en el presente trabajo en el conocimiento de los mecanismos de los efectos de los lípidos de la dieta en el cáncer de mama.** En este apartado se incluyen los dos artículos restantes del grupo de “artículos de aplicación e integración de los resultados del estudio morfológico”, en los que se aporta una visión global de estos efectos.

Artículos:

Artículo 7: Are the olive oil and other dietary lipids related to cancer? Experimental evidence. E. Escrich, M. Solanas, R. Moral, **I. Costa**, L. Grau. *Clinical and Translational Oncology*, 2006, 8: 868-883.

Artículo 8: Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer. E. Escrich, R. Moral, L. Grau, **I. Costa**, M. Solanas. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2007, 51: 1279-1292.

III – RESULTADOS



ARTÍCULOS ESPECÍFICOS DEL ESTUDIO MORFOLÓGICO

ARTÍCULO 1: Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7, 12 dimethylbenz(α)anthracene in the rat: A comparative analysis with human breast tumors. **I. Costa**, M. Solanas, E. Escrich. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2002; 126: 915-927

ARTÍCULO 2: High fat corn oil diet promotes the development of high histologic grade rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not. **I. Costa**, R. Moral, M. Solanas, E. Escrich. *Breast Cancer Research and Treatment* 2004; 86: 225-235

ARTÍCULO 3: High corn oil and extra virgin olive oil diets and experimental mammary carcinogenesis: clinicopathological and immunohistochemical p21Ha-Ras expression study. **I Costa**, R. Moral, M. Solanas, FJ. Andreu, MC. Ruiz de Villa, E. Escrich. *Virchows Archiv* 2011; 458: 141-151

1. ARTÍCULO 1

Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7, 12 dimethylbenz(α)anthracene in the rat: A comparative analysis with human breast tumors.

I. Costa, M. Solanas, E. Escrich.

Archives of Pathology and Laboratory Medicine 2002; 126: 915-927

RESULTADOS

Histopathologic Characterization of Mammary Neoplastic Lesions Induced With 7,12 Dimethylbenz(α)anthracene in the Rat

A Comparative Analysis With Human Breast Tumors

Irmgard Costa, MD; Montserrat Solanas, PhD; Eduard Escrich, PhD

• **Context.**—The dimethylbenz(α)anthracene (DMBA) breast cancer model induced in the rat is used for the study of mammary carcinogenesis because it closely mimics human breast disease.

Objective.—To analyze the histopathologic features of mammary carcinomas induced in the DMBA experimental model, in a manner similar to that used in human pathology, to allow a comparative analysis between both systems.

Design.—Three experimental series of 20 animals were used. At 53 days of age, a single dose of 5 mg of DMBA per rat was given. Mammary tumors were collected when the rats were killed. Several histopathologic parameters were studied. For grading, the parameters described in the modified Scarff-Bloom-Richardson scheme were used, adapted to rat mammary tumors.

Results.—More than 50% of the carcinomas presented a pattern grade I, a nuclear grade I or II, and fewer than 10 mitoses/10 high-power fields ($P < .05$). Although the tumors were generally well differentiated, they showed a range of differentiation. More than 85% of carcinomas did not display tumoral necrosis ($P < .05$). This feature was observed mostly in high-grade carcinomas. There was no or scanty lymphoplasmacytic infiltration in more than 70%

of carcinomas ($P < .05$). The degree of infiltration increased with the histologic grade. Microcalcifications were found rarely ($P < .05$). The carcinomas exhibited a mixed structural pattern, most with a predominant cribriform pattern ($P < .05$). No or light (+) stromal response was seen in most cases ($P < .05$). Some carcinomas, especially when poorly differentiated, presented a desmoplastic reaction. Most carcinomas presented scanty mast cell infiltration ($P < .05$), no features of secretion ($P < .05$), and absence of microcribriform pattern ($P < .05$). These features were seen more often in low-grade carcinomas.

Conclusions.—Despite the presence of some structural differences, rat mammary adenocarcinomas and the most common human breast carcinomas share several morphologic similarities. Moreover, some features could be related to the aggressive behavior of the tumor. The analysis carried out in this study, similar to that done in human pathology, allows a more extensive understanding of mammary tumors in rats, as well as a more accurate use of this animal model, and has made it possible to develop an innovative classification of rat mammary lesions.

(*Arch Pathol Lab Med.* 2002;126:915–927)

Animal experimental systems are particularly useful for the study of human mammary carcinogenesis. Among these systems, chemically induced rat models are one of the most widely used for different reasons. First, the rat mammary gland shows a high susceptibility to developing neoplasms, and these neoplasms closely mimic human breast disease. Most of the experimental mammary tumors are malignant, specifically adenocarcinomas.

Carcinogenesis initiation occurs primarily, as does human breast cancer, from the terminal ductal-lobular unit.¹ Moreover, both lesions show molecular similarities. Comparative studies reveal the existence of estrogen and progesterone receptors with identical properties in both systems,² which explains tumor hormone dependence, and the presence of *ras* gene mutations in human and rat carcinomas.³ Second, the biological behavior of experimental mammary tumors has been characterized and it is well known that the age of the host at the time of carcinogen exposure, reproductive history, endocrinologic milieu and diet, among other factors influence tumor initiation and development.⁴ Finally, experimental conditions and requirements are well established and accepted.⁵ For these reasons, and in spite of the distance between the animal and human species, mammary cancer experimental models induced in the rat are the most widely used models for the study of human breast cancer.

The histopathologic analysis of human breast tumors is essential in defining the benign or malignant nature of

Accepted for publication March 5, 2002.

From the Department of Pathology, Hospital General de Granollers, Barcelona, Spain (Dr Costa); and the Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Medical Physiology Unit, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain (Drs Costa, Solanas, and Escrich).

Presented at the XX Spanish Congress of Pathology, Pamplona, Spain, July 1–5, 2001.

Reprints: Eduard Escrich, PhD, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Medical Physiology Unit, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain (e-mail: Eduard.Esrich@uab.es).

these tumors and in establishing the aggressiveness of malignant tumors. Moreover, some microscopic characters indicate, especially in the classic form (or not otherwise specified designation) of invasive ductal carcinoma, a clinical behavior and even a particular therapeutic approach. Since the introduction of these animal models in the study of mammary carcinogenesis, several reviews have been reported to establish the microscopic characteristics of these lesions and to provide a comparative basis with human disease.⁶⁻⁹ All of these reports agree that the most frequent breast carcinoma developed in the rat under the commonly used regimens for tumor induction exhibits cribriform and/or papillary areas. Moreover, they show a predominantly noninvasive or microinvasive growth pattern and a low incidence of metastasis. These morphologic and biological trends differ from those described in human invasive ductal carcinoma, which typically displays a ductal pattern, an infiltrative growth pattern, and metastatic behavior. Furthermore, all of these features contribute to the difficulty of making a clear distinction between benign and malignant rat mammary lesions. For this reason, Young and Hallows,⁶ in addition to classifying rat mammary tumors, defined several criteria of benignity and malignancy (adopted later by others¹) in order to accurately diagnose these lesions in the vast majority of cases.

The most successful rat mammary lesion classification used to date is the one established at a consensus conference held in Hanover, Germany, in 1987.¹ This classification correlates neoplastic and nonneoplastic lesions in the rat and in human mammary glands. It seems clear that most of the lesions found in the human breast have a counterpart in rat pathology. However, there are specific lesions in humans, such as Paget disease of the nipple, medullary carcinoma, and lobular carcinoma, that have not been reported in the rat.

The histologic differences between the most common human and rat mammary carcinomas and the ambiguous histologic expression of some experimental tumors have raised doubts concerning the relevance of the rat model for human carcinogenesis studies. Moreover, there has been a lack of investigations studying rat mammary tumorigenesis as it is studied in humans, probably because in most cases the histopathologic information necessary to carry out such experimental work is restricted to the diagnosis of tumor benignity or malignancy. Nevertheless, extending the morphologic analysis can be useful in several comparative studies between rat and mammary carcinogenesis, allowing at the same time a more extensive knowledge base and more accurate use of this animal model. For these reasons, it is the purpose of the present study to determine, first and from a new point of view, the histopathologic features of 7,12-dimethylbenz(α)anthracene (DMBA)-induced mammary tumors in the rat, and in particular those of carcinomas. Second, we will compare rat mammary lesions with their human counterparts to establish the similarities and differences between these systems and, thus, to assess the validity of the experimental model induced in rats with DMBA for the study of human mammary carcinogenesis from a histopathologic perspective. For these reasons, we have analyzed several selected histopathologic parameters of carcinomas, some from previous reviews and others from those normally used in the histopathologic analysis of human breast carcinoma. These parameters were then correlated with those that represent morphologic differentiation of carcinomas. Finally, using our results and data

from the available literature, mammary lesions in the rat were compared with those described in the human breast. Specifically, a comparative study was carried out in carcinomas developed in rats, regarding morphologic features observed in human invasive ductal carcinoma, the most common carcinoma in the human breast.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Model

We studied mammary gland lesions in female Sprague-Dawley rats (IFFA-CREDO-source ICO: OFA. SD [IOPS Caw]) from 3 consecutive experimental series consisting of 20 animals each (series A, B, and C). When the study began, the animals were 22 days old and had an average weight of 44.54 g (\pm 286 g), 53.0 g (\pm 602 g), and 42.1 g (\pm 6.4 g) in series A, B, and C, respectively. The experiment began when the animals were weaned. After weaning, the animals were fed a semisynthetic diet, designed and described previously,^{10,11} that had a normal composition for the rat (casein, 18%; dextrose, 67.9%; corn oil, 3%; cellulose, 5%; salt mixture, 5.9%; and vitamin mixture, 0.24%). Following the method of Huggins et al,¹² at 53 days of age, all the rats were given a single intragastric dose of 5 mg 7,12-dimethylbenz(α)anthracene (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) per rat in 1 mL corn oil. All animals were provided with fresh diet and tap water ad libitum throughout the experiment, and environmental conditions were continuously automatically regulated, as described previously.¹¹ The animals were housed 3 or 4 to a cage, with a base surface of 1000 cm² in a well-ventilated room, and all were submitted to a daily rhythm of 12 hours with artificial light (7:30 AM to 7:30 PM in A and 8:00 AM to 8:00 PM in B and C) and 12 hours of darkness. The temperature was kept at 24 \pm 1°C in A and at 22 \pm 2°C in B and C. The care of the animals and the facility were in accordance with institutional guidelines. These regulations follow the current legislation applicable in our country to animals used for experimentation and other scientific purposes. The organization and infrastructure of the animal facilities were set up in accordance with the Good Laboratory Practices. Finally, the animals were humanely killed at an average age of 254, 278, and 261 days (201, 225, and 208 days after DMBA administration) in series A, B, and C, respectively. The rats were killed by decapitation, and a complete postmortem examination was carried out.

Histopathology

Macroscopic mammary lesions were collected and partially or totally fixed in 10% buffered formalin and were embedded in paraffin using conventional automated systems. The blocks were cut to obtain 4- to 5- μ m-thick sections and were stained with hematoxylin-eosin. The slides were examined and scored by a pathologist.

Epithelial lesions were classified as neoplastic or nonneoplastic and benign or malignant, applying histopathologic criteria delineated previously by Young and Hallows.⁶ Among these criteria, the most useful are analysis of the loss or preservation of the tubuloalveolar pattern of the normal mammary gland, the cell population, the presence or absence of invasion of the stroma and neighboring tissues, and cytologic features such as nuclear enlargement or number of mitoses. In the present study, we applied to carcinomas several histopathologic parameters, which we divided into 2 groups. The first group includes those parameters developed in the study of human mammary pathology. We identified histologic grade using 3 morphologic features, namely, tubule formation, nuclear pleomorphism, and number of mitoses, as markers of morphologic differentiation, according to the Scarff-Bloom-Richardson scheme.¹³ These parameters were then adapted to the rat mammary tumors. Thus, tubule formation or pattern grade was classified in 3 grades (I, II, III), depending on the extent of solid areas. Grade I was assigned to carcinomas that displayed less than 25% solid areas, grade II to those with 25% to 75% solid areas, and grade III to carcinomas with more than 75%

of tumor cells arranged in solid structures. Nuclear pleomorphism or nuclear grade included, as in human mammary carcinoma, 3 categories (I, II, III), depending on the size and shape of nuclei, chromatin pattern, and the presence or absence of nucleoli. Finally, we classified tumor mitotic activity in 3 groups, according to the number of mitoses reported in 10 high-power fields (HPF), at $\times 400$ magnification, in the histologically most malignant areas and in cellular areas. Carcinomas with fewer than 10 mitoses/10 HPF belonged to group I, those with 10 to 19 mitoses/10 HPF were assigned to group II, and carcinomas with 20 or more mitoses/10 HPF corresponded to group III, as described in the Scarff-Bloom-Richardson method. Group I was subclassified, in its turn, into 3 categories: (a) carcinomas with 3 or fewer mitoses, (b) carcinomas with 4 to 6 mitoses, and (c) carcinomas with 7 to 9 mitoses. Changes and adaptations from the human histologic grading system will be discussed later. We also analyzed tumoral necrosis. For histopathologic study, preserved areas were removed from the tumor, and the analysis of this attribute was limited to microscopic study. Tumoral necrosis was evaluated as absent, focal, or extensive. The presence or absence of inflammatory cell infiltration was reported. When present, it was described as light (scarce areas with light cell density), moderate (several areas with light to moderate cell density), and pronounced (several foci with prominent cell density). Finally, we collected the carcinomas with microcalcifications.

The second group of histologic parameters takes in selected parameters based on morphologic features previously described in rat mammary carcinomas. We studied the structural pattern, which is defined most commonly as cribriform and/or papillary. The first pattern is characterized by the presence of glandlike structures surrounding a lumen that may show great diversity of size and shape. The epithelium lining the acini varies from columnar to flattened or cuboidal, and from 1 to several layers thick, and it shows criteria of anaplasia. Stroma within the cell masses is usually scanty or absent. The second pattern displays fibrous intraluminal papilliform projections lined by 1 to several layers of atypical epithelial cells. Papillae are often very complicated and have neoplastic acinar structures. A representative picture of each pattern is shown in Figure 1. We analyzed this parameter, evaluating the proportion of each pattern. Thus, we defined 3 categories according to the proportion of the cribriform pattern: (a) carcinomas with a prevailing cribriform pattern (100% to 70% of the tumor), (b) carcinomas displaying similar rates between both patterns (60% to 40% of the tumor with a cribriform pattern), and (c) carcinomas showing a predominant papillary pattern (30% to 0% of the tumor with a cribriform pattern). Stromal response was evaluated, although most rat mammary carcinomas are known to be nodular and very clearly bounded. When absent, it was classified as negative (-). When occasional prominent fibroblasts were seen around neoplastic nests, it was classified as positive (+). Some carcinomas displayed a significant cellular and stromal reaction that was classified as ++ or +++, depending on the extent and intensity of the response, the latter when a truly desmoplastic reaction was present. We also studied the intensity of mast cell infiltration, a typical phenomenon in the rat mammary gland. Mast cells are present in tumor connective tissue in the substance or at the periphery of carcinomas and are easily identified by their content of cytoplasmic granules. The mast cell population was estimated on an arbitrary scale. When scattered cells were present in occasional high-power fields of the carcinoma, a + category was assigned. When mast cells were present in most of the tumor, a ++ or +++ category was assigned, depending on cell density. Secretion in carcinomas was evaluated as a feature of functional differentiation. The neoplastic cells can be seen to contain light-colored intracytoplasmic vacuoles of different sizes, previously described as lipid droplets. When present, the secretion may occur as a localized focus (focal) or can almost obscure the histologic pattern of the epithelium (widespread). Finally, we analyzed the presence or absence of a prevailing microcribriform pattern, defined as regular and cohesive, small, rounded acinar structures.

Statistical Evaluation

Statistical analysis of the qualitative data was carried out using a χ^2 test. The level of significance was set at $P < .05$.

RESULTS

Neoplastic and nonneoplastic lesions that developed in the rat mammary glands are depicted in Table 1. Most of the lesions were tumoral (83.8%, 87.1%, and 92.1% in A, B, and C, respectively), and among them, the vast majority were carcinomas.

Nineteen carcinomas from series A, 32 from B, and 69 from C were submitted for histopathologic analysis, the data for which are shown in Tables 2 and 3. Similar results were found for each parameter between the 3 experimental series. Only nuclear grade and stromal reaction presented a statistically different rate distribution between series A, B, and C.

Most of the carcinomas showed a pattern grade I (63.2%, 50%, and 60.9% in A, B, and C, respectively), followed by grade II ($P < .05$). Only 5.3% of carcinomas in A, 6.3% in B, and 17.4% in C were grade III. Carcinomas with a high pattern grade showed large, solid-looking areas (Figure 2, A). With reference to nuclear grade, while carcinomas from series A and C were mostly grade I (63.2% and 53.6%, respectively; $P < .05$), those from B were grade II (62.5%; $P < .05$). Nevertheless, there was a minority of grade III carcinomas in the 3 series (5.3%, 9.4%, and 17.4% in A, B, and C, respectively). With respect to tumor mitotic activity, the majority of the carcinomas belonged to the group of < 10 mitoses/10 HPF (89.5%, 100%, and 86.9% in A, B and C, respectively) and, specifically, 3 or fewer (73.7%, 65.6%, and 71% in A, B, and C, respectively; $P < .05$). Only 10.5% of carcinomas from A and 13% from C showed 10 or more mitoses/10 HPF. When tumoral necrosis was analyzed, most carcinomas did not present this feature (89.5% in A, 90.6% in B, and 85.5% in C; $P < .05$). When present and especially when extensive, it gave the tumor a comedocarcinoma pattern (Figure 2, B). Inflammatory cell infiltration was absent or light in most carcinomas. Thus, in A, 42.1% of carcinomas showed no inflammatory cell infiltration, and when present it was usually light (31.6%), whereas in B and C, 40.6% and 43.5% of carcinomas, respectively, presented scarce infiltration. Although there was a trend toward low inflammatory cell infiltration in the 3 series, only in C were the differences statistically significant ($P < .05$). The inflammatory cells were usually lymphocytes and plasma cells, although occasionally they were composed of eosinophils and polymorphonuclear leukocytes. Microcalcifications were rarely found. No carcinoma from A, and only 3 (9.4%) and 4 (5.8%) from B and C, respectively, presented this feature ($P < .05$).

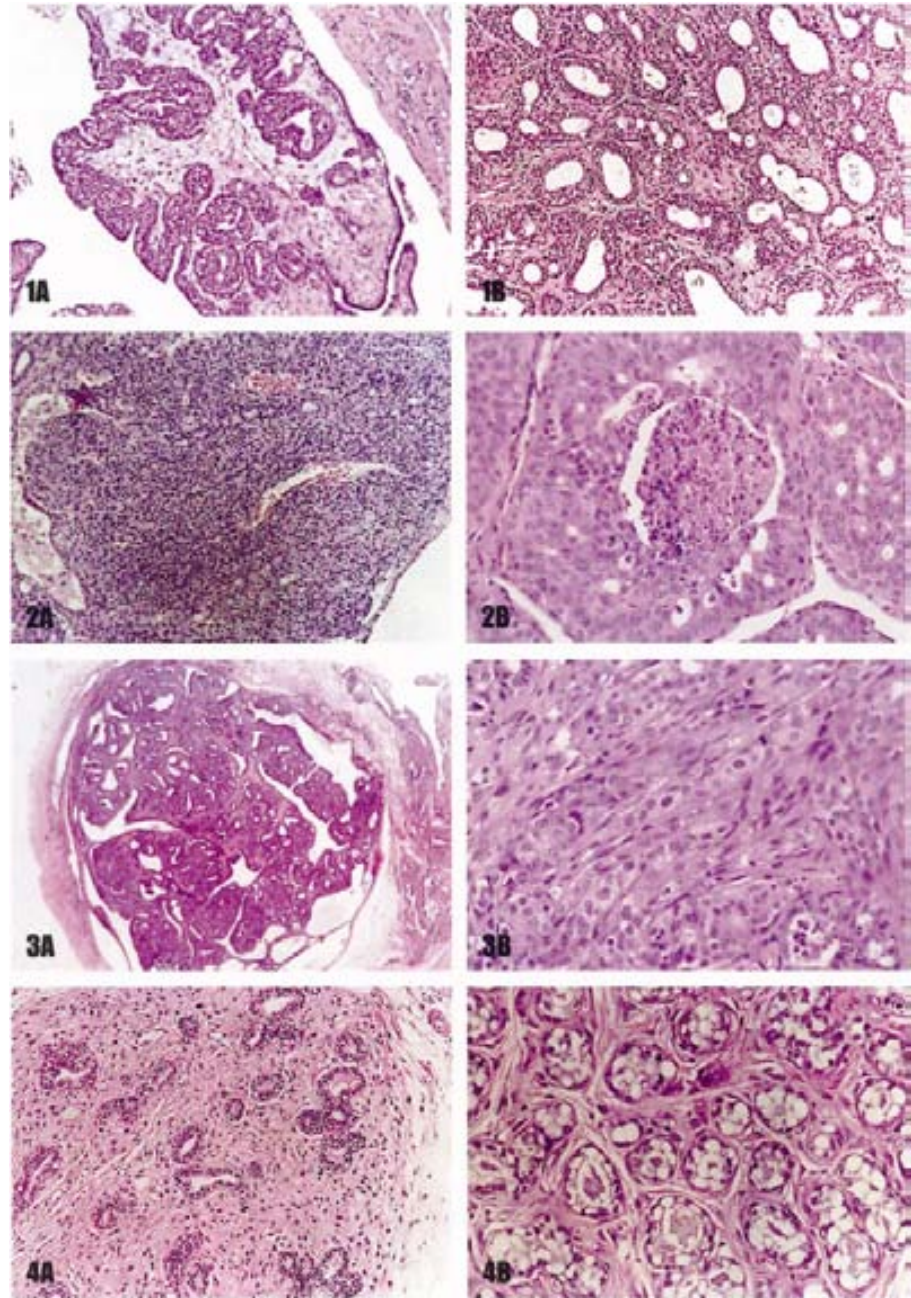
Most of the carcinomas exhibited a mixed structural pattern, as defined previously, with a predominant cribriform pattern in series B and C ($P < .05$) or in a similar amount with papillary pattern in series A ($P < .05$), displaying a complex histologic appearance. Carcinomas with a predominant papillary pattern were not seen in this study. However, several carcinomas presented a pure cribriform pattern (31.6%, 15.6%, and 33.3% in A, B, and C, respectively). Neither a lobular pattern nor a colloid pattern was found in experimental carcinomas. Stromal response was negative or light (+) in most cases in the 3 series ($P < .05$). Accordingly, 68.4%, 62.5%, and 52.2% of carcinomas in series A, B, and C, respectively, showed a

Figure 1. Carcinoma of the rat mammary gland displaying a papillary (A) and cribriform (B) pattern (hematoxylin-eosin, original magnification $\times 100$).

Figure 2. Carcinoma of the rat mammary gland with extensive solid areas (A) (hematoxylin-eosin, original magnification $\times 100$) and tumoral necrosis exhibiting the appearance of a comedocarcinoma (B) (hematoxylin-eosin, original magnification $\times 200$).

Figure 3. A, Carcinoma of the rat mammary gland showing a well-circumscribed and nodular appearance (hematoxylin-eosin, original magnification $\times 20$). B, Infiltrative pattern with intense desmoplastic reaction (hematoxylin-eosin, original magnification $\times 400$).

Figure 4. A, Fibroadenoma of the rat mammary gland with a pericanalicular growth pattern (hematoxylin-eosin, original magnification $\times 100$). B, Adenoma of the rat mammary gland. Closely apposed alveolar or tubular structures are separated by small amounts of connective tissue (hematoxylin-eosin, original magnification $\times 200$).



slight reaction (+). This feature was evident (++ or +++) in 15.8% of carcinomas from A, 37.5% from B, and 18.8% from C. Thus, although most carcinomas appeared nodular, well circumscribed, and very clearly bounded (Figure 3, A), some of them demonstrated invasion of neighboring tissues, with intense stromal desmoplastic reaction and tumor tubule formation similar to human invasive ductal carcinoma (Figure 3, B). In some cases, tumor edges were less defined and carcinomas could adopt a stellate or spiculated gross configuration. Rarely, carcinomas may arise in benign lesions, usually as histologically epithelial malignant foci without stromal reaction, or they may display a multifocal appearance, defined as nodular microscopic nests of carcinoma in a nontumoral and fibrotic stromal background. Unlike benign lesions, most carcinomas presented scanty (+) mast cell infiltration in the 3 series (68.4% in A, 65.6% in B, and 66.7% in C), and only

5.3%, 6.3%, and 17.4% of carcinomas from A, B, and C, respectively, displayed pronounced (+++) mast cell infiltration ($P < .05$). As to secretion, most carcinomas did not show intracytoplasmic lipid droplets ($P < .05$). Although almost 40% of carcinomas from series A and B and 26.1% from C presented this feature, it was widespread in a minority of cases. Finally, a prevailing microcribriform pattern was found in less than one third of carcinomas in the 3 series ($P < .05$).

On correlating these histopathologic parameters, it was evident that most carcinomas exhibited identical or close nuclear and pattern grades ($P < .05$) (Table 4). Moreover, carcinomas with high nuclear and pattern grades displayed higher proliferative activity than well-differentiated carcinomas. This fact is more obvious when analyzing carcinomas from series C (Table 5). Thus, of 12 carcinomas, 9 (75%) pattern grade III carcinomas and 8 (66.7%)

	Series A	Series B	Series C
Total No. of Lesions	37	62	101
Nontumoral, No.	6	8	8
Lobular hyperplasia	3	4	7
Lobular hyperplasia and fibrosis	1	0	0
Epidermal cyst	1	0	0
Ductal cyst	0	4	0
Fatty metaplasia	1	0	0
Fibrosis	0	0	1
Tumoral, No. (% macroscopic lesions)	31 (83.8)	54 (87.1)	93 (92.1)
Benign, No.	9	19	23
Fibroadenoma	8	10	13
Adenoma	0	6	7
Fibroma	0	2	1
Lipoma	1	1	0
Papilloma	0	0	2
Malignant, No. (% tumoral lesions)	22 (71)	35 (64.8)	70 (75.3)
Adenocarcinoma	22	35	69
Sarcoma	0	0	1

	Series A	Series B	Series C
Pattern grade, No. (%)			
I	12 (63.2)	16 (50)	42 (60.9)
II	6 (31.6)	14 (43.7)	15 (21.7)
III	1 (5.3)	2 (6.3)	12 (17.4)
Nuclear grade, No. (%)			
I	12 (63.2)	9 (28.1)	37 (53.6)
II	6 (31.6)	20 (62.5)	20 (29)
III	1 (5.3)	3 (9.4)	12 (17.4)
No. of mitoses/10 HPF,* No. (%)			
<10	17 (89.5)	32 (100)	60 (86.9)
≤3	14 (73.7)	21 (65.6)	49 (71)
4–6	3 (15.8)	10 (31.3)	9 (13)
7–9	0	1 (3.1)	2 (2.9)
10–19	2 (10.5)	0	7 (10.1)
≥20	0	0	2 (2.9)
Tumoral necrosis, No. (%)			
Absent	17 (89.5)	29 (90.6)	59 (85.5)
Focal	2 (10.5)	1 (3.1)	3 (4.3)
Extensive	0	2 (6.3)	7 (10.1)
Inflammatory cell infiltration, No. (%)			
Absent	8 (42.1)	10 (31.3)	23 (33.3)
Light	6 (31.6)	13 (40.6)	30 (43.5)
Moderate	2 (10.5)	4 (12.5)	9 (13)
Pronounced	3 (15.8)	5 (15.6)	7 (10.1)
Microcalcifications, No. (%)			
Absent	19 (100)	29 (90.6)	65 (94.2)
Present	0	3 (9.4)	4 (5.8)

* HPF indicates high-power field.

nuclear grade III carcinomas showed 10 or more mitoses/10 HPF, while all pattern or nuclear grade I carcinomas presented fewer than 10 mitoses/10 HPF.

Tumoral necrosis was observed mostly in carcinomas with high pattern or nuclear grades (Table 6). The increase in pattern and nuclear grade, as shown in series B and C, is associated with an increase in the rate of carcinomas with tumoral necrosis. The only carcinoma with pattern and nuclear grade III that developed in series A exhibited,

	Series A	Series B	Series C
Structural pattern (% cribriform pattern), No. (%)			
100%–70%	9 (47.3)	19 (59.4)	50 (72.5)
60%–40%	10 (52.7)	13 (40.6)	19 (27.5)
30%–0%	0	0	0
Stromal response, No. (%)			
–	3 (15.8)	0	20 (29)
+	13 (68.4)	20 (62.5)	36 (52.2)
++	3 (15.8)	10 (31.3)	8 (11.6)
+++	0	2 (6.2)	5 (7.2)
Mast cell infiltration, No. (%)			
+	13 (68.4)	21 (65.6)	46 (66.7)
++	5 (26.3)	9 (28.1)	11 (15.9)
+++	1 (5.3)	2 (6.3)	12 (17.4)
Secretion, No. (%)			
Absent	13 (68.4)	20 (62.5)	51 (73.9)
Focal	6 (31.6)	7 (21.9)	10 (14.5)
Widespread	0	5 (15.6)	8 (11.6)
Microcribriform pattern, No. (%)			
Absent	16 (84.2)	28 (87.5)	64 (92.7)
Present	3 (15.8)	4 (12.5)	5 (7.2)

* See text for description of parameter classifications.

although focally, tumoral necrosis. Occasional grade I carcinomas displayed tumoral necrosis (6.3% and 2.4% of pattern grade I carcinomas from B and C, respectively, and 8.3% of nuclear grade I carcinomas from A).

When correlating morphologic differentiation and inflammatory cell infiltration, poorly differentiated carcinomas presented a lymphoplasmacytic reaction more often than low-grade tumors; this reaction was usually absent or light in the latter ($P < .05$). Thus, nuclear grade III carcinomas from A and B displayed a pronounced inflammatory cell reaction (Table 7). On the other hand, more than 80% of pattern or nuclear grade I carcinomas from A exhibited no or scarce infiltration, as seen when analyzing pattern or nuclear grade I carcinomas from B (87.4% and 88.8%, respectively). In series C, it was evident

Table 4. Correlation Between Pattern and Nuclear Grade*

Nuclear Grade	Pattern Grade								
	Series A			Series B			Series C		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
I	8 (66.7)	4 (33.3)	0	8 (88.9)	1 (11.1)	0	34 (91.9)	3 (8.1)	0
II	4 (66.7)	2 (33.3)	0	8 (40)	10 (50)	2 (10)	8 (40)	8 (40)	4 (40)
III	0	0	1 (100)	0	3 (100)	0	0	4 (33.3)	8 (66.7)

* Data are expressed as the number (%) of lesions distributed per pattern grade according to nuclear grade.

that the increase in morphologic grade was associated with an increase in the rate of carcinomas displaying a moderate or pronounced inflammatory cell infiltration.

Regarding structural pattern and morphologic differentiation, grade III carcinomas displayed a predominant cribriform pattern more frequently than grade I or II tumors (Table 8). Thus, no pattern grade III carcinomas and only 1 of the nuclear grade III carcinomas from series B showed a mixed pattern with similar amounts of cribriform and papillary areas. In C, 100% and more than 90% of carcinomas with pattern and nuclear grade III, respectively, presented a prevailing cribriform pattern, similar to the results of grade III carcinoma in A.

It was evident that a pronounced (+++) stromal reaction was usually associated with grade III carcinomas, while well-differentiated carcinomas showed no or only light (- or +) response (Table 9). So, more than 90% of pattern grade I carcinomas from the 3 series belonged to the latter groups. In series A, the only carcinoma with pattern and nuclear grade III presented a moderate (++) stromal response. In C, most pattern grade III carcinomas (83.4%) showed moderate (++) or pronounced (+++) reaction. Concerning the nuclear grade, 91.7% of carcinomas from A, 88.9% from B, and 94.5% from C displaying a

nuclear grade I were associated with no or light stromal reaction, while this feature was ++ or +++ in all nuclear grade III carcinomas from B and in more than 65% from C. These results showed a statistical distribution in series C ($P < .05$).

Marked mast cell infiltration (+++) was seen particularly in low-grade carcinomas and only occasionally in grade III tumors (Table 10). In this study, only 1 case from those with numerous mast cells exhibited a nuclear grade III, corresponding to series C. Likewise, the presence of secretion was associated with low-grade carcinomas and exceptionally with grade III tumors, as shown in Table 11.

Finally, when correlating pattern and nuclear grade with microcribriform pattern, we found that no grade III carcinoma exhibited this pattern as a predominant feature (Table 12). Moreover, when present, most carcinomas displayed a pattern grade I (2 of 3 from A and all from B and C) or nuclear grade I (all from A and C and half from B) ($P < .05$).

Among benign breast tumors, fibroadenomas were the most common. Fibroadenomas were nonencapsulated, round to oval masses and were well circumscribed from the adjacent mammary parenchyma. They manifested variable proliferation of stromal and epithelial elements. Most

Table 5. Correlation Between Histologic Grade and Mitotic Activity*

	No. of Mitoses in 10 High-Power Fields									
	Series A					Series B				
	<10					<10				
	≤3	4-6	7-9	10-19	≥20	≤3	4-6	7-9	10-19	≥20
Pattern grade	11 (91.7)					16 (100)				
I	10 (83.3)	1 (8.3)	0	1 (8.3)	0	16 (100)	0	0	0	0
II	4 (66.7)	2 (33.3)	0	0	0	4 (28.6)	9 (64.3)	1 (7.1)	0	0
III	0	0	0	1 (100)	0	1 (50)	1 (50)	0	0	0
Nuclear grade	11 (91.7)					9 (100)				
I	10 (83.3)	1 (8.3)	0	1 (8.3)	0	9 (100)	0	0	0	0
II	4 (66.7)	2 (33.3)	0	0	0	11 (55)	9 (45)	0	0	0
III	0	0	0	1 (100)	0	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	0	0

* Data are expressed as the number (%) of lesions distributed per number of mitoses in 10 high-power fields, according to pattern and nuclear grade.

tumors were predominantly epithelial, and fibrous tissue surrounded the mammary ducts and acini and produced a pericanalicular growth pattern (Figure 4, A). In other tumors, the ducts were distorted into elongated and compressed slitlike structures by a predominant intracanalicular connective tissue growth. In both types, the epithelium was usually only 1 layer thick and was supported by a layer of myoepithelium and a basement membrane, as it is in the normal mammary gland. Although inflammatory cell infiltration was a rare event, numerous mast cells were present in the stroma. Unlike fibroadenomas, the adenomas showed a clear predominance of benign epithelial elements, consisting of normal and uniformly sized acini in close proximity to one another. While a connective tissue stromal component enveloped each duct, it was much less conspicuous and more uniformly arranged than in fibroadenomas (Figure 4, B). Cytoplasmic vacuolation of the epithelial cells was a common feature. Three fibroadenomas and 2 cysts from series B and 1 fibroadenoma from series C exhibited microcalcifications. No phyllodes tumor, as defined in human pathology, was found in rat mammary glands.

COMMENT

In vivo experimental animal models that closely mimic human disease are needed for elucidating the multistep nature of the mammary carcinogenic process and the influence of host and external factors on neoplastic development. The most widely used model is based on DMBA-induced tumors in the rat. Its main characteristics include homogeneity, reproducibility, and the need for a low generation time. The model is also highly practical. Nevertheless, the fundamental properties of this experimental model are the similarities in pathogenesis with the human system, as well as with the endocrine, genetic, and dietetic influences affecting the neoplastic process.^{2,4} For these reasons, and despite the differences exhibited between rat and human mammary carcinogenesis (such as the low in-

cidence of metastases and the role of prolactin in the experimental model), this model is useful for many research purposes.

Since the beginning of the application of the DMBA-induced experimental model in the study of human carcinogenesis, mammary lesions developed in rats have been characterized.⁶⁻⁸ Carcinomas are the most common mammary tumors induced experimentally. Microscopically, human and rat tumors share the same criteria of malignancy. In spite of these similarities, several differences between rat and human mammary tumors have been reported. Thus, rat adenocarcinomas appear very clearly bounded and the epithelial component largely prevails, making these tumors much softer in rats than in humans. Moreover, they are often cribriform, showing papillary areas. With the idea of comparing human and rat mammary lesions, several histopathologic classifications have been reported in the literature. Among them, the most widely accepted is the one defined in Hanover in 1987,¹ in which the terminology was adapted to that used in human mammary pathology. In this classification, which is innovative and extensive, it is clear that although most of the lesions found in the rat mammary glands have their counterpart in human pathology, there are specific lesions in humans that have not been reported in the rat mammary gland.

In this study, we carried out a detailed histopathologic analysis of rat mammary lesions, in particular of carcinomas, for several reasons. First, human mammary lesion classifications have evolved progressively. Hence, additional clinicopathologic entities have been described, others are not universally recognized, and the terminology used to name some tumors has changed. Therefore, it is essential to adapt the histopathologic findings in rat mammary lesions to these changes in order to use this experimental model for the study of human mammary carcinogenesis correctly. Second, the histopathologic analysis carried out in rat mammary lesions is restricted, in most cases, to the morphologic description and to determining the benign or malignant nature of the tumor. However, a more detailed morphologic study, similar to studies performed in human pathology (especially of carcinomas), would allow us to carry out not only a more extensive comparative analysis between the 2 systems and thereby an assessment of the validity of this model for the study of breast cancer, but also to extend and amplify experimental findings.

With this purpose in mind, we evaluated the mammary lesions developed in 3 experimental series of 20 rats; the groups were chronologically consecutive and were submitted to similar environmental and diet conditions. Our results show that most of the DMBA-induced tumors were malignant and epithelial in nature. Given that the incidence of animals with tumors and other carcinogenetic parameters have been described and analyzed previously,¹⁴ we did not address these topics. However, it is evident that the number of tumors that developed differed significantly among the 3 series. One possibility that could explain these differences lies in the animals' average age when they were killed, and another lies in the genetic susceptibility to develop neoplasms of 1 or more rats. Despite these findings, tumoral and carcinoma rates depicted in Table 1 are similar. Thus, 71%, 64.8%, and 74.2% of tumoral lesions developed in series A, B, and C, respectively, are carcinomas, coinciding with the available literature. Thus, the incidence of DMBA-induced tumors can reach

Table 5. Extended

No. of Mitoses in 10 High-Power Fields				
Series C				
<10				
≤3	4-6	7-9	10-19	≥20
42 (100)				
39 (92.8)	2 (4.8)	1 (2.4)	0	0
15 (100)				
9 (60)	6 (40)	0	0	0
	3 (25)			
1 (8.3)	1 (8.3)	1 (8.3)	7 (58.3)	2 (16.7)
37 (100)				
34 (91.9)	2 (5.4)	1 (2.7)	0	0
	19 (95)			
13 (65)	5 (25)	1 (5)	1 (5)	0
	4 (33.3)			
2 (16.7)	2 (16.7)	0	6 (50)	2 (16.7)

Table 6. Correlation Between Histologic Grade and Tumoral Necrosis*

	Tumoral Necrosis								
	Series A			Series B			Series C		
	Absent	Focal	Extensive	Absent	Focal	Extensive	Absent	Focal	Extensive
Pattern grade									
I	12 (100)	0	0	15 (93.7)	1 (6.3)	0	41 (97.6)	0	1 (2.4)
II	5 (83.3)	1 (16.7)	0	13 (92.8)	0	1 (7.2)	14 (93.3)	1 (6.7)	0
III	0	1 (100)	0	1 (50)	0	1 (50)	4 (33.3)	2 (16.7)	6 (50)
Nuclear grade									
I	11 (91.7)	1 (8.3)	0	9 (100)	0	0	37 (100)	0	0
II	6 (100)	0	0	18 (90)	1 (5)	1 (5)	18 (90)	0	2 (10)
III	0	1 (100)	0	2 (66.7)	0	1 (33.3)	4 (33.3)	3 (25)	5 (41.7)

* Data are expressed as the number (%) of lesions distributed in the tumoral necrosis categories, according to pattern and nuclear grade.

Table 7. Correlation Between Histologic Grade and Inflammatory Cell Infiltration*

	Inflammatory Cell Infiltration											
	Series A				Series B				Series C			
	Absent	Light	Moderate	Pronounced	Absent	Light	Moderate	Pronounced	Absent	Light	Moderate	Pronounced
Pattern grade												
I	4 (33.3)	6 (50)	0	2 (16.7)	7 (43.7)	7 (43.7)	1 (6.3)	1 (6.3)	21 (50)	15 (35.7)	4 (9.5)	2 (4.8)
II	4 (66.7)	0	2 (33.3)	0	2 (14.3)	5 (35.7)	3 (21.4)	4 (28.6)	2 (13.3)	10 (66.7)	3 (20)	0
III	0	0	0	1 (100)	1 (50)	1 (50)	0	0	0	5 (41.7)	2 (16.6)	5 (41.7)
Nuclear grade												
I	6 (50)	4 (33.3)	1 (8.3)	1 (8.3)	3 (33.3)	5 (55.5)	1 (11.1)	0	18 (48.6)	14 (37.8)	4 (10.8)	1 (2.7)
II	2 (33.3)	2 (33.3)	1 (16.7)	1 (16.7)	7 (35)	8 (40)	3 (15)	2 (10)	3 (15)	12 (60)	3 (15)	2 (10)
III	0	0	0	1 (100)	0	0	0	3 (100)	2 (16.7)	4 (33.3)	2 (16.7)	4 (33.3)

* Data are expressed as the number (%) of lesions distributed in the inflammatory cell infiltration categories, according to pattern and nuclear grade.

Table 8. Correlation Between Histologic Grade and Structural Pattern*

	Structural Pattern (% Cribriform Pattern)								
	Series A			Series B			Series C		
	100%–70%	60%–40%	30%–0%	100%–70%	60%–40%	30%–0%	100%–70%	60%–40%	30%–0%
Pattern grade									
I	7 (58.3)	5 (41.7)	0	9 (56.3)	7 (43.7)	0	25 (59.5)	17 (40.5)	0
II	1 (16.7)	5 (83.3)	0	8 (57.1)	6 (42.9)	0	13 (86.7)	2 (13.3)	0
III	1 (100)	0	0	2 (100)	0	0	12 (100)	0	0
Nuclear grade									
I	7 (58.3)	5 (41.7)	0	6 (66.7)	3 (33.3)	0	24 (64.9)	13 (35.1)	0
II	1 (16.7)	5 (83.3)	0	11 (55)	9 (45)	0	15 (75)	5 (25)	0
III	1 (100)	0	0	2 (66.7)	1 (33.3)	0	11 (91.7)	1 (8.3)	0

* Data are expressed as the number (%) of lesions distributed in the structural pattern categories, according to pattern and nuclear grade. The percentage of structural pattern refers to the cribriform pattern.

Table 9. Correlation Between Histologic Grade and Stromal Response*

	Stromal Response											
	Series A				Series B				Series C			
	–	+	++	+++	–	+	++	+++	–	+	++	+++
Pattern grade												
I	3 (25)	8 (66.7)	1 (8.3)	0	0	15 (93.7)	1 (6.3)	0	18 (42.8)	22 (52.4)	2 (4.8)	0
II	0	5 (83.3)	1 (16.7)	0	0	8 (57.1)	4 (28.6)	2 (14.3)	2 (13.3)	12 (80)	1 (6.7)	0
III	0	0	1 (100)	0	0	1 (50)	1 (50)	0	0	2 (16.7)	5 (41.7)	5 (41.7)
Nuclear grade												
I	3 (25)	8 (66.7)	1 (8.3)	0	0	8 (88.9)	1 (11.1)	0	17 (45.9)	18 (48.6)	2 (5.4)	0
II	0	5 (83.3)	1 (16.7)	0	0	16 (80)	4 (20)	0	3 (15)	14 (70)	3 (15)	0
III	0	0	1 (100)	0	0	0	1 (33.3)	2 (66.7)	0	4 (33.3)	3 (25)	5 (41.7)

* Data are expressed as the number (%) of lesions distributed in the stromal response categories, according to pattern and nuclear grade.

	Mast Cell Infiltration								
	Series A			Series B			Series C		
	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
Pattern grade									
I	9 (75)	3 (16.7)	1 (8.3)	10 (62.5)	4 (25)	2 (12.5)	24 (57.1)	9 (21.4)	9 (21.4)
II	3 (50)	3 (50)	0	10 (71.4)	4 (28.6)	0	11 (73.3)	1 (6.7)	3 (20)
III	1 (100)	0	0	1 (50)	1 (50)	0	11 (91.7)	1 (8.3)	0
Nuclear grade									
I	8 (66.7)	3 (25)	1 (8.3)	5 (55.5)	2 (22.2)	2 (22.2)	19 (51.4)	9 (24.3)	9 (24.3)
II	4 (66.7)	2 (33.3)	0	14 (70)	6 (30)	0	17 (85)	1 (5)	2 (10)
III	1 (100)	0	0	2 (66.7)	1 (33.3)	0	10 (83.3)	1 (8.3)	1 (8.3)

* Data are expressed as the number (%) of lesions distributed in the mast cell infiltration categories, according to pattern and nuclear grade.

	Secretion								
	Series A			Series B			Series C		
	Absent	Focal	Widespread	Absent	Focal	Widespread	Absent	Focal	Widespread
Pattern grade									
I	8 (66.7)	4 (33.3)	0	9 (56.2)	4 (25)	3 (18.8)	29 (69)	6 (14.3)	7 (16.7)
II	4 (66.7)	2 (33.3)	0	10 (71.4)	2 (14.3)	2 (14.3)	11 (73.3)	4 (26.7)	0
III	1 (100)	0	0	1 (50)	1 (50)	0	11 (91.7)	0	1 (8.3)
Nuclear grade									
I	9 (75)	3 (25)	0	5 (55.5)	2 (22.2)	2 (22.2)	26 (70.3)	4 (10.8)	7 (18.9)
II	3 (50)	3 (50)	0	12 (60)	5 (25)	3 (15)	15 (75)	5 (25)	0
III	1 (100)	0	0	3 (100)	0	0	10 (83.3)	1 (8.3)	1 (8.3)

* Data are expressed as the number (%) of lesions distributed in the secretion categories, according to pattern and nuclear grade.

	Microcribriform Pattern					
	Series A		Series B		Series C	
	Absent	Present	Absent	Present	Absent	Present
Pattern grade						
I	10 (83.3)	2 (16.7)	12 (75)	4 (25)	37 (88.1)	5 (11.9)
II	5 (83.3)	1 (16.7)	14 (100)	0	15 (100)	0
III	1 (100)	0	2 (100)	0	12 (100)	0
Nuclear grade						
I	9 (75)	3 (25)	7 (77.8)	2 (22.2)	32 (86.5)	5 (13.5)
II	6 (100)	0	18 (90)	2 (10)	20 (100)	0
III	1 (100)	0	3 (100)	0	12 (100)	0

* Data are expressed as the number (%) of lesions distributed according to the absence or presence of the microcribriform pattern, regarding the pattern and nuclear grade.

100%, of which approximately 50% to 90% are histologically malignant tumors, when the carcinogen is administered to intact virgin rats in their peak of maximal susceptibility, which in Sprague-Dawley rats occurs between the ages of 40 and 60 days.¹⁵ It must be stated, however, that tumor incidence depends on other factors as well, such as the dose of carcinogen or diet.

The results of the histopathologic analysis were very similar when comparing series A, B, and C (Tables 2 and 3). Although some differences were noted for each parameter, only nuclear grade and stromal reaction presented a statistically different rate distribution among the 3 experimental series. To be exact, carcinomas from series B exhibited predominantly nuclear grade II, whereas carcinomas from series A and C were mostly grade I. Moreover,

all the carcinomas from series B presented some degree of stromal reaction, in contrast to carcinomas from series A and C, in which several cases with no stromal response were detected. Those significant findings could be related to the greater duration of the series B experiment (17 and 24 days longer than C and A, respectively). Therefore, even though the differences between the lengths of the 3 experimental series were not great and we found a similar rate distribution of each parameter among the series, we have to note that some features related to tumor malignancy and invasion ability were graded higher in the longest series.

One of the main purposes of this study was to carry out a detailed morphologic study of rat mammary carcinomas. Given that histopathologic analysis of human

mammary carcinomas is very useful for the diagnosis and grading of the morphologic aggressiveness of these tumors, we applied the same parameters to rat mammary adenocarcinomas. Specifically, the features described in the modified Scarff-Bloom-Richardson scheme were used.¹³ Nevertheless, a remodeled version adapted to rat mammary adenocarcinomas was carried out. In fact, given that most rat carcinomas display a prevailing cribriform and/or papillary pattern, the tumor tubule formation was named *pattern grade*. Moreover, it was not described in relation to the extent of tubule formation, but rather to the extent of solid areas. However, the scores were identical in both systems. With regard to mitotic activity, we have preserved 3 grades, similar to human analysis. The poor proliferative capacity of rat mammary carcinomas forced us to subclassify the first score (<10 mitoses/10 HPF) in order to get a better distribution of carcinomas and to realize the variety of mitotic activity found in different experimentally induced mammary tumors. This fact could be due to the lesser size of most rat mammary carcinomas compared with their human counterparts. Grading of nuclear pleomorphism was not changed and was analyzed identically to human invasive ductal carcinoma. In this study, most DMBA-induced carcinomas displayed a pattern grade I and a nuclear grade I or II and exhibited few mitoses, given the clear correlation between those parameters. Thus, more than 50% of carcinomas from the 3 series presented a pattern grade I, more than 50% from A and C exhibited a nuclear grade I, 62.5% from series B displayed a nuclear grade II, and more than 80% of carcinomas had fewer than 10 mitoses/10 HPF. Therefore, they were histologically well differentiated. However, some carcinomas presented extensive solid areas, nuclear pleomorphism and hyperchromasia, and a high mitotic count, showing a range of differentiation as described in human invasive ductal carcinoma.

Although several authors have stated that human mammary carcinomas are on the whole less highly differentiated than rat carcinomas,⁶⁻⁸ we found no study in the literature that analyzed differentiation of rat tumors in a manner similar to the way it is done in human breast pathology. Gijbels et al,¹⁶ measuring nuclear DNA content of spontaneous or radiation-induced rat mammary tumors by flow cytometry and other morphometric parameters, corroborated that rat mammary carcinomas were less malignant than their human counterparts (low percentage of DNA aneuploidy in rat adenocarcinomas compared to human malignant tumors).

Although most of the carcinomas in our study did not display tumoral necrosis, it must be remembered that only preserved areas were removed from the tumor, and analysis of this attribute was limited to microscopic study; therefore, tumoral necrosis in rat breast carcinomas is probably a more frequent feature. Even so, tumoral necrosis was seen rarely in grade I carcinomas, in contrast to grade III tumors, in which it was found readily.

Most carcinomas showed scanty or no inflammatory cell infiltration. High pattern or nuclear grade carcinomas displayed tumoral necrosis or some inflammatory cell infiltration more frequently than low-grade carcinomas. Furthermore, these features were more pronounced in grade III carcinomas, as is described in human ductal carcinoma. The inflammatory cell reaction consisted basically of lymphocytes and plasma cells. This infiltrate is described as a host response elicited by the tumor cells, and several

studies have stated that it is more prominent in invasive malignant tumors than in noninvasive or benign tumors.^{1,17}

Experimentally induced mammary carcinomas in rats showed a predominant glandular or cribriform pattern with glandlike structures that may show diversity of shape and size. Stroma within the groups of acini can be very scant. The majority of carcinomas presented papillary areas. These data differ from those described in the most common human carcinomas. Moreover, DMBA-induced carcinomas are nodular and remain rigidly confined by the adjacent stroma, and they show no clear evidence of invasion. However, as we have stated, some rat mammary carcinomas display a prominent desmoplastic reaction and show invasion of the stroma, as well as a tubular pattern, appearing histologically similar to human ductal carcinoma. These features were present more frequently in high-grade carcinomas. The predominantly light stromal response exhibited by most rat mammary carcinomas in our study could explain the low frequency of metastases described in this model.^{1,2,6} However, metastases have been described, especially if the animals have been allowed to live long enough.^{1,6} Moreover, most of the experimental reports do not mention this pathology. It probably has not been widely investigated since it does not fall directly under the hypothesis of most investigations and it may very easily pass unnoticed.²

Although no intraductal carcinomas were found in the present study, they have been described in other experimental studies. In fact, the extensive work by Russo et al^{1,4,15} concerning the pathogenesis of the experimentally induced mammary tumors in rats in comparison with the human mammary tumorigenesis allowed these authors to corroborate the similar pathways that carcinogenesis follows in both systems. Thus, terminal-end buds, described in the rat mammary gland as the site of origin of breast cancer, start to enlarge after the administration of DMBA and constitute intraductal proliferations. The intraductal proliferations will progress to intraductal carcinomas. Their confluence leads to the formation of microtumors. From these structures, the fully developed or palpable tumors grow into invasive carcinomas with various patterns, such as cribriform, papillary, or comedo types. This process advances as time elapses, and by 30 to 40 days post-DMBA administration, intraductal carcinomas are found. In this way, there is an animal model for the study of intraductal carcinoma prior to the development of invasive disease, described by Crist et al.¹⁸ These authors demonstrated that an 87% incidence rate of intraductal carcinoma and 0% rate of invasive carcinoma can be achieved in Sprague-Dawley rats between 22 and 45 days post-*N*-nitroso-*N*-methylurea induction. Incidence of invasive carcinoma was 56% at 50 to 60 days and increased to 90% at 75 to 106 days postinduction. Therefore, it seems probable that the absence of intraductal lesions in the present study lies in the fact that the animals were killed later (more than 200 days postinduction). However, we have to recognize that the adenocarcinomas collected from series A and C and described as exhibiting no stromal reaction could be considered noninvasive carcinomas or carcinomas in situ and could be the result of the confluence of intraductal carcinomas prior to the development of invasion.

The correlation observed between papillary pattern and low pattern and nuclear grade is in agreement with the

histologically well-differentiated character of human breast papillary carcinoma.

Most carcinomas showed few mast cells within the tumor itself, fewer than are found in normal mammary tissues or benign lesions. Since Erlich's¹⁹ first description of mast cells and their association with some neoplasms, numerous reports have appeared confirming a role of mast cells' secretory products in tumorigenesis. Their ability to release heparin, histamine, proteinases, prostaglandins, and various mediators and chemotactic factors by degranulation suggests that mast cells have important functions in cellular interactions and matrix degradation that facilitate tumor invasion and metastatic spread.²⁰ In fact, only intact and not degranulated or disrupted forms of these cells can be counted using routine hematoxylin-eosin stains. Mast cell degranulation has been demonstrated to be a common feature in later stages of tumor proliferation. Once tumor-mediated degranulation occurs, mast cells lose the ability to regulate it.²¹ Russo and Russo¹⁵ stated that the intraductal proliferations that will progress to carcinoma in situ and to invasive carcinoma, are surrounded by a number of mast cells 3 times higher than in nonneoplastic mammary tissues. These authors postulated that mast cells are attracted by the transformed epithelial cells, degranulate, and stimulate local regulatory factors, which in turn affect cell proliferation, desmoplasia, and angiogenesis. This process is thought to stimulate tumorigenic growth and to allow the intraductal proliferations to progress to carcinoma. Streltsova and Pavlenko-Mikhailov²² described the highest number of mast cells at the moment of benign tumor formation, a second most intensive rise during malignant transformation of the epithelium, and a decrease in the number of the mast cells following the moment of malignant transformation. These findings are in line with our results. Furthermore, our observations suggest that a prominent mast cell reaction seems more related to pattern and nuclear grade I carcinomas than to poorly differentiated neoplasms. These results are consistent with those described in human breast tumors by Aaltomaa et al²³ and in lung adenocarcinomas by Tomita et al,²⁴ who found a direct relationship between mast cell count and tumor differentiation.

Since the function of mammary epithelium is to produce milk, the presence of lipids, proteins, and carbohydrates in a tumor must be considered evidence of functional differentiation. The cells of many mammary tumors, both benign and malignant, can be seen to contain lipid droplets.^{1,6} Ultrastructural, immunofluorescent, and immunohistochemical studies have shown that well-differentiated carcinomas contain α -lactalbumin, casein, and other milk proteins, exhibiting a more erratic pattern of distribution than in the normal breast. In the present work, most of the carcinomas do not contain light-colored intracytoplasmic vacuoles suggesting lipid droplets. However, when present, they are located in grade I or II carcinomas, correlating functional and structural differentiation.

The microcribriform pattern is observed mainly in grade I carcinomas and can closely resemble benign lesions, such as adenoma or lobular hyperplasia. The benign or malignant nature of rat mammary tumors can be determined by applying the Young and Hallows' histopathologic criteria.⁶ Moreover, carcinomas from the present study that exhibited a major microcribriform pattern

could correspond to the histologic type of carcinoma these authors described in the rat as cribriform carcinoma.

Invasive ductal carcinoma is the most frequently encountered malignant tumor of the human breast. A generic term sometimes employed is *invasive duct carcinoma, not otherwise specified*, which recognizes the distinction between these tumors and the many other specific forms of duct carcinoma, such as tubular, medullary, metaplastic, or colloid. There are specific lesions in humans, such as Paget disease of the nipple, the colloid or medullary type of duct carcinoma, and lobular carcinoma in situ or invasive lobular carcinoma that have not been reported in the rat. Moreover, human cribriform carcinoma, a specific form of invasive duct carcinoma, cannot be compared with rat carcinomas that, as we have previously stated, frequently display a prevailing cribriform pattern. The former is a well-differentiated carcinoma that is associated with a high survival probability and that must fulfill some histologic criteria to be diagnosed. On the other hand, rat carcinomas, although presenting a cribriform pattern, show various degrees of histologic aggressiveness.

Papillary carcinomas, carcinomas, or metaplastic carcinomas, as well as sarcomas, have been described in the rat mammary gland.⁶⁻⁹ Humanlike phyllodes tumors, benign or malignant, have not been reported in these animals.

On the basis of our results and those detailed in the available literature, we have classified rat mammary gland lesions and correlated them with their human counterparts. The classification, depicted in Table 13, is based on the one adopted by Rosen and Oberman²⁵ to classify human breast tumors, using the World Health Organization terminology for almost all tumors.

Mammary gland carcinoma induced in the rat with DMBA has a histogenetic pathogenesis comparable to that of human breast cancer. Carcinogenesis initiation occurs primarily, as does human breast cancer, from the terminal ductal-lobular unit, and both tumors develop by a similar multistep process.¹⁵ Although rat mammary tumors, in contrast to the situation in women, are characterized by a noninvasive or microinvasive cribriform and papillary growth pattern, both rat mammary carcinoma and human ductal carcinoma share some similarities. Both tumors show the same criteria of malignancy and display various degrees of cytologic atypia, pattern grade, and mitotic activity. Moreover, some histologic features, such as tumoral necrosis or inflammatory cell infiltration, can be present. These morphologic characteristics could be related, as in human mammary tumoral pathology, to the aggressive behavior of the tumor. On the other hand, we have observed carcinomas exhibiting a pattern (invasion of neighboring tissues, desmoplastic reaction, and tumor tubule formation) very similar to that of human invasive ductal carcinoma.

We think that rat mammary carcinomas ought to be named—from a structural point of view—adenocarcinomas, because of the prevailing glandular or cribriform pattern, adding the most relevant morphologic characteristics, such as pattern type, histological grade, mitotic count, tumoral necrosis, degree of inflammatory cell infiltration, etc. For the reasons cited previously, we consider rat mammary adenocarcinomas to be equivalent to human ductal carcinomas, which constitute a group of tumors with various morphologic appearances that can determine a clinical behavior. It is true, however, that there are specific

Table 13. Classification of Rat Mammary Lesions and Correlation With Human Lesions

	Epithelial Tumors				
	Benign	Malignant		Fibroepithelial Tumors	
		Noninvasive	Invasive	Benign	Malignant
Human Mammary Lesions	Adenoma Tubular Lactating Apocrine Papilloma Florid papillomatosis Others	Intraductal carcinoma, with or without Paget disease Lobular carcinoma in situ	Invasive ductal carcinoma, with or without Paget disease Invasive lobular carcinoma Medullary carcinoma Mucinous carcinoma Tubular carcinoma Invasive papillary carcinoma Invasive cribriform carcinoma Carcinoma with metaplasia Others	Fibroadenoma NOS* Juvenile Phyllodes tumor	Phyllodes tumor
Rat Mammary Lesions	Adenoma Papillary (papilloma) Tubular Lactating Salivary gland tumors	Carcinoma in situ	Adenocarcinoma Carcinoma with squamous metaplasia Salivary gland tumors	Fibroadenoma	Carcinosarcoma

* NOS indicates not otherwise specified.

human mammary lesions, such as lobular carcinoma or phyllodes tumor, that have not been reported in the rat. These tumors are much less frequent than the classic form of ductal carcinoma. Moreover, to subclassify rat mammary carcinomas as papillary, cribriform, comedocarcinoma, or anaplastic is confusing and of little use, given that there is no correlation with their human counterparts, which are described as clinicopathologic entities, and given the changes made in the terminology used to name some human mammary lesions.

In this study, most benign tumoral lesions were categorized as fibroadenomas and adenomas. In rats, pericanalicular fibroadenomas are by far the most common type, although the intracanalicular type that occurs in humans is also found. Both types of rat fibroadenoma closely resemble their human counterparts. Intraductal papillomas are described in the rat mammary gland,^{8,9} normally within the group of adenomas, as benign papillary epithelial lesions arising in the mammary ducts. Adenomas keep to a tubuloalveolar pattern, a feature that favors diagnoses of benignity. However, the histologic differentiation between adenomas and well-differentiated adenocarcinomas can be difficult. Thus, some adenomas present papillomatous and hyperplastic epithelium filling cystically dilated ducts and exhibit a complex structural pattern. Others are composed of closely packed tubules and acini resembling adenocarcinomas with a microcribriform pattern. As the histologic diagnostic process may be difficult, some authors have examined additional quantitative criteria, such as flow cytometric analysis¹⁸ or immunohistochemical techniques,²⁶ to discriminate between benign and malignant lesions. However, the value of such additional techniques has been proved to be limited or too expensive for this purpose.

In fact, whether spontaneous or carcinogen-induced rat mammary tumors are benign or malignant can be determined by applying the histologic and cytologic criteria delineated previously by Young and Hallowes⁶ and adopted later by Russo et al.¹ Thus, the presence of cytologic

atypia, loss of the tubuloalveolar pattern of the normal mammary gland, absence of myoepithelial cells, and invasion of the stroma and neighboring tissues are reliable criteria of malignancy.

Among nontumoral lesions, the most common is lobular hyperplasia or adenosis. In the human breast, this abnormality is present in various growth patterns, such as sclerosing adenosis, microglandular adenosis, or tubular adenosis, some of which are described in the rat mammary gland. We have found mammary cysts and focal fibrosis, as well as occasional foci of epithelial hyperplasia, in the mammary gland tissue adjacent to tumors. These lesions are found particularly in experimental studies evaluating tumorigenesis development. The fibrocystic disease associated with apocrine metaplasia and commonly related to carcinoma in women does not have the same importance in rat pathology and it is very uncommon, except in estrogen-induced carcinoma.⁶ The epidermal cyst observed in an animal from series A probably originates from the superficial epidermis.

Therefore, our results suggest that the experimental model induced in the rat with DMBA is useful for the study of human mammary carcinogenesis from a histopathologic perspective. Despite some differences observed between rat mammary adenocarcinomas and the most common human breast carcinomas, several similar characteristics, such as the various degrees of morphologic aggressiveness and the parallel correlations observed between different parameters, allow us to accept the DMBA-induced rat model as a current tool for the understanding of breast cancer. Moreover, the histopathologic analysis carried out in this study provides a new characterization of rat mammary carcinomas and a more accurate and meticulous application of this animal model. It would be possible to obtain more information about the characteristics of the tumors if the animals were exposed under distinct influences. Finally, we have attempted to develop an innovative and current classification of rat mammary lesions that corresponds to the evolution of the human classifi-

Table 13. Extended

Miscellaneous Tumors	Tumorlike Lesions
Mesenchymal	Duct ectasia
Lipoma	Duct hyperplasia, with or without atypia
Fibroma	Adenosis (sclerosing, tubular, etc.)
Hemangioma	Lobular hyperplasia with atypia
Leiomyoma	Fibrosis
Fibrosarcoma	Cyst
Angiosarcoma	Apocrine metaplasia
Leiomyosarcoma	Others
Others	
Cutaneous	
Lymphoid	
Mesenchymal	Duct ectasia
Fibroma	Duct hyperplasia, with or without atypia
Lipoma	Lobular hyperplasia
Hemangioma	Fibrosis
Fibrosarcoma	Cyst
Angiosarcoma	
Cutaneous	
Lymphoid	

cation system. While accepting that some human lesions are not found in the rat mammary gland, we conclude that the most common neoplastic conditions observed in the human female breast are represented in this experimental model.

Financial support was provided by the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT OLI96-2114), Fundación para la Formación Continua (P19981160), and Grups de Recerca de Qualitat, Generalitat de Catalunya (1995SGR-495). We thank M. C. Ruiz de Villa, PhD (Department of Statistics, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain) for valuable suggestions on statistical analysis, and A. Hurtado and R. Moral for their help in sample collection.

References

- Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, van Zwielen MJ. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest.* 1990; 62:1-32.
- Escrich E. Validity of the DMBA-induced mammary cancer model for the study of human breast cancer. *Int J Biol Markers.* 1987;2:197-206.
- Solanas M, Escrich E. Ha-ras in normal and tumoral tissues: structure, function and regulation. *J Physiol Biochem.* 1996;52:173-192.
- Russo J, Russo JH. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res Treat.* 1996;39:7-20.

- Escrich E. Mammary cancer model induced by 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene: a good experimental tool for the study of tumors markers. *Int J Biol Markers.* 1987;2:109-119.
- Young S, Hallowes RC. Tumors of the mammary gland. In: *Pathology of Tumors in Laboratory Animals.* Lyon, France: IARC Scientific Publications; 1973: 31-86.
- Altman NH, Goodman DG. Neoplastic diseases. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH, eds. *The Laboratory Rat.* New York, NY: Academic Press; 1979: 361-362.
- van Zwielen MJ. Normal anatomy and pathology of the rat mammary gland. In: *The Rat as Animal Model in Breast Cancer Research.* Boston, Mass: Martinus Nijhoff; 1984:53-134.
- Russo J, Russo IH, van Zwielen MJ, Rogers AE, Gusterson BA. Classification of neoplastic and non-neoplastic lesions of the rat mammary gland. In: Jones TC, Mohr U, Hunt RD, eds. *Integument and Mammary Gland of Laboratory Animals.* Berlin, Germany: Springer-Verlag; 1989:275-304.
- Escrich E, Solanas M, Segura R. Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats, I: diet definition. *Int J In Vivo Res.* 1994;8:1099-1106.
- Escrich E, Solanas M, Ruiz de Villa MC, Ribalta T, Muntané J, Segura R. Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats, II: suitability of diets. *Int J In Vivo Res.* 1994;8:1107-1112.
- Huggins C, Grand LC, Brillantes FP. Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons, and its suppression. *Nature.* 1961;189:204-207.
- Dalton LW, Page DL, Dupont WD. Histologic grading of breast carcinomas: a reproducibility study. *Cancer.* 1994;73:2765-2770.
- Solanas M, Moral R, Colomer R, Escrich E. Effects of dietary (n-6) polyunsaturated lipids on experimental mammary carcinogenesis. *J Women's Cancer.* 2000;2:67-72.
- Russo IH, Russo J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect.* 1996;104:938-967.
- Gijbels MJ, Visser JWM, Solleveld HA, Broerse JJ, Zurcher C. Flow cytometric DNA measurement and cytomorphometric analysis of formalin fixed rat mammary tumors. *Br J Cancer.* 1991;64:523-527.
- Hussain MA, Tyagi SP, Tyagi N, Khan MH. Stromal response in breast tumors and allied lesions. *J Indian Med Assoc.* 1992;90:119-121.
- Crist KA, Chaudhuri B, Shivaram S, Chaudhuri PK. Ductal carcinoma "in situ" in rat mammary gland. *J Surg Res.* 1992;52:205-208.
- Ehrlich P. Beiträge zur Kenntniss der Grannlierten: Bindegewabzellen und der eosinophilen Leucocyten. *Arch Anat Physiol.* 1879;3:166-169.
- Dabbous MK, North SM, Haney L, Tipton DA, Nicolson GL. Effects of mast cell-macrophage interactions on the production of collagenolytic enzymes by metastatic tumor cells and tumor-derived and stromal fibroblasts. *Clin Exp Metastasis.* 1995;13:33-41.
- de Cidre LL, Eijan AM, Bertolesi G, Isturiz M, Sacerdote de Lustig E. Influence of mast cells on two murine mammary adenocarcinomas. *Tumor Biol.* 1996; 17:345-353.
- Streltsova VN, Pavlenko-Mikhailov IuN. Relationship between the number of mast cells and neoplastic proliferation of the mammary gland epithelium [in Russian]. *Vopr Onkol.* 1977;23:53-57.
- Aaltomaa S, Lipponen P, Papinaho S, Kosma VM. Mast cells in breast cancer. *Anticancer Res.* 1993;13:785-788.
- Tomita M, Matsuzaki Y, Onitsuka T. Correlation between mast cells and survival rates in patients with pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 1999; 26:103-108.
- Rosen PP, Oberman HA. *Tumors of the Mammary Gland.* Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1992:7-10. *Atlas of Tumor Pathology*; 3rd series, fascicle 7.
- Yamamoto H, Imai S, Yamamoto I. Immunohistochemical expression of monoclonal antibodies (epi-1 and myo-1) derived from human breast cancer against rat mammary tumors. *Exp Toxicol Pathol.* 1992;44:235-238.

RESULTADOS

Antecedentes:

El análisis morfológico de los tumores de mama humano continúa siendo esencial para definir la naturaleza benigna o maligna de estas neoplasias y, además, aporta datos sobre la agresividad en los casos malignos, con implicaciones en el pronóstico y en el tratamiento. Desde la introducción de los modelos animales en el estudio de la carcinogénesis mamaria, se han publicado diversos trabajos que describen las características morfológicas de las lesiones desarrolladas en la rata, tal como se ha comentado en el apartado E.2 de la “Introducción”, con el objetivo de demostrar su aplicabilidad en el estudio de la patología mamaria humana. Todos estos trabajos coinciden en señalar que la mayor parte de las lesiones observadas en la mama humana se encuentran en la rata, a excepción de algunas formas de carcinoma o de algunos procesos no neoplásicos. No obstante, también se remarcan las diferencias entre el carcinoma de mama experimental y el carcinoma de mama humano más frecuente, el carcinoma ductal infiltrante. En este sentido, el aspecto nodular y el patrón arquitectural cribiforme y/o papilar predominante del primero, que difiere del patrón de crecimiento ductal e invasivo del segundo, ha comportado dudas y recelos sobre la relevancia del modelo de cáncer de mama en rata en los estudios de carcinogénesis mamaria. El objetivo principal del trabajo que compone este artículo fue validar el modelo de cáncer de mama inducido con dimetilbenz(α)antraceno (DMBA) en la rata, desde un punto de vista histopatológico. Con este fin, en primer lugar, se describieron las características histopatológicas de las lesiones mamarias desarrolladas en tres series experimentales diferentes y, en el caso de los carcinomas, se aplicó un estudio morfológico similar al que se aplica en el estudio del cáncer de mama humano, para analizar las similitudes y las diferencias entre ambos sistemas; y, en segundo lugar, se propuso una clasificación de las lesiones mamarias experimentales, similar a la de la mama humana.

Resumen de los resultados y datos adicionales:

El análisis morfológico incluyó todas las lesiones mamarias desarrolladas en tres series experimentales: A, B y C. Como se detalla en la Tabla 1 del artículo, la mayoría de las lesiones fueron tumorales, de las cuales, más del 64% correspondían a carcinomas. Se analizaron 19 carcinomas de la serie A, 32 de la serie B y los 69 de la serie C, evaluando parámetros morfológicos (grado arquitectural y nuclear, nº de mitosis, necrosis tumoral, infiltrado inflamatorio, microcalcificaciones, patrón arquitectural, reacción estromal, infiltrado mastocitario, secreción y patrón microcribiforme), descritos y justificados en el artículo, y cuyos resultados se exhiben en las Tablas 2 y 3 del mismo. En este sentido, la

selección de estos parámetros se basó, por un lado, en las características, ya conocidas, propias del tejido mamario y de los tumores que se desarrollan en la mama de estos animales, como son la nodularidad, que explica el estudio de la reacción estromal, el infiltrado mastocitario presente en el estroma mamario y en algunos tumores de estos animales, o el patrón arquitectural predominantemente cribiforme y/o papilar, así como microcribiforme, y la secreción celular, esta última como parámetro de diferenciación. Por otro lado, el resto de los parámetros (grados arquitectural y nuclear, número de mitosis, necrosis tumoral, infiltrado inflamatorio y microcalcificaciones) son los que se usan, habitualmente, en el estudio morfológico del cáncer de mama humano, algunos con valor pronóstico y predictivo, tal como se ha detallado en el apartado E.1.a de la “Introducción”. En esta sección, se resumirán los resultados, que se hallan detallados en el artículo referente, y se aportarán algunos datos e imágenes adicionales. La mayoría de los carcinomas presentaron grado arquitectural I (más del 60% en A y C y el 50% en B), con predominio de áreas glandulares/cribiformes (Figura A1; A: adicional al artículo), y grado nuclear I (63,2% y 53,6% en A y C, respectivamente) (Figura A2) o II (62,5% en B). Menos del 10% de los carcinomas de mama de la serie A y B y menos del 20% de la serie C mostraron extensas áreas sólidas y, por tanto, grado arquitectural III (Figura A3) y/o marcado pleomorfismo nuclear y nucleolos prominentes (Figura A4). La mayoría de los carcinomas en las tres series presentaban menos de 10 mitosis por 10 CGA (campos de gran aumento) y no mostraban necrosis tumoral. No obstante, ocasionales carcinomas presentaban necrosis extensa, que en algunos adoptaba aspecto de comedocarcinoma (Figura A5). El infiltrado inflamatorio asociado, cuando estaba presente, solía ser leve y predominantemente linfoplasmocitario, aunque algunos tumores mostraban infiltración más densa (Figura A6) y, en otros, se acompañaba de polimorfonucleares eosinófilos y neutrófilos (Figura A7). Las microcalcificaciones fueron un hallazgo excepcional. Todos los carcinomas exhibían un patrón arquitectural mixto, con áreas cribiformes/glandulares y otras papilares, predominando, en las series B y C, las primeras (Figura A8) y, en la A, proporciones similares entre ambos patrones (Figura A9). Entre los carcinomas con patrón cribiforme predominante, un número no despreciable de ellos lo presentaron como puro o único (31,6%, 15,6% y 33,3% en A, B y C, respectivamente) (datos no expuestos en el artículo). No se observó patrón lobulillar ni cambio coloide en ninguno de los carcinomas experimentales. Una de las características de estos carcinomas fue su nodularidad y buena delimitación del tejido mamario vecino (Figura A10). Para valorar el patrón invasivo de los carcinomas, se analizó la reacción estromal asociada a los nidos neoplásicos. Aunque la mayoría mostraban leves cambios estromales (+), otros exhibían

imágenes sugestivas de infiltración del estroma, en forma de nódulos tumorales expansivos, que podían invadir tejidos vecinos (piel y músculo esquelético) (Figura A11), o una moderada o marcada reacción estromal, incluso desmoplásica (Figura A12). Ocasionales carcinomas adoptaban un patrón ductal (que se incluyó dentro del patrón cribiforme/glandular en la valoración del patrón arquitectural), que remedaba al carcinoma ductal infiltrante humano (Figura A13) y, en algunos, se observaron áreas con un patrón cordonal o sólido, sugestivas de dediferenciación, extensas en un caso de la serie B (Figura A14). Por otro lado, algunas lesiones benignas mostraron en su seno focos de carcinoma que no despertaban reacción estromal (Figura A15) y otros tumores se caracterizaron por múltiples nidos de carcinoma separados por tejido fibroso (Figura A16). La presencia de mastocitos, abundante en las lesiones benignas, era escasa en más del 65% de los carcinomas de las tres series. Algunos carcinomas mostraron imágenes sugestivas de secreción citoplasmática (Figura A17), aunque, en la mayoría, ésta fue ausente. Se evidenció un patrón microcribiforme predominante en menos de un tercio de los carcinomas (Figura A18). La distribución de los resultados de la evaluación de cada uno de estos parámetros morfológicos fue estadísticamente significativa, tal como se halla detallado en el artículo.

Al correlacionar estos parámetros histopatológicos, se constató que la mayoría de los carcinomas exhibían idénticos o similares grados nuclear y arquitectural, así como una actividad mitótica paralela (Tablas 4 y 5 del artículo) ($P < 0,05$). La necrosis tumoral se observó con mayor frecuencia en carcinomas de grados arquitectural y/o nuclear elevados (Tabla 6 del artículo). También se constató que los carcinomas peor diferenciados presentaban mayor y más frecuente infiltración linfoplasmocitaria (Tabla 7 del artículo) ($P < 0,05$) y un patrón cribiforme predominante (Tabla 8 del artículo) que los tumores de bajo grado, mientras que entre los carcinomas de grados I y/o II se observó mayor componente de patrón papilar. La reacción estromal marcada (+++) solía asociarse a carcinomas de grados III, mientras que los tumores de bajo grado mostraban predominantemente nula o leve reacción estromal (- ó +) (Tabla 9 del artículo) ($P < 0,05$ en serie C). El infiltrado mastocitario marcado (+++) se observó en carcinomas de bajo grado arquitectural o nuclear (Figura A19) y, sólo ocasionalmente, en los tumores de grado III (Tabla 10 del artículo); y lo mismo ocurría con la presencia de secreción y de patrón microcribiforme ($P < 0,05$) (Tabla 11 y 12 del artículo).

Entre los tumores benignos, el fibroadenoma fue la neoplasia más frecuente, con un patrón pericanalicular (Figura A20 y A21) más frecuente que intracanalicular (Figura A22 y A23) (6 de 8, 8 de 10 y 10 de 13 de las series A, B y C, respectivamente). Se observaron

numerosos mastocitos en el estroma de estos tumores. Los adenomas estaban constituidos por abundantes acinos uniformes, agrupados en lóbulos separados por escaso tejido fibroso (Figura A24 y A25). Otros tumores benignos, como fibromas (Figura A26), lipomas y papilomas, fueron más infrecuentes e idénticos a sus homólogos humanos. Entre las lesiones proliferativas no tumorales, se reconocieron hiperplasias lobulillares (Figura A27), definidas como un aumento en el n^o, tamaño y complejidad de los lobulillos mamarios, algunas en forma de adenosis esclerosante. En la serie C, se observó un tumor de patrón fibroadenomatoso, con hendiduras foliáceas (Figura A28) y estroma densamente celular, con atipia citológica moderada (Figura A29) y ocasionales figuras de mitosis (Figura A30), que semejaba un tumor “phyllodes” y que fue diagnosticado como sarcoma de bajo grado. No se hallaron lesiones proliferativas intraductales semejantes a las descritas en la mama humana y con significado de lesión precursora maligna, como la atipia del epitelio plano o la hiperplasia ductal atípica, ni lesiones parecidas al carcinoma lobulillar “in situ”. Tampoco se observaron cambios de metaplasia apocrina.

Finalmente, en el artículo se propone una clasificación de los tumores de mama desarrollados en el modelo experimental inducido con DMBA en la rata (Tabla 13 del artículo), basada en nuestra experiencia y en los datos recogidos en la literatura, adaptando la terminología a la información disponible en la mama humana, especialmente para los carcinomas, para obtener una mayor adaptabilidad y aplicabilidad de los datos morfológicos obtenidos en los trabajos experimentales realizados en este modelo, al sistema humano. En este sentido, se propone usar el nombre de adenocarcinoma para el carcinoma de mama experimental, añadiendo los datos morfológicos adicionales, y evitar la subclasificación en tipos histológicos, tal como se comentará en el apartado de “Discusión” de este trabajo.

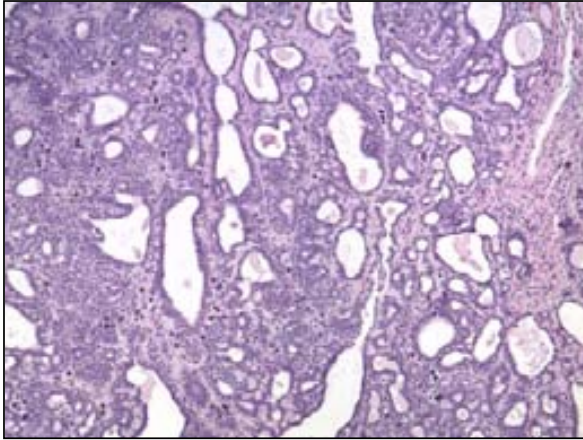


Figura A1: Áreas glandulares/cribiformes (H&E x40)

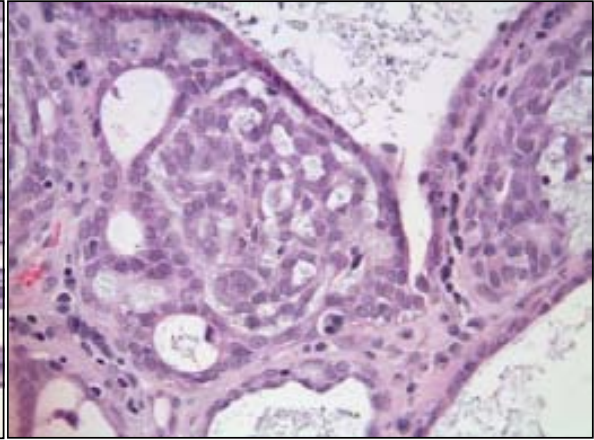


Figura A2: Grado nuclear I (H&E x200)

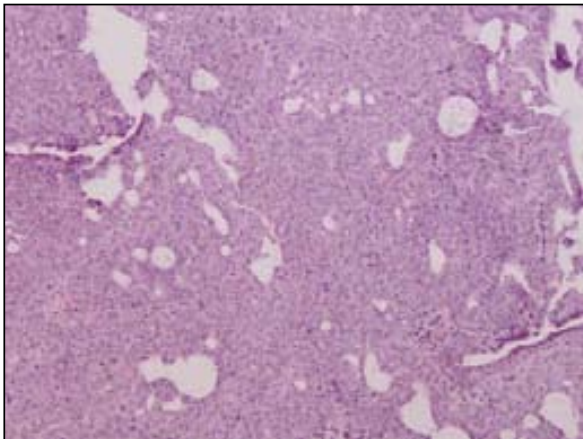


Figura A3: Grado arquitectural III (H&E x40)

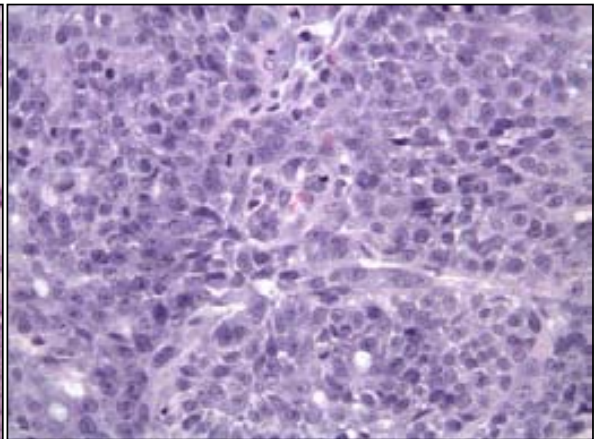


Figura A4: Pleomorfismo nuclear y nucleolos (H&E x200)

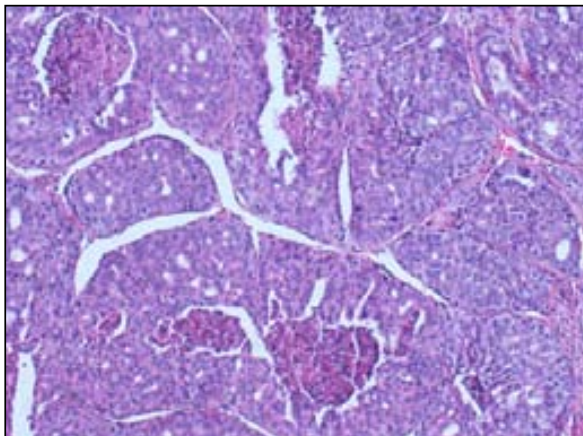


Figura A5: Necrosis tipo comedo (H&E x100)

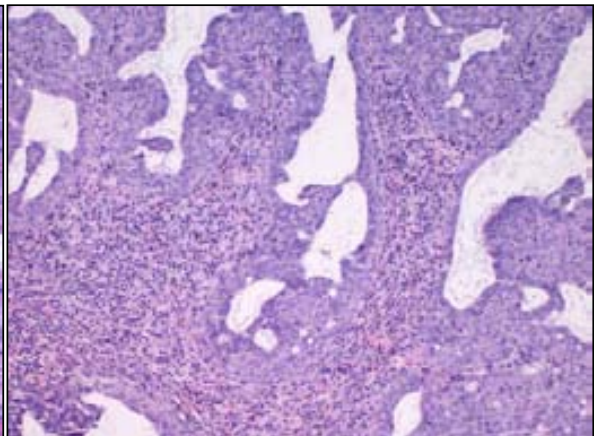


Figura A6: Infiltrado linfoplasmocitario denso (H&E x100)

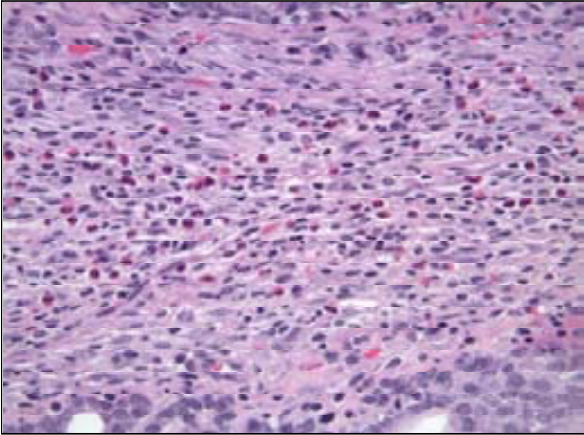


Figura A7: Infiltrado eosinofílico (H&E x200)

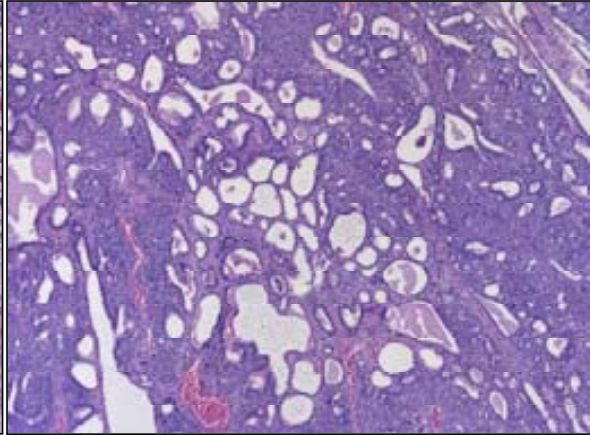


Figura A8: Patrón cribiforme predominante (H&E x40)

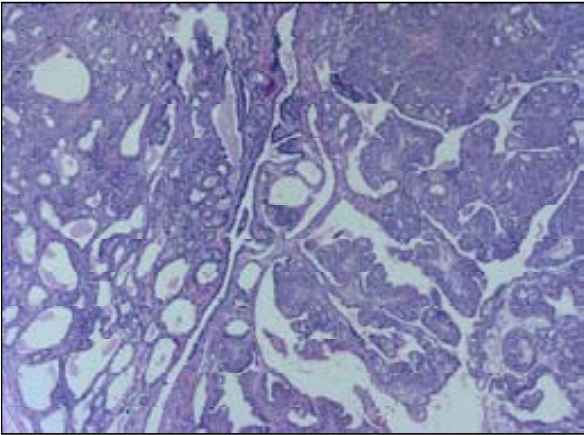


Figura A9: Patrón cribiforme y y papilar mixto (H&E x40)

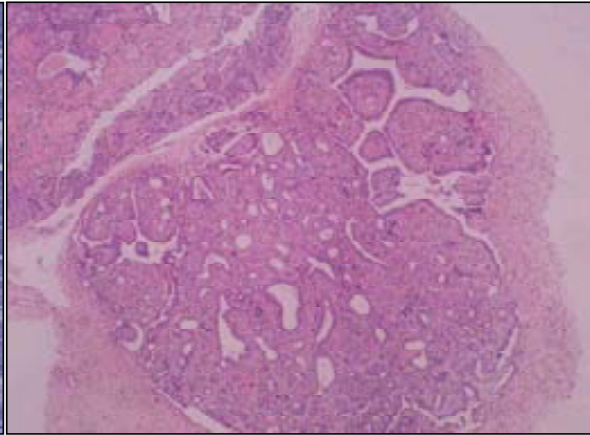


Figura A10: Nodularidad tumoral (H&E x40)

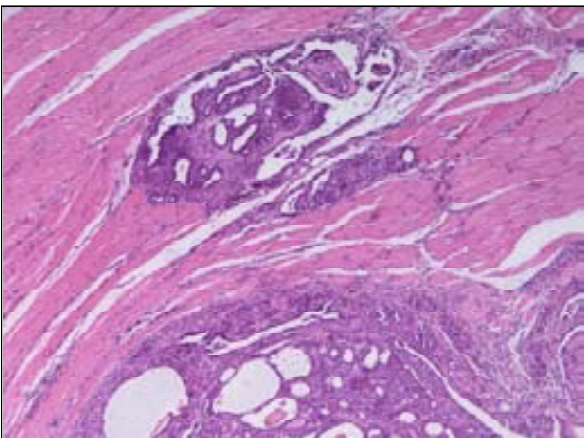


Figura A11: Nódulos tumorales expansivos (H&E x40)

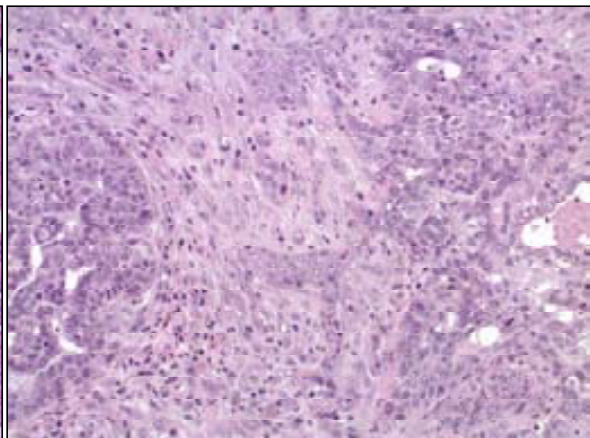


Figura A12: Reacción estromal desmoplásica (H&E x200)

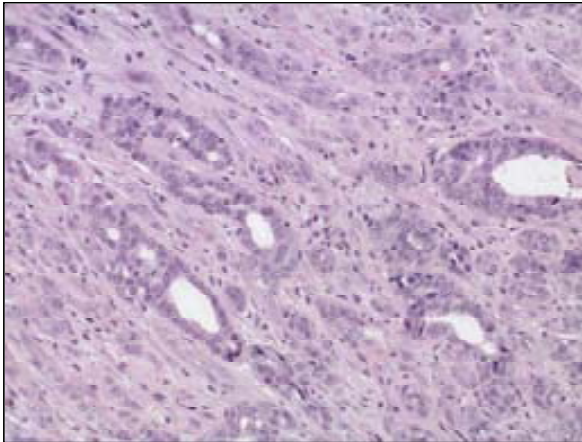


Figura A13: Patrón ductal y reacción estromal desmoplásica (H&E x200)

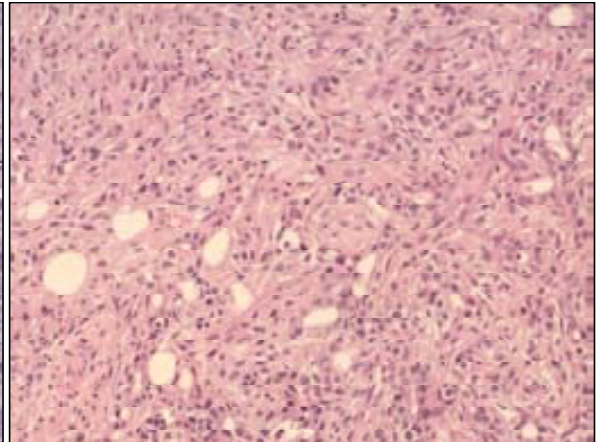


Figura A14: Dediferenciación (H&E x200)

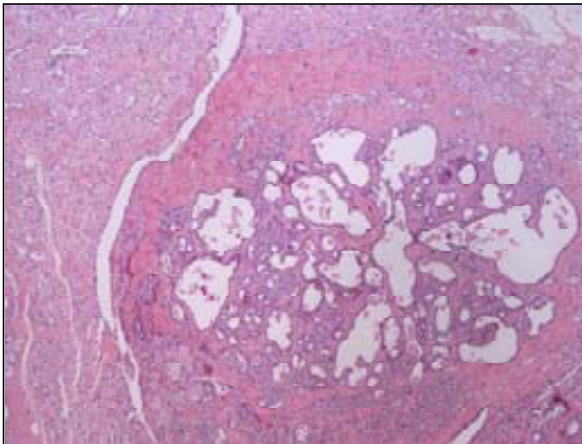


Figura A15: Focos de carcinoma en lesiones benignas (H&E x100)

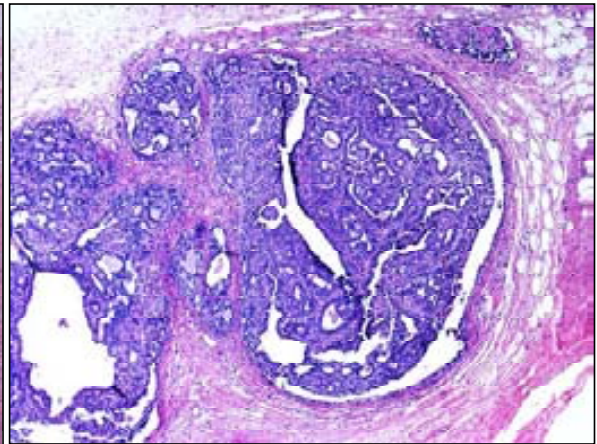


Figura A16: Nidos de carcinoma separados por tejido fibroso (H&E x100)

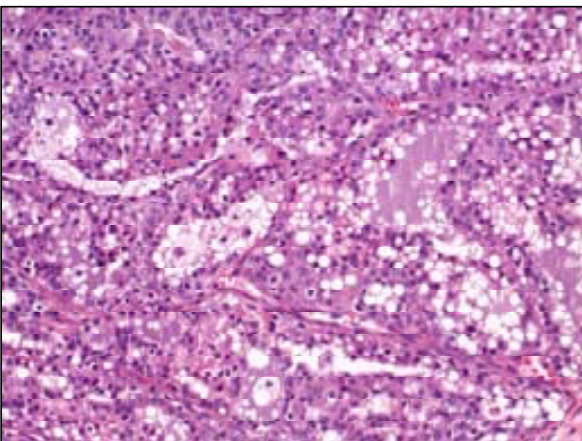


Figura A17: Secreción citoplasmática en carcinoma (H&E x200)

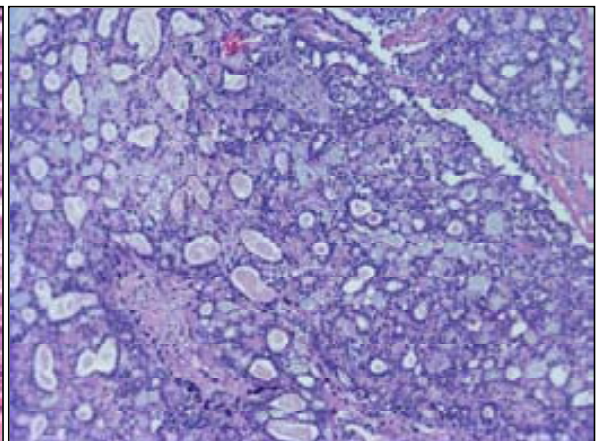


Figura A18: Patrón microcribiforme (H&E x100)

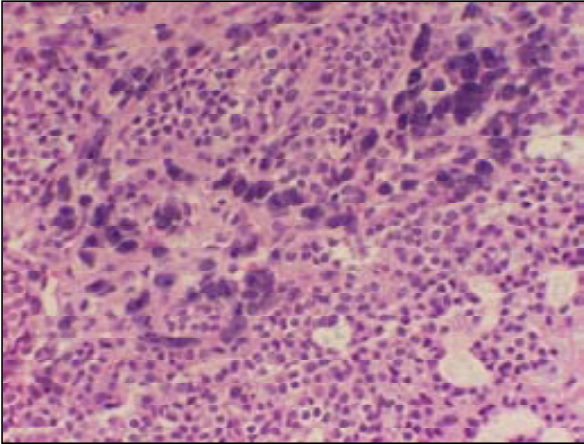


Figura A19: Infiltrado mastocitario en carcinoma de bajo grado arquitectural y nuclear (H&E x200)

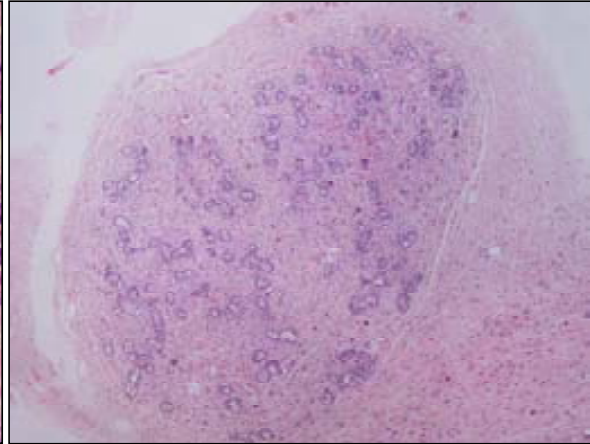


Figura A20: Fibroadenoma pericanalicular (H&E x40)

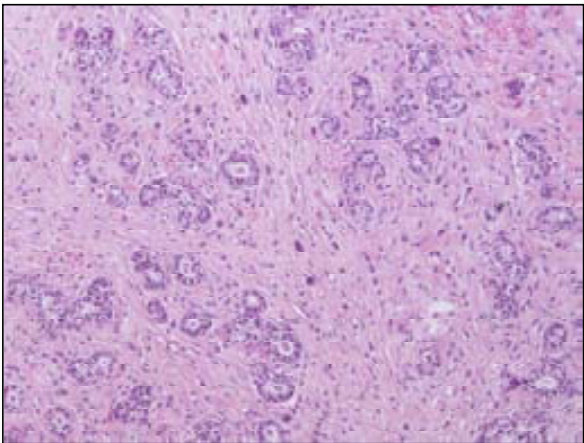


Figura A21: Fibroadenoma pericanalicular (H&E x100)

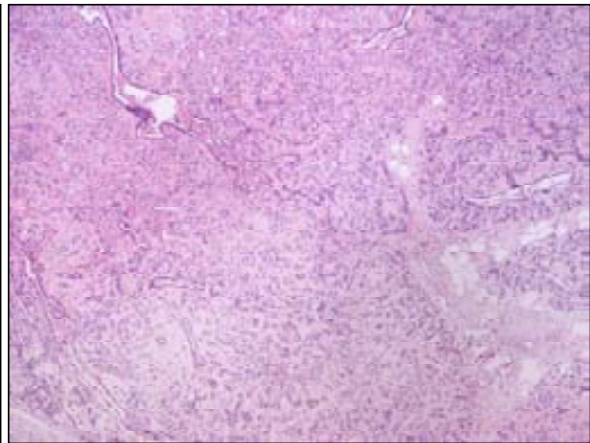


Figura A22: Fibroadenoma intracanalicular (H&E x40)

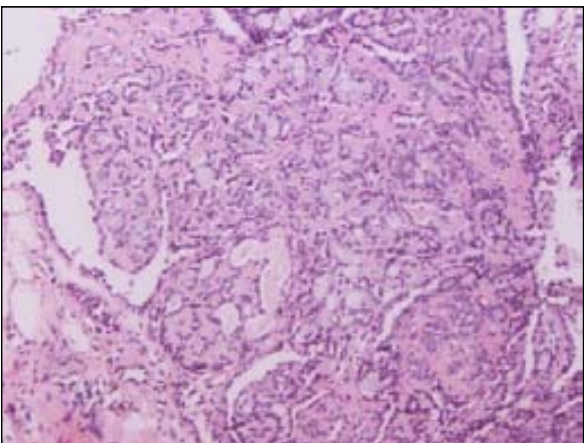


Figura A23: Fibroadenoma intracanalicular (H&E x100)

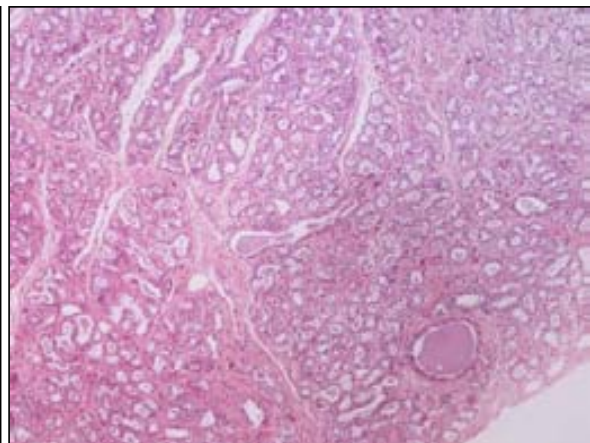


Figura A24: Adenoma (H&E x100)

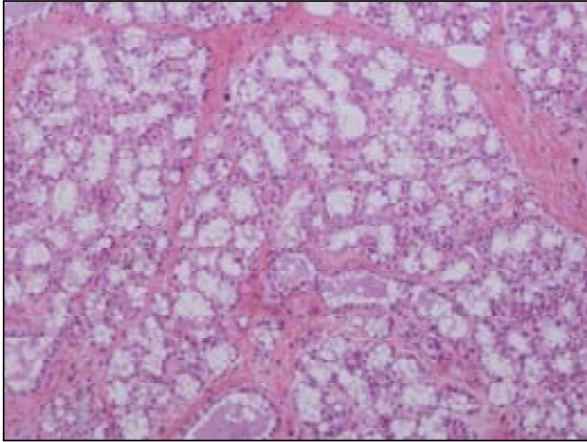


Figura A25: Adenoma
(H&E x200)

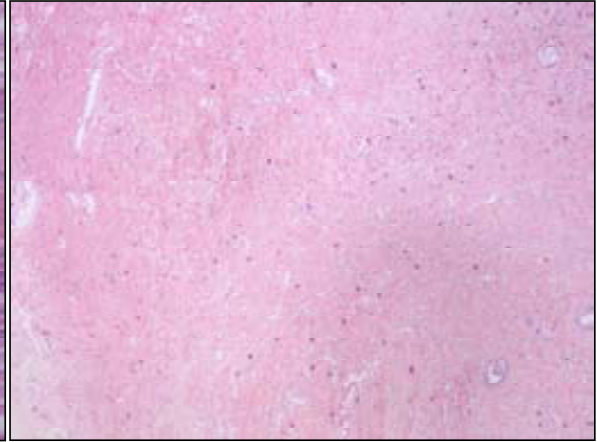


Figura A26: Fibroma
(H&E x100)

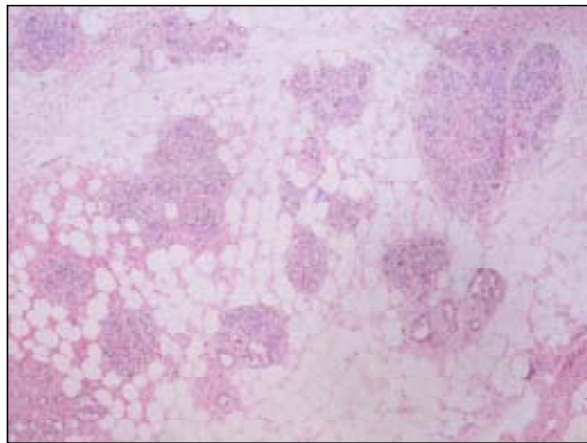


Figura A27: Hiperplasia lobulillar
(H&E x100)

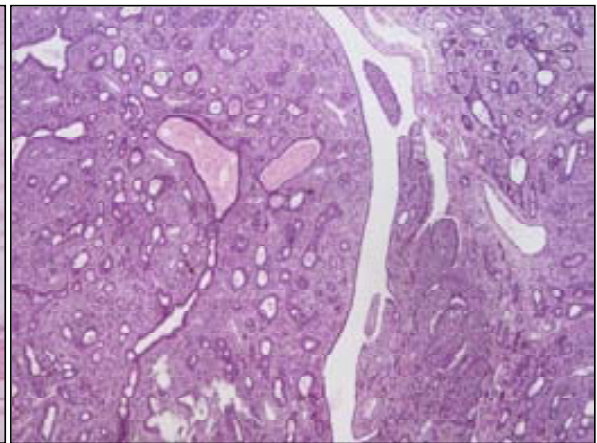


Figura A28: Hendiduras foliáceas en tumor *phyllodes*-like (H&E x40)

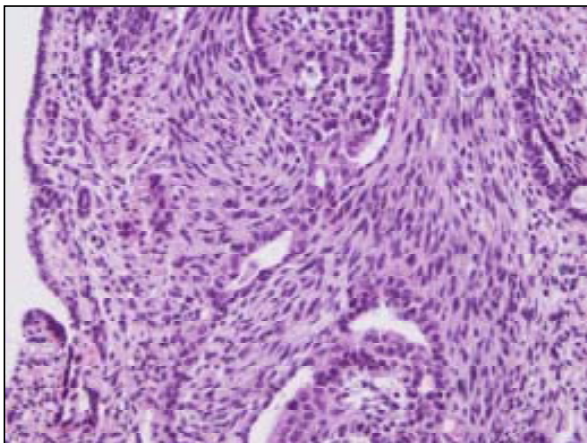


Figura A29: Estroma celular en tumor *phyllodes*-like (H&E x200)

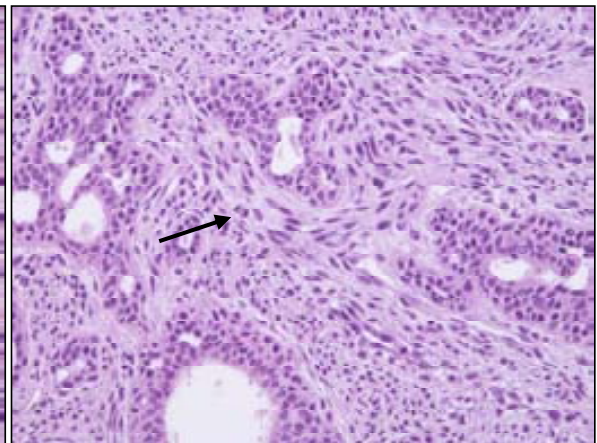


Figura A30: Figuras de mitosis en estroma de tumor *phyllodes*-like (H&E x200)

RESULTADOS

Arch Pathol Lab Med 2002; 126: 915-927

2. ARTÍCULO 2

High fat corn oil diet promotes the development of high histologic grade rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not.

I. Costa, R. Moral, M. Solanas, E. Escrich.

Breast Cancer Research and Treatment 2004; 86: 225-235

RESULTADOS



Report

High-fat corn oil diet promotes the development of high histologic grade rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not

Irmgard Costa^{1,2}, Raquel Moral¹, Montserrat Solanas¹, and Eduard Escrich¹

¹Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Physiology Unit, Medical School, Universitat Autònoma de Barcelona; ²Department of Pathology, Hospital General de Granollers, Barcelona, Spain

Key words: corn oil, DMBA, high-fat diet, histopathology, mammary carcinomas, olive oil, rat

Summary

Effects of a high corn oil and a high olive oil diet on the histopathologic characteristics of rat dimethylbenz(α)anthracene-induced mammary adenocarcinomas were investigated in comparison with those of a control low-fat diet. Two experimental series (A and B) studied the influence of a high corn oil diet on the initiation and the promotion of mammary carcinogenesis, while another one (C) assessed the effects of the two dietary lipids on the promotion. Nine parameters have been analyzed and a new histologic grading method, adapted to rat tumors, has been applied in each carcinoma. High corn oil diets, particularly when acting as promoters, associated with higher-grade carcinomas than control ($p < 0.05$) and high olive oil groups. Stromal invasion and tumoral necrosis were more prominent and a prevailing cribriform pattern was observed ($p < 0.05$). High olive oil diet adenocarcinomas exhibited a predominantly low histologic grade and few necrotic and invasive areas, similar to the control, and they presented the highest percentage of papillary areas. Lymphoplasmacytic and mast cell infiltration were also influenced by the dietary lipids. Thus, high corn oil diet adenocarcinomas presented a higher degree of morphological malignancy than control and high olive oil tumors, which is in line with the greater clinical malignancy described in rats from the former group and the non-promoting effect of the high olive oil diet. As far as we are concerned, a similar histopathologic approach of the effects of the dietary lipids on experimental breast cancer has not been carried out up to now.

Introduction

Breast cancer is the most common malignancy and the second most frequent cancer-related death in women [1]. The geographical variation of incidence rates suggests that lifestyle and environmental factors, especially diet, may be associated with the development of this neoplasia [2]. Some epidemiological and, particularly, animal studies have shown that dietary lipids influence breast cancer development at several stages, being the amount and type of fat the key factors of this relationship [3, 4]. Thus, the high dietary intake of $n - 6$ polyunsaturated fatty acids (PUFAs), primarily linoleic acid (18:2 $n - 6$), has a stimulating effect, higher than that of the high saturated fat

diets, while high levels of very long chain $n - 3$ PUFAs inhibit the tumor growth. Conjugated linoleic acid and γ -linolenic acid seem to have also inhibitory effects. As for the olive oil, rich in oleic acid (18:1 $n - 9$), while several epidemiological studies show a relatively low risk of breast cancer in countries with a high intake of this oil, animal model studies have reported from a non-promoting or a low-promoting effect to a protective one on breast cancer [5–10].

One of the most extensively used experimental mammary tumor models, for its similarities in pathogenesis and molecular features with the human system, is the one induced in the rat with dimethylbenz(α)anthracene (DMBA) [11]. We have recently carried out a detailed morphologic

analysis of DMBA-induced mammary carcinomas. In that study, we assessed the validity of this model for the study of human breast cancer, from a histopathologic point of view, and we developed an accurate characterization of rat mammary tumors, useful for the analysis of the effects of distinct influences on experimental breast cancer [12]. Using this animal model, we previously demonstrated a tumor-enhancing effect of a high corn oil diet, rich in $n - 6$ PUFAs, and a negative modulatory effect of a high virgin olive oil diet on mammary carcinogenesis [13–16]. The aim of the present study was to investigate whether the different clinical behavior of rat mammary tumors by the effect of dietary lipids associates with specific histopathologic features related to their degree of malignancy. Most of the studies handling a similar experimental approach have been restricted to classify the mammary gland tumors developed and to evaluate few parameters [17–20]. Here, we applied the exhaustive method previously stated to be useful to analyze rat mammary adenocarcinomas and we also designed a new histologic grading method adapted to these tumors. This histopathologic approach will allow us to gain an insight into the consequences that a nutritional factor, as dietary lipids, can induce on the degree of morphological differentiation of mammary tumors, which undoubtedly has a prognostic value.

Materials and methods

Animals and experimental design

We used Sprague-Dawley female rats (IFFA-CREDO-source ICO: OFA. SD [IOPS Caw]) from three experimental series consisting of 60 animals each (A, B and C). On starting, the animals were 22 days of age, housed four per cage and maintained environmentally controlled with a 12 light/dark cycle. They were fed fresh experimental diets and water *ad libitum*. At 53 days of age, rats were treated with a single dose of 5 mg of 7,12-DMBA (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) administered in corn oil by means of gastric gavage [21].

In series A and B, we investigated the influence of a high corn oil diet on different stages of mammary carcinogenesis. Animals were randomly distributed in three groups ($n = 20$) depending on the provided diet throughout the study: a control

group – LFCO – was fed all the study with the low-fat diet ($m3$); an initiation group – HFCO_I –, whose animals were supplied the high corn oil diet ($M20$) from weaning until sacrifice; and a promotion group – HFCO_P –, where rats were fed the control diet from weaning until induction with the carcinogen and then changed to $M20$. Rats from series C were distributed in three groups ($n = 20$) to assess the influence of different dietary lipids in the promotion of experimental mammary carcinogenesis. All the animals were fed the low-fat diet from weaning to induction. Rats from control group – LFCO – were maintained on this diet all through the study. The other two groups were fed different high-fat diets: the high corn oil diet group (HFCO_P) and the high olive oil diet group (HFOO_P). The animals were sacrificed by decapitation at an average age of 254, 278 and 261 days old in series A, B and C, respectively, and a complete post-mortem examination was carried out. Nineteen mammary adenocarcinomas from group LFCO, 64 from group HFCO_I and 66 from group HFCO_P of series A; 32 adenocarcinomas from group LFCO, 47 from group HFCO_I and 36 from group HFCO_P of series B; and 69 from LFCO, 91 from HFCO_P and 67 from group HFOO_P of series C were submitted to histopathologic analysis.

All animals received humane care under an institutionally approved experimental animal protocol, following the legislation applicable in this country.

Diets

The definition, preparation and suitability of the semi-synthetic experimental diets used were previously described [15, 22, 23]. Three diets were designed: the $m3$ low-fat diet (3% corn oil), the $M20$ high corn oil diet (20% corn oil) and the $m3O17$ high olive oil diet (3% corn oil + 17% virgin olive oil). Diets also contained 18% ($m3$) or 23% ($M20$ and $m3O17$) casein, 67.9% ($m3$) or 45% ($M20$ and $m3O17$) dextrose; and 5% cellulose, 5.9% salt-mixture and 0.24% vitamin mixture. In order to maintain the normal lipidic metabolism, they were supplemented with methionine (0.51% in $m3$ and 0.66% in the two high-fat diets), choline (1800 mg/kg diet) and folic acid (5 mg/kg diet). Diets were prepared weekly and stored under nitrogen in the dark at 4 °C.

Histopathology

Macroscopic mammary lesions were collected and fixed in 10% buffered formalin. Five-micron sections were cut from paraffin-embedded tissue and stained with hematoxylin and eosin for light microscopic study.

Epithelial lesions were classified applying the morphological criteria delineated by Young and Hallows [24]. We have analyzed nine histopathologic parameters in each carcinoma: pattern and nuclear grade, mitotic index, tumoral necrosis, lymphoplasmacytic infiltration, structural pattern, stromal reaction, mast cell infiltration and secretion. Some of these features were adapted to the characteristics of rat mammary tumors (refer to [12] for detailed descriptions). In this sense, pattern grade was classified in three scores (1, 2 and 3), depending on the extent of solid areas. Tumor mitotic activity was distributed in three categories, according to the number of mitoses reported in 10 high power fields (HPF), at $\times 400$ magnification: (1) < 10 mitoses, (2) 10 to < 20 mitoses, and (3) ≥ 20 mitoses. Carcinomas with less than 10 mitoses/10 HPF were subclassified into three subcategories: (a) ≤ 3 mitoses, (b) 4–6 mitoses and (c) 7–9 mitoses. Structural pattern evaluated the cribriform and papillary areas, according to the proportion of the cribriform pattern. Tumoral necrosis was evaluated microscopically because only preserved areas were removed from the tumor for histopathologic analysis.

Finally, in order to better characterize the effects of the dietary lipids on the histopathologic features of experimental mammary carcinomas, we integrated the three parameters used in human breast pathology for morphological grading. We applied in each carcinoma, on the one hand, the Scarff–Bloom–Richardson grading method used in human pathology [25] and, on the other hand, a modified system, which we adapted to rat mammary carcinomas. Thus, in order to obtain the overall grade, the scores for the degree of pattern differentiation, nuclear pleomorphism and mitotic index were added together. Pattern and nuclear grades were scored 1, 2 and 3 points in both methods. When we have used the Scarff–Bloom–Richardson scheme, the mitotic index was applied as described in human breast cancer. The overall histopathologic grade was determined on the following basis: 3–5 points corresponded to grade I

or well differentiated adenocarcinoma, 6–7 points to grade II or moderately differentiated adenocarcinoma and 8–9 points to grade III or poorly differentiated adenocarcinoma. The new grading method for rat mammary adenocarcinomas that we designed represents a modification of the Scarff–Bloom–Richardson scheme. In this way, we have accepted 5 scores for the mitotic index parameter, given the subclassification of the first mitotic category (< 10 mitoses/10 HPF). The scores for this parameter were: ≤ 3 mitosis/10 HPF scored 1 point, 4–6 scored 2 points, 7–9 scored 3 points, 10–19 scored 4 points and ≥ 20 scored 5 points. When adding the scores of the pattern and nuclear grade, the global histopathologic grade in each carcinoma was determined as: 3–5 points corresponded to a grade I, 6–8 points to a grade II and 9–11 points to a grade III.

Statistical evaluation

The statistical analysis of the qualitative data was carried out using a *ji*-square test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

491 mammary adenocarcinomas from the different dietary groups of the three experimental series were submitted to histopathologic examination. When analyzing pattern and nuclear grade, we observed that adenocarcinomas from high corn oil groups, and mainly those from groups HFCO_P, tended to a greater architectural and nuclear grade compared with control groups tumors. Thus, while more than 50% of the adenocarcinomas showed a pattern grade I in groups LFCO, the high corn oil groups displayed a greater distribution between the three grades (Figure 1(a)). Moreover, the percentage of adenocarcinomas exhibiting a pattern grade III was 33.3 and 30.6% in groups HFCO_P of series A and B, respectively, compared with 5.3 and 6.2% in the corresponding control groups ($p = 0.013$ in series A and $p = 0.035$ in series B). In series C, these differences were near to the statistical significance ($p = 0.056$). With reference to nuclear grade (Figure 1(b)), while carcinomas from groups LFCO were mostly grade I (63.2% in series A and 53.6% in series C) or 2 (62.5% in series B), adenocarcinomas from groups HFCO_P and

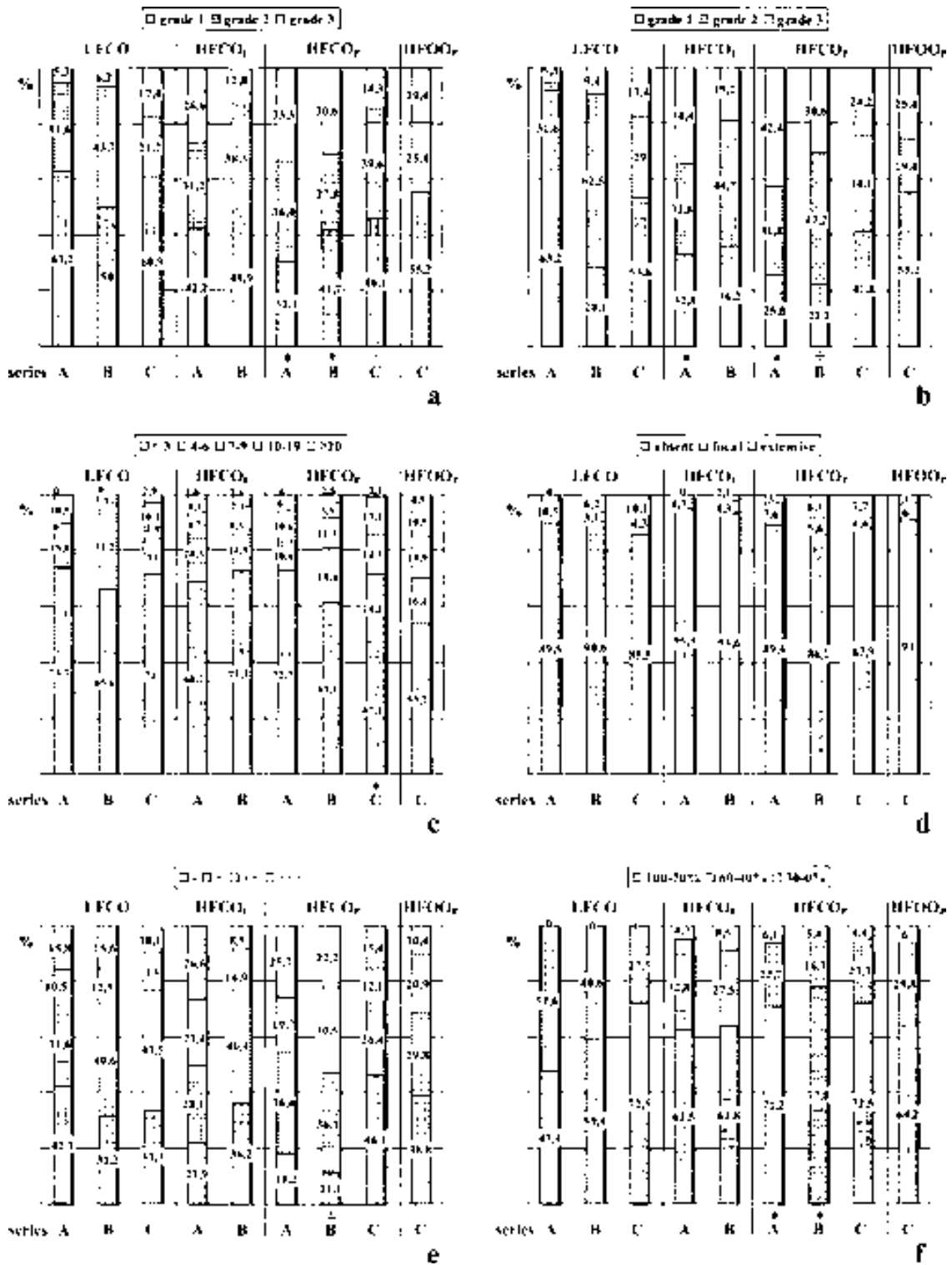


Figure 1. Analysis of the nine histologic parameters in rat mammary adenocarcinomas from different dietary fat groups: (a) pattern and (b) nuclear grade, (c) mitotic activity, (d) tumoral necrosis, (e) lymphoplasmacytic cell infiltration, (f) structural pattern, (g) stromal reaction, (h) mast cell infiltration and (i) secretion. Each column represents an experimental group of one series. *: significantly different ($p < 0.05$) from the values of its corresponding control group; \pm : $0.1 > p > 0.05$ from the values of its corresponding control group.

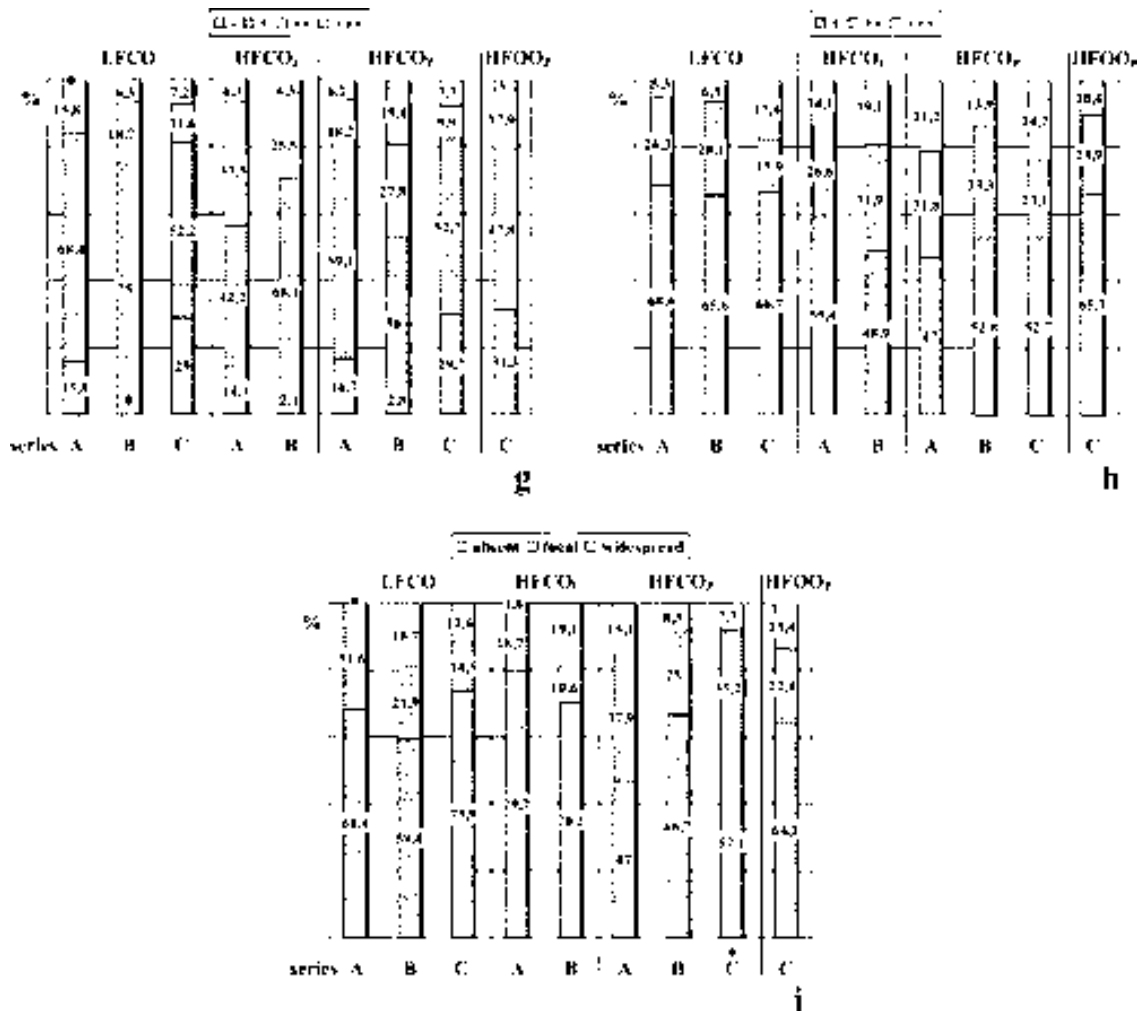


Figure 1. (Continued)

HFCO₁ exhibited a higher grade ($p = 0.019$ and $p = 0.002$ in series A between the control and the two high-fat diet groups – HFCO₁ and HFCO_p, respectively –; $p = 0.098$ in series B when comparing group LFCO and HFCO_p). Regarding group HFOO_p, the adenocarcinomas exhibited a similar distribution of pattern and nuclear grades to group LFCO.

With respect to tumor mitotic activity (Figure 1c), most of the adenocarcinomas of the three groups from series A and B exhibited a similar low mitotic activity (≤ 3 mitosis/10 HPF). However, a trend towards a higher tumor proliferation in the high-fat diet groups, and especially in HFCO_p from series B, compared to the control group was observed. Moreover, in series C, adenocarcinomas from group HFCO_p presented a

significantly higher mitotic count than those from the control group ($p = 0.012$). Thus, more than 50% of adenocarcinomas from HFCO_p displayed >3 mitosis/10 HPF, while less than 30% of control group adenocarcinomas exhibited that mitotic index. As for the olive oil tumors, the values were not significantly different from those of the control group, although they were somewhat higher.

When tumoral necrosis was analyzed, the majority of the carcinomas did not present this feature (Figure 1(d)). An extensive tumoral necrosis was seen mainly in adenocarcinomas from group HFCO_p in series A and B, compared with groups LFCO and HFCO₁. In series B, group HFCO_p exhibited the higher percentage of adenocarcinomas with tumoral necrosis, focal or extensive. Adenocarcinomas from groups HFCO₁

and HFOO_P were the ones with less microscopic necrotic areas, although these differences were not statistically significant.

With regard to inflammatory cell infiltration, it was absent or light (-/+) in the great majority of carcinomas of groups LFCO (Figure 1(e)). Thus, 73.7, 71.8 and 76.8% of carcinomas of this group in series A, B and C, respectively, showed no (-) or scanty (+) inflammatory cell infiltration. As for both high-fat corn oil and olive oil groups, the adenocarcinomas exhibited a trend towards a more prominent lymphoplasmacytic reaction, especially when comparing groups HFCO_P and LFCO from series B (52.7% of the adenocarcinomas from group HFCO_P displayed a moderate (++) or a prominent (+++) inflammatory cell infiltration) ($p = 0.096$).

Most of the adenocarcinomas from high-fat corn oil groups displayed a pure or a prevailing cribriform pattern (100–70% of the tumor), particularly in series A and B (Figure 1(f)). This fact was highlighted when comparing groups LFCO and HFCO_P of both series ($p = 0.031$ in series A and $p = 0.047$ in series B). In this way, while 47.4 and 59.4% of carcinomas of groups LFCO from series A and B, respectively, predominantly exhibited this pattern, 71.2 and 77.8% of groups HFCO_P carcinomas were widely glandular. These differences did not repeat in series C. Regarding high olive oil diet group, we found a lesser

percentage of adenocarcinomas with a prevailing cribriform pattern compared to LFCO and HFCO_P groups.

In relation to stromal reaction (Figure 1(g)), adenocarcinomas from high-fat corn oil diet groups showed a tendency to a more prominent response compared with tumors from groups LFCO. Nearly half of the carcinomas of group HFCO_I in series A and HFCO_P in series B displayed a clear or a truly desmoplastic (++ or +++) response, while the vast majority of tumors from groups LFCO in both series – more than 75% – exhibited no (-) or a light (+) stromal reaction. In series C, although the differences between groups LFCO and HFCO_P were not noted, we found a greater number of adenocarcinomas with unequivocal (+++) images of desmoplasia in these groups than in group HFOO_P.

The analysis of the mast cell infiltration showed a non-significant trend towards a denser infiltration in the high-fat corn oil diet groups than in LFCO, in the three series. In contrast, olive oil adenocarcinomas predominantly presented scarce mast cells, similarly to that observed in the control group (Figure 1(h)).

Regarding secretion, adenocarcinomas from group HFCO_P in series A and C ($p = 0.011$ in series C) and group HFOO_P in series C exhibited lipid droplets more often than those from groups LFCO. In contrast, in series B secretion was

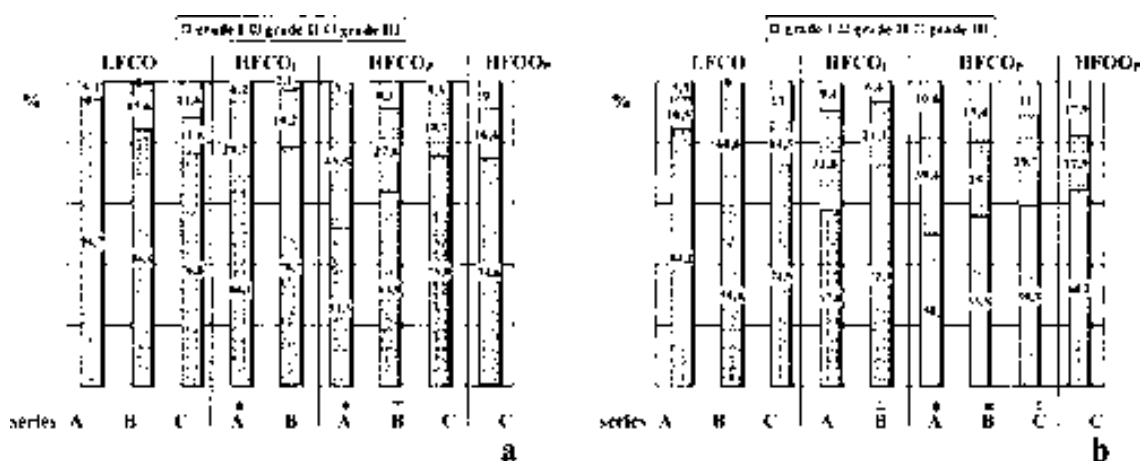


Figure 2. Results of the histologic grading of rat mammary adenocarcinomas from different dietary fat groups: (a) according to the Scarff-Bloom-Richardson method and (b) according to the proposed modified method adapted to the rat. Each column represents an experimental group of one series. *: significantly different ($p < 0.05$) from the values of its corresponding control group; \pm : $0.1 > p > 0.05$ from the values of its corresponding control group.

mainly found in carcinomas from group LFCO. Groups HFCO_I displayed the less secretory adenocarcinomas (Figure 1(i)).

Finally, when we applied the Scarff–Bloom–Richardson grading system in the adenocarcinomas, as used in human pathology, it was evident that the tumors from the high-fat corn oil groups, in series A and B, exhibited a higher grade than those from the control groups (Figure 2(a)). Therefore, in series A, the great majority of ade-

nocarcinomas from the control group were graded I, while this percentage was significantly lower in the high-fat diet groups ($p = 0.022$ when comparing with group HFCO_I and $p = 0.001$ when comparing with group HFCO_P). Regarding series B, these differences, although not so evident, were also present. High-fat diet groups, and specially HFCO_P group ($p = 0.092$), presented a higher percentage of grade II or III adenocarcinomas than those from group LFCO, where no grade III

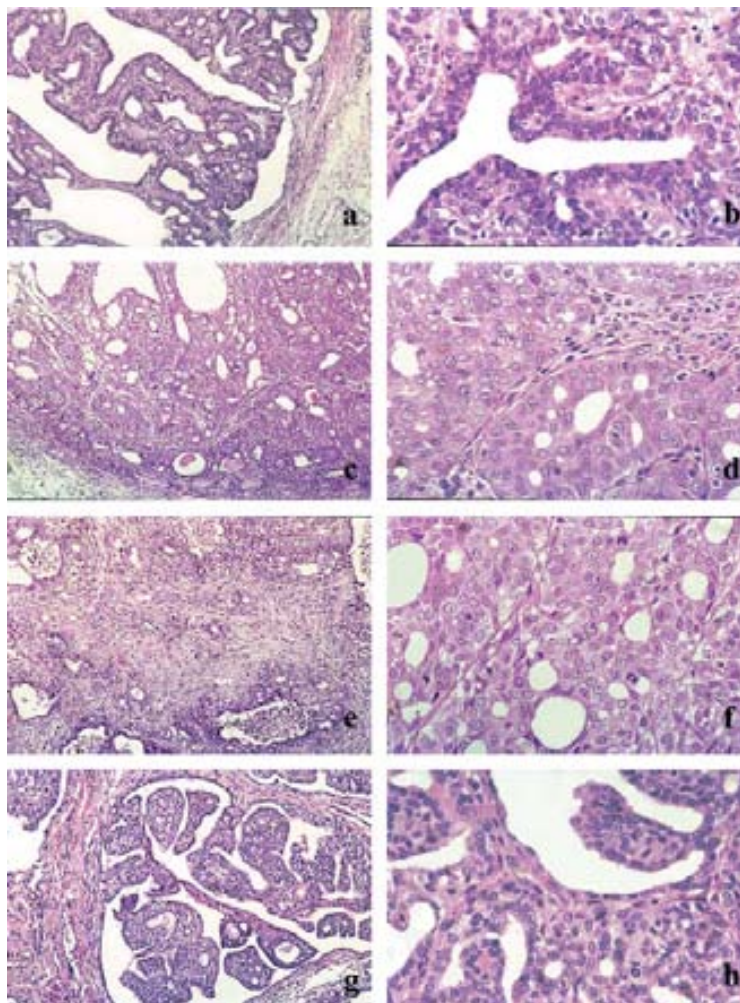


Figure 3. Histopathologic features of rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas from the different dietary groups. (a and b) Most of the tumors from the low-fat diet groups were low grade and non-invasive; they displayed cribriform and papillary areas and no necrosis. (c and d) Carcinomas from groups HFCO_I exhibited a high pattern and nuclear grade, but few mitotic figures and no necrotic areas. (e and f) Adenocarcinomas from groups HFCO_P presented the highest degree of morphological aggressiveness, with stromal invasion and tumoral necrosis, and a prevailing cribriform pattern; tumor cells displayed nucleoli and a high mitotic count. (g and h) Adenocarcinomas of the high olive oil group (HFCO_O) were well differentiated, with papillary areas and no or light stromal response, but with high mitotic figures (hematoxylin and eosin staining; original magnification $\times 10$ (a, c, e, g); $\times 20$ (b, h); $\times 40$ (d, f).

adenocarcinoma was found. These differences did not repeat in series C, when applying this grading method. Moreover, no different distribution was found between the control and the high olive oil group.

Applying the modified histopathologic grading method that we propose in this work, the differences observed between high corn oil diet and control groups from the three series were highlighted (Figure 2(b)). In this way, we found statistically significant differences when comparing groups LFCO and HFCO_P in series A and B. In series A, more than 80% of carcinomas from group LFCO exhibited a grade I, while half of the tumors from group HFCO_P presented a higher grade ($p = 0.028$). In series B, HFCO_P group presented a significant higher proportion of grade III tumors than group LFCO ($p = 0.023$). Regarding groups HFCO_I from both series, the differences with the control group were also noted ($p = 0.083$ in series B). In series C, we also found a statistical tendency towards a higher histologic grade in the tumors induced in group HFCO_P, compared to those from the control ($p = 0.078$) and the olive oil groups. There were no differences in the rate distribution between groups LFCO and HFCO_P.

Figure 3 displays a representative image of the most characteristic features of the adenocarcinomas developed in each dietary group.

Discussion

We previously demonstrated the tumor-enhancing effect of a high corn oil diet, rich in $n - 6$ PUFAs, and a negative modulatory effect of a high virgin olive oil diet on the DMBA-induced mammary carcinogenesis [13–16]. In the present study, we investigated the effects of these lipids on the tumor histopathologic characteristics and their possible association with the clinical behavior. First, we analyzed several morphologic parameters, previously stated to be useful to characterize rat mammary adenocarcinomas. Some of them were adapted to these tumors, which exhibit some differences with their human counterparts, as it has been justified [12]. Second, we designed a new grading method, which represents a modification of the Scarff–Bloom–Richardson scheme used in human mammary pathology, that will allow a better characterization of these experimental tu-

mors. As far as we are concerned, a similar histopathologic approach of this experimental situation has not been previously handled and the few preceding studies are basically restricted to classify and to evaluate the incidence of the different mammary gland tumors [17–20] or to evaluate few histopathologic parameters, as we will discuss below.

The results obtained in this study provide arguments in favor of an effect of dietary lipids on the histopathologic characteristics of mammary adenocarcinomas, which is in agreement with their effect on the carcinogenesis process. On the one hand, tumors developed in rats fed the high-fat corn oil diet were associated with morphologic features compatible with a high degree of malignancy, particularly when this diet acted as promoter, rather than in the initiation stage of mammary carcinogenesis. Thus, tumors displayed a higher pattern and nuclear grade, mainly grade III, and a trend towards a greater mitotic count than those from the control and olive oil groups. These results are in line with the reported proliferative effect of high-fat corn oil diets and linoleic acid on mammary epithelium and breast cancer cell lines [26–28]. In the 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine (PhIP) induced-mammary cancer model, it has been also described a higher proliferative index in rats fed a high-fat diet than in low-fat diet animals [29]. On the other hand, group HFCO_P carcinomas exhibited a low pattern and nuclear grades similar to the control group tumors, but more mitotic figures. This higher mitotic activity, compared to those from the control group, is apparently amazing given the well-differentiating pathologic profile of olive oil tumors and could be related to an unspecific effect of the higher energy intake characteristic of high-fat diets [15].

Another parameter related to the malignancy of mammary tumors, particularly to their invasive capacity, which is the stromal response, was more prominent in carcinomas from high corn oil groups than in those from control and high olive oil groups, suggesting a higher incidence of infiltrative carcinomas in rats fed a rich linoleic acid diet. This finding has been previously described by Rogers et al. [30] and, more recently, in the PhIP induced-mammary carcinogenesis model [29]. Moreover, the higher invasive ability could explain, as well, the high incidence of

experimental metastasis observed in nude mice fed a high percentage of linoleic acid [31]. In this way, the lower stromal response observed in the high olive oil group could suggest a poor invasive ability of the carcinomas developed in this dietary group.

Some features described in human mammary pathology as adverse prognostic factors, such as the lymphoplasmacytic infiltration and tumoral necrosis, tended to be more prominent in the high corn oil groups, mainly when $n - 6$ lipids acted as promoters, than in control groups carcinomas. Given the significant correlation between histologic grade and these two features [12], these results would be in line with the higher morphologic aggressiveness displayed by those adenocarcinomas. Moreover, adenocarcinomas from group HFOO_p presented less necrotic areas, which could be related to the lower average volume per tumor of this group, compared with groups LFCO and HFCO_p [15]. Hubbard and Erickson [32] have also demonstrated the absence of necrotic tissue in smaller tumors. On the other hand, the moderate lymphoplasmacytic reaction exhibited in olive oil tumors could indicate a direct effect of fatty acids on this parameter, as it has been described with mast cell and macrophage populations [32].

The prevailing pure cribriform pattern observed in high corn oil groups, and again mainly in groups HFCO_p rather than in HFCO_l, in contrast to the most extensive papillary areas displayed by olive oil tumors were compatible with the higher degree of malignancy of the formers and the lower degree observed in the latter [12]. Moreover, taken into account that in human breast cancer, papillary carcinomas have been reported to have a favorable prognosis [33], this result would be consistent with the lower morphological aggressiveness proposed for the tumors from the olive oil group.

The denser mast cell infiltration observed in high corn oil adenocarcinomas compared to low-fat and high olive oil tumors could be explained by the role of mast cell secretion products in tumorigenesis. In this sense, high corn oil diets could increase this cellular population and, thus, shorten the latency and enhance the growth of mammary tumors, as well as induce tumoral invasion [32].

We evaluated the presence of secretion in the adenocarcinomas as a marker of functional and morphological differentiation. The results ob-

tained in series A and C showed a higher secretion activity in high fat promotion groups, corn and olive oil, than in groups LFCO and HFCO_l. However, series B presented a non-significant tendency to a predominance of intracytoplasmic lipid droplets in carcinomas from group LFCO. Several situations acting on the carcinomas could account for these results: the relationship between low histologic grade and secretion in these experimental carcinomas [12], the intracytoplasmic storage of lipid droplets in response to an excessive amount of fatty acids, and the use of the caloric value of this storage in highly mitotic carcinomas [32]. Given the wide range of influence that can affect this parameter in different senses, it is difficult to assess a simple explanation for the differences observed between the groups.

The finding that dietary lipids affect the histopathologic features of experimental mammary carcinomas and that this effect depends on the type and the moment of their administration in the carcinogenesis process was clearer demonstrated when we applied an integrated grading method, and particularly when we used the system adapted to rat mammary adenocarcinomas. Thus, applying the human Scarff-Bloom-Richardson grading method, we observed a higher percentage of less differentiated carcinomas in high corn oil groups, specifically in corn oil promotion groups, than in control or high olive oil groups. However, these results were only statistically significant in series A. When we used the modified grading system that we propose for these experimental mammary tumors, the differences between high corn oil promotion groups and the control groups became significant or nearly significant in all the series. Moreover, the differences between high corn oil and olive oil tumors were more evident. Thus, this adapted grading method allowed a more accurate characterization of these tumors, given their wider distribution among the grades and, therefore, to better typify the effects of an environmental factor, as dietary lipids, on breast cancer, from a histopathologic approach.

The integrated analysis carried out in the present study demonstrates that dietary $n - 6$ polyunsaturated lipids affect the morphological appearance of mammary carcinomas inducing a poorer differentiation, which is in line with the greater degree of clinical malignancy previously described by us in the same series [13, 14, 16]. In

human breast pathology, histopathologic grading has prognostic implications, affecting clinical outcome and overall and free survival [33]. Moreover, our study also demonstrates that the more aggressive features are present when $n - 6$ dietary fats act as promoters than when they are also given during the initiation of the carcinogenesis. In this last situation, lipids may have modified the reproductive parameters of the animal, accelerating the appearance of puberty and therefore of mammary gland maturation [34]. The mammary tissue, more highly differentiated, would be more resistant to neoplastic development and more independent from promoting factors, as dietary fats, than in promotion group where the carcinogen would have act when the mammary gland exhibits its higher susceptibility [35].

Regarding high olive oil diet group, the absence of significant differences with the control and the lower degree of morphologic malignancy of the carcinomas compared to the high corn oil diet group are in line with the non-promoting effect of these lipids on mammary carcinogenesis that we previously demonstrated [15].

In summary, our study demonstrates that dietary lipids affect the degree of morphological aggressiveness of the experimental mammary tumors according to their clinical behavior, which provides more arguments in favor of their relationship with breast cancer.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from “Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología” (CICYT SAF92-0537, CICYT OLI96-2114), “Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya i Balears 2002”, and “Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología” and FEDER (BFI 2003-07341).

References

- Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M: Cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 52: 23–47, 2002
- World Cancer Research Foundation and American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. World Cancer Research Foundation/American Institute for Cancer Research, Washington, DC, 1997.
- Clinton SK: Diet, anthropometry and breast cancer: integration of experimental and epidemiologic approaches. *J Nutr* 127: 916S–920S, 1997
- Bartsch H, Nair J, Owen RW: Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 26: 2209–2218, 1999
- Welsch CW: Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: a review and critique. *Cancer Res* 52: 2040s–2048s, 1992
- Fay MP, Freedman LS, Clifford C, Midthune N: Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res* 57: 3979–3988, 1997
- Ip C: 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, 1997
- Lipworth L, Martínez ME, Angell J, Hsieh C, Trichopoulos D: Olive oil and human cancer: an assessment of the evidence. *Prev Med* 26: 181–190, 1997
- Zusman I, Gurevich P, Madar Z, Nyska A, Korol D, Timar B, Zuckerman A: Tumor-promoting and tumor-protective effects of high-fat diets on chemically induced mammary cancer in rats. *Anticancer Res* 17: 349–356, 1997
- Lee MM, Lin SS: Dietary fat and breast cancer. *Annu Rev Nutr* 20: 221–248, 2000
- Escrich E: Validity of the DMBA-induced mammary cancer model for the study of human breast cancer. *Int J Biol Markers* 2: 197–206, 1987
- Costa I, Solanas M, Escrich E: Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz(a)anthracene in the rat. A comparative analysis with human breast tumors. *Arch Pathol Lab Med* 126: 915–927, 2002
- Escrich E, Solanas M, Soler M, Ruiz de Villa MC, Sánchez JA, Segura R: Dietary polyunsaturated $n - 6$ lipids effects on the growth and fatty acid composition of rat mammary tumors. *J Nutr Biochem* 12: 536–549, 2001
- Solanas M, Moral R, Escrich E: The stimulating effect of a high-fat $n - 6$ polyunsaturated diet on rat DMBA-induced mammary tumors is not related to changes in c-Ha-ras1 mRNA tumor expression. *Nutr Res* 21: 1261–1273, 2001
- Solanas M, Hurtado A, Costa I, Moral R, Menendez JA, Colomer R, Escrich E: Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA-induced mammary tumors compared with a high corn oil diet. *Int J Oncol* 21: 745–753, 2002
- Moral R, Solanas M, García G, Colomer R, Escrich E: Modulation of EGFR and new expression by $n - 6$ and $n - 9$ high-fat diets in experimental mammary adenocarcinomas. *Oncol Rep* 10: 1417–1424, 2003
- Hopkins GH, Hard GC, West CE: Carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in C3H-AvylB mice: influence of different dietary fats. *J Natl Cancer Inst* 60: 849–853, 1978
- Fischer SM, Conti CJ, Locniskar M, Belury MA, Maldve RE, Lee ML, Leyton J, Slaga TJ, Bechtel DH: The effect of dietary fat on the rapid development of mammary tumors induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in SENCAR mice. *Cancer Res* 52: 662–666, 1992

19. Ghoshal A, Preisseger K-H, Takayama S, Thorgeirsson SS, Snyderwine EG: Induction of mammary tumors in female Sprague-Dawley rats by the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5-b]pyridine and effect of dietary fat. *Carcinogenesis* 15: 2429-2433, 1994
20. Cohen LA, Epstein M, Pittman B, Rivenson A: The influence of different varieties of olive oil on *N*-methylnitrosourea (NMU)-induced mammary tumorigenesis. *Anticancer Res* 20: 2307-2312, 2000
21. Huggins C, Morii S, Grand LC: Mammary cancer induced by a single dose of polynuclear hydrocarbons: routes of administration. *Ann Surg* 154: 315-318, 1961
22. Escrich E, Solanas M, Segura R: Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: I - Diet definition. *In vivo* 8: 1099-1106, 1994
23. Escrich E, Solanas M, Ruiz de Villa MC, Ribalta T, Muntané J, Segura R: Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: II - Suitability of the diets. *In vivo* 8: 1107-1112, 1994
24. Young S, Hallows RC: Tumours of the mammary gland. In: Turusov V (ed.) *Pathology of Tumours in Laboratory Animals, Tumours of the Rat, Vol. I*. IARC Sci Publ, Lyon, 1973, pp 31-86
25. Dalton LW, Page DL, Dupont WD: Histologic grading of breast carcinoma. A reproducibility study. *Cancer* 73: 2765-2770, 1994
26. Welsch CW, DeHoog JV, O'Connor DH, Sheffield LG: Influence of dietary fat levels on development and hormone responsiveness of the mouse mammary gland. *Cancer Res* 45: 6147-6154, 1985
27. Zhang L, Bird RP, Bruce WR: Proliferative activity of murine mammary epithelium as affected by dietary fat and calcium. *Cancer Res* 47: 4905-4908, 1987
28. Cunningham DC, Harrison LY, Shultz TD: Proliferative responses of normal human mammary and MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid, conjugated linoleic acid and eicosanoid synthesis inhibitors in culture. *Anticancer Res* 17(1A): 197-203, 1997
29. Snyderwine EG, Thorgeirsson UP, Venugopal M, Roberts-Thomson SJ: Mammary gland carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol [4,5-b]pyridine in Sprague-Dawley rats on high and low-fat diets. *Nutr Cancer* 31: 160-167, 1998
30. Rogers AE, Conner B, Boulanger C, Lee S: Mammary tumorigenesis in rats fed diets high in lard. *Lipids* 21: 275-280, 1986
31. Rose DP, Connolly JM: Influence of dietary linoleic acid on experimental human breast cancer cell metastasis in athymic nude mice. *Int J Oncol* 13: 1179-1183, 1998
32. Hubbard NE, Erickson KL: Influence of dietary fats on cell populations of line 168 mouse mammary tumors: a morphometric and ultrastructural study. *Cancer Lett* 35: 281-294, 1987.
33. Rosen PP, Oberman HA: *Tumors of the Mammary Gland. Atlas of Tumor Pathology (3rd series, fascicle 7)*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1992.
34. Innami S, Yang MG, Mickelsen O, Hafs HD: The influence of high-fat diets on estrous cycles, sperm production and fertility of rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 143: 63-68, 1973
35. Russo IH, Russo J: Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Persp* 104: 938-967, 1996

Address for offprints and correspondence: Eduard Escrich, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Medical Physiology Unit, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain; *Tel.:* +34-93-581-14-23; *Fax:* +34-93-581-29-86; *E-mail:* Eduard.Escrich@uab.es

RESULTADOS

Antecedentes:

Como se ha comentado en el apartado B.1.c de la “Introducción”, estudios epidemiológicos y, sobretodo, experimentales han demostrado que los lípidos de la dieta constituyen un factor que influye en el cáncer de mama, relación que parece establecerse principalmente en la fase de promoción de la carcinogénesis y que depende de la cantidad y del tipo de grasa. El “Grup Multidisciplinari per a l’Estudi del Càncer de Mama” (GMECM), del que la doctoranda forma parte, ha aportado conocimientos clínicos y moleculares en el proyecto de investigación que desarrolla sobre “Lípidos de la Dieta y Cáncer de Mama”, que han sido plasmados en la literatura, tal como se tratará en el apartado de la “Discusión”, formando, algunos de éstos trabajos, parte de este compendio de publicaciones. En este sentido, se considera que las dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) n-6, especialmente ácido linoleico, presente en el aceite de maíz, ejercen un efecto estimulador del cáncer de mama experimental, mientras que el aceite de oliva, que además del ácido oleico (ácido graso monoinsaturado) contiene otros componentes bioactivos, parece mostrar una modulación predominantemente negativa. El estudio morfológico de los tumores de mama desarrollados en diferentes situaciones de dietas, referentes al aporte de grasas, ha sido tratado en la literatura de forma parcial, limitado al diagnóstico de las lesiones y, en el caso de los carcinomas, al análisis de parámetros histopatológicos aislados, como la actividad proliferativa o la capacidad invasiva, tal como se revisará en el apartado de la “Discusión”. El objetivo del trabajo que constituye el presente artículo fue analizar las características histopatológicas de los carcinomas de mama desarrollados en cuatro grupos de dieta distintas, de tres series experimentales de cáncer de mama inducido con DMBA en la rata: dos series (A y B) con un grupo normolipídico (LFCO) y dos de dieta rica en aceite de maíz, uno que analiza el efecto en la iniciación (HFCO_I) y el otro en la promoción (HFCO_P) de la carcinogénesis; y otra serie (C) con un grupo normolipídico y dos de dieta hiperlipídica, uno rico en aceite de maíz (HFCO_P) y el otro en aceite de oliva virgen extra (HFOO_P), actuando ambos en la promoción. El diseño experimental se describe con mayor detalle en el artículo. Concretamente, se pretendió valorar si se observaban diferencias morfológicas relacionadas con la agresividad de los tumores que pudieran corresponderse con el comportamiento clínico descrito en las distintas situaciones. Con este propósito se evaluaron, en primer lugar, los parámetros histopatológicos descritos en el anterior artículo y, en segundo lugar, se realizó un análisis integrado de los carcinomas, de forma similar a lo que se realiza en la mama humana, aplicando, por un lado, el Sistema de Gradación de Scarff, Bloom y Richardson usado en

patología humana, y, por otro lado, un sistema de gradación modificado y adaptado a los carcinomas de mama de la rata, diseñado por los autores, tal como se defiende en el artículo y en el apartado A de la “Discusión” de este trabajo. El estudio llevado a cabo se considera original y novedoso ya que no se recoge en la literatura una aproximación similar, según nuestro conocimiento.

Resumen de los resultados y datos adicionales:

En la Tabla A1 (A: adicional al artículo) se recoge la incidencia de animales afectados por patología mamaria, en el momento del sacrificio, y las lesiones tumorales y no tumorales desarrolladas en las ratas de los grupos experimentales de las tres series.

Tabla A1: Incidencia tumoral y patología mamaria

	SERIE A			SERIE B			SERIE C		
	LFCO	HFCO _I	HFCO _P	LFCO	HFCO _I	HFCO _P	LFCO	HFCO _P	HFOO _P
Incidencia tumoral	12/19 63,2%	18/20 ¹ 90%	13/19 68,4%	14/20 70%	17/20 85%	16/20 80%	14/20 70%	18/20 90%	16/20 80%
PATOLOGÍA MALIGNA									
Adenocarcinoma	22	70 ¹	69 ^{1,2}	35	56	42	72	95	69
% total /grupo	59,4%	75,3%	92%	56,4%	68,3%	52,5%	72,7%	69,8%	63,3%
PATOLOGÍA BENIGNA									
Adenoma	0	0	0	6	3	7	6	10	8
Fibroadenoma	8	11	2	10	13	14	13	14	12
Fibroma	0	0	0	2	4	0	1	2	1
Papiloma	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Lipoma	2	3	1	1	0	0	0	0	1
Ectasia ductal	1	1	0	4	0	0	0	0	2
Hiperplasia lobulillar	3	7	2	4	2	15	5	15	16
Hiperplasia ductal	0	0	0	0	3	1	0	0	0
Fibrosis	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Adenosis esclerosante	1	1	0	0	1	1	0	0	0
TOTAL	37	93	75	62	82	80	99	136	109

¹ Diferencias estadísticamente significativas del grupo señalado respecto al grupo control (LFCO) $P < 0,05$

² Diferencias estadísticamente significativas del grupo señalado respecto al grupo HFCO_I $P < 0,05$

Se observó un mayor número de ratas afectadas por patología mamaria en los grupos de dietas hiperlipídicas que en el control, con diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre LFCO y HFCO_I en la serie A. La patología más frecuente en todos los grupos experimentales fue el adenocarcinoma. Al analizar el número total de adenocarcinomas por grupo experimental, al final del experimento, se constató una mayor multiplicidad tumoral en los grupos de dietas ricas en aceite de maíz que en los controles y en el grupo HFOO_P. En este sentido, las diferencias entre LFCO y HFCO_I; LFCO y HFCO_P; y HFCO_I y HFCO_P de la serie A fueron estadísticamente significativas ($P < 0,05$). En la serie B, HFCO_I mostraba un mayor,

pero no significativo, porcentaje de adenocarcinomas que LFCO, mientras que HFCO_P desarrolló menor número y porcentaje de adenocarcinomas que HFCO_I y mayor que LFCO. En la serie C, los valores entre LFCO y HFCO_P fueron parecidos, siendo el grupo rico en aceite de oliva virgen extra el que presentó menor porcentaje de adenocarcinomas. Al analizar las lesiones epiteliales proliferativas desarrolladas en estos animales (Tabla A2), se repitieron los resultados anteriores. En este sentido, se constató que, aunque en todos los grupos experimentales el n° y el porcentaje de adenocarcinomas era mayor que los de las lesiones benignas (hiperplasia lobulillar y ductal, adenoma, fibroadenoma, adenosis esclerosante, papiloma), las mayores diferencias tendían a observarse en los grupos con dietas ricas en aceite de maíz. Así, en la serie A, las diferencias observadas en cada grupo de dieta hiperlipídica entre las lesiones malignas y benignas (70/19 del grupo HFCO_I y 69/4 del grupo HFCO_P) eran más evidentes que en el grupo control (22/12) ($P < 0,05$). Además, las diferencias entre el grupo HFCO_I y el HFCO_P fueron también significativas.

Tabla A2: Lesiones epiteliales proliferativas mamarias

	SERIE A			SERIE B			SERIE C		
	LFCO	HFCO _I	HFCO _P	LFCO	HFCO _I	HFCO _P	LFCO	HFCO _P	HFOO _P
Lesiones benignas	12	19	4	20	22	38	26	39	36
Lesiones malignas	22	70 ¹	69 ^{1,2}	35	56	42	72	95	69
	64,7%	78,6%	94,5%	63,6%	71,8%	52,5%	73,5%	71%	65,7%
TOTAL lesiones proliferativas	34	89	73	55	78	80	98	134	105
	34/37	89/93	73/75	55/62	78/82	80/80	98/99	134/136	105/109

¹Diferencias estadísticamente significativas del grupo señalado respecto al grupo control (LFCO) $P < 0,05$

²Diferencias estadísticamente significativas del grupo señalado respecto al grupo HFCO_I $P < 0,05$

Los resultados del mismo análisis no fueron tan claros y no cumplían criterios de significación estadística en la serie B donde, aunque el número de adenocarcinomas de HFCO_P era superior que en LFCO, la relación con las lesiones epiteliales proliferativas benignas era menor al grupo control. En la serie C, las diferencias entre ambos grupos de lesiones proliferativas fueron importantes en los tres grupos experimentales, siendo menor en el grupo HFOO_P.

El estudio histopatológico se realizó en un total de 491 adenocarcinomas mamarios y los resultados están plasmados en la Figura 1 del artículo. Al analizar el grado arquitectural y nuclear, se observó que los adenocarcinomas de los grupos ricos en aceite de maíz, y sobre todo los de los grupos HFCO_P, tendían a unos mayores grados que los de los grupos control. En este sentido, las diferencias fueron significativas entre HFCO_P y LFCO en las series A y B

y casi significativas en C, al analizar el grado arquitectural (Figura 1a), y entre HFCO_P y LFCO y HFCO_I y LFCO en la serie A, y casi significativas entre HFCO_P y LFCO en la serie B, referente al grado nuclear (Figura 1b). En cuanto al grupo HFOO_P, los adenocarcinomas mostraron una distribución de los grados similar a la del grupo control. Respecto a la actividad mitótica (Figura 1c), aunque los adenocarcinomas de todos los grupos experimentales exhibían pocas figuras de mitosis (menos de 3/10 campos de gran aumento), se constató una tendencia al aumento de éstas en los grupos HFCO_P de las tres series, significativa en C. HFOO_P mostró adenocarcinomas con una no significativa mayor actividad proliferativa que LFCO. Aunque el estudio de la necrosis tumoral se vio limitado por la selección de las áreas periféricas, preservadas, de los tumores para la evaluación histológica, pudo observarse una más frecuente y extensa necrosis en los adenocarcinomas de los grupos HFCO_P que en los de LFCO, HFCO_I y HFOO_P, aunque no significativa, en algún análisis (Figura 1d). Al valorar las diferencias existentes en el grado de actividad inflamatoria entre los adenocarcinomas de mama de los grupos experimentales de cada serie (Figura 1e), se constató que la mayoría de los tumores de los grupos control mostraban nula o escasa actividad inflamatoria, mientras que, en los grupos de dietas hiperlipídicas, los adenocarcinomas se asociaban a mayor componente inflamatorio, siendo las diferencias entre HFCO_P y LFCO casi significativas, en la serie B. En cuanto al patrón arquitectural (Figura 1f), se observó que los adenocarcinomas de los grupos ricos en aceite de maíz mostraban un patrón cribiforme predominante, en relación a los grupos control, cuyos tumores exhibían mayores áreas con patrón papilar. Estas diferencias se observaron, en concreto, en las series A y B, donde fueron estadísticamente significativas al comparar HFCO_P y LFCO. En estas dos series, el patrón cribiforme puro (100%) era más frecuente en los adenocarcinomas del grupo HFCO_P (45,5% y 47,2% de los adenocarcinomas en las series A y B, respectivamente), seguido por los adenocarcinomas del grupo HFCO_I (39,1% y 19,2%) y con menor frecuencia en los de los grupos control (31,6% y 15,6%) (datos no expuestos en el artículo). En la serie C, estas diferencias no fueron tan evidentes, siendo el grupo HFOO_P el que presentó menor porcentaje de carcinomas con patrón cribiforme prevalente y mayor porcentaje con patrón papilar predominante. Al analizar la reacción estromal (Figura 1g), se observó, en general, que los adenocarcinomas de los grupos con dieta rica en aceite de maíz mostraban mayor reacción estromal que los de los grupos control o HFOO_P. Así, el grupo control de la serie A no mostró ningún carcinoma con imágenes claras de desmoplasia, siendo los del grupo HFCO_I los que presentaban mayor reacción estromal. En la serie B, el grupo HFCO_P fue el que mostró carcinomas con características invasivas más evidentes. En la serie C, aunque las

diferencias entre los tres grupos experimentales no eran tan claras, los carcinomas del grupo HFOO_P fueron los que presentaron menor porcentaje de carcinomas con reacción desmoplásica. El análisis de la infiltración mastocitaria mostró una tendencia no significativa hacia una mayor densidad en los grupos de dieta rica en aceite de maíz que en los controles, en las tres series, mientras que HFOO_P mostró resultados similares a LFCO (Figura 1h). En relación al estudio de imágenes de secreción citoplasmática y luminal en los carcinomas (Figura 1i), se constató, en las series A y C, que dicho cambio era más frecuente en los carcinomas de los grupos HFCO_P y HFOO_P que en los controles (significativo entre HFCO_P y LFCO en C), mientras que en la serie B no se apreciaron estas diferencias.


En resumen, el estudio histopatológico de los adenocarcinomas de los cuatro grupos experimentales mostró diferencias entre ellos, especialmente en relación a la dieta rica en aceite de maíz. Los resultados expuestos permiten describir a los carcinomas de mama experimentales disecados de las ratas que recibieron una dieta rica en aceite de maíz con las siguientes características: elevados grados arquitectural y nuclear (Figura A31; A: adicional al artículo) y actividad mitótica evidente (Figura A32), especialmente cuando la dieta fue administrada en la fase de promoción de la carcinogénesis. Asimismo, estos tumores fueron los que mostraron necrosis tumoral con mayor frecuencia (Figura A33) y mayor infiltrado linfoplasmocitario asociado (Figura A34), exhibiendo un patrón cribiforme predominante, frecuentes imágenes de invasión de los tejidos vecinos (Figura A35), con reacción desmoplásica infiltrante (Figura A36) y, usualmente, cambio secretor. En cambio, los adenocarcinomas mamarios desarrollados en el grupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva virgen extra mostraron características más similares a las de los tumores del grupo control: grados arquitectural y nuclear más bajos (Figura A37), aunque con mayor actividad mitótica (Figura A38) y patrón arquitectural con componente papilar asociado con mayor frecuencia que en los otros dos grupos experimentales (Figura A39). Asimismo, los adenocarcinomas de HFOO_P fueron los que mostraron menor reacción desmoplásica, con valores similares al grupo LFCO respecto a la invasión de tejidos vecinos (Figura A40 y A41). También exhibían cambio secretor (Figura A42).

Finalmente, cuando se aplicó el Sistema de Gradación de Scarff, Bloom y Richardson en los adenocarcinomas, tal como se utiliza en patología humana, se evidenció que los tumores de los grupos con dieta rica en aceite de maíz, en las series A y B, exhibían mayores grados que los de los grupos controles, siendo estas diferencias únicamente significativas en A (Figura 2 del artículo). En la serie C, la distribución de los carcinomas por grado

histológico era similar entre los tres grupos experimentales. Al aplicar el método descrito y propuesto en el presente artículo, que se adapta a las características propias de los carcinomas de mama experimentales, las diferencias observadas se resaltaron, obteniéndose un mayor porcentaje de carcinomas de mama de alto grado histológico en los grupos HFCO_P respecto al grupo control, en las tres series, siendo las diferencias estadísticamente significativas en A y B. En la serie C, la mayor distribución de los carcinomas entre los grados, al aplicar el sistema de gradación adaptado, corroboró estos resultados, que tendían a la significación estadística. Respecto a HFCO_I, también se constató mayor agresividad morfológica en los carcinomas desarrollados en este grupo, en relación al control, aunque menos evidente. Los carcinomas de HFOO_P mostraron una distribución similar a LFCO.

Estos resultados se repitieron en una serie experimental posterior subsecuente, que incluye los mismos grupos experimentales. Aunque los datos obtenidos están pendientes de publicación, en este estudio también se constató un mayor porcentaje de adenocarcinomas de mama de alto grado histológico (GH) en el grupo HFCO_P que en LFCO y HFOO_P. En cuanto al grupo HFCO_I, también mostró mayor agresividad histológica que el control y que HFOO_P. Estos resultados preliminares se exhiben en la Tabla A3.

Tabla A3: Distribución de los grados histológicos de los carcinomas de mama experimentales entre diferentes grupos experimentales, en cuanto a aporte de grasas, en una nueva serie experimental



GH	LFCO	HFCO _I	HFCO _P	HFOO _P
I	57,4%	23%	20%	41,7%
II	29,8%	44%	34,1%	33,3%
III	12,8%	33%	45,9%	25%

↔ $P < 0,05$

En esta serie, el grupo HFOO_P no mostró, tampoco, diferencias en la distribución del grado histológico con el grupo control. La reacción estromal desmoplásica también se observó con mayor frecuencia en los carcinomas de los grupos de dieta rica en aceite de maíz (HFCO_P 23,5%, HFCO_I 24,7%, LFCO 15% y HFOO_P 10,6%) y la necrosis tumoral extensa, únicamente en un carcinoma del grupo HFCO_I y en nueve del HFCO_P.

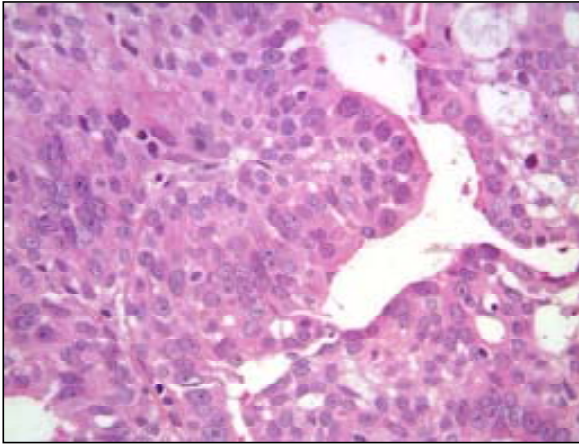


Figura A31: HFCO_p, grados arquitectural y nuclear elevados (H&E x400)

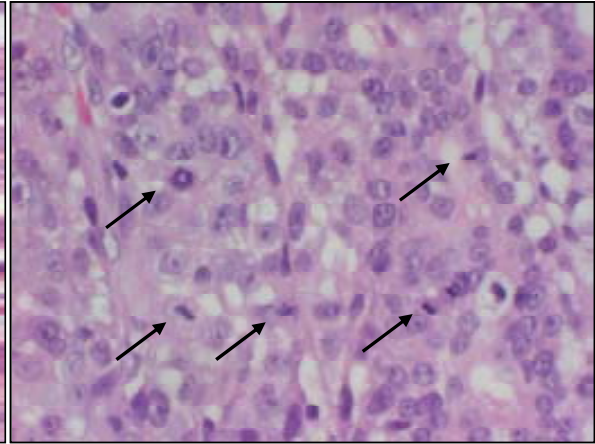


Figura A32: HFCO_p, actividad mitótica (H&E x400)

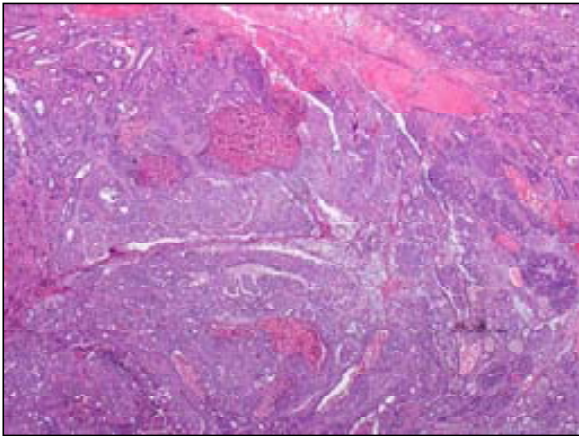


Figura A33: HFCO_p, necrosis tumoral (H&E x40)

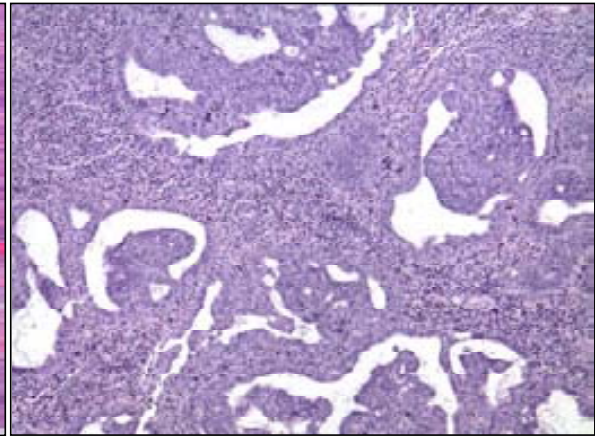


Figura A34: HFCO_p, infiltrado inflamatorio (H&E x100)

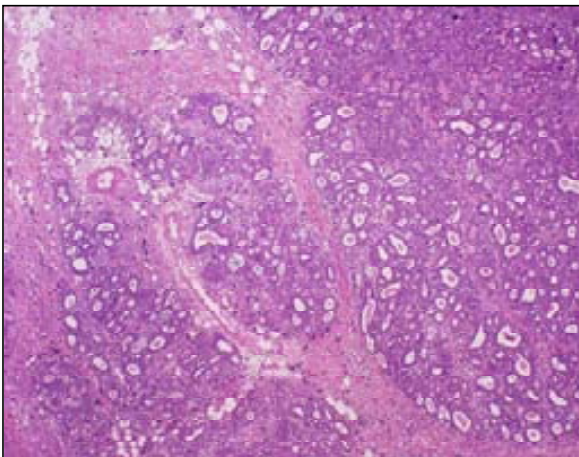


Figura A35: HFCO_p, invasión de tejidos adyacentes (H&E x40)

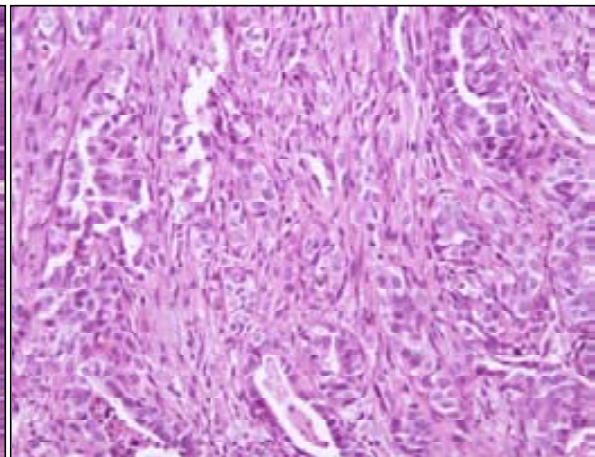


Figura A36: HFCO_p, reacción desmoplásica (H&E x200)

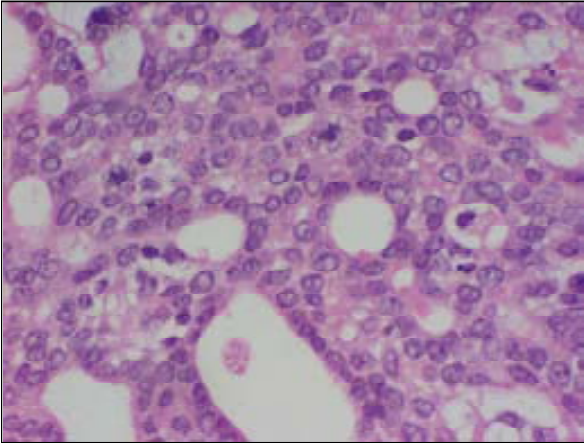


Figura A37: HFOOp, grados arquitectural y nuclear bajos (H&E x400)

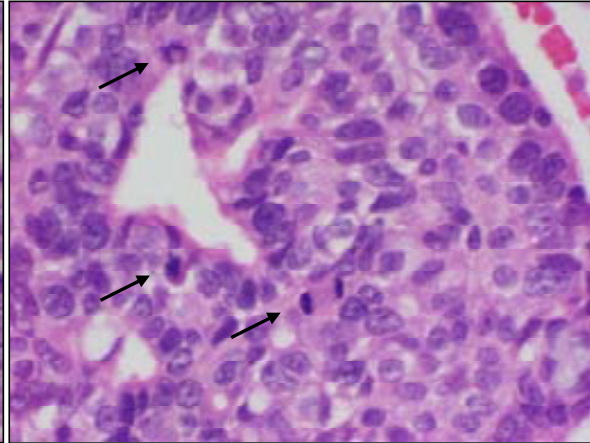


Figura A38: HFOOp, actividad mitótica (H&E x400)

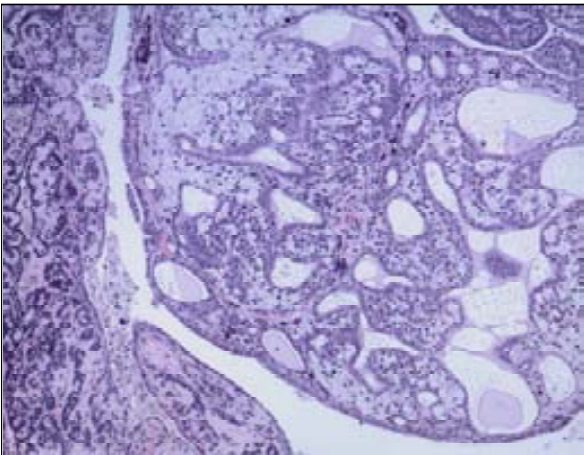


Figura A39: HFOOp, patrón papilar (H&E x100)

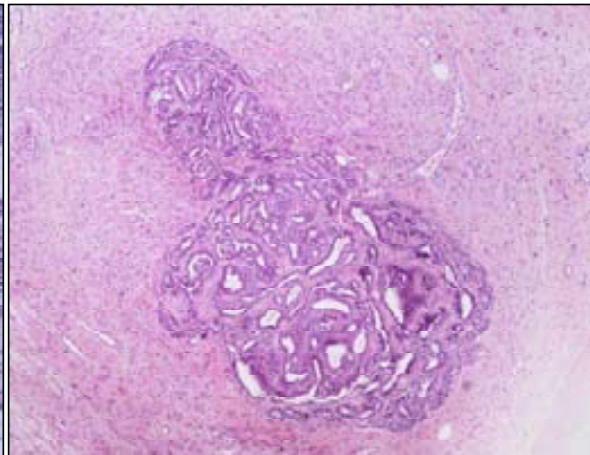


Figura A40: HFOOp, márgenes tumorales nodulares (H&E x40)

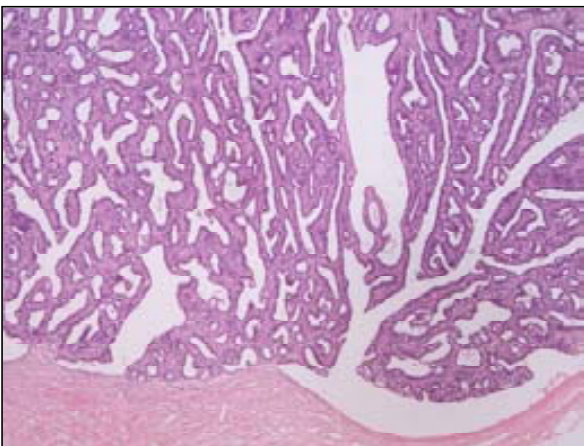


Figura A41: HFOOp, márgenes tumorales nodulares (H&E x100)

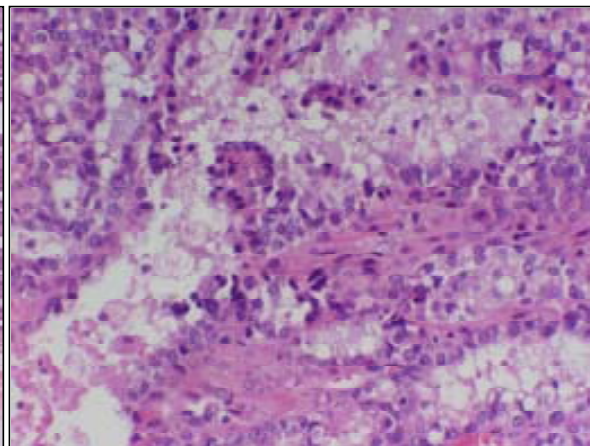


Figura A42: HFOOp, cambio secretor (H&E x200)

3. ARTÍCULO 3

High corn oil and extra virgin olive oil diets and experimental mammary carcinogenesis: clinicopathological and immunohistochemical p21Ha-Ras expression study.

I. Costa, R. Moral, M. Solanas, FJ. Andreu, MC. Ruiz de Villa, E. Escrich

Virchows Archiv 2011; 458: 141-151

RESULTADOS

High corn oil and extra virgin olive oil diets and experimental mammary carcinogenesis: clinicopathological and immunohistochemical p21Ha-Ras expression study

Irmgard Costa · Raquel Moral · Montserrat Solanas ·
Francisco Javier Andreu ·
Maria Carmen Ruiz de Villa · Eduard ESCRICH

Received: 3 August 2010 / Revised: 25 November 2010 / Accepted: 13 December 2010 / Published online: 15 January 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Dietary lipids have a role in the aetiology of breast cancer, acting at several cellular levels. We investigated the effects of a high corn oil and a high extra virgin olive oil diet on the clinical and histopathological characteristics of rat dimethylbenz(α)anthracene-induced mammary carcinogenesis and on the expression of p21Ha-Ras, detected by immunohistochemistry, in one experimental series including a low-fat corn oil diet (LFCO) and two high-fat diet groups: HFCO_p, rich in corn oil, and HFOO_p, rich in extra virgin olive oil. Whereas the high corn oil diet tended to reduce latency time, to raise tumour incidence and to increase total tumour yield, the high extra virgin olive oil diet led to a latency time similar to that of LFCO and to a lower tumour incidence than HFCO_p and lower total tumour yield, even than LFCO. HFCO_p tumours displayed a higher histological grade and profile than LFCO tumours, while adenocarcinomas in HFOO_p were similar to LFCO ones. Although no significant differences in p21Ha-Ras expression among dietary groups was found, we detected a significant p21Ha-

Ras decreasing expression as grade increased, in groups LFCO and HFCO_p. HFOO_p tumours exhibited a higher staining in high-grade carcinomas compared to the similar malignant tumours of the two other dietary groups. These data suggest that dietary lipids influence the clinical behaviour and the morphological malignancy of the experimental mammary carcinogenesis, according to the type of fat, without altering p21Ha-Ras expression. Nevertheless, this expression could be affected by the malignancy of tumours, probably through a post-translational event.

Keywords Dietary lipids · Breast cancer · Experimental model · Histopathology · Immunohistochemistry · p21Ha-Ras

Introduction

Breast cancer is the most common malignancy in Western country women [1]. Its association with dietary fat has been examined for a long time and it remains controversial [2, 3]. Although some epidemiological studies have generated conflicting data [4–6], animal studies have shown that dietary lipids constitute a remarkable breast cancer risk, the amount and type of fat being the key factors of this relationship. In general, the high dietary intake of *n*-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), primarily linoleic acid (18:2 *n*-6), a main component of corn oil, has a strong stimulating effect on mammary carcinogenesis, whereas high levels of very long-chain *n*-3 PUFAs, conjugated linoleic acid and γ -linolenic acid inhibit tumour growth. Concerning monounsaturated fatty acids (MUFAs), such as oleic acid (18:1 *n*-9), present in high levels in olive oil and the main source of fat in Mediterranean countries, although there is growing evidence of their protective role in breast

I. Costa · R. Moral · M. Solanas · E. ESCRICH (✉)
Department of Cell Biology, Physiology and Immunology,
Medical Physiology Unit, Medical School,
Universitat Autònoma de Barcelona,
08193 Bellaterra,
Barcelona, Spain
e-mail: Eduard.ESCRICH@uab.es

I. Costa · F. J. Andreu
Department of Pathology, Corporació Parc Taulí-UDIAT,
08208 Sabadell,
Barcelona, Spain

M. C. Ruiz de Villa
Department of Statistics, Universitat de Barcelona,
08028, Barcelona, Spain

cancer, some experimental studies have yielded conflicting results [7–11]. Dietary lipids seem to influence breast cancer development at various stages in the tumourigenic process, but mainly at promotion, through specific mechanisms independent of the most general effect of a high caloric intake [11, 12].

Ras proteins include the three classical isoforms of p21Ras proteins, Ha-Ras, Ki-Ras and N-Ras. They function as molecular switches of many signalling pathways that regulate cell growth, differentiation and survival [13]. Mutational-activated Ras as well as the upregulation of normal Ras have been shown to play a role in mammary tumourigenesis and metastasis [14]. Specifically, enhanced levels of *Ha-ras* expression have been found in human and experimental mammary tumours, and induction of mammary carcinomas in rats by exposure to a carcinogen often involves malignant activation of *Ha-Ras* [15, 16]. Moreover, changes in Ras expression and activation seem to play a role in the molecular changes induced by dietary lipids on breast cancer, not completely understood and probably dependent on the type of fat evaluated [12, 17].

One of the most accepted experimental animal models for the study of breast cancer is that of the dimethylbenz(α)anthracene (DMBA)-induction in female Sprague–Dawley rats. In this model, we have previously demonstrated a tumour-enhancing effect of a high corn oil diet and a negative modulatory effect of a high extra virgin olive oil diet on clinical mammary carcinogenesis and on the histopathological features of the carcinomas [18, 19]. We have also investigated several molecular mechanisms to gain insight into the complex pathways underlying these modulatory effects [20–27]. In this sense, we recently showed that high extra virgin olive oil diet decreases Ras activity, while high corn oil diet stimulates breast cancer without affecting Ras-cell signalling pathways [28].

The present study was conducted to investigate the effects of a high corn oil and a high extra virgin olive oil diet on the promotion stage of DMBA-induced mammary carcinogenesis, and to compare them with those of a normolipidic control one, from three experimental approaches: the clinical behaviour of the tumours, by means of the analysis of some carcinogenesis parameters; their morphological degree of malignancy, through the study of the histopathological characteristics of the carcinomas; and the influence of the different diets on p21Ras expression, specifically on p21Ha-Ras, by immunohistochemistry. The aim was to analyse whether dietary lipids exert their influence on mammary tumour development by altering the p21Ha-Ras protein isoform expression and/or its cellular localisation and to evaluate the relationship of this expression with the histopathological aggressiveness of these experimental tumours.

Materials and methods

Experimental design and diets

The experimental series consisted of 60 Sprague–Dawley female rats (IFFA-CREDO-source ICO: OFA. SD [IOPS Caw]). On starting, the animals were 22 days of age, housed four per cage and maintained under environmentally controlled conditions with a 12-h light/dark cycle. They were fed fresh experimental diets and water ad libitum. At 53 days of age, the rats were treated with a single dose of 5 mg of 7, 12-DMBA (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) administered in corn oil by means of gastric gavage [29, 30]. All animals received humane care under an institutionally approved experimental animal protocol, following the legislation applicable in this country.

Animals were randomly distributed into three groups ($n=20$ for each group) depending on the provided diet throughout the study: a control group, low-fat corn oil (LFCO), fed throughout the study with the low-fat diet, and two promotion groups, the high-fat corn oil promotion (HFCO) and the high-fat olive oil promotion (HFOO_p), where rats were fed the control diet from weaning until induction with the carcinogen and then changed to HFCO or HFOO diet, respectively. Rats were inspected weekly for the detection of mammary tumours. The animals were sacrificed by decapitation at an average age of 261 days old and a complete post-mortem examination was carried out.

The definition, preparation and suitability of the semi-synthetic experimental diets used were previously described [31, 32]. Three diets were designed: the LFCO diet (3% corn oil), the HFCO diet (20% corn oil) and the HFOO diet (3% corn oil+17% extra virgin olive oil). Diets also contained 18% (LFCO) or 23% (HFCO and HFOO) casein, 67.9% (LFCO) or 45% (HFCO and HFOO) dextrose, and 5% cellulose, 5.9% salt mixture and 0.24% vitamin mixture. In order to maintain the normal lipidic metabolism, they were supplemented with methionine (0.51% in LFCO and 0.66% in the two high-fat diets), choline (1800 mg/Kg diet) and folic acid (5 mg/Kg diet). Diets were prepared weekly and stored under nitrogen in the dark at 4°C.

Tissue processing, histopathology and immunohistochemical analysis

Macroscopic mammary lesions were collected at sacrifice and fixed in 10% buffered formalin. Four-micron sections were cut from paraffin-embedded tissue and stained with haematoxylin and eosin for light microscopic study. The slides were analysed by a pathologist blinded to the dietary groups.

Epithelial lesions were classified by applying the morphological criteria delineated by Young and Hallows

[33] on rat mammary tumours. Seven histopathological parameters were analysed in each carcinoma: structural pattern, pattern and nuclear grade, mitotic index, stromal reaction, lymphoplasmacytic infiltration and secretion. Some of these features have been previously adapted to the characteristics of rat mammary tumours [34]. Specifically, as these experimental carcinomas predominantly display cribriform and/or papillary differentiation rather than a tubular formation, structural pattern was evaluated according to the proportion of the cribriform/papillary areas. Regarding pattern grade, we applied the same proportion of tubular formation as it is done in human breast ductal carcinomas, but depending on the extent of the solid ones: grade 1, less than 25% solid areas; grade 2, 25–75% solid areas and grade 3, more than 75% of these areas. Tumour mitotic activity was defined as the number of mitoses in 10 high-power fields (HPF), at $\times 400$ magnification, in the most mitotically areas, and distributed as ≤ 3 mitoses, 4–6 mitoses, 7–9 mitoses, 10 to < 20 mitoses, and ≥ 20 mitoses. The histopathological grading method for rat mammary carcinomas [19], which integrates the three parameters used in human breast pathology for morphological grading [35], was applied to each tumour. In order to obtain the overall grade, the scores for the degree of pattern differentiation, nuclear pleomorphism and mitotic index were added. Pattern and nuclear grades were scored with 1, 2 and 3 points and the mitotic index parameter accepted 5 scores. When adding the scores, the global histopathological grade in each carcinoma was determined as: 3–5 points corresponded to a grade I, 6–8 points to a grade II and 9–11 points to a grade III.

The immunohistochemical study was performed with a mouse monoclonal antibody against p21Ha-Ras (clone F235-1.7.1, Calbiochem; San Diego, CA, USA) which binds specifically to *c-* and *v-Ha-ras*, but not to *c-N-ras* or *c-K-ras*, encoded proteins. Briefly, unstained 4- μ sections were cut from paraffin-embedded blocks and deparaffinised by routine techniques before being placed in citrate pH 6.0 for 3 min at 95–99°C, for antigen retrieval. After cooling down for 20 min, slides were treated with pepsin and then quenched with 3% H₂O₂ for 5 min. The slides were then incubated with the primary antibody (1/40 dilution), for 8 h, using the Dakocytomation Autostainer. Labelling was detected with the peroxidase reaction EnVision™+Dual Link kit (Dako, Envision Plus Detection Kit; Carpinteria, CA, USA) as per the manufacturer's protocol. All sections were counterstained with Harris' haematoxylin.

The same positive control case was used in order to match the intensity of the staining; and a negative control staining was carried out by substituting the primary antibody with non-immunised serum in every working procedure. The results were evaluated quantitatively, using

an image analysis software (NOESIS-VISILOG 5.1) which allows a measurement of the positive area from a self-defined $\times 400$ magnification tumour field, in terms of percentage, and the degree of the intensity of this staining (G1–G3 as intensity increases). The slides were analysed by a pathologist blinded to the dietary groups.

Statistical evaluation

The statistical analysis of the qualitative data was carried out using the X^2 test (histopathological study and carcinogenesis at sacrifice). The quantitative data (% p21Ha-Ras expression) was analysed by an ANOVA test with multiple comparisons (Tukey's DHS test) when significant differences were obtained. When non-normality was found, the Arc Sin transformation was applied and the residual check for normality was carried out. In all cases, the level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Parameters of the carcinogenesis

The results of the analysis of the carcinogenesis parameters are depicted in Table 1. Latency time, defined by means of the average time from carcinogen administration to first palpable malignant tumour, was shorter in group HFCO_p than those recorded for the control and HFOO_p groups (close to significance, $0.05 < P < 0.1$), whereas it was virtually identical between HFOO_p and control groups. Tumour incidence, defined as the percentage of animals bearing at least one malignant mammary tumour at sacrifice, was increased in the high-fat corn oil group (90%) more than in the control (70%), while group HFOO_p

Table 1 Parameters of the carcinogenesis

	Experimental group ^a		
	LFCO	HFCO _p	HFOO _p
Latency time (days) ^b			
M \pm SD (M)	102.5 \pm 42.3 (103)	77.3 \pm 32.1 (73)	102.3 \pm 47.4 (109)
At sacrifice			
Incidence of animals with tumours (%)	70 (14/20)	90 (18/20)	80 (16/20)
Total tumour yield	72	95	69
Tumour yield per rat (m)	3	3.5	2.5

^a LFCO low-fat corn oil group, HFCO_p high-fat corn oil group, HFOO_p high-fat olive oil group

M mean, SD standard deviation, m median

displayed intermediate values (80%). These differences were not statistically significant. Finally, the total tumour yield, defined as the cumulative total number of malignant mammary tumours in each dietary group at sacrifice, was higher in the group of animals fed the high corn oil diet ($n=95$) than that in the control ($n=72$). The group HFOO_p showed the lowest value ($n=69$), even lower than that of the control group, although the differences were not statistically significant. A similar non-statistical distribution was obtained when the tumour yield per rat was analysed, with higher values in group HFCO_p (3.5), the lowest in group HFOO_p (2.5) and intermediate in group LFCO (3).

Histopathology

The histopathological study was carried out on 227 mammary carcinomas (69 from LFCO, 91 from HFCO_p and 67 from HFOO_p). Figure 1 depicts a characteristic image of each of the parameters studied and the results obtained, displayed as the percentage of tumours from each dietary group exhibiting the different categories of the histopathological feature analysed. No differences were observed among the dietary groups when structural pattern was analysed. Most carcinomas exhibited a pure or a prevailing cribriform pattern (100–70% of the tumour), although tumours from HFOO_p displayed more papillary areas than those from HFCO_p and LFCO groups. With regard to pattern and nuclear grade, we found that carcinomas from the high-fat corn oil group displayed a trend towards higher grades compared to the control situation, nearly significant when pattern grade was studied ($P=0.056$). Thus, while more than 50% of the carcinomas showed a pattern or a nuclear grade 1 in groups LFCO, the high-fat corn oil group displayed a greater distribution among the three scores for each parameter. Regarding group HFOO_p, the carcinomas exhibited a similar pattern and nuclear grades distribution to group LFCO. With respect to mitotic activity, a higher percentage of tumours exhibiting >3 mitosis/10 HPF was found in the high-fat diet groups than that in the control situation. More than 50% of carcinomas from HFCO_p displayed >3 mitosis/10 HPF, while less than 30% of control group carcinomas exhibited that mitotic index, being these differences significant ($P=0.012$). As for the high-fat olive oil group, although the tumours exhibited a higher mitotic index than in LFCO, the differences were not significant. Most of the tumours from the three dietary groups were well circumscribed, with slight invasion of neighbouring tissues, and only some of them presented an infiltrative pattern, clearly invasive and with an intense desmoplastic reaction. High-fat olive oil tumours exhibited the lowest high (+++) stromal response. Lymphocytic infiltration was similar among the three dietary groups, although the most prominent inflammation

(+++)⁺ was seen in tumours from Group HFCO_p. Regarding secretion, carcinomas from high-fat groups exhibited lipid droplets more often than those from group LFCO, significantly when comparing groups HFCO_p and LFCO ($P=0.011$).

Applying the modified histopathological grading method adapted to rat tumours, we appreciated a higher percentage of histological grade II and III carcinomas in the high-fat corn oil group than in those from the control and the high extra virgin olive oil diet situation (Fig. 2). Specifically, a statistical tendency towards higher grade carcinomas in group HFCO_p, compared to those from the control ($P=0.078$), was found. There were no differences in the rate distribution between groups LFCO and HFOO_p. Most of the carcinomas of each rat were morphologically similar and displayed the same or one less or more histopathological grade (79% (11/14) in group LFCO, 72% (13/18) in group HFCO_p and in 81% (13/16) of the rats from group HFOO_p).

p21Ha-Ras immunohistochemical analysis

The immunohistochemical detection of p21Ha-Ras was performed on 220 carcinomas (68 LFCO, 87 HFCO_p and 65 HFOO_p). Immunoreaction was not strictly confined to tumour cells, but it also was evident in benign tissue components of the section analysed, including myoepithelia, ductal and lobular epithelia, fibroblasts, muscle cells, skin and vessel walls. The staining reaction was always dominated by fine intracytoplasmic granules that exhibited a heterogeneous distribution and density among tumours. We did not find any variations in the localisation of the protein. A positive stain was found in all tumours, although differences in the quantitative evaluation of the slides were noted. Thus, some tumours exhibited a uniformly weak staining on tumour cells; others, a mixed mild to moderate staining intensity in the same tumour and others, a diffuse and strong expression of the protein (Fig. 3). No significant differences among dietary groups were appreciated, although expression of p21Ha-Ras was somehow higher in the two high-fat dietary groups than in the control situation (Table 2). In this sense, while the average percentage of the positive area was 50.34% (median of 46.05), in carcinomas of the low-fat diet, high-fat corn oil and olive oil groups showed a positive area staining of 54.92% and 53.96% (median of 56.43 and 54.26), respectively. When the relationship between p21Ha-Ras expression and the histological grade was evaluated, we detected that p21Ha-Ras expression tended to decrease as grade increased (Fig. 4). Analysing all the carcinomas irrespective of the dietary group, we found that grade I carcinomas showed a statistically significant higher expression (median 56.69% positive area) than did grade II (42.82%) and grade III carcinomas (43.13%; $P=0.041$ and

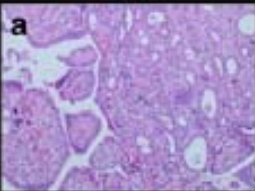
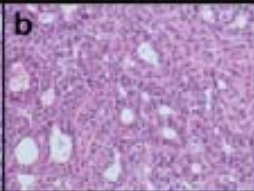
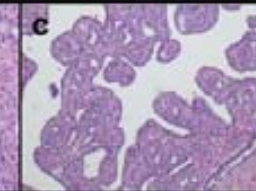

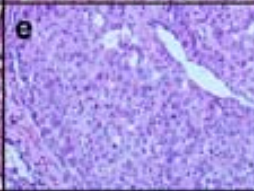
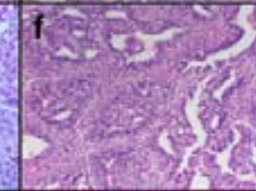
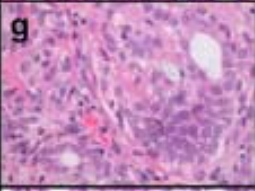
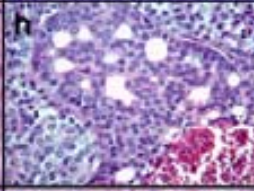
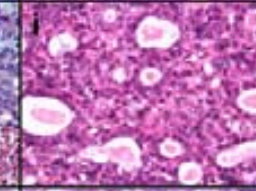
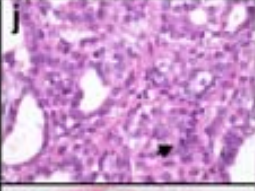
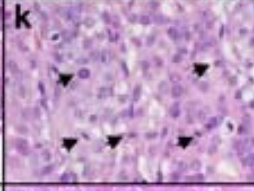
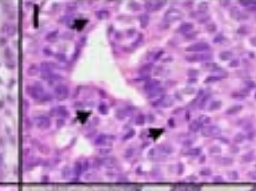


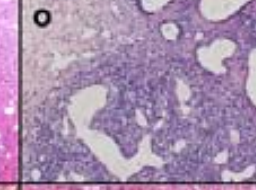
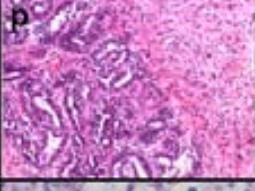
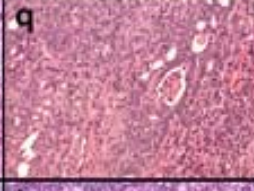
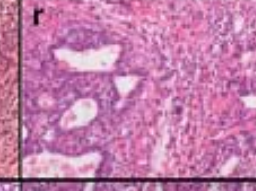
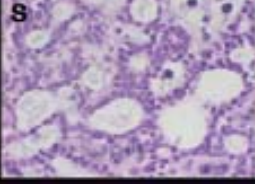
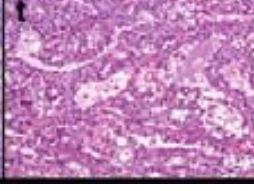

	LFCO	HFCO _p	HFOO _p		LFCO	HFCO _p	HFOO _p
Structural pattern				100-70%	72.5	72.5	64.2
				69-40%	27.5	23.1	29.8
				39-0%	0	4.4	6
Pattern grade				Grade 1	60.9	46.1 ^b	55.2
				Grade 2	21.7	39.6	25.4
				Grade 3	17.4	14.3	19.4
Nuclear grade				Grade 1	53.6	41.8	55.2
				Grade 2	29	34.1	19.4
				Grade 3	17.4	24.2	25.4
Mitosis				≤3	71	47.2 ^a	53.7
				4-6	13	24.2	16.4
				7-9	2.9	14.3	14.9
				10-19	10.1	13.1	10.5
				≥20	2.9	1.1	4.5
Stromal reaction				-	29	29.7	31.3
				+	52.2	52.7	47.8
				++	11.6	9.9	17.9
				+++	7.2	7.7	3
Lymphocytic infiltration				-	33.3	46.1	38.8
				+	43.5	26.4	29.8
				++	13	12.1	20.9
				+++	10.1	15.4	10.4
Secretion				absent	73.9	57.1 ^a	64.2
				focal	14.5	35.2	22.4
				widespread	11.6	7.7	13.4

Fig. 1 Histopathological features and results of the morphological analysis of rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas from the different dietary groups, displayed as the percentage of tumours from each dietary group exhibiting the different categories of the histopathological feature analysed. Adenocarcinomas from HFOO_p exhibited more papillary areas (*c*) than LFCO (*a*) and HFCO_p (*b*) tumours, while carcinomas from HFCO_p displayed a higher pattern (*e*) and nuclear (*h*) grades and a higher mitotic activity (*k*) than those from LFCO (*d*, *g* and *j*) and HFOO_p (*f*, *i* and *l*). No differences were found between the three dietary groups when stromal reaction was analysed. Most of the tumours were well circumscribed (*m*), with slight invasion of neighbouring tissues (*o*), and only some of them presented an

infiltrative pattern, clearly invasive and with an intense desmoplastic reaction (*n*). Lymphocytic infiltration was similar among the three dietary groups, although a more prominent inflammation (++ and +++) was seen in tumours from group HFCO_p (*q*) and HFOO_p (*r*) than in LFCO (*p*). Secretion was present more often in tumours from HFCO_p (*t*) and HFOO_p (*u*) than in LFCO (*s*). Refer to the text and to [34] for detailed descriptions. LFCO low-fat corn oil group, HFCO_p high-fat corn oil group, HFOO_p high-fat olive oil group; *m*, *n* (H&E ×40); *a*–*f*, *o* (H&E ×100); *p*–*u* (H&E ×200); *g*–*l* (H&E ×400); *a* significantly different ($P < 0.05$) from the values of the control group; *b* $0.1 > P > 0.05$ from the values of the control group

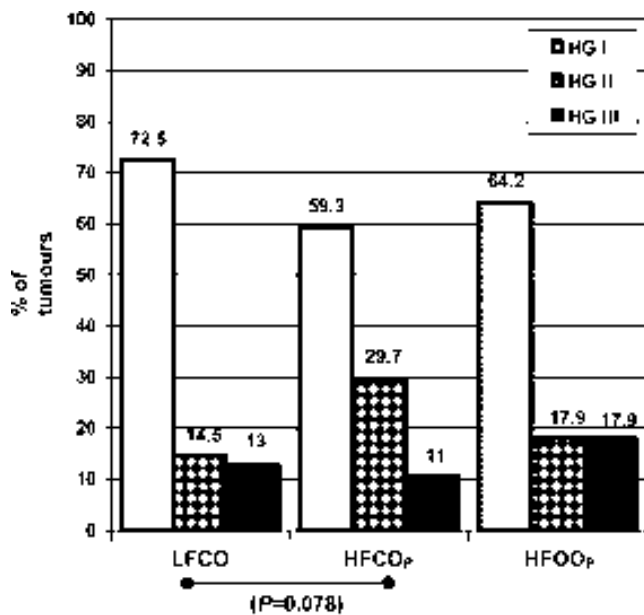


Fig. 2 Histopathological grading of rat DMBA-induced mammary carcinomas using the method previously adapted to rat tumours. LFCO low-fat corn oil group, HFCO_P high-fat corn oil group, HFOO_P high-fat olive oil group, HG histopathological grade

$P=0.009$, respectively). Specifically, carcinomas from low-fat and high-fat corn oil groups exhibited the same tendency in the distribution of p21Ha-Ras expression according to histological grade. However, a different distribution of the staining in the high-fat olive oil group, as compared to the other dietary groups, was observed. In this group, the positive p21Ha-Ras staining area was very similar between low- (median of 56.02%) and high-grade carcinomas (median of 53.14%). Moreover, grade III carcinomas from this dietary group expressed a higher percentage of stained area than did the similar poorly differentiated tumours of LFCO and HFCO_P groups (median of 25.5% and 35.31%, respectively).

Discussion

In the present study, we evaluated the clinical and histopathological effects of diets rich in corn oil and extra virgin olive oil on DMBA-induced mammary carcinogenesis, and the possible role of p21Ha-Ras expression as a mechanism of such effects. For the histopathological analysis, a modified grading system for rat mammary cancer previously developed by our group was applied [19]. This grading method has been shown to provide an integrated view of these experimental breast carcinomas and to be a useful tool to analyse the effects of an environmental factor on tumour morphological malignancy [36, 37]. Our results showed that the high-fat corn oil diet

Fig. 3 p21Ha-Ras expression by immunohistochemistry in rat DMBA-induced mammary carcinomas (a, c and e) and the image analysis measurement from the NOESIS-VISILOG 5.1 software (b, d and f): a and b low and weak staining ($\times 200$); c and d mild to moderate p21Ha-Ras expression ($\times 200$), and e and f diffuse and strong staining ($\times 200$)

has a stimulatory effect on mammary carcinogenesis: tumours appeared earlier, the percentage of affected animals was increased, and there were a higher number of tumours per group and per animal when compared with control and high-fat olive oil groups. Moreover, tumours from HFCO_P group displayed higher pattern and nuclear grades, a higher mitotic count and a higher global histological grade than group LFCO. On the other hand, the high extra virgin olive oil diet, with the same amount of fat than the high corn oil diet, had a different effect on breast tumourigenesis, since most of the parameters in group HFOO_P indicated a lower tumour malignancy in comparison to that of group HFCO_P. Thus, the high-fat extra virgin olive oil diet caused higher latency as well as lower incidence and tumour yield per group and per animal than the high-fat corn oil diet. Moreover, in group HFOO_P, tumour yields were lower even than those of the control group, although there were more affected animals and the tumours appeared at the same time. The histopathological analysis indicated that carcinomas from group HFOO_P displayed lower nuclear and pattern grades and a lower histological grade as compared to those from the high-fat corn oil group, and no differences with the control situation. Furthermore, most carcinomas from the olive oil group were well circumscribed, exhibited the least infiltrative pattern and the most extensive papillary areas, according with a lower morphological aggressiveness. The results obtained in this work are in concordance with previous studies carried out in our laboratory where we analysed the clinical behaviour of tumours throughout the time. Such works clearly demonstrated the tumour-enhancing effect of the high-fat corn oil diet and a negative modulatory effect of the high extra virgin olive oil diet [18, 23]. In the present work, most of the clinical differences among groups were non-significant or close to significance, but this could be probably due to the fact that it was performed at one time point (the end of the assay) and not throughout the time, hence with a lower statistical power. In addition, in other two experimental series, we found significant higher pattern, nuclear and global histological grades in mammary carcinomas from high-fat corn oil groups than in those from their controls [19]. The significant higher mitotic activity observed in group HFCO_P in the present study could be attributed to the proliferative effect of high corn oil diets and linoleic acid, as it has been already described in vivo and in vitro [19, 38–40]. On the other hand, the non-significant increase in the mitotic count as well as in the tumour incidence observed in group HFOO_P as compared to the control may be related to

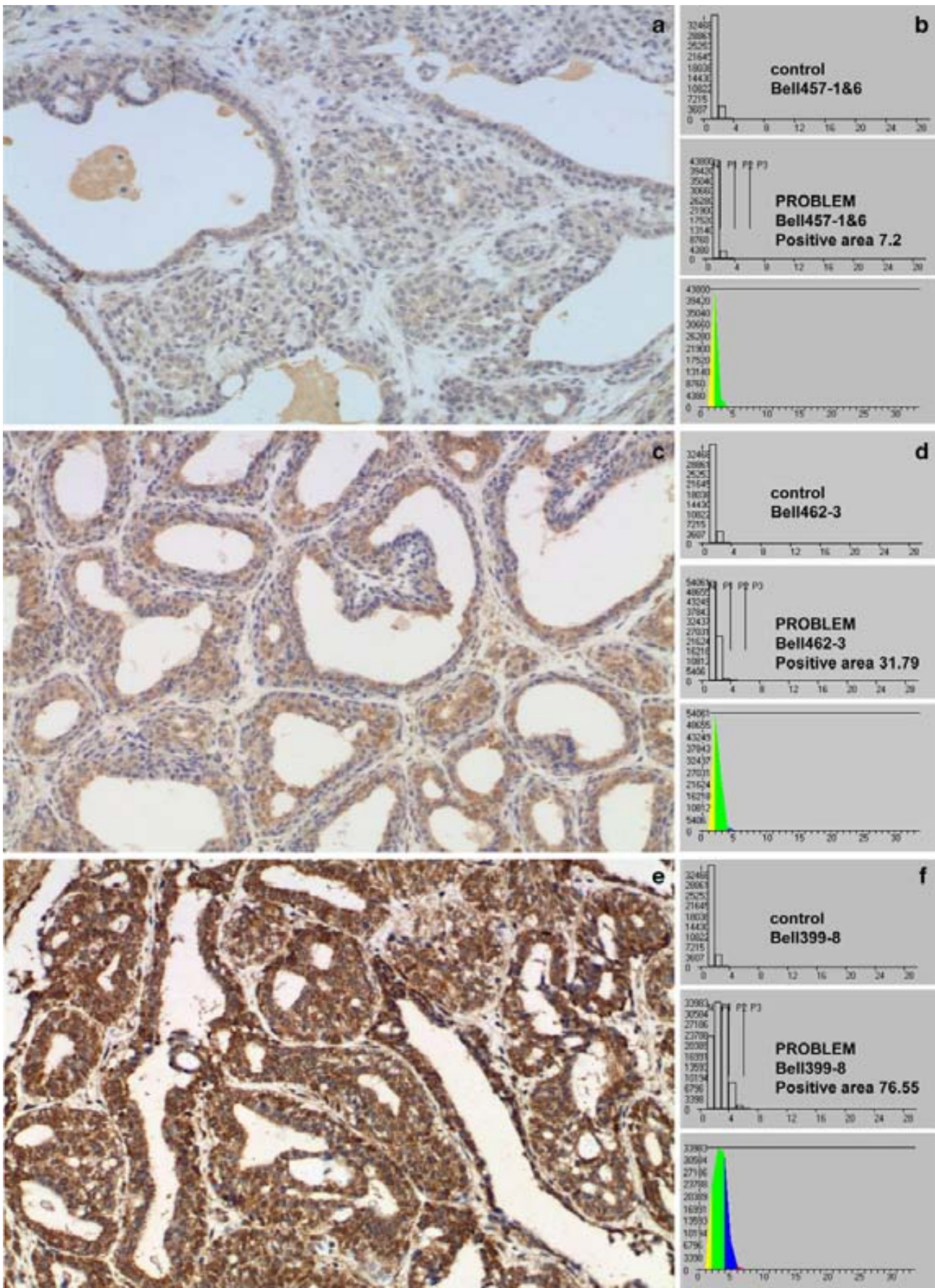


Table 2 Quantitative evaluation of the immunohistochemical expression of p21Ha-Ras among dietary groups

	Total p21Ha-Ras M±SD (m)	G1 M±SD (m)	G2 M±SD (m)	G3 M±SD (m)
LFCO	50.34±24.97 (46.05)	45.14±18.97 (45.63)	5.03±10.28 (0.26)	0.17±0.63 (0.00)
HFCO _P	54.92±19.75 (56.43)	50.40±15.02 (55.22)	4.41±6.43 (0.76)	0.11±0.58 (0.00)
HFOO _P	53.96±20.23 (54.26)	50.84±16.73 (52.90)	3.10±5.25 (0.48)	0.01±0.04 (0.00)

Results expressed as the percentage of the positive staining area from a defined tumour field

M mean, *SD* standard deviation, *m* median; *G1*, *G2* and *G3* degree of the intensity of the staining, from low to high; *LFCO* low-fat corn oil group, *HFCO_P* high-fat corn oil group, *HFOO_P* high-fat olive oil group

the non-specific stimulatory effect of calories described for high-fat diets [41]. Finally, no differences regarding lymphocytic infiltration were found, whereas secretion was higher in carcinomas from the high-fat groups than in the control situation, being significant when comparing HFCO_P and LFCO, probably because of the storage of intracytoplasmic lipid droplets in response to an excessive amount of fat [42, 43].

Interestingly, we observed that most of the mammary carcinomas developed in each rat were morphologically similar, what suggests a uniform morphological distribution of the carcinomas per animal. This fact was more evident in the control and the high-fat olive oil groups than in group HFCO_P. Further studies may be designed to investigate a possible effect of diets at this level.

The influence of dietary lipids on cancer has been proposed to be exerted at several cellular and physiological processes, probably in an integrated, simultaneous and/or sequential way [11, 17]. We have investigated whether Ras,

in particular p21Ha-Ras, may be involved in the modulatory effects of dietary fat on breast cancer. The product of *c-Ha-ras* is a 21 kDa GTPase, being active in its GTP-bound form and inactive when it is bound to GDP, and acting as a critical regulator of cell function, including proliferation, differentiation and apoptosis [13, 16, 44]. The present study specifically evaluated the expression of p21Ha-Ras protein on carcinoma-tissue samples from the three dietary groups by immunohistochemistry. This methodology allows us to localise the protein in the cell and to detect and to select the suitable tumour areas for the quantitative analysis. To our knowledge, there are no published studies of the effects of dietary lipids on p21Ha-Ras expression with this experimental approach. The results showed that p21Ha-Ras was expressed in the non-tumour mammary gland associated with the carcinomas and in all tumours. The staining was diffusely cytoplasmic—we did not find any variations in the localisation of the protein—but it exhibited heterogeneity in its intensity. However, we did not observe any

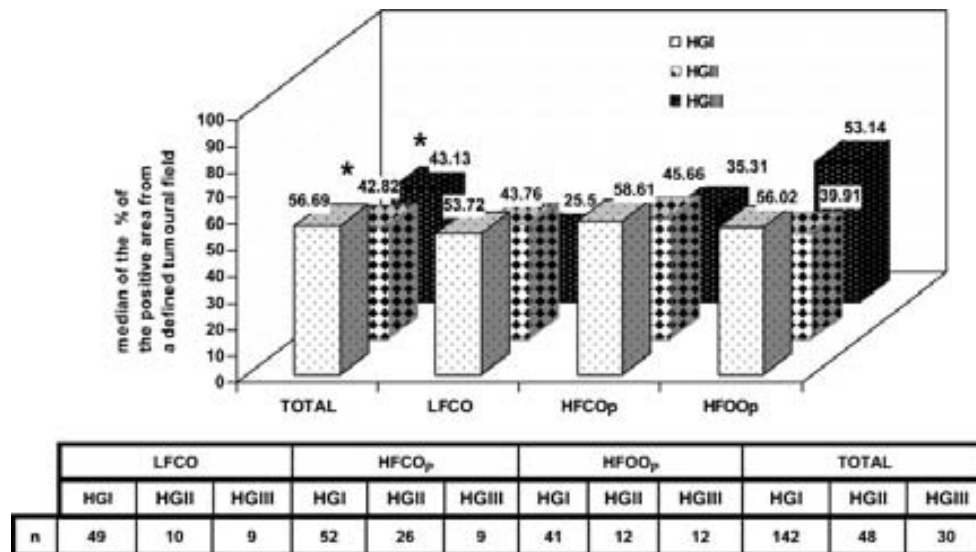


Fig. 4 Relationship between histopathological grade and p21Ha-Ras expression in the whole carcinomas from all dietary groups and in carcinomas from the different dietary groups. The results are expressed as the median of the percentage of positive p21Ha-Ras stained area from a defined ×400 magnification tumour field, for each histopathological grade, per total and per experimental group

evaluated. *HG* histopathological grade, *TOTAL* total carcinomas from all dietary groups, *LFCO* low-fat corn oil group, *HFCO_P* high-fat corn oil group, *HFOO_P* high-fat olive oil group, *n* number of mammary carcinomas analysed; **P*<0.05, significantly different from the values of low-grade (HGI) carcinomas

significant differences on p21Ha-Ras expression due to dietary lipids. In this sense, no differences between high-fat corn oil and low-fat diets were neither found when Ha-ras mRNA and protein expression by Western Blot were studied, nor when p21Ha-Ras activation was evaluated [21, 28, 45], that suggests that the HFCO diet stimulates mammary carcinogenesis through Ras-independent pathways. Concerning the high extra virgin olive oil diet, we previously found that it decreased the levels of the activated Ras and increased those of the total protein, probably by raising the relative levels of the non-activated form [28]. The lack of differences in total levels detected by immunohistochemistry would be related to methodological issues and to the small magnitude of the differences. In the literature, there are no other data about the influence of olive oil on Ras status in cancer. Studies performed in colon cancer models and cell lines have shown an effect of n-3 PUFA as compared to n-6 PUFA on Ras protein and that this could take place at a post-translational level, by changes in Ras localisation or activation [46–48].

Although several reports have evaluated the association between p21Ha-Ras expression and some clinical and histopathological parameters in human breast cancer, the results have been contradictory, probably due to the different methods and analyses used [49–58]. Our study was carried out with image analysis software, in order to obtain more objective values than with a simple semi-quantitative method. A significant decrease of p21Ha-Ras expression as histological grade increased was found when tumours were considered all together, irrespective to the dietary condition. Considering that there may be an inverse relationship between p21Ha-Ras total expression and activity, this result could indicate increased Ras activity levels with higher malignancy degrees. This association, however, was not observed in group HFOO_p where, in addition, grade III carcinomas exhibited a higher staining than did the similar poorly differentiated tumours of the other two experimental groups. These results suggest that the relationship between tumour morphological malignancy and p21Ha-Ras is complex and it would be affected by factors such as dietary lipids, and that other molecular pathways could be playing an important role in tumour aggressiveness.

In summary, our study demonstrates that dietary lipids influence clinical and morphological characteristics of experimental mammary adenocarcinomas. However, p21Ha-Ras expression does not seem to play a direct role in the enhancing effect of the high-fat corn oil diet and the non-promoting effect of the high extra virgin olive oil diet. Moreover, we have found that tumour p21Ha-Ras expression depends on the histological grade and that olive oil may affect this relationship. Thus, carcinomas morphologically similar may have a different molecular context due to the influence of an

environmental factor such as dietary lipids, what may have biological and behavioural consequences.

Acknowledgements This work was supported by grants from “Plan Nacional de I+D+I 2004-2007” (AGL2006-07691), “Fundación Patrimonio Comunal Olivarero 2008-1012” (FPCO2008-165.396), “Agencia para el Aceite de Oliva, Ministerio de Medio Ambiente y de Medio Rural y Marino 2008-2012” (AAO2008-165.471), “Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español” (OIP2009-165.646) and the “Departaments d’Agricultura, Alimentació i Acció Rural, i de Salut de la Generalitat de Catalunya” (GC2010-165.000). The sponsors had no role in the study design, data collection and analysis, interpretation of results, the preparation of the manuscript, the decision to submit the manuscript for publication and the writing of the manuscript.

Conflict of interest statement We declare that we have no conflict of interest.

References

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008) Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 58:71–96
- World Cancer Research Foundation (WCRF) and American Institute for Cancer Research (AICR) (2007) Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research, Washington, DC
- Lee MM, Lin SS (2000) Dietary fat and breast cancer. *Annu Rev Nutr* 20:221–248
- Trichopoulou A, Lagiou P, Kuper H, Trichopoulos D (2000) Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 9:869–873
- Kushi L, Giovannucci E (2002) Dietary fat and cancer. *Am Med* 113 Suppl 9B:63S-70S
- Freedman LS, Potischman N, Kipnis V, Midthune D, Schatzkin A, Thompson FE, Troiano RP, Prentice R, Patterson R, Carroll R, Subar AF (2006) A comparison of two dietary instruments for evaluating the fat–breast cancer relationship. *Int J Epidemiol* 35:1011–1021
- Ip C (1997) Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acid, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am J Clin Nutr* 66:1523S–1529S
- Rose DP (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
- Zusman I, Gurevich P, Madar Z, Nyska A, Korol D, Timar B, Zuckerman A (1997) Tumor-promoting and tumor-protective effects of high-fat diets on chemically induced mammary cancer in rats. *Anticancer Res* 17:349–356
- Bartsch H, Nair J, Owen RW (1999) Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 20:2209–2218
- Escrich E, Solanas M, Moral R (2006) Olive oil, and other lipids, in cancer: experimental approaches. In: Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Yaqoob P (eds) *Olive Oil and Health*. CAB International Publishing, Oxfordshire, UK, pp 317–374
- Escrich E, Solanas M, Moral R, Costa I, Grau L (2006) Are the olive oil and other dietary lipids related to cancer? Experimental evidence. *Clin Transl Oncol* 8:868–883
- Karnoub AE, Weinberg RA (2008) Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:517–531
- Malaney S, Daly RJ (2001) The Ras signalling pathway in mammary tumorigenesis and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6:101–113

15. Miyakis S, Sourvinos G, Spandidos DA (1998) Differential expression and mutation of the Ras family genes in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 251:609–612
16. Malumbres M, Barbacid M (2003) Ras oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3:459–465
17. Escrich E, Moral R, Grau L, Costa I, Solanas M (2007) Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer. *Mol Nutr Food Res* 51:1279–1292
18. Solanas M, Hurtado A, Costa I, Moral R, Menendez JA, Colomer R, Escrich E (2002) Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA-induced mammary tumors compared with a high corn oil diet. *Int J Oncol* 21:745–753
19. 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 does not. *Breast Cancer Res Treat* 86:225–235
20. Escrich E, Solanas M, Soler M, Ruiz de Villa MC, Sánchez JA, 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
21. 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. *Nutr Res* 21:1261–1273
22. Solanas M, Escrich E, Rouzaut A, Costa I, Martínez A, Notario V (2002) Deregulated expression of the PCPH proto-oncogene in rat mammary tumors induced with 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene. *Mol Carcinog* 33:219–227
23. Moral R, Solanas M, García 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* 10:1417–1424
24. Escrich E, Moral R, García G, Costa I, Sánchez JA, 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* 40:73–78
25. Moral R, Solanas M, Manzanares EM, Haro D, Escrich E (2004) Influence of DMBA-induced mammary cancer on the liver *CPT1*, *mit HMG-CoA synthase* and *PPAR α* mRNA expression in rats fed a low or high corn oil diet. *Int J Mol Med* 14:283–287
26. Moral R, Solanas M, García 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* 20:429–435
27. Solanas M, Moral R, García G, Grau L, Vela E, Escrich R, Costa I, Escrich E (2009) Differential expression of H19 and vitamin D3 upregulated protein 1 as a mechanism of the modulatory effects of high virgin olive oil and high corn oil diets on experimental mammary tumors. *Eur J Cancer Prev* 18:153–161
28. 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 signalling and the proliferation-apoptosis balance. *Carcinogenesis* 31:871–879
29. Huggins C, Morii S, Grand LC (1961) Mammary cancer induced by a single dose of polynuclear hydrocarbons: routes of administration. *Ann Surg* 154:315–318
30. Escrich E (1987) Validity of the DMBA-induced mammary cancer model for the study of human breast cancer. *Int J Biol Markers* 2:197–206
31. Escrich E, Solanas M, Segura R (1994) Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: I-diet definition. *In Vivo* 8:1099–1106
32. Escrich E, Solanas M, Ruiz de Villa MC, Ribalta T, Muntané J, Segura R (1994) Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: II-suitability of the diets. *In Vivo* 8:1107–1112
33. Young S, Hallows RC (1973) Tumours of the mammary gland. In: Turusov V (ed) *Pathology of tumours in laboratory animals*, vol I, Tumours of the rat. IARC Sci Publ, Lyon, pp 31–86
34. Costa I, Solanas M, Escrich E (2002) Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7, 12 dimethylbenz (a)anthracene in the rat. A comparative analysis with human breast tumors. *Arch Pathol Lab Med* 126:915–927
35. Elston CW, Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow up. *Histopathology* 19:403–410
36. Shan L, Yu M, Snyderwine EG (2005) Gene expression profiling of chemically induced rat mammary gland cancer. *Carcinogenesis* 26:503–509
37. Qiu C, Shan L, Yu M, Snyderwine EG (2005) Steroid hormone receptor expression and proliferation in rat mammary gland carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine. *Carcinogenesis* 26:763–769
38. Snyderwine EG, Thorgeirsson UP, Venugopal M, Roberts-Thomson SJ (1998) Mammary gland carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol [4, 5-b]pyridine in Sprague-Dawley rats on high and low-fat diets. *Nutr Cancer* 31:160–167
39. Zhang L, Bird RP, Bruce WR (1987) Proliferative activity of murine mammary epithelium as affected by dietary fat and calcium. *Cancer Res* 47:4905–4908
40. Cunningham DC, Harrison LY, Shultz TD (1997) Proliferative responses of normal human mammary and MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid, conjugated linoleic acid and eicosanoid synthesis inhibitors in culture. *Anticancer Res* 17:197–203
41. Guthrie N, Carroll KK (1999) Specific versus non-specific effects of dietary fats on carcinogenesis. *Prog Lipid Res* 38:261–271
42. Hubbard NE, Erickson KL (1987) Influence of dietary fats on cell populations of line 168 mouse mammary tumors: a morphometric and ultrastructural study. *Cancer Lett* 35:281–294
43. Kossoy G, Yarden G, Ben-Hur H, Kossoy N, Stark A, Madar Z, Zusm I (2001) Comparative effects of dimethylbenz(a)anthracene and a 15% olive oil diet on cellular components and expression of apoptosis-related proteins in the spleen and mammary gland tumors of rats. *Oncol Rep* 8:435–439
44. Ramos JW (2008) The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 40:2707–2719
45. Roberts-Thomson SJ, Snyderwine EG (1997) Effect of dietary fat on codon 12 and 13 *Ha-Ras* gene mutations in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5b]pyridine-induced rat mammary gland tumors. *Mol Carcinog* 20:348–354
46. Singh J, Hamid R, Reddy BS (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* 57:253–258
47. Davidson LA, Lupton JR, Jiang YH, Chapkin RS (1999) Carcinogen and dietary lipid regulate ras expression and localization in rat colon without affecting farnesylation kinetics. *Carcinogenesis* 20:785–791
48. Collet ED, Davidson LA, Fan YY, Lupton JR, Chapkin RS (2001) n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulate oncogenic Ras activation in colonocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C1066–C1075
49. Agnantis NJ, Parissi P, Anagnostakis D, Spandidos DA (1986) Comparative study of Harvey-ras oncogene expression with conventional clinicopathologic parameters of breast cancer. *Oncology* 43:36–39
50. Sacconi Jotti G, Fontanesi M, Bombardieri E, Gabrielli M, Veronesi P, Bianchi M, Becchi G, Bogni A, Tardini A (1992) Preliminary

- study on oncogene product immunohistochemistry (c-erbB2, c-myc, ras, p21, EGFR) in breast pathology. *Int J Biol Markers* 7:35–42
51. Agnantis NJ, Apostolikas NA, Zolotas VG, Spandidos DA (1994) Immunohistochemical detection of ras p21 oncoprotein in breast cancer imprints. *Acta Cytol* 38:335–340
 52. Özer E, Sis B, Özen E, Sakizli M, Canda T, Sarioglu S (2000) BRCA1, c-erbB2, and H-ras gene expressions in young women with breast cancer. An immunohistochemical study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 8:12–18
 53. Watson DM, Elton RA, Jack WJ, Dixon JM, Chetty U, Miller WR (1991) The H-ras oncogene product p21 and prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 17:161–169
 54. Göhring UJ, Schöndorf T, Kiecker VR, Becker M, Kurbacher C, Scharl A (1999) Immunohistochemical detection of H-ras proto-oncoprotein p21 indicates favorable prognosis in node-negative breast cancer patients. *Tumour Biol* 20:173–183
 55. Schöndorf T, Rutzel S, Andrack A, Becker M, Hoopmann M, Breidenbach M, Göhring UJ (2002) Immunohistochemical analysis reveals a protective effect of H-ras expression mediated via apoptosis in node-negative breast cancer patients. *Int J Oncol* 20:273–277
 56. Walker RA, Wilkinson N (1988) p21 ras protein expression in benign and malignant human breast. *J Pathol* 156:147–153
 57. Spaventi R, Kamenjicki E, Pecina N, Grazio S, Pavelic J, Kusic B, Curtila D, Danilovic Z, Spaventi S (1994) Immunohistochemical detection of TGF- α , EGF-R, c-erbB2, c-H-ras, c-myc, estrogen and progesterone in benign and malignant human breast lesions: a concomitant expression. *In Vivo* 8:183–189
 58. Going JJ, Anderson TJ, Wyllie AH (1992) Ras p21 in breast tissue: associations with pathology and cellular localisation. *Br J Cancer* 65:45–50

RESULTADOS

Antecedentes:

Los mecanismos celulares a través de los cuales los lípidos de la dieta modulan la carcinogénesis mamaria no están totalmente determinados, pero son múltiples y variados e, “in vivo”, se ejercerían de una forma integrada, simultánea y/o secuencial, tal como se ha detallado en el apartado D de la “Introducción” de este trabajo. Entre ellos destacan los efectos sobre la vía de transducción de señales celular. En este sentido, el “Grup Multidisciplinari per a l’estudi de Càncer de Mama” (GMECM) ha estudiado la posible influencia de los lípidos de la dieta en la vía ErbB/Ras y de sus tres principales efectores (ERK1/2, Akt y RalA/B), en cáncer de mama experimental. Los resultados, que han sido plasmados en la literatura y se discutirán en el apartado B de la “Discusión”, muestran, entre otros, que los niveles totales de la proteína Ras y la actividad de la misma, en los carcinomas de mama experimentales, se modifican según el tipo de grasa estudiada. El presente artículo pretende integrar los datos clínicos e histopatológicos obtenidos de tres diseños de dieta, con diferente aporte lipídico, con los resultados del análisis de la expresión de la proteína Ras. Concretamente, se estudió la isoforma Ha-Ras de Ras, dada su implicación conocida en la tumorigénesis mamaria, tal como se detalla en el apartado F de la “Introducción” y como se discute en el apartado correspondiente de la “Discusión”, con técnicas de inmunohistoquímica, para localizar la proteína a nivel celular, y con un sistema de análisis de imagen, que se detallará a continuación, y que permitió cuantificar la expresión de la misma. Un estudio parecido, según nuestros conocimientos, no estaba recogido en la literatura y permite complementar los datos obtenidos en los trabajos previos sobre este tema, realizados por el grupo investigador.

Resumen de los resultados y datos adicionales:

Se analizaron los datos clínicopatológicos obtenidos de una serie experimental con un grupo control (normolipídico o LFCO) y dos de dieta hiperlipídica: uno rico en aceite de maíz (HFCO_P) y el otro rico en aceite de oliva virgen extra (HFOO_P), diseñados según lo descrito en el apartado de “Material y Métodos” del artículo. Los parámetros de la carcinogénesis analizados en el estudio clínico fueron: el tiempo de latencia, la incidencia tumoral y el número de tumores totales y por rata, en el momento del sacrificio de los animales. Los parámetros histopatológicos evaluados fueron algunos de los utilizados en los trabajos previos (patrón arquitectural, grados arquitectural y nuclear, índice mitótico, reacción estromal, infiltrado linfoplasmocitario y secreción), así como el grado histológico, evaluado de acuerdo

al sistema modificado y adaptado a los tumores de mama de la rata, descrito en el artículo anterior (Artículo 2). El análisis de la expresión de la proteína p21Ha-Ras se realizó con la técnica de inmunohistoquímica, con un anticuerpo monoclonal específico contra p21Ha-Ras que reconoce, en concreto, el fragmento que corresponde a los residuos 54 a 188 de las formas mutada y no mutada de la proteína. Este método permite la localización de la proteína en la célula y su valoración “in situ”. Para valorar las posibles diferencias en la expresión de p21Ha-Ras en los tumores de mama por efecto de las dietas, los resultados de la inmunotinción se evaluaron cuantitativamente, utilizando un “software” de Noesis-Visilog 5.1, que permite medir las áreas marcadas con el anticuerpo, en términos de porcentaje. En concreto, se seleccionaron de 8 a 10 campos de gran aumento (x400) de una sección histológica marcada con el anticuerpo, de cada uno de los carcinomas de mama estudiados, excluyendo los tejidos no neoplásicos (estroma, grasa, parénquima benigno,...) y, sobre el área tumoral delimitada, se realizó el análisis cuantitativo de la expresión de p21Ha-Ras. El sistema realiza, por un lado, la cuantificación de la positividad de la tinción en forma de % sobre el área total estudiada y, por otro lado, la graduación de la misma, que se define como G1, G2 y G3 a medida que la intensidad aumenta. La positividad se mide a partir de los niveles detectados en el control negativo correspondiente, realizado en cada una de las tandas de inmunohistoquímica. Cada tanda de inmunohistoquímica incluía representación de tumores de los distintos grupos experimentales y, además, un control positivo, que fue siempre el mismo y que se analizaba antes de realizar el estudio cuantitativo para validar la técnica. Se reconocieron como valorables aquellas tandas de inmunohistoquímica en las que el caso control negativo presentaba una positividad inespecífica de fondo que no sobrepasaba el 2% y en las que el positivo mostró valores similares (+/- 2%) entre la primera valoración válida y las posteriores. La valoración histológica e inmunohistoquímica se efectuó sin conocer los grupos experimentales a los que pertenecían los carcinomas evaluados.

Los resultados del estudio clínico, que se exhiben en la Tabla 1 del presente artículo, mostraron que, en el grupo de animales que recibieron una dieta hiperlipídica rica en aceite de maíz (grupo HFCO_p), los carcinomas de mama aparecían antes que en los grupos control y con dieta rica en aceite de oliva virgen extra (HFOO_p), éstos dos últimos con resultados casi idénticos. Además, la incidencia tumoral, definida como el porcentaje de animales de un grupo experimental con al menos un tumor de mama maligno, fue mayor en HFCO_p que en el grupo control, mostrando HFOO_p valores intermedios. En cuanto al número total de tumores por grupo y por rata, éste también fue mayor en HFCO_p que en el control, siendo el grupo

HFOO_p el que tenía los valores más bajos. No obstante, las diferencias expresadas sólo mostraron una tendencia a la significación estadística, en el estudio del primer parámetro. Los resultados del análisis histopatológico de los carcinomas de mama desarrollados en los tres grupos experimentales se exhiben en la Figura 1 del artículo. Se observaron algunas diferencias morfológicas entre los tres grupos, como una significativa mayor actividad mitótica en los carcinomas del grupo HFCO_p que en los del control, y una mayor secreción ($P < 0,05$ entre HFCO_p y control) y un infiltrado linfoplasmocitario más intenso en los carcinomas de los grupos de dieta hiperlipídica en relación al grupo control. Los carcinomas del grupo HFOO_p presentaron una morfología similar a la de los tumores del grupo control, con mayor porcentaje de áreas papilares, menor reacción estromal desmoplásica, pero con una no significativa mayor actividad mitótica. Los carcinomas de HFCO_p mostraron mayor grado histológico – según el sistema de gradación modificado y adaptado a los tumores de rata, descrito en el Artículo 2-, con tendencia estadísticamente significativa ($P = 0,078$), que los de los grupos control y HFOO_p (Figura 2 del artículo). La mayoría de los adenocarcinomas desarrollados en cada rata fueron morfológicamente similares y exhibían el mismo ± 1 grado histológico (79% -11/14- en LFCO, 72% -13/18- en HFCO_p y 81% -13/16- en HFOO_p).

El estudio inmunohistoquímico se realizó en 220 carcinomas de mama (68 de LFCO, 87 HFCO_p y 65 de HFOO_p). La positividad se observó citoplasmática en forma de fino granulado, compatible con la localización de la proteína en el citosol y, ocasionalmente, se reconoció positividad nuclear. No se evidenció ninguna variación en la localización de la proteína (citoplasma “versus” membrana). En las secciones estudiadas, se constató expresión de p21Ha-Ras en las células epiteliales ductales y lobulillares, mioepiteliales, en los fibroblastos, en las paredes vasculares y en músculo esquelético y piel, cuando estaban representados en la laminilla, y en todos los tumores. No obstante, la tinción mostró una distribución y densidad heterogénea y variable, según las características fenotípicas de las células y entre los tumores. Tal como se observan en las figuras adjuntas a esta sección, el sistema de análisis de imagen permitió identificar casos de carcinoma con escasa expresión de p21Ha-Ras en las células tumorales (Figura A43; A: adicional al artículo), con porcentajes de positividad bajos y de escasa intensidad, y casos con intensa y abundante tinción con el anticuerpo (Figura A44), como se demuestra en las curva de grados, adjuntas a las imágenes tomada para el análisis. La Figura A45 muestra un ejemplo de un carcinoma con escasa y leve tinción inmunohistoquímica para p21Ha-Ras, a x100 (a) y x400 (b) aumentos, mientras que las Figuras A46 y A47 muestran dos casos de moderada e intensa positividad,

respectivamente, a idénticos aumentos. Al analizar y cuantificar la expresión de la proteína entre los grupos experimentales, no se observaron diferencias significativas ni en el porcentaje ni en la intensidad de la inmunotinción (Tabla 2 del artículo). En cambio, al correlacionar los resultados del estudio inmunohistoquímico con el grado histológico de los carcinomas, se constató que la expresión de p21Ha-Ras tendía a disminuir al aumentar la malignidad morfológica (Figura 4 del artículo). En concreto, los carcinomas de grado I mostraron una significativa mayor expresión (56,69% de mediana) que los de grado II (42,82%) y grado III (43,13%). Estas diferencias se hacían notablemente mayores al analizar por separado los grupos LFCO y HFCO_p (53,72% en grado I “versus” 25,5% en grado III en el primero; 58,61% en grado I “versus” 35,31% en grado III en el segundo), mientras que desaparecían en el grupo HFOO_p. En este grupo, el área positiva para la tinción de p21Ha-Ras era muy similar entre los carcinomas de bajo y alto grado histológico (56,02% y 53,14%, respectivamente). Además, al comparar los carcinomas de grado III de los tres grupos experimentales, se constató una mayor expresión de p21Ha-Ras en el grupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva virgen extra que en la de los dos restantes.

Se realizó un estudio similar de la expresión de p21Ha-Ras por inmunohistoquímica en las otras dos series, A y B, cuyos resultados no están expuestos en el artículo, y que incluyen, cada una, un grupo control y dos grupos de animales alimentados con una dieta rica en aceite de maíz, en uno -HFCO_I- administrada durante la fase de iniciación de la carcinogénesis, y en el otro -HFCO_p-, durante la fase de promoción. Se analizaron 256 carcinomas de mama: 146 de la serie A (19 del grupo control, 62 del grupo HFCO_I y 65 del grupo HFCO_p) y 110 de la serie B (31 del grupo control, 46 del grupo HFCO_I y 33 del grupo HFCO_p). Los resultados se exhiben en la Tabla A4, adjunta y adicional al artículo, y tampoco mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Así, en la serie A, el promedio del área positiva para p21Ha-Ras fue de 28,96% en el grupo control, de 26,30% en HFCO_I y de 33,75% en HFCO_p y en la serie B de 34,37% en el grupo control, de 26,36% en el HFCO_I y de 27,41% en el HFCO_p, resultados similares a lo obtenido en el estudio presentado en el Artículo 3. La distribución de la intensidad de la tinción se observó paralela a la de la expresión total.

En cuanto a la correlación de la expresión de p21Ha-Ras con el grado histológico, en la serie A, se observaron resultados similares a los expresados en el estudio de Artículo 3, y que se plasman en la Tabla A5, con menor expresión de la proteína en los carcinomas de grado III (18,12% de mediana) respecto a los de grado I (27,65%), resultados que se repiten

en el grupo HFCO_p. El mismo estudio en el grupo LFCO no fue posible, debido a que sólo se analizaron dos carcinomas de grado histológico II y uno de grado III.

Tabla A4: Estudio inmunohistoquímico de p21Ha-Ras (series A y B)

	p21Ha-Ras M±SD (m)	G1 M±SD (m)	G2 M±SD (m)	G3 M±SD (m)
Serie A				
LFCO	28,96±19,48 (28,74)	28,68±19,09 (28,74)	0,52±0,77 (0,26)	0
HFCO _I	26,30±22,97 (17,24)	25,49±21,64 (17,23)	1,73±2,97 (0,32)	0
HFCO _p	33,75±23,75 (28,73)	32,25± 21,13(28,73)	3,72±6,04 (0,69)	0,14±0,14 (0,11)
Serie B				
LFCO	34,37±23,68 (34,65)	31,99± 20,83 (33,22)	2,94±6,02 (0,41)	0,10±0,20 (0,01)
HFCO _I	26,36±21,87 (21,91)	25,59±20,70 (21,90)	1,40±3,24 (0,23)	0,07±0,12 (0,03)
HFCO _p	27,41±25,49 (20,47)	26,40±23,71 (20,40)	1,54±3,03 (0,08)	0,20±0,29 (0,04)

M media, SD desviación estándar, m mediana

Tabla A5: Correlación expresión de p21Ha-Ras y grado histológico (serie A)

	GRADO HISTOLÓGICO I p21Ha-Ras M±SD (m)	GRADO HISTOLÓGICO II p21Ha-Ras M±SD (m)	GRADO HISTOLÓGICO III p21Ha-Ras M±SD (m)
Serie A			
TOTAL	31,15±23,08 (27,65)	36,46±22,92 (37,34)	28,13±21,80 (18,12)
HFCO _p	33,85±24,56 (27,65)	35,84±23,64 (33,33)	24,13±20,87 (18,12)

M media, SD desviación estándar, m mediana

En la serie B, se correlacionó la expresión de p21Ha-Ras con el grado nuclear y el arquitectural de los carcinomas (Tabla A6, adicional al artículo).

Tabla A6: Correlación expresión de p21Ha-Ras y grado nuclear y arquitectural (serie B)

	Grado I p21Ha-Ras M±SD (m)	Grado II p21Ha-Ras M±SD (m)	Grado III p21Ha-Ras M±SD (m)
Serie B			
Grado arquitectural			
TOTAL	29,99±23,37 (26,40)	33,43±24,64 (14,86)	20,60±20,12 (14,32)
HFCO _p	38,42±25,19 (34,07)	34,92±31,37 (27,66)	15,49±15,56 (10,40)
Grado nuclear			
TOTAL	32,44±23,14 (34,22)	31,38±25,22 (27,15)	21,63±18,46 (16,37)
HFCO _p	30,02±18,61 (27,74)	38,52±31,26 (31,13)	17,84±15,68 (14,95)

M media, SD desviación estándar, m mediana

Aunque se constató una tendencia a una mayor expresión de p21Ha-Ras en los carcinomas de bajo grado respecto a los de alto grado, las diferencias no fueron significativas. Así, la mediana del área positiva fue de 26,40% en los carcinomas de grado arquitectural I frente al 14,32% de los carcinomas de grado III y de 34,22 % en los carcinomas de grado nuclear I frente al 16,37% de los carcinomas de grado nuclear III, con resultados en la misma línea, en HFCO_p. El grupo control no permitió un estudio estadístico, al recogerse sólo dos casos de grado arquitectural III y tres de grado nuclear III. En esta serie, también se analizó la relación de la expresión de p21Ha-Ras con la actividad mitótica, agrupando los tres primeros subgrupos (menos de 10 mitosis/10 campos de gran aumento) y los dos últimos grupos (con 10 o más mitosis). Los resultados se exhiben en la Tabla A7 y muestran la misma tendencia a la disminución de la expresión de la proteína con el aumento de la actividad mitótica, más evidente cuando se analiza aisladamente el grupo HFCO_p.

Tabla A7: Correlación expresión de p21Ha-Ras y mitosis (serie B)

	<10mitosis/10CGA p21Ha-Ras M±SD (m)	≥10mitosis/10CGA p21Ha-Ras M±SD (m)
Serie A		
TOTAL	29,80±23,84 (26,98)	28,25±16,78 (24,45)
HFCO _p	31,36±26,53 (26,98)	16,55±5,55 (16,55)

M media, SD desviación estándar, m mediana

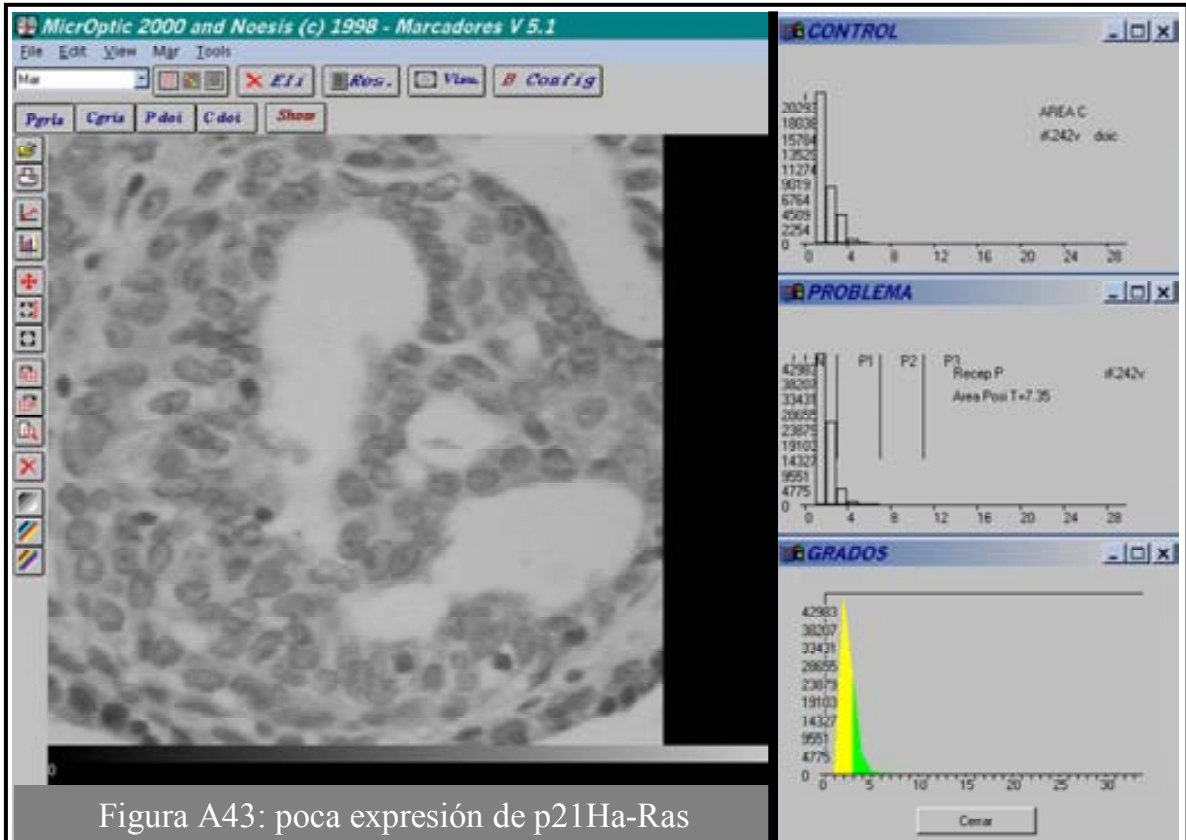


Figura A43: poca expresión de p21Ha-Ras

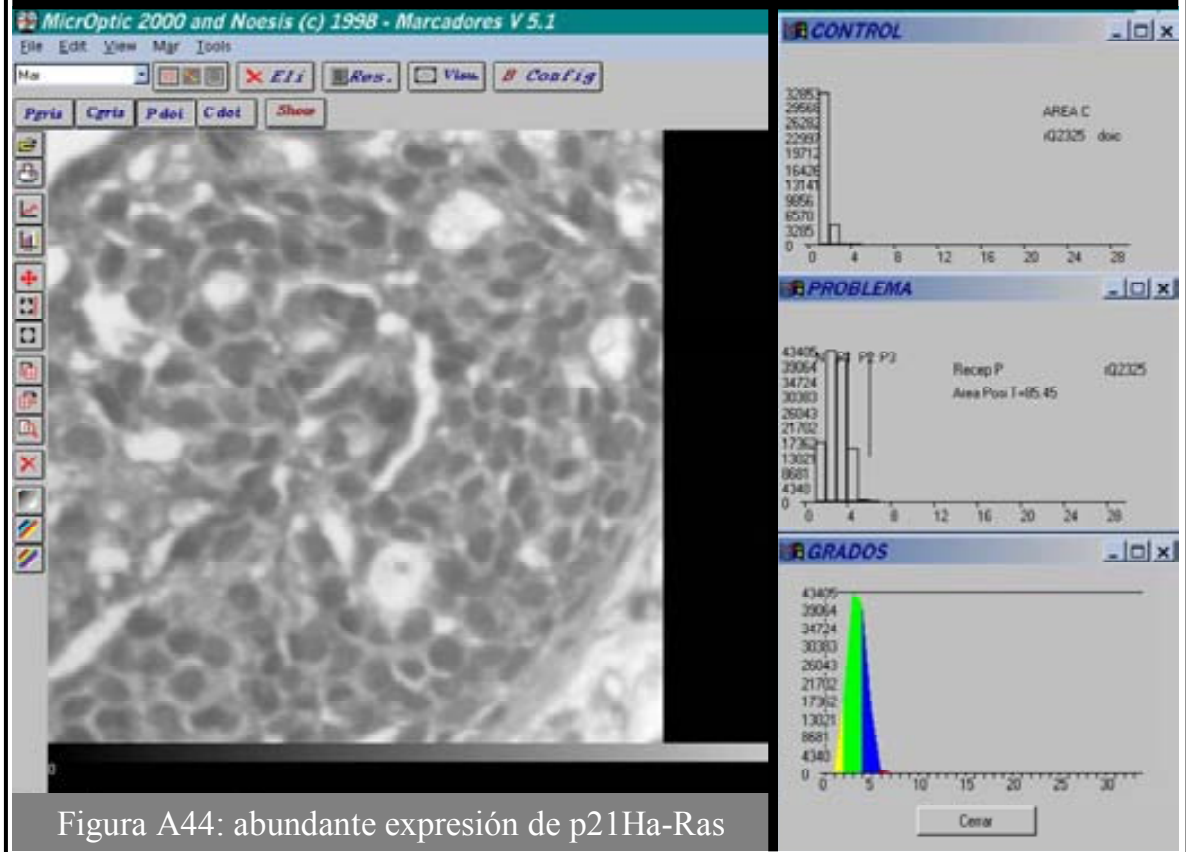
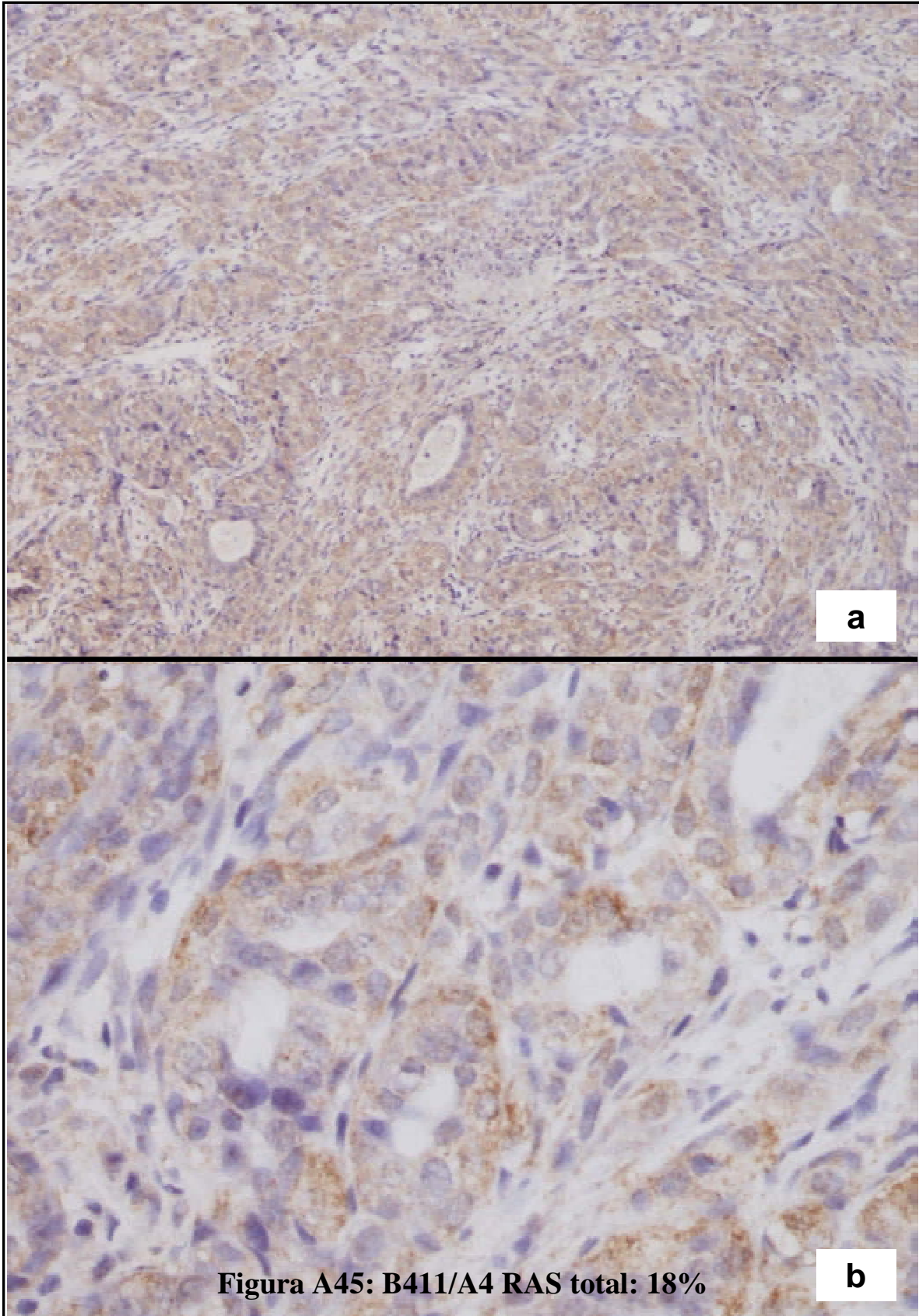


Figura A44: abundante expresión de p21Ha-Ras



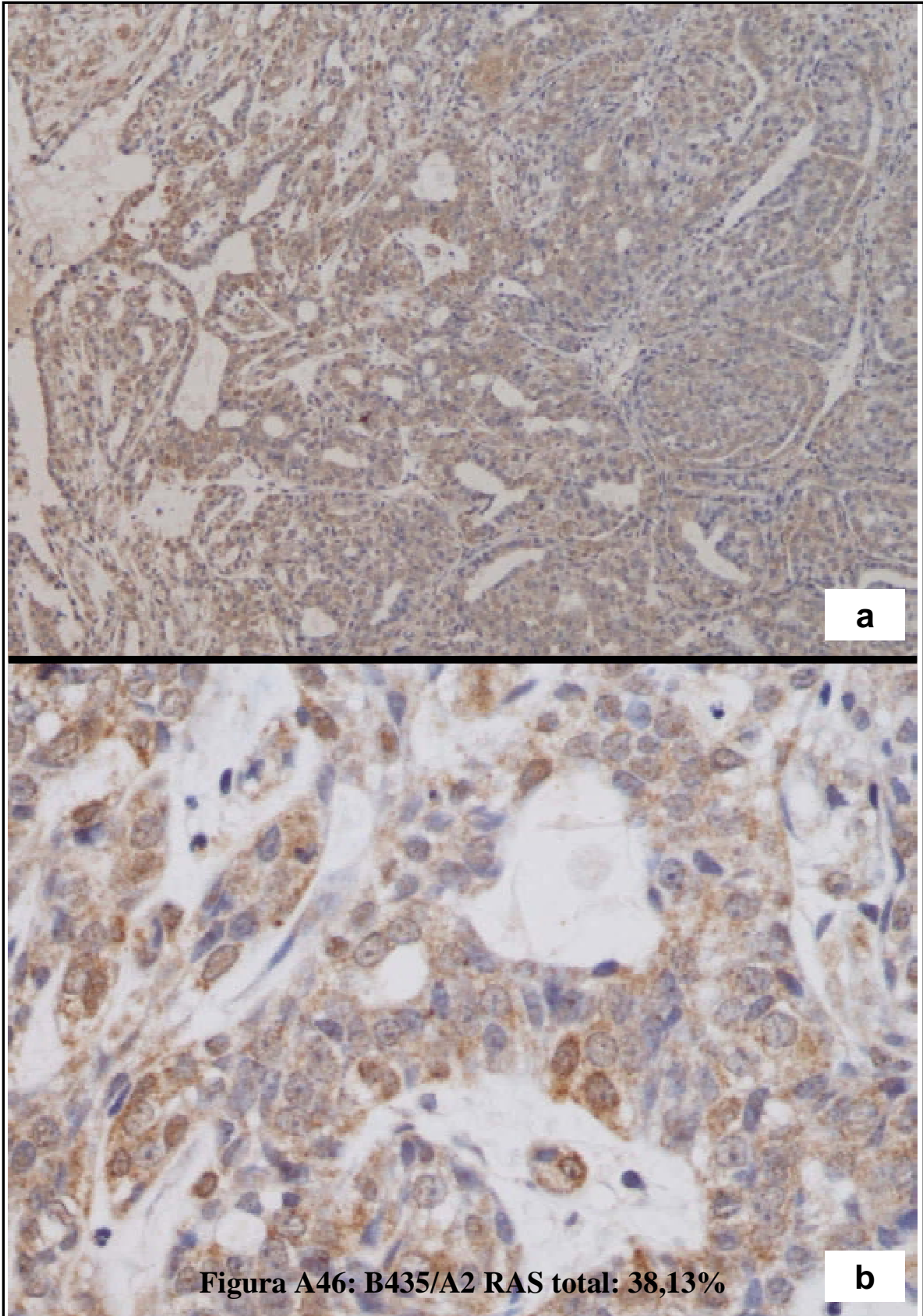
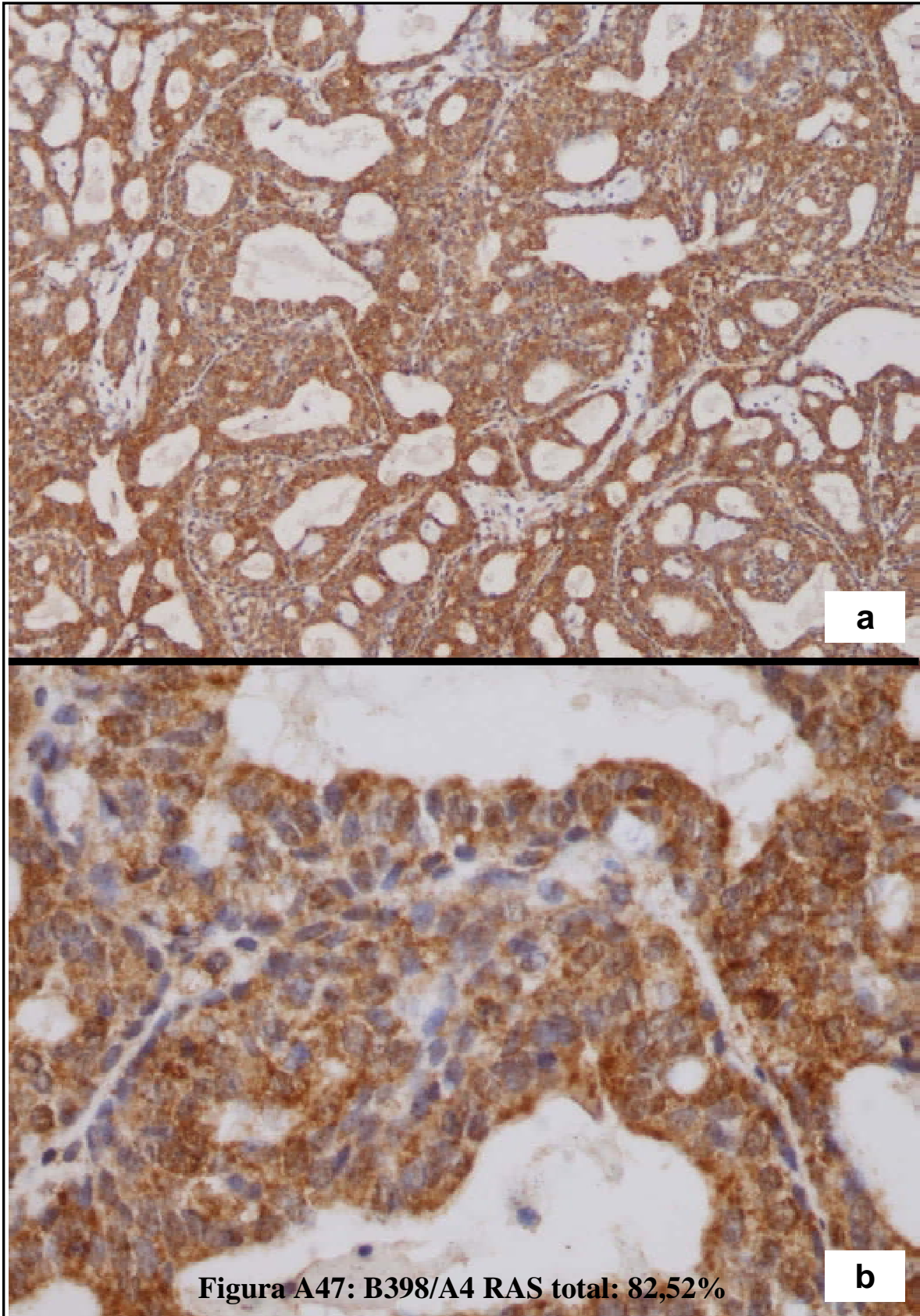


Figura A46: B435/A2 RAS total: 38,13%



ARTÍCULOS DE APLICACIÓN E INTEGRACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO MORFOLÓGICO

ARTÍCULO 4: Deregulated expression of the PCPH proto-oncogen in rat mammary tumors induced with 7,12-dimethylbenz(α)anthracene. M. Solanas, E. Escrich, A. Rouzaut, **I. Costa**, A. Martínez, V. Notario. *Molecular Carcinogenesis* 2002; 33: 219-227

ARTÍCULO 5: 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. M. Solanas, A. Hurtado, **I. Costa**, R. Moral, J.A. Menéndez, R. Colomer, E. Escrich. *International Journal of Oncology* 2002; 21: 745-753

ARTÍCULO 6: Identification of novel differentially expressed genes by the effect of a high-fat n-6 diet in experimental breast cancer. E. Escrich, R. Moral, G. García, **I. Costa**, J.A. Sánchez, M. Solanas. *Molecular Carcinogenesis* 2004; 40: 73-78

ARTÍCULO 7: Are the olive oil and other dietary lipids related to cancer? Experimental evidence. E. Escrich, M. Solanas, R. Moral, **I. Costa**, L. Grau. *Clinical and Translational Oncology* 2006; 8: 868-883

ARTÍCULO 8: Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer. E. Escrich, R. Moral, L. Grau, **I. Costa**, M. Solanas. *Molecular Nutrition and Food Research* 2007; 51: 1279-1292

ARTÍCULO 9: Differential expression of H19 and vitamin D3 up-regulated protein 1 as a mechanism of the modulatory effects of high virgin olive oil and high corn oil diets on experimental mammary tumors. M. Solanas, R. Moral, G. García, L. Grau, E. Vela, R. Escrich, **I. Costa**, E. Escrich. *European Journal of Cancer Prevention* 2009; 18: 153-161

ARTÍCULO 10: Diets high in corn oil or extra-virgin olive oil provided from weaning advance sexual maturation and differentially modify susceptibility to mammary carcinogenesis in female rats. R. Moral, R. Escrich, M. Solanas, E. Vela, **I. Costa**, MC. Ruíz de Villa, E. Escrich. *Nutrition and Cancer* 2011; 63: 410-420

El proyecto de investigación de “Lípidos de la Dieta y Cáncer de Mama” que desarrolla el “Grup Multidisciplinari per a l’Estudi del Càncer de Mama” (GMECM), del que la doctoranda forma parte, incluye estudios clínicos, morfológicos y moleculares orientados al conocimiento de los efectos de los distintos tipos de grasas de la dieta en la carcinogénesis mamaria y de los mecanismos de estas acciones. Los artículos que se presentan en esta segunda sección, y que forman parte de esta Tesis Doctoral, están orientados hacia estos fines. En concreto, se analizan el comportamiento clínico del cáncer de mama en diferentes situaciones dietéticas, en cuanto aporte de lípidos (Artículo 5), el papel de algunos genes y proteínas en los mecanismos a través de los cuales los lípidos de la dieta modulan el cáncer de mama (Artículos 4, 6 y 9) y la influencia de estas grasas en la maduración sexual de las ratas como elemento modificador de la susceptibilidad de la glándula mamaria a la carcinogénesis (Artículo 10). Finalmente, los Artículos 7 y 8, además de introducir nuevos datos sobre los efectos de los lípidos de la dieta en el cáncer de mama, aportan una visión integradora de los resultados de los trabajos propios con los de la literatura, realizados hasta el momento, sobre estos efectos. Todos estos artículos se han añadido a la Tesis Doctoral dado que, y de acuerdo con la realidad multidisciplinar del GMECM, incluyen resultados del análisis morfológico de la glándula mamaria y de los tumores experimentales, en el que la doctoranda ha participado más activamente, como elemento adicional y complementario en los trabajos correspondientes, y cuya aportación se resaltarán en los resúmenes que se muestran a continuación. La presentación de estos artículos se realizará según su publicación en el tiempo y en el orden establecido en el índice de la Tesis Doctoral.

RESULTADOS

4. ARTÍCULO 4

Deregulated expression of the *PCPH* proto-oncogene in rat mammary tumors induced with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.

M. Solanas, E. Escrich, A. Rouzaut, **I. Costa**, A. Martínez, V. Notario

Molecular Carcinogenesis 2002; 33: 219-227

RESULTADOS

Deregulated Expression of the *PCPH* Proto-oncogene in Rat Mammary Tumors Induced With 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracene

Montserrat Solanas,¹ Eduard Escrich,¹ Ana Rouzaut,⁴ Irmgard Costa,^{1,2} Alfredo Martínez,³ and Vicente Notario^{4*}

¹Department of Cell Biology, Physiology, and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

²Department of Pathology, Hospital General de Granollers, Barcelona, Spain

³Department of Cell and Cancer Biology, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

⁴Laboratory of Experimental Carcinogenesis, Department of Radiation Medicine, Georgetown University Medical Center, Washington, D.C.

The *PCPH* proto-oncogene was identified by its frequent activation in Syrian hamster fetal cells exposed to 3-methylcholanthrene. We previously isolated human *PCPH* cDNA and studied its expression in normal human tissues. We report herein the pattern of *PCPH* expression in normal rat tissues. Each tissue expressed one major *PCPH* polypeptide that varied in molecular mass in different tissues. Normal mammary gland expressed a single *PCPH* polypeptide of 27 kDa. This *PCPH* form also was expressed in lactating mammary glands but at significantly greater levels. These results suggest the existence of tissue-specific regulatory mechanisms for *PCPH* expression that may be influenced by the differentiation stage. Our previous studies on the involvement of *PCPH* in human cancer showed that human breast tumor cell lines have frequent alterations in *PCPH*, including multiple *PCPH* polypeptide forms that are not expressed in normal cells. These cell lines also have frequent loss of a 27-kDa form identified as the only *PCPH* polypeptide expressed by normal human breast epithelial cells. In this study, we found that these same alterations occurred in vivo during mammary carcinogenesis in Sprague-Dawley rats treated with 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene, in both benign and malignant tumors, indicating that stable changes in *PCPH* expression took place early in the neoplastic process. Results showed that this experimental system is relevant to human breast carcinogenesis and provides an excellent model to study the molecular basis of the regulation of *PCPH* expression during normal differentiation and pathologic stages of neoplasia of the mammary gland and to analyze the role of *PCPH* in the carcinogenic process. Furthermore, the detection of atypical *PCPH* polypeptides in tumors suggests that *PCPH* immunodetection may be applied as a diagnostic tool for the early identification of neoplastic breast epithelial cells.

© 2002 Wiley-Liss, Inc.

Key words: carcinogenesis; oncogenes; breast cancer; gene expression

INTRODUCTION

PCPH is a widely conserved gene among eukaryotes [1] and was defined as a proto-oncogene on the basis of its frequent oncogenic activation in explanted Syrian hamster embryo fibroblasts upon exposure to a single dose of 3-methylcholanthrene [2,3]. The protein product expressed from normal *PCPH* cDNA has intrinsic nucleotide phosphohydrolase activity [4]. The activated *PCPH* oncogene encodes a truncated form (246 vs. 469 amino acids) of the normal protein [5] that retains all the known structural determinants for nucleotide phosphohydrolase activity [4,6,7]. Transfection experiments into mouse NIH/3T3 cells showed that the *PCPH* oncogene has intrinsic transforming activity and that it acts synergistically with the human *Ha-ras* oncogene in the process of tumorigenic conversion [3]. Indeed, cells expressing the *PCPH* oncogene are able to proliferate when seeded in semisolid

medium and form tumors when injected into nude mice [5].

To investigate the possible involvement of *PCPH* in human neoplasia, we first cloned the human cDNA [8] and determined its genomic structure [9]. In addition, we studied the expression of *PCPH* in normal human tissues and in a variety of human neoplastic cells, including some primary tumors and numerous human tumor cell lines [8,10]. These

*Correspondence to: Department of Radiation Medicine, Georgetown University Medical Center, Research Building, Room E215, 3970 Reservoir Road NW, Washington, D.C. 20007.

Received 9 August 2001; Revised 28 December 2001; Accepted 25 January 2002

Abbreviations: DMBA, 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

DOI 10.1002/mc.10039

studies were performed at the protein level, by Western blot analysis using a polyclonal anti-PCPH antiserum developed against bacterial recombinant Syrian hamster normal PCPH protein [10]. Results from the analyses of breast tumor cell extracts showed that the single 27-kDa PCPH form present in normal human breast epithelial cells either was lost or was barely detectable in 35% of the cells tested. In addition, 80% of them expressed several immunoreactive forms of PCPH (47, 70, 80, and 90 kDa in size) not present in normal breast epithelial cells [10]. These data indicated that mechanisms controlling *PCPH* expression are altered in breast tumor cells and suggested the possibility that they may involve aberrant splicing of the *PCPH* transcript or post-translational processing of the PCPH protein [8,9].

To investigate these processes in a reproducible, *in vivo* system of mammary carcinogenesis, we studied the expression of *PCPH* in benign and malignant mammary tumors induced in Sprague-Dawley rats by treatment with 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA) [11] compared with normal mammary gland. Our study also explored the normal pattern of *PCPH* expression in several other rat tissues, including the mammary gland of lactating rats. Results established the existence in normal rat tissues of various immunorelated PCPH forms that were expressed in a tissue-specific manner. Most tissues expressed one major individual polypeptide form of PCPH: a 70-kDa form in brain, a 35-kDa form in skeletal muscle, and a 27-kDa form in the mammary gland. In contrast, this simple and highly regulated pattern of PCPH expression was lost in most mammary tumor samples, including the benign neoplasms tested. These results indicated that the alteration of PCPH expression is an event that takes place during the initial stages of mammary carcinogenesis and that the pattern of expression of PCPH-related polypeptide forms may be used as a diagnostic tool for the early identification of neoplastic mammary epithelial cells.

MATERIALS AND METHODS

Induction of Mammary Tumors

Mammary tumors were induced in 53-d-old female virgin Sprague-Dawley rats ($n = 20$) by a single dose of DMBA. This protocol results in the development of tumors that parallel closely the characteristics of human breast tumors [12,13]. In our case, DMBA treatment resulted in the development of 19 benign tumors and 35 malignant adenocarcinomas. The carcinogen (1 mL of corn oil containing 5 mg of DMBA per animal) was administered by buco-gastric instillation, essentially as previously described [11,12]. Control rats received corn oil alone. Animals were kept in a certified facility, housed in a temperature-controlled environment ($24 \pm 1^\circ\text{C}$)

with a 12-h light/dark cycle and provided with water and an N3 diet [14,15] *ad libitum*. Rats were weighed and palpated for tumors weekly. Animals were killed by decapitation and necropsied. At necropsy, all normal tissues and tumors were quickly removed and frozen in liquid nitrogen for storage. A small portion of each tumor was fixed in 10% formaldehyde in phosphate-buffered saline, embedded in paraffin, and stained with hematoxylin and eosin for pathologic examination. Histologic diagnosis of experimental mammary tumors was based on well-established criteria [16]. The pathologic characteristics of most tumors included in this study were consistent with either benign fibroadenoma or malignant adenocarcinoma.

Preparation of Tissue and Tumor Extracts

Extracts were prepared from mammary tumors and various normal tissues from virgin rats (brain, heart muscle, kidney, stomach, skeletal muscle, spleen, thymus, thyroid, liver, lung, skin, mammary gland, and adipose tissue) and from mammary glands of lactating animals. Samples maintained in liquid nitrogen were pulverized mechanically while still frozen in a small volume of liquid nitrogen. The pulverized material was transferred to an Eppendorf tube and homogenized with several strokes of a tight-fitting plastic pestle, at 4°C , in a buffer consisting of 20 mM Tris HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% sodium dodecyl sulfate supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete mini tablets; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The supernatant was collected by microcentrifugation for 20 min at 4°C , aliquoted, and stored at -80°C until used. The total protein content of the homogenates was determined by the BCA Protein Assay System (Pierce, Rockford, IL).

Immunohistochemistry for PCPH

Tissue sections (5 μm thick) were dewaxed and rehydrated, and intrinsic peroxidase was blocked with 3% H_2O_2 for 30 min. Antigen retrieval was performed twice in a 1.36-kW turntable microwave oven (General Electric Co., Louisville, KY) by heating the slides in 0.1 M citrate buffer (pH 6.0) at maximum power for 5 min each time. Nonspecific background was reduced by incubating the slides in 3% normal goat serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 30 min at room temperature. The primary antibody against PCPH was the same used for Western blotting [8,10], but the optimal dilution for immunohistochemistry was 1:2000. Slides were incubated in the primary antibody overnight at 4°C . The next day the tissues were exposed for 1 h to biotinylated goat anti-rabbit IgG (diluted 1:200; Vector Laboratories) and then for 1 h to the avidin-biotinylated peroxidase complex (diluted 1:100;

Vector Laboratories). Peroxidase activity was detected with diaminobenzidine, and the slides were lightly counterstained with hematoxylin. Substitution of the primary antibody by pre-immune serum from the same rabbit was used as negative control. Pictures were taken in a BX50 microscope (Olympus, Minneapolis, MN) equipped with a PDMC-2 digital camera (Polaroid, Cambridge, MA).

Western Immunodetection Analysis

Total extracts (50 μ g of protein) were subjected to sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis on 12% gels, blotted onto PVDF membranes by electrotransfer; the membranes were probed with anti-PCPH antiserum (367-10W) as previously described [8,10]. Visualization of immunoreactive polypeptides was accomplished by using a peroxidase-conjugated secondary antibody and development with chemiluminescence (ECL;

Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ). Blots were stripped and reprobed with an anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) polyclonal antibody (Trevigen, Inc., Gaithersburg, MD), to control for equal sample loading. The relative abundance of the immunoreactive polypeptides was determined by densitometric analysis of the various blot exposures in a PDI Model DNA35 Scanner (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), using the PDI Discovery Series software (Quantity One version 2.0) for data processing. When applicable, statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney test [17].

RESULTS

Expression of PCPH in Normal Rat Tissues

Western analyses of total extracts prepared from various normal tissues of virgin rats with a PCPH-specific polyclonal antiserum showed a

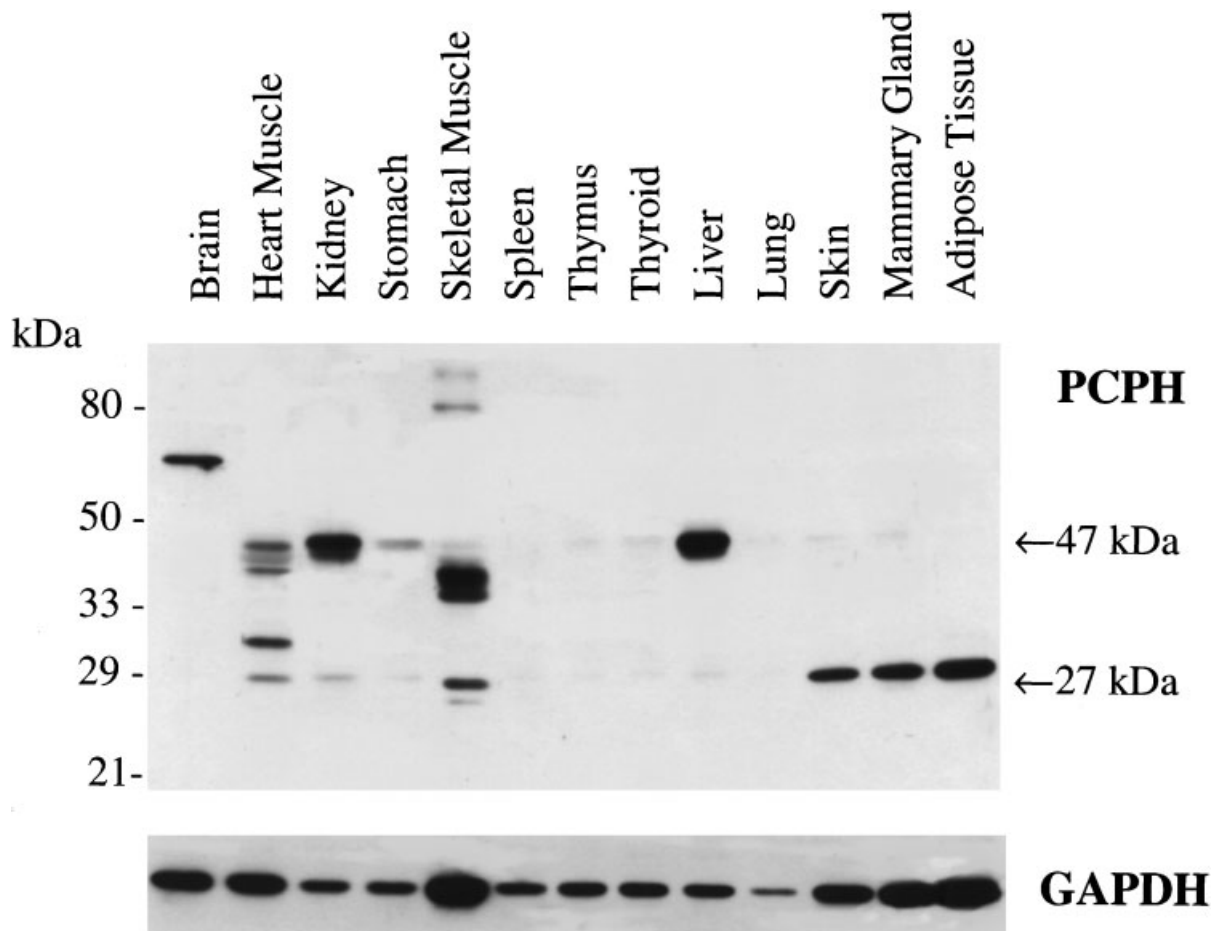


Figure 1. PCPH expression in normal organs of the virgin female Sprague-Dawley rat. Extracts prepared from the organs indicated were analyzed by Western blotting with an anti-PCPH polyclonal antiserum (top panel). After stripping, immunoreactivity with an anti-GAPDH antibody was used as loading control (bottom panel). The migration of molecular mass standards is shown on the left, and the position of the most widely expressed PCPH polypeptides is indicated with arrows on the right.

heterogeneous pattern of PCPH expression with regard to both the relative amounts and the apparent molecular masses of the PCPH-immunorelated polypeptides detected (Figure 1). The highest levels of PCPH expression were detected in liver and kidney, both of which expressed a major polypeptide of about 47 kDa and a much less abundant, but detectable polypeptide of about 27 kDa. These two PCPH forms also were detected, though at much lower levels, in the stomach. Extracts from skin, mammary gland, and adipose tissue contained the 27-kDa PCPH form almost exclusively and in relatively high amounts, whereas the 47-kDa form was, in different experiments, either undetectable or present at levels near the limit of detection of our technique.

Interestingly, both heart and skeletal muscle showed a much more heterogeneous pattern of PCPH expression. The major PCPH polypeptides present in skeletal muscle were detected as a doublet of about 35–37 kDa, but other PCPH forms, from the 27-kDa form to much larger forms of approximately 80 kDa and above, were also detectable. Heart muscle contained low amounts of both the 47-kDa and the 27-kDa polypeptides in addition to other forms of intermediate molecular mass, with the most abundant migrating as a polypeptide of about 30 kDa. A unique PCPH polypeptide of

about 70 kDa was present in brain. No expression of PCPH-immunorelated polypeptide forms was detectable in extracts from spleen, thymus, thyroid, and lung.

Increased Expression of PCPH in the Mammary Glands During Lactation

Preliminary evidence from analyses on the involvement of PCPH in human breast tumors [9,10] had suggested the possibility that the expression of PCPH in mammary epithelium varies with its differentiation state. To determine whether this also could be the case in the rat, we prepared total extracts of individual mammary glands from virgin rats and from lactating animals and analyzed them by Western blot with the anti-PCPH antiserum. Results (Figure 2) showed that in essentially all tested cases the level of expression of PCPH was greater in extracts from mammary glands of lactating animals. On average, the increase of PCPH expression during lactation was on the order of 14-fold, a highly significant difference ($P < 0.05$). There were no significant qualitative differences, however; the 27-kDa polypeptide was the only PCPH form detectable in the mammary glands of both virgin and lactating animals.

Immunohistochemical staining for PCPH in paraffin sections obtained from rat mammary tissue

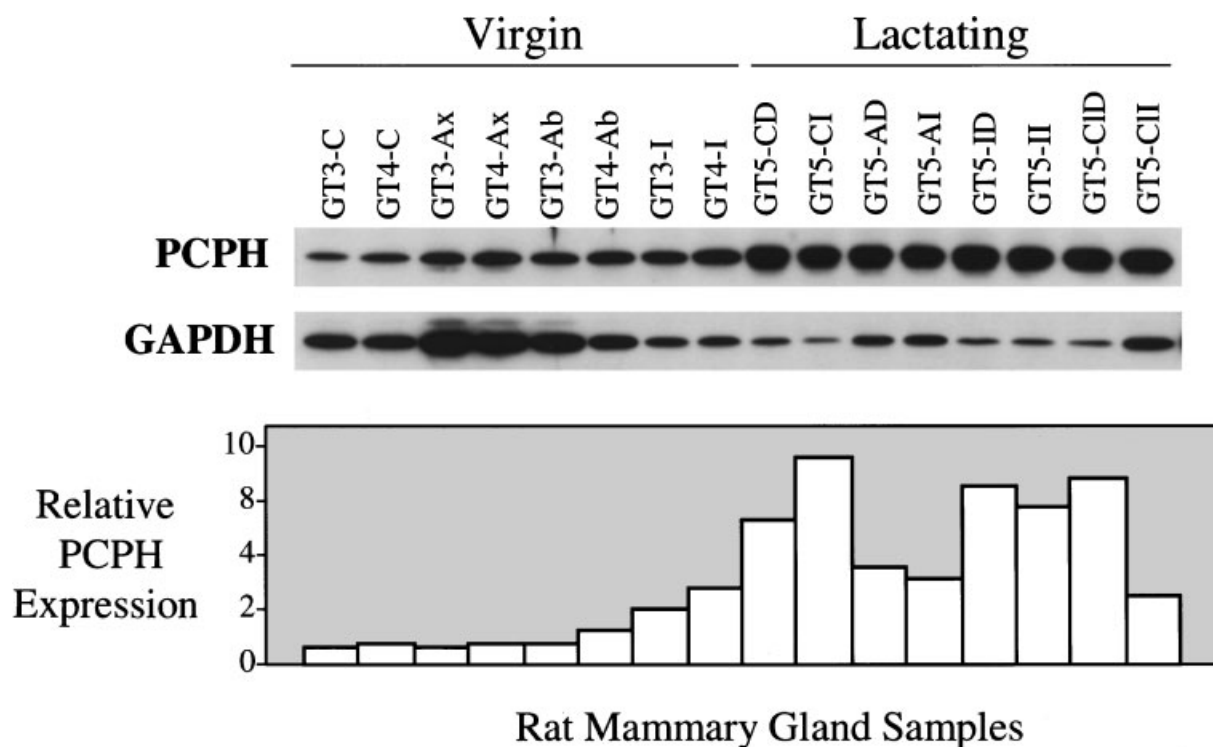


Figure 2. Expression levels of PCPH in extracts of mammary glands dissected from virgin or lactating animals. Similar exposures of Western analyses with anti-PCPH or anti-GAPDH antisera are shown. The relative levels of PCPH expression (given here in arbitrary units) were estimated by densitometry after correcting the intensity of the PCPH signal in each sample by that of the corresponding GAPDH loading control.

showed that the differences observed by Western analyses indeed reflected differences in the levels and patterns of expression of PCPH in the epithelial cells of virgin and lactating mammary glands: normal mammary glands from virgin animals showed PCPH immunoreactivity in the ducts and secretory units with a predominant nuclear pattern (Figure 3A), whereas in the lactating glands the staining was more intense than in their inactive counterparts, and the stronger expression was found in the cytoplasm of the secretory cells (Figure 3B). Similar differences could be found between virgin and lactating animals from 8 wk up to at least 36 wk of age. The specificity of the PCPH immunoreactivity was established by the fact that substitution of the anti-PCPH primary antibody by pre-immune serum from the same rabbit for analyses of serial sections resulted in a complete lack of staining (Figure 3C).

Induction and Immunohistochemical Characterization of Mammary Tumors

A sample of 54 DMBA-induced mammary tumors was included in the present study. Histopathologic analyses showed that the majority of them (35 tumors) had malignant characteristics suggestive of adenocarcinoma. The histologic features of the malignant tumors were very consistent among all samples, and no appreciable morphologic differences were observed. The remaining 19 tumors were classified as benign, with a majority of them ($n = 10$) showing histopathologic characteristic consistent with fibroadenoma. With the exception of one animal, which had a single fibroadenoma, benign tumors developed in animals that also had one or more malignant tumors. Immunohistochemical analyses were performed with the anti-PCPH polyclonal antibody, to compare the pattern of expression of the normal mammary gland (Figure 3A) with samples of pathologic states, including hyperplastic glands and benign and malignant tumors.

In addition, these analyses included samples of morphologically normal mammary glands dissected from the same DMBA-treated animals from which benign or malignant tumors or both also had been isolated. There were no obvious differences in either the pattern or the intensity of anti-PCPH staining between these samples and truly normal glands from animals that were not exposed to DMBA. The anti-PCPH staining pattern and intensity observed in hyperplastic glands (Figure 3D and E) were very similar to those seen in mammary glands of normal, virgin animals (Figure 3A), with nuclei containing most of the immunoreactivity. On the contrary, immunohistochemical labeling for PCPH was dramatically reduced to undetectable levels in benign tumors (Figure 3F) and malignant adenocarcinomas (Figure 3G-I).

Expression of PCPH Polypeptides in DMBA-Induced Tumors

Extracts prepared from all benign and malignant tumors were tested for PCPH expression by Western blot analysis using rabbit anti-bacterial recombinant PCPH antiserum [10]. All samples were analyzed at least two separate times. Results showed profound qualitative and quantitative changes in the tumors relative to the pattern of PCPH expression in the normal rat mammary gland (Figure 4). The most common pattern included increased expression of the 47-kDa species and a dramatic decrease, or even complete disappearance, of the 27-kDa PCPH form. This pattern was noted in both benign and malignant tumors, though it was more pronounced in the latter. Densitometric and statistical analyses of various exposures of all Western blots showed that 88.5% of the malignant tumors expressed the 47-kDa form and had close to undetectable levels of the 27-kDa polypeptide, whereas 11.5% of them expressed both forms. This proportion was different among benign tumors: 60% expressed the 47-kDa species but did not express the 27-kDa form, and the remaining two tumors (40%) expressed relatively high levels of both polypeptides.

Only one benign tumor (Figure 4, lane 1) showed levels of the 27-kDa PCPH species that were comparable to the levels in normal mammary gland (Figures 1, 2, and 4). But extracts from this tumor also showed greatly increased levels of the 47-kDa and other PCPH-related polypeptide species. In fact, this was the second most salient feature of the tumor samples: the presence of a heterogeneous assortment of PCPH-immunorelated polypeptides that showed electrophoretic mobility characteristics similar to some of the individual forms detected in normal rat tissues (Figure 1). For instance, some benign and malignant tumors (Figure 4, lanes 1, 2, 4-6, 9, 10, and 12) expressed a PCPH form of approximately 70 kDa, similar to the only PCPH species detected in normal brain (Figure 1); other benign or malignant tumors (Figure 4, lane 1) expressed PCPH forms in the range of 35-37 kDa, similar to polypeptides detected in muscle tissues (Figure 1). Most of the malignant tumors expressed additional PCPH forms not detected previously in any of the normal rat tissues included in this study, such as a polypeptide of about 60 kDa and a variety of low-molecular-mass species.

DISCUSSION

As with the situation in mouse and human tissues [8,18], there are two major PCPH polypeptide forms expressed in most normal rat tissues: the 47-kDa and 27-kDa forms. The 47-kDa species matches the size of the translation products deduced from the open reading frames of the mouse and human cDNAs

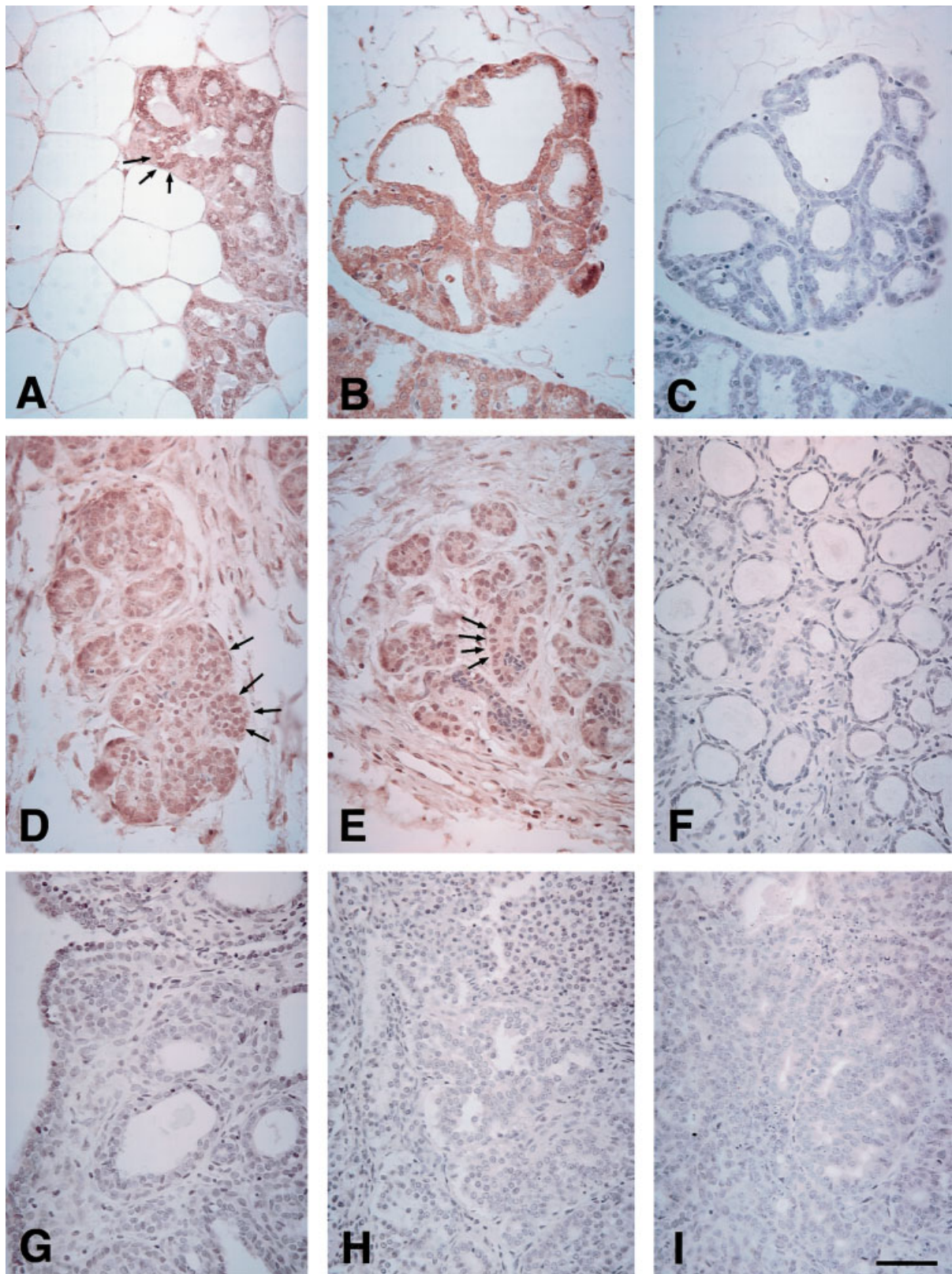


Figure 3. Immunohistochemical staining for PCPH in paraffin sections obtained from rat mammary tissue at different physiopathologic stages. (A) Normal mammary glands from virgin animals showed PCPH immunoreactivity in the ducts and secretory units with a predominant nuclear pattern (arrows). (B) In the lactating glands the staining was more intense than in their inactive counterparts, and the stronger expression was found in the cytoplasm of the secretory

cells. (C) Substitution of the primary antibody by pre-immune serum in serial sections resulted in a lack of staining. (D and E) In glands showing hyperplastic features, the staining pattern and intensity were very similar to those found in normal animals, with most of the immunoreactivity localizing in the cell nuclei (arrows). Immunohistochemical labeling for PCPH in benign tumors (F) and malignant adenocarcinomas (G-I) resulted in a complete lack of staining. Bar = 50 μ m.

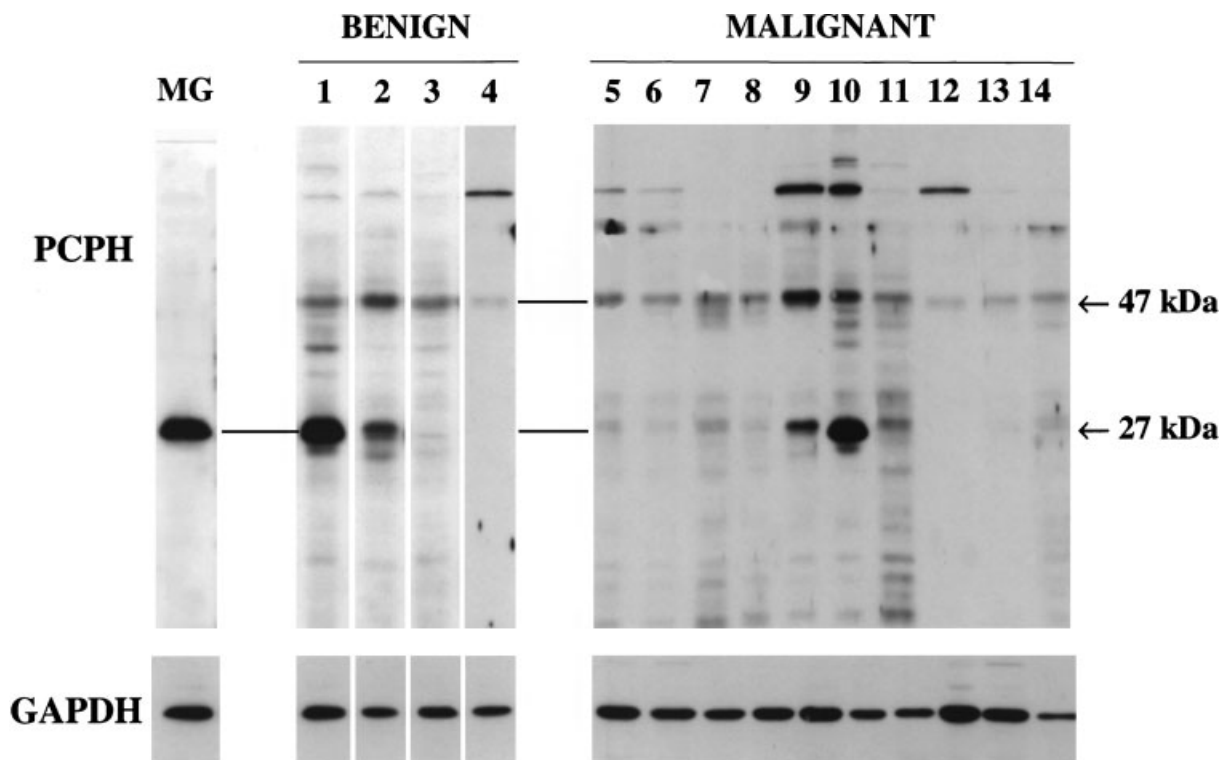


Figure 4. Representative Western blots for the analysis of PCPH expression in benign (lanes 1–4) and malignant (lanes 5–14) tumors induced by DMBA treatment in Sprague-Dawley rats. The pattern of PCPH expression in the normal mammary gland (MG) is shown in the left panel. The migration of relevant PCPH polypeptide species is indicated by arrows on the right. After stripping, immunoreactivity with an anti-GAPDH antibody was used as loading control (bottom panels).

[8,18]. Therefore, given the high level of conservation of the *PCPH* gene [1,8], it seems highly likely that it also is the translation product of the main open reading frame of the rat gene. The translation origin and structure of the 27-kDa polypeptide remain to be elucidated. Our finding that the 27-kDa form is the most abundant product in the normal rat mammary gland (Figure 1), however, agrees with our previous observation that this form was the only PCPH polypeptide detectable in normal epithelial cells isolated from various human organs, including breast epithelial cells [10]. This result is also consistent with the fact that the same 27-kDa form is the main *PCPH* product detected in skin, because skin and mammary gland have the same embryonal origin [19,20].

PCPH is a single-copy gene in mammals [1,8,18]. Consequently, the expression of distinct major PCPH polypeptides in different tissues (Figure 1) strongly suggests that there may be very precise mechanisms to regulate PCPH expression in a tissue-specific manner. Furthermore, from a quantitative point of view, the output of the PCPH regulatory machinery seems to be influenced by the differentiation status of the tissue. This was clearly the case

with the lactating mammary glands (Figure 2), which showed a marked increase in the expression level of the 27-kDa PCPH species preferentially localized in the cytoplasm of secretory cells (Figure 3), without a concomitant qualitative alteration. PCPH expression probably is controlled at the level of RNA processing. Our previous studies [3,5,8,18] showed that during mammalian evolution there is a qualitative increase in complexity in *PCPH* RNA expression: human cells express a greater number of *PCPH* mRNAs than do cells from other species. In addition, we have isolated and characterized *PCPH* cDNA clones derived from alternatively spliced mRNAs [10] (unpublished observations). Therefore, it is possible that the various PCPH polypeptide forms result from the translation of individual spliced mRNAs that accumulate preferentially in the cells in a tissue-specific manner. The possibility that the various PCPH polypeptides arise by protein processing or post-translational modification or both cannot be ruled out at this point.

In agreement with the findings of previous studies from our own and other laboratories [12,13,21–23], a single dose of DMBA resulted in the generation of

mainly malignant mammary tumors in the rats and a significantly smaller number of benign tumors. Benign and malignant tumors showed very well defined morphologic features, and there was little variation among individual tumors within each category. This morphologic homogeneity contrasted with the heterogeneous pattern of expression of PCPH in the tumor samples (Figure 4). Relative to the simple pattern of PCPH expression in the normal mammary gland (Figures 1 and 4), tumors showed remarkable quantitative or qualitative differences or both. The alterations of PCPH expression seen by Western analysis of total extracts of tumors showed a general pattern that was characterized by two main features. First, there was an increase in qualitative complexity, reflected in the expression of multiple PCPH polypeptide forms, and, second, the 47-kDa polypeptide was present in most tumors (88.5%), accompanied by the downregulation, or even the complete loss, of the 27-kDa form characteristic of the normal mammary gland. This pattern is similar to that noted in the analysis of PCPH expression in human breast tumor cell lines [10], suggesting the existence in rat and human mammary cells of a common mechanism of deregulation of the system(s) that control the tissue-specific expression of PCPH.

The fact that the altered pattern of PCPH expression can be detected in benign tumors suggests that PCPH deregulation is an early event in neoplastic processes of the mammary gland, common to the development of benign and malignant tumors. The lack of immunohistochemical staining of benign and malignant tumor samples (Figure 3F-I) may be explained by the lower sensitivity of this technique relative to Western immunodetection. It also correlates with the predominant loss in the tumors of the 27-kDa PCPH polypeptide, which we recently mapped (data not shown) as encompassing the entire epitope recognized by the anti-PCPH antibody.

Our results showed that the experimental system we used is relevant to human breast carcinogenesis and provides an excellent model system to study the molecular basis of the regulation of PCPH expression during normal differentiation and pathologic stages of neoplasia of the mammary gland and to analyze the role of PCPH in the tumorigenic process. Furthermore, the detection of atypical PCPH polypeptide in benign tumors suggests that PCPH immunodetection can be applied for the early identification of neoplastic cells in the mammary gland.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Desarrollo y Consolidación de Redes Temáticas, Generalitat de Catalunya (1998-XT-62, 2000XT-50); the Comisión Interministerial de Ciencia y

Tecnología (CICYT OLI96-2114); and the U.S. Public Health Service (CA64472) from the National Cancer Institute.

REFERENCES

1. Velasco JA, Zimonjic DB, Popescu NC, et al. Tissue-specific expression, evolutionary conservation and localization of the *cph* proto-oncogene on Syrian hamster chromosome X. *Oncogene* 1996;12:2713-2717.
2. Notario V, Castro R, Flessate DM, Doniger J, DiPaolo JA. Frequent activation of non-*ras* transforming sequences in neoplastic Syrian hamster cells initiated with chemical carcinogens. *Oncogene* 1990;5:1425-1430.
3. Velasco JA, Castro R, Avila MA, et al. *Cph*, a novel oncogene which cooperates with H-*ras* in the transformation of NIH/3T3 fibroblasts. *Oncogene* 1994;9:2065-2069.
4. Recio JA, Páez JG, Maskeri B, et al. Both normal and transforming PCPH proteins have guanosine diphosphatase activity but only the oncoprotein cooperates with *ras* in activating extracellular signal-regulated kinase ERK1. *Cancer Res* 2000;60:1720-1728.
5. Velasco J, Avila MA, Notario V. The product of the *cph* oncogene is a truncated, nucleotide binding protein that enhances survival to stress. *Oncogene* 1999;18:689-701.
6. Handa M, Guidotti G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun* 1996;218:916-923.
7. Yang F, Hicks-Berger CA, Smith TM, Kirley TL. Site directed mutagenesis of human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3: The importance of residues in the apyrase conserved regions. *Biochemistry* 2001;40:3943-3950.
8. Recio JA, Zambrano N, de la Peña L, et al. The human *PCPH* proto-oncogene: cDNA identification, primary structure, chromosomal mapping, and expression in normal and tumor cells. *Mol Carcinog* 2000;27:229-236.
9. Rouzaut A, Notario V. Alternative promoter usage and mRNA splicing in the regulation of the expression of the *PCPH* gene. Abstract. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2001;42:492.
10. Rouzaut A, Recio JA, Notario V. Expression of the protein product of the *PCPH* proto-oncogene in human tumor cell lines. *Radiat Res* 2001;155:181-187.
11. Huggins C, Morii S, Grand LC. Mammary cancer induced by a single dose of polynuclear hydrocarbons: routes of administration. *Ann Surg* 1961;154(suppl):315-318.
12. Etschich E. Mammary cancer model induced by dimethylbenz(a)anthracene: A good experimental tool for the study of tumor markers. *Int J Biol Markers* 1987;2:109-119.
13. Etschich E. Validity of DMBA-induced mammary cancer model for the study of human breast cancer. *Int J Biol Markers* 1987;2:197-206.
14. Etschich E, Solanas M, Segura R. Experimental diets for the study of the lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats. I. Diet definition. *Int J In Vivo Res* 1994;8:1099-1106.
15. Etschich E, Solanas M, Ruiz de Villa MC, et al. Experimental diets for the study of the lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats. II. Suitability of the diets. *Int J In Vivo Res* 1994;8:1107-1112.
16. Young S, Hallows RC. Tumours of the mammary gland. In: Turosov DE, editor. *Pathology of tumours in laboratory animals*, vol. 1, Lyon: IARC; 1973. p 31-74.
17. Mann HB, Whitney DR. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Statist* 1947;18:50-60.
18. Recio JA, Zambrano N, de la Peña L, et al. cDNA isolation, expression and chromosomal localization of the mouse *Pcph* proto-oncogene. *Mol Carcinog* 1999;26:130-136.

19. Beller F. Development and anatomy of the breast. In: Mitchell GW, Bassett LW, editors. *The female breast and its disorders*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1990. p 1–12.
20. Masso-Welch PA, Darcy KM, Stangle-Castor MC, Ip MM. A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J Mammary Gland Biol Neoplas* 2000;5:165–185.
21. Russo J, Russo IH. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res Treat* 1996;39:7–20.
22. Heffelfinger SC, Gear RB, Taylor K, et al. DMBA-induced mammary pathologies are antigenic in vivo and in vitro. *Lab Invest* 2000;80:485–492.
23. Mehta RG. Experimental basis for the prevention of breast cancer. *Eur J Cancer* 2000;36:1275–1282.

RESULTADOS

Antecedentes, resumen de los resultados y datos adicionales:

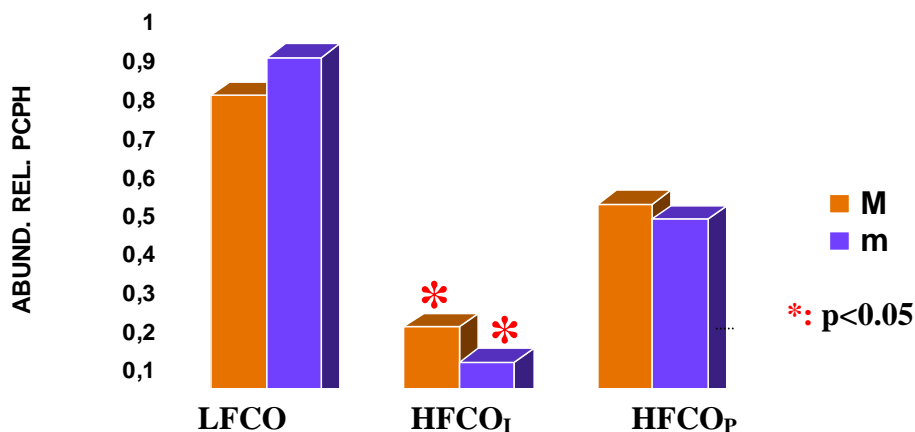
Este trabajo tiene como objetivo analizar la expresión del protooncogén *PCPH* en el modelo experimental de cáncer de mama inducido por DMBA en la rata. Las características, función y expresión de este gen han sido estudiadas, en gran parte, por el equipo del Dr. V. Notario, coautor del presente artículo. El gen *PCPH* codifica una proteína con actividad nucleótido fosfohidrolasa y, activado, presenta capacidad tumorigénica, actuando en sinergia con el oncogen *Ha-ras*, tal como se detalla en la publicación. Estudios previos han analizado la expresión de *PCPH* “in vitro”, en tejidos humanos normales y tumorales, y, en este sentido, se ha sugerido la existencia de cambios en el procesamiento del transcripto y/o de la proteína PCPH en células epiteliales tumorales mamarias. El estudio que configura el presente artículo pretende, en concreto, analizar estos procesos en un sistema “in vivo” de la carcinogénesis mamaria. Para ello, se exploró el patrón normal de expresión de PCPH en diversos tejidos de la rata, incluyendo la glándula mamaria lactante, y en los tumores mamarios benignos y malignos desarrollados en ratas Sprague-Dawley tras tratamiento con DMBA. En el apartado de “Material y Métodos” del artículo 4 se especifica la metodología de inducción, extracción y preparación tumoral, así como las técnicas utilizadas, de inmunohistoquímica y análisis por “Western blot”, para la determinación de la proteína. El diagnóstico histológico de las lesiones y tumores mamarios desarrollados se realizó de acuerdo a los criterios definidos en el Artículo 1 de esta Tesis Doctoral.

Los mayores niveles de expresión de PCPH se detectaron en hígado y riñón, donde se halló un polipéptido predominante de 47 kDa y uno minoritario de 27 kDa, presentes también en estómago. Otros tejidos mostraron mayor heterogeneidad de expresión, con algunas formas tejido-específicas, como en corazón y músculo esquelético; en otros, como el cerebro, se observó un único polipéptido de 70 kDa; y otros, como bazo, timo, tiroides y pulmón, no revelaron presencia de la proteína. Extractos de piel, glándula mamaria y tejido adiposo contenían, casi exclusivamente, la proteína de 27 kDa. Estos resultados se plasman en la Figura 1 del artículo. En cuanto a la glándula mamaria de ratas lactantes, los niveles de PCPH aumentaron hasta 14 veces más, respecto a la de las vírgenes ($P < 0,05$) (Figura 2 del artículo), con variación del patrón inmunohistoquímico. Así, en las mamas inactivas, se observó una tinción predominantemente nuclear en las células ductales y secretoras, mientras que en las glándulas lactantes, la tinción era citoplasmática y más intensa en las células secretoras (Figura 3A y B del artículo). Se estudió la expresión de PCPH en un total de 54 tumores mamarios, 35 de ellos malignos (adenocarcinomas). El estudio inmunohistoquímico se

realizó, además, en glándula mamaria no tumoral de estos animales. Se observó que el patrón y la intensidad de la tinción en el tejido no tumoral o con cambios de hiperplasia eran muy similares a los descritos en las mamas de los animales vírgenes normales (Figura 3D y E del artículo), mientras que disminuía claramente hasta niveles indetectables en los tumores benignos (Figura 3F del artículo) y malignos (Figura 3G-I del artículo). Finalmente, el estudio de expresión de la proteína por “Western blot” en los tumores mamarios mostró cambios cuantitativos y cualitativos evidentes respecto a los recogidos en glándula mamaria normal (Figura 4 del artículo). El patrón más común fue un aumento de la expresión de la forma 47 kDa asociado a una disminución, e incluso desaparición, de la forma 27 kDa, en los tumores benignos (60%) y malignos (88,5%). También se observó expresión de otras formas de PCHP, algunas de las tejido-específicas, como la forma 70 kDa -característica del cerebro- y 35-37 kDa -detectada en tejidos musculares- y otras adicionales no detectadas previamente, como un polipéptido de 60 kDa y una variedad de especies de bajo peso molecular.

Estudios posteriores realizados por el grupo investigador, y que se añaden a estos resultados, han demostrado una infrarregulación del gen *PCPH* por efecto de una dieta rica en n-6 PUFA (comunicación personal). En la Figura A48 (A: adicional al artículo) se muestran los resultados obtenidos del análisis de la expresión de ARNm de *PCPH*, por “Northern blot”, en los carcinomas de mama de la serie experimental A, descrita en el Artículo 2 de la Tesis Doctoral. En esta gráfica se objetiva una disminución de la expresión del transcrito de *PCPH* en los tumores de los grupos de animales alimentados con una dieta rica en aceite de maíz, en relación con el grupo control, que es significativa cuando se analiza el efecto de estas grasas durante la iniciación de la carcinogénesis mamaria.

Figura A48: Expresión del ARNm de *PCPH* en los tumores mamarios por efecto de una dieta rica en n-6 PUFA



M: media; m: mediana

LFCO: grupo control normolipídico; HFCO_I: grupo de dieta hiperlipídica rica en aceite de maíz, iniciación; HFCO_P: grupo de dieta hiperlipídica rica en aceite de maíz, promoción

5. ARTÍCULO 5

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.

M. Solanas, A. Hurtado, **I. Costa**, R. Moral, J.A. Menéndez, R. Colomer, E. Escrich

International Journal of Oncology 2002; 21:745-753

RESULTADOS

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

MONTSERRAT SOLANAS¹, ANTONI HURTADO¹, IRMGARD COSTA^{1,2}, RAQUEL MORAL¹, JAVIER ABEL MENÉNDEZ³, RAMON COLOMER³ and EDUARD ESCRICH¹

¹Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Medical Physiology Unit, Medical School, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra; ²Department of Pathology, Hospital General de Granollers, 08400 Granollers, Barcelona; ³Department of Medical Oncology, Hospital Universitario 12 de Octubre, 28041 Madrid, Spain

Received April 22, 2002; Accepted June 18, 2002

Abstract. Effects of a high virgin olive oil diet on the promotion stage of dimethylbenz(α)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats were investigated in comparison with those of a high corn oil diet. Animals were randomly placed into 4 groups: control, fed a normolipidic control diet (3% corn oil); M, fed a high corn oil diet (20%); O, fed a high olive oil diet (3% corn oil plus 17% olive oil); and MO, fed the high olive oil diet after 33 days of high corn oil diet. Whereas the high corn oil diet clearly stimulated the mammary carcinogenesis, reducing the latency time and increasing the tumor incidence, multiplicity and volume, the high olive oil diet led to a lower tumor incidence than in the former group, a latency time similar to that of the control and lower tumor multiplicity and volume even than in the control group. Moreover, the histopathological features of the adenocarcinomas in olive oil groups were compatible with a greater degree of differentiation. These data suggest that the high virgin olive oil diet would have acted as a negative modulator of the experimental mammary carcinogenesis conferring to the tumors a more benign clinical behavior and a lower histopathological malignancy in comparison with the control and high corn oil diets.

Introduction

Cancer of the breast is the most common cancer in women worldwide. The highest incidence rates are in the developed world, North America, Northern Europe and Australia, and the lowest are reported in Africa and Asia (1). These differential incidence rates of breast cancer suggest that lifestyle and

environmental factors may be associated with the development of this cancer. Dietary fat is thought to be one of the main risk factors for breast cancer on the basis of positive correlation found in international ecological studies. However, case-control and cohort studies have generated conflicting results, probably due to methodological issues, and taken together they do not support a strong association (2,3). The link between dietary fat and the development of breast cancer has also been clearly established experimentally (4-6). The type and amount of fat appear to be important determinants of this relationship. Thus, the high dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), primarily linoleic acid (18:2n-6), has a strong tumor-enhancing effect, which is made at levels under 4% of total calories. However, other n-6 PUFAs, as conjugated linoleic acid and γ -linolenic acid (18:3n-6) seem to have inhibitory effects. Increased quantities of saturated fatty acids also enhance the tumorigenesis but more weakly than n-6 PUFAs. In contrast, high levels of very long chain n-3 PUFAs in the diet inhibit the tumor growth, and monounsaturated fats seem to be also protective although the studies have produced inconsistent results (7-11). From animal studies it has also been shown that the effects of dietary lipids can be exerted on various stages in the tumorigenic process, but mainly on the promotion (12-14). Finally, they also support the hypothesis that there is a specific effect of dietary fat, as well as a general effect of caloric intake (4,15). All these actions of the dietary lipids affect not only breast cancer but also those of the colon and prostate (9).

The results of the studies with olive oil, rich in oleic acid (18:1n-9) are of particular interest. On the one hand, several epidemiological studies have shown lower incidence rates of breast cancer in Mediterranean European countries, where the product is consumed in large quantities, compared to most Western countries (16,17). On the other hand, research in experimental animals has yielded inconsistent results, having reported a non-promoting or a low-promoting effect to a protective one on breast cancer (6-8,18). Therefore, the relationship between the olive oil intake and breast cancer risk has become a controversial issue that could have very important repercussions in human health, especially among the female population (19).

Correspondence to: Dr E. Escrich, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Medical Physiology Unit, Medical School, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain
E-mail: eduard.escrich@uab.es

Key words: high olive oil diet, high corn oil diet, dietary lipids, DMBA, mammary tumors

This study was conducted to investigate the effects of the high fat olive oil feeding on the promotion stage of mammary carcinogenesis and to compare them with those of a high-fat corn oil diet and a normolipidic control one. We used one of the most useful experimental models of breast cancer, that of the DMBA-induction in female Sprague-Dawley rats, in which we have previously demonstrated the tumor-enhancing effect of the high-fat n-6 PUFA diets and investigated some molecular mechanisms (20-22). Moreover, in order to test the possible protective potential on tumor progression of olive oil on breast cancer we also analyzed the effect of the olive oil diet after the tumor promotion with a high-fat corn oil diet. All these effects have been studied from two experimental approaches: the clinical behavior of the tumors, by means of the analysis of the carcinogenesis parameters, and its morphological degree of malignancy, through the study of the tumor histopathological features. This kind of exhaustive approach should provide us with information about the effects of the different types of dietary lipids on the mammary tumor development and malignancy.

Materials and methods

Animals and experimental design. Eighty virgin female Sprague-Dawley 22-day-old rats were purchased from Iffa-Credo (Lyon, France), housed four per cage and maintained in an air-conditioned room with a 12-h light/dark cycle. Rats were given the control m3 diet (containing 3% corn oil) and water *ad libitum* until 53 days of age. At this age, rats were randomly placed into four groups of 20. The rats in group C were maintained on the m3 diet and the rats in the other three groups were fed different types of high-fat diets until the end of the study. Thus, rats in group M were given the M20 diet (containing 20% corn oil), rats in group O were given the mO20 diet (containing 3% corn oil and 17% olive oil) and rats in group MO were given the M20 diet for 5 weeks (until 86 days of age) and then the mO20 diet until the end of the experiment. On day 53 of age, all animals received a single dose of 5 mg of 7,12-dimethylbenz(α)anthracene (DMBA) (Sigma-Aldrich, Spain) diluted in corn oil, according to Huggins *et al.* (23), Tseng and Gurpide (24), and Escrich (25). Rats were inspected and weighed weekly from 23 days of age and palpated for mammary tumors from day 74. When a tumor was first palpated, the date, the location and the volume were recorded. Approximately 30 weeks after DMBA administration, the rats were sacrificed by decapitation at the diestrus phase of the estrus cycle. At necropsy, tumors and suspicious lesions were rapidly removed, measured, rinsed in normal saline and histologically examined. Only confirmed mammary adenocarcinomas were reported in the results of this study.

The care of the animals was in accordance with the institutional guidelines. These regulations follow the current legislation applicable in our country to those animals used for experimental and other scientific purposes. The organization and infrastructure of the animal facilities are set up in line with the Good Laboratory Practices.

Diets. Three experimental semisynthetic diets were designed: the m3 low-fat corn oil diet (3% wt/wt) and two high fat

Table I. Percentage of components in the experimental diets.

Diet ingredient	Experimental diets		
	m3	M20	mO20
Proteins (casein)	18.0	23.0	23.0
Carbohydrates (dextrose)	67.9	45.9	45.9
Lipids			
Corn oil	3	20	3
Virgin olive oil	-	-	17
Fiber (cellulose)	5	5	5
Salt mix	5.9	5.9	5.9
Vitamin mix	0.24	0.24	0.24

diets (20% wt/wt), the M20 corn oil diet and the mO20 olive oil diet (Table I). These two high-fat diets supplied 3% of the lipids as corn oil just like the control diet, and the remaining 17% also as corn oil in the M20 diet and as olive oil in the mO20 diet. The olive oil used was virgin and variety 'hojiblanca', which has a lower relative content of saturated fats than other varieties. The composition of the diets was based on that formulated by Carroll and Khor (12) with some modifications. Thus, in order to maintain the normal lipid metabolism, high-fat diets were supplemented with methionine (0.51% in the low-fat diet and 0.66% in the two high-fat diets), choline (1,800 mg/kg diet) and folic acid (5 mg/kg diet). The definition, preparation and suitability of these diets were previously described (26,27). The diets were prepared weekly in our laboratory and were stored in vacuum-sealed bags in the dark at 4°C. The fatty acid composition of the corn and olive oils used is shown in Table II.

Histopathological analysis. Samples of tumors and suspicious lesions were fixed in 10% buffered formalin, dehydrated and embedded in paraffin. The sections were stained with hematoxylin and eosin. The diagnosis of the mammary pathology was mainly based on the criteria of Young and Hallows (28). Moreover, in order to determine the changes induced by the dietary lipids on the tumor histopathological features, we analyzed nuclear and architectural grade, number of mitosis in 10 high power fields (HPF) and the reaction of the tumor adjoining stroma (desmoplasia) in tumors from the different experimental groups.

Statistical analysis. The weight gain data all through the study were analyzed by the methodology of Mixed-Effects Models (29). The analysis of the data from the carcinogenesis study throughout the study was performed by the Friedman's two factors non-parametric analysis of variance and that of the quantitative data at the sacrifice by the Kruskal-Wallis-test for comparing various data and the Mann-Whitney's U test for two data. The analysis of

Table II. Percentage composition of the main fatty acids of the oils employed in the experimental diets.^a

	Fatty acid						
	Palmitic 16:0	Palmitoleic 16:1n-9	Stearic 18:0	Oleic 18:1n-9	Linoleic 18:2n-6	Linolenic 18:3n-3	Arachidic 20:0
Corn oil	11.2	0.2	2.1	28.2	57.1	0.9	0.3
Olive oil	7.89	0.49	2.64	79.03	8.24	0.6	0.5

^aFatty acid composition determined by gas chromatography.

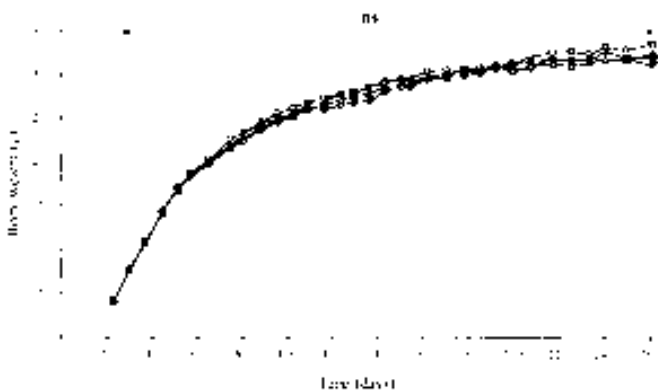


Figure 1. Animal weight gain curves of female Sprague-Dawley rats fed the experimental diets after weaning. All rats were treated with DMBA at 53 days of age. The average body weights of the animals were plotted against time. ns, the differences observed among groups were not statistically significant, as determined by the methodology of Mixed Effects Models. ♦, group C; ■, group M; ▲, group O; ×, group MO.

qualitative data was carried out by the χ^2 test (histopathological study, carcinogenesis at the sacrifice and percentage of partially regressed tumors). The degree of tumor partial regression, characterized through the weekly variation rate index, was evaluated by the analysis of variance (ANOVA). In all cases, values of $p < 0.05$ were taken as significant.

Results

Animal weight gains. Body weights of animals were similar in all groups throughout the experimental period (Fig. 1). The statistical analysis did not show any significant difference between each one of the high-fat diet groups and the control group. Moreover, the coefficients of variance of the body weight averages (27) were uniformly low, always lower than 10%, and with a constant evolution in all groups (data not shown).

Mammary pathology. Most mammary tumors developed by rats treated with DMBA were adenocarcinomas, in which differences in carcinogenesis yield, among the groups were confined. The distribution of the different types of mammary pathology is shown in Table III.

Table III. Mammary pathology in rats treated with DMBA and fed the experimental diets.

	Experimental group			
	C	M	O	MO
Malignant neoplastic pathology				
Adenocarcinoma	72	95	69	56
Benign pathology				
Neoplastic				
Adenoma	6	10	8	12
Fibroadenoma	13	14	12	3
Fibroma	1	2	1	3
Papilloma	2	-	-	1
Lipoma	-	-	1	-
Others				
Cystic				
Ductal ectasia	-	-	2	1
Non-cystic				
Lobular hyperplasia	5	15	16	16
Fibrosis	-	-	-	3

Several histopathological parameters were analyzed in 69 adenocarcinomas from group C, 91 from group M, 67 from group O and 55 from group MO (Table IV). Firstly, we assessed the nuclear and architectural grade of the mammary adenocarcinomas as an expression of their morphological differentiation. The tumors from the group M showed a tendency to greater architectural and nuclear grades compared with tumors from the group C, being the differences in the architectural grade near to the statistical significance. On the other hand, the tumors from the high olive oil diet groups were similar to those from the control, although the group MO stood out for its lower percentage of grade III tumors. The differences in the architectural grade between this group and the control were statistically significant. Moreover, the number of mitosis in 10 high power fields (HPF) was measured as a demonstration of the tumor proliferative capacity. The

Table IV. Histopathological features of DMBA-induced adenocarcinomas from rats fed the experimental diets.^a

	Experimental group			
	C (%)	M (%)	O (%)	MO (%)
Architectural grade				
I	42 (60.9)	42 (46.1)	37 (55.2)	35 (63.6)
II	15 (21.7)	36 (39.6)	17 (25.4)	18 (32.7)
III	12 (17.4)	13 (14.3)	13 (19.4)	2 (3.6)
Nuclear grade				
I	37 (53.6)	38 (41.8)	37 (55.2)	37 (67.3)
II	20 (29)	31 (34.1)	13 (19.4)	13 (23.6)
III	12 (17.4)	22 (24.2)	17 (25.4)	5 (9.1)
No. of mitosis (x10 HPF)				
≤3	49 (71)	43 (47.2)	36 (53.7)	39 (71)
4-6	9 (13)	22 (24.2)	11 (16.4)	8 (14.5)
7-9	2 (2.9)	13 (14.3)	10 (14.9)	4 (7.3)
10-<20	7 (10.1)	12 (13.1)	7 (10.5)	4 (7.3)
≥20	2 (2.9)	1 (1.1)	3 (4.5)	0 (0)
Stromal reaction				
-	20 (29)	27 (29.7)	21 (31.3)	28 (51)
+	36 (52.2)	48 (52.7)	32 (47.8)	21 (38.2)
++	8 (11.6)	9 (9.9)	12 (17.9)	4 (7.3)
+++	5 (7.2)	7 (7.7)	2 (3)	2 (3.6)

^aThe statistical significance of the differences observed among groups is indicated in the text.

adenocarcinomas from the group M exhibited a higher number of mitosis than those from the other groups, being the differences in relation to the control group statistically significant. As for the tumors from olive oil groups, the values were not significantly different to those from the control, although in the group O they were somewhat higher. Finally, we analyzed the reaction of the tumor adjoining stroma (desmoplasia) as an expression of the tumor invasive capacity. No (-) or minimal (+) stromal reaction was observed in most cases although we found a greater number of adenocarcinomas with unequivocal (+++) images of desmoplasia in the groups C and M than in the groups O or MO. However, none of the differences observed was statistically significant. A histological image of a representative mammary adenocarcinoma of each experimental group is shown in Fig. 2.

Parameters of the carcinogenesis

Latency. The period of time from carcinogen administration to the palpable detection of the malignant tumor (latency time) was analyzed by means of the average time to first tumor

development. In the different experimental groups it was the following (mean ± standard deviation -days-): group C, 102.5±42.3 (n=14); group M, 77.3±32.1 (n=18); group O, 102.3±47.4 (n=16); group MO, 78±34.3 (n=16). The medians were 103, 73, 109 and 69.5 respectively. Therefore, latency time recorded for groups M and MO was shorter (almost significantly, 0.1<p<0.05) than that recorded for control group, whereas rats from group O, fed the mO20 diet throughout the study, did not practically differ from controls. The same results were obtained by analyzing the latency by means of the time-to-first-tumor for each experimental group and the distribution in the time of the first tumor for each one of the animals in every group (data not shown).

Tumor incidence. The percentage of animals bearing at least one malignant mammary tumor (tumor incidence), like the following parameters of carcinogenesis, was analyzed as a function of the time and at the end of the study (sacrifice). Tumor incidence significantly increased in the order C<O<MO<M throughout the study. Around the day 140 after DMBA-administration, this parameter became stable in groups M and MO. Groups C and O also stabilized, but later (Fig. 3a). It must be emphasized that this was the only parameter of the carcinogenesis in which group O was over the control group. At sacrifice the differences were of the same order but not statistically significant (Table V).

Tumor multiplicity. The cumulative total number of malignant mammary tumors in each dietary group (tumor multiplicity) also increased throughout the experiment. The curve evolution in each of them was very similar except that of the group MO which tended to become almost stable approximately from day 150 (Fig. 3b). The tumor multiplicity was significantly higher (p<0.0001) in the group M whose animals were fed the M20 diet throughout the study, than in the other groups. On the other hand, the tumor multiplicity in group O was in general the lowest, even lower than that of the control group (p<0.0001). As for group MO, at the beginning its values were quite similar to those of group M, and then showed tendency similar to those of group O. At the end point of the study, any difference was not statistically significant (Table V).

Tumor volume. The analysis of the tumor growth was carried out through the total volume of all malignant tumors in each experimental group (total tumor volume) and the average tumor volume (total tumor volume/number of malignant tumors), both throughout the study and at the end. In the time study, the tumor volume (c.c.) was measured using the function $V = 4/3\pi(D1/2)(D2/2)^2$, where D1 and D2 are the major diameters of the tumor measured with the caliper and D1>D2. At the sacrifice, the function was $V = 4/3\pi(D1/2)(D2/2)(D3/2)$, being D1>D2>D3.

The total tumor volume increased in all groups throughout the experiment, especially at the last third of the study except in the two groups fed olive oil diet whose increase in this period was lower (Fig. 3c). The total volume in the group of rats fed the corn oil diet was significantly higher than that found in control group, whereas in the group of rats always fed the olive oil diet it was significantly lower (p<0.0001).

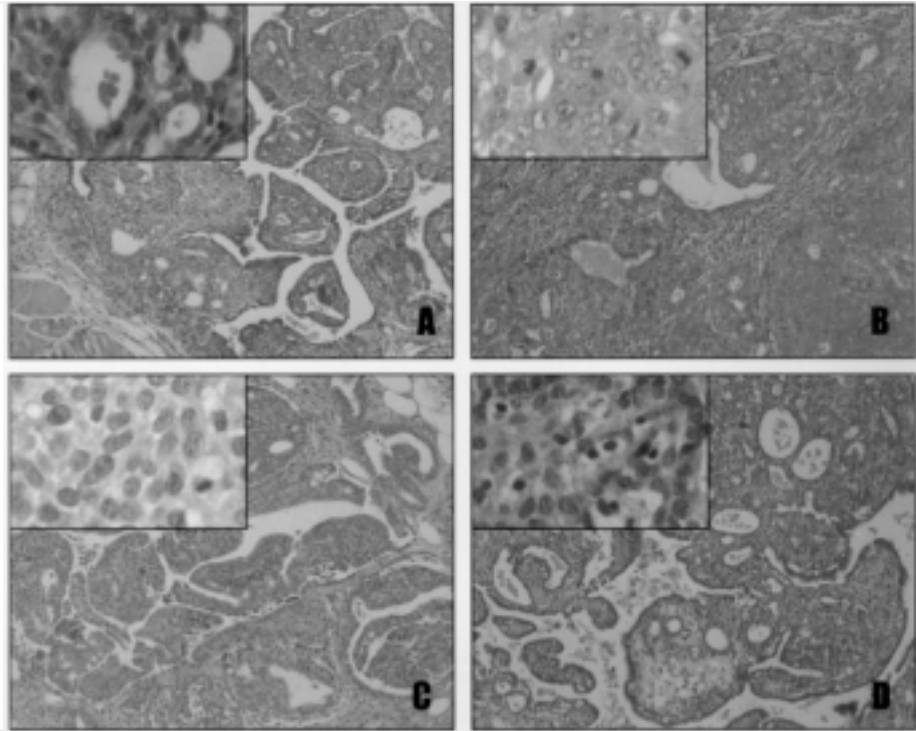


Figure 2. Histopathological features of DMBA-induced mammary adenocarcinomas of female Sprague-Dawley rats fed corn and/or olive oil diets. Adenocarcinomas from control group (A) displayed a low architectural grade. At higher magnification, as shown in the left upper corner picture, they exhibited slight nuclear atypia and most of the fields did not present mitotic figures. On the other hand, rats from group M (B) developed adenocarcinomas with a higher degree of morphological malignancy. Adenocarcinomas in the group O (C) were structurally similar to those from control group, although some of the formers displayed a more prevailing papillary pattern. Adenocarcinomas from group MO (D) retained the histological pattern of control group tumors. Hematoxylin and eosin, low power pictures at x100 magnification, high power pictures at x400 magnification.

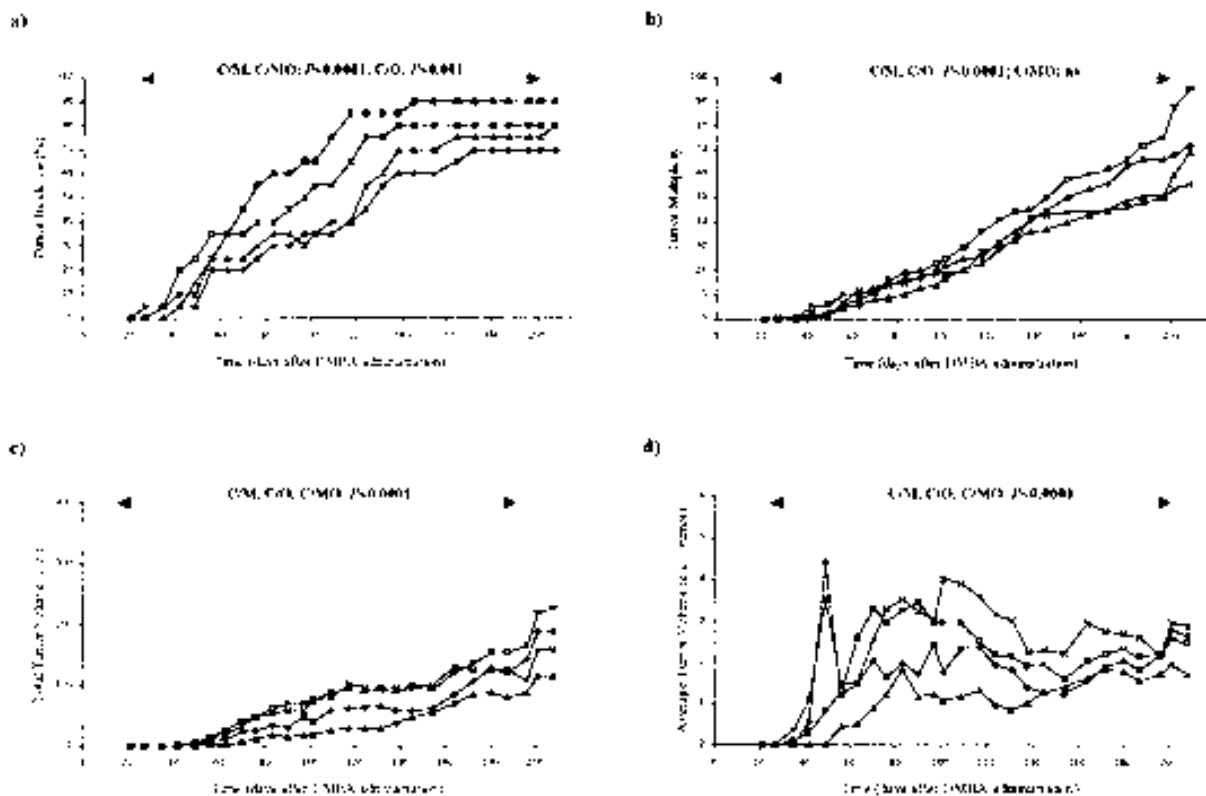


Figure 3. Effects of dietary corn and olive oils on carcinogenesis parameters of the DMBA-induced mammary adenocarcinomas of female Sprague-Dawley rats. (a), Percentage incidence of rats with palpable mammary tumors (tumor incidence). (b), Cumulative total number of palpable mammary tumors (tumor multiplicity). (c), Total volume of palpable mammary tumors. (d), Average volume per tumor. The statistical significance of the observed differences among groups throughout the study, as determined by the Friedman's two factors test, is indicated in each graphic. P, statistical significance level. \blacklozenge , group C; \blacksquare , group M; \blacktriangle , group O; \blacktimes , group MO.

Table V. Effect of dietary corn and olive oils on tumor incidence, multiplicity and volume of the malignant mammary pathology.^a

Group	Tumor incidence (%)	Tumor multiplicity (total no. of tumors)	Tumor volume (c.c.)	
			Total	Average per tumor
C	70 (14/20)	72	116	M ± SD n 1.6±3.4 72
M	90 (18/20)	95	145.5	M ± SD n 1.6±4.3 92
O	80 (16/20)	69	56.2	M ± SD n 0.8±2.4 68
MO	80 (16/20)	56	91.0	M ± SD n 1.7±4.1 55

^aTumor data at the end of the study (sacrifice). See the text for statistically significant differences at this point. m, median; M, mean; SD, standard deviation; n, sample size.

Table VI. Effect of dietary corn and olive oils on the partial regression of the malignant mammary tumors.^a

Group	Total no. of tumors	Partially regressed tumors (%)	Weekly variation rate (WVR %)
C	72	5 (6.9)	8.1
M	95	2 (2.1)	7.3
O	69	5 (7.2)	10.2
MO	56	4 (7.1)	6.8

^aThe statistical significance of the differences observed among groups is indicated in the text.

In relation to the average volume per tumor, in general it increased in the first third of the study in all groups, it decreased in the second third, and finally it increased again until the end (Fig. 3d). This type of curve evolution can be perfectly explained taking into account the nature of this parameter (ratio total tumor volume/tumor multiplicity). The average tumor volume was significantly higher in group M than in control group whereas in group O tumors displayed the lowest volumes, significantly lower than those of the control (p<0.0001). The mean volume per tumor in group MO was significantly higher than in the other groups (p<0.0001), even group M (p<0.001). At sacrifice, the differences between groups C and O were the only statistically significant (p<0.05) (Table V).

Tumor regression. In order to investigate the possible protector or inhibitory effect of the high olive oil diet in comparison with the high corn oil and control diets on the mammary carcinogenesis, we also studied the tumor regression. It was analyzed from the weekly-recorded tumor volume data. The criterion for the partial regression was a negative median of volume differences among consecutive palpations. The degree of tumor partial regression was quantified by means of the weekly variation rate index (WVR), defined as the percentage of the reduction of the tumor volume each week. It was expressed through the function $WVR = (V_{max} - V_{sacrifice}) / V_{max} \times t$, where V_{max} is the maximum tumor volume, $V_{sacrifice}$ is the tumor volume at the end of the study and t is the time spent in producing the decrease in the tumor volume.

The results showed that in all cases where tumor regression was detected, it was partial since no tumor underwent a complete remission. There was a certain number of partially regressed tumors in all experimental groups (Table VI). The percentage of these regressed tumors was lower in group M (2.1%) than in the control (6.9%), whereas in groups O and MO it was very similar (7.2 and 7.1%, respectively) and also similar to the control value. However, these differences were not statistically significant. As for the degree of tumor partial regression, it was 8.1% in group C, 7.3% in group M, 10.2% in group O and 6.8% in group MO. The differences were not statistically significant.

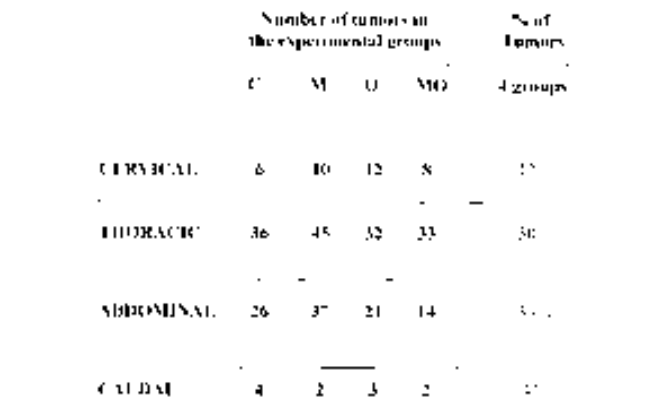


Figure 4. Location of the DMBA-induced mammary adenocarcinomas of female Sprague-Dawley rats fed high corn and/or olive oil diets. The total number of tumors distributed in the various mammary gland regions of the rat for each experimental group is indicated. The percentage of tumors taken as a whole, irrespective of the experimental group, in each region is also indicated. This percentage was significantly different (p<0.05) as determined by the χ^2 test.

Group MO behaved like group M except in the last third of the study when its values decreased until becoming lower than the control values but higher than those of group O that displayed always the lowest volumes. The differences found in this group with regard to the control were also statistically significant (p<0.0001). At sacrifice, none of the differences was statistically significant (Table V).

Tumor location. The different distribution of the mammary adenocarcinomas, irrespective of the experimental group, in the distinct gland regions (Fig. 4) was statistically significant. The tumors were mainly located in thoracic and abdominal glands. This pattern of distribution did not change as a consequence of the dietary treatment.

Discussion

The effects of the dietary olive oil on breast cancer have been given attention by many research groups for a long time because of the epidemiological evidence that clearly indicates lower rates of breast cancer in the Mediterranean countries, such as Spain, Greece or Italy, where olive oil is the principal source of fat, compared with other developed countries (17,30-33). However, results from animal model studies have been inconsistent, having reported an inhibitory effect or just a weak or null effect of olive oil on breast tumor promotion (3,6,7). A few studies have recorded tumor-promoter effects (13,34,35). In the present study we have evaluated the effect of a high virgin olive oil diet on the promotion of rat DMBA-induced mammary cancer from two distinct approaches, the tumor clinical behavior and histopathological features.

Firstly, the comparable and homogeneous growth of the animals irrespective of the experimental group indicates similar overall energy intake and utilization among the various dietary groups. This fact added to the absence in the animals of clinical and histopathological signs caused by nutritional imbalance allow us to assure the specificity of the results.

The analysis of the high-fat diet effects on the carcinogenesis showed, in the first place, that the feeding with the high-fat corn oil diet (group M) clearly stimulated the promotion of the DMBA-induced mammary tumors: they appeared earlier, there was a greater number of affected animals, the tumor mass, analyzed by means of the tumor multiplicity and volume, was higher and the average size of tumors was also larger. Secondly, the high-fat olive oil diet (group O) caused higher latency, lower incidence and tumor mass and smaller tumors than the high-fat corn oil diet. Interestingly, in this olive oil group the tumor multiplicity and volume and the average volume per tumor were lower even than those of the control group, although there were more affected animals and the tumors appeared at the same time. On the one hand, the tumor incidence, higher than in the control group and lower than in the corn oil group, suggests a weak promoting effect of the high-fat olive oil diet compared to that of the corn oil. On the other, the lower tumor multiplicity and volume even than in the control seem to indicate a negative effect of that diet on the growth of the DMBA-induced mammary tumors. This kind of dual effect of the high olive oil diet would imply that although this diet provoked a greater animal affectation than the control, probably due to an stimulatory unspecific effect of the calories, it would have led the tumors to a pattern of less malignancy or biological aggressiveness, slowing the clinical appearance of tumors and lowering the tumor mass and volume.

The present study has also provided for the analysis of the effect of the olive oil on the tumor development after a previous period with the high-fat corn oil diet (group MO). The results

obtained in this experimental group confirmed the effects previously attributed to the two high-fat diets. On the one hand, the tumor incidence was the second highest, lower than that of group M but higher than those of groups O and C. On the other, the tumor multiplicity, and to a lesser extent the total tumor volume, evolved from identical or similar values to those of group M at the beginning of the study to values close to or even lower than those of group O and so, lower than those of the control group. These results suggest firstly that the 33 days period just after the carcinogen treatment with the high corn oil diet was essential in order to determine both the latency and the number of affected animals, and secondly that the high olive oil diet was able to diminish or revert the powerful promoting effects of the high corn oil diet, slowing or avoiding the clinical appearance and the growth of the DMBA-induced mammary tumors. Definitively, the effects of the high olive oil diet suggest a negative modulating effect, which would result in a more benign behavior of the cancerous disease in comparison with the high corn oil diet and even the normolipidic diet effects.

In order to investigate whether the aforementioned negative modulating effect of the high olive oil diet could be an authentic inhibitory effect, as other authors have proposed, we also studied the tumor regression. It must be pointed out that no tumor regressed completely in any experimental group. Instead, with the criterion chosen for evaluating the partial tumor regression, a certain level of partial regression was detected in all experimental groups, what could be attributable to methodological questions and other factors such as tumor necrosis. The results showed lack of differences both in the percentage of partially regressed tumors and in the degree of regression between the high olive oil diet groups and the high corn oil diet and control groups. Therefore, the negative modulating effect proposed for the high olive oil diet would not be as potent as for regressing the mammary tumors already appeared, either totally or partially, indicating that its effect would consist rather in a slow progression than in a tumor regression. These results would also suggest that the high olive oil diets effects would not be as potent as for using these diets as therapeutic agents, at least by their own. However, *in vitro* we have previously demonstrated that the oleic acid combined with some chemotherapics is capable of increasing the cytotoxicity of these agents in human breast cancer cells (36,37).

The results of the study of the tumor histopathological features support the conclusions derived from the carcinogenesis analysis, especially for the high corn oil diet group. Thus, group M was the one that displayed the least morphologically differentiated tumors and those with the highest proliferative capacity. As for the tumors from the olive oil diet groups, as a whole, their histopathological features were similar to those of tumors from the control group and, therefore, they were more morphologically differentiated than those of group M, specially some of the tumors of group MO. At first, it is surprising that some tumors of group MO displayed a greater degree of morphological differentiation than tumors of group O. In this sense, a histopathological analysis all through the experiment possibly could provide more information on this fact. Most of the adenocarcinomas from groups control and

MO (Fig. 2A and D, respectively) could correspond to the papillary carcinomas type or grade I and those from group O (Fig. 2C) to the papillary carcinomas type or grade II, previously described by Russo *et al.* (38-40). Carcinomas from group M could include the cystic variant of papillary carcinomas grade II and the cribriform carcinomas recognised by these authors. In any case, we can state that the high olive oil diet groups displayed well differentiated tumors, similar to those of the control, in contrast to the more morphologically aggressive tumors of the high corn oil diet group. Moreover, in the olive oil groups, the percentage of tumors with mixed architectural pattern and even with prevailing papillary areas was higher than in the other groups (Fig. 2). Taken into account that in human breast cancer, papillary carcinomas have been reported to have a very favorable prognosis, even in women with axillary node metastases (41), this fact would be consistent with the lower morphological aggressiveness proposed for the tumors from the olive oil groups.

Besides, the results obtained in the analysis of the desmoplasia in the group C were consistent with the low invasive capacity that characterizes the DMBA-induced mammary tumors (42). The high-fat diets did not modify this situation, suggesting in the case of group M that although the high corn oil diet stimulated the tumor growth, it did not increase the invasive capacity of the experimental mammary tumors.

The mechanisms by which the effects of olive oil diets can be performed are not well understood. Ip (8) has proposed that the null or the cancer-suppressive response of olive oil is not a function of the high 18:1 content in the oil but is due to an insufficient supply of 18:2n-6. A certain amount of this fatty acid, by virtue of its role as a precursor of eicosanoids, would be necessary for optimal promotion of mammary carcinogenesis (5). Related to this hypothesis, a competitive inhibition by oleic acid of the $\Delta 6$ -desaturase, the first step of the eicosanoid biosynthesis leading from linoleic acid to arachidonic acid, could explain, in part, that the tumors progress slower in the high olive oil diet groups. The combination of low linoleic acid (LA) and high oleic acid (OA) would act to suppress $\Delta 6$ -desaturase activity and, so, inhibit the growth and development of the experimental mammary tumors (14). The great diversity of types and varieties of commercially available olive oil, with a variable relative content of LA and OA, could account for the contradictory results published regarding its effect on carcinogenesis. In the N-methylnitrosourea (NMU)-induced mammary tumor model, it has been shown that different varieties of olive oil exerted different effects on the tumor development, being that with the lowest LA/OA ratio (80% OA, 5% LA; ratio 0.07) which exhibited the lowest level of adenocarcinomas and the highest level of the more benign adenocarcinoma arising from within a fibroadenoma (43). In the present study, virgin olive oil was used with 79.03% OA and 8.24% LA, leading to a ratio of 0.10. Moreover, it was from the variety 'hojiblanca', which has a lower content in saturated fatty acids than other varieties of olive oil, probably another key factor of the final effect of the olive oil on mammary cancer. Finally, other unique components of the olive oil must be taken into account, such as the antioxidants squalene and phenols, β -sitosterol and flavonoids, which

have been also proposed as accountable for its specific effects on breast cancer (44-49).

Definitively, the results of the present study suggest that the high virgin olive oil diet would act as a negative modulator of the mammary carcinogenesis induced by genotoxic agents, conferring to the tumors mainly an indolent clinical behavior and a histopathological pattern compatible with a lower degree of malignancy in comparison with the high-fat corn oil diets, which would clearly act as potent tumor promoter. Moreover, this effect would be able to revert the promoting effect of a high-fat corn oil diet previously administered. Although one must be cautious in extrapolating the information from experimental research to humans because of possible species differences, our results point the importance of dietetic habits, and specially fat intake, to which populations are subject to all through the life in relation to cancer development.

Acknowledgements

This study was done in the Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona, Spain). It was supported by grants of 'Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología' (CICYT OL196-2114) and 'Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya i Balears'. The authors wish to thank Grupo Hojiblanca (Málaga, Spain) for the olive oil used in this study; Drs J.A. Sánchez, J. Ocaña and M.C. Ruiz de Villa from the Department of Statistics of the Universitat de Barcelona for their support in the statistical analysis of the data; and Ms. L. Grau for her help in the preparation of the manuscript.

References

1. Word Cancer Research Foundation and American Institute for Cancer Research: Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Word Cancer Research Foundation/American Institute for Cancer Research, Washington DC, 1997.
2. Willett WC: Dietary fat and breast cancer. *Toxicol Sci* 52 (Suppl): 127-146, 1999.
3. Lee MM and Lin SS: Dietary fat and breast cancer. *Annu Rev Nutr* 20: 221-248, 2000.
4. Freedman LS, Clifford C and Messina M: Analysis of dietary fat, calories, body weight and the development of mammary tumors in rats and mice. A review. *Cancer Res* 50: 5710-5719, 1990.
5. Rose DP: Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancers: evidence from *in vitro* experiments and animal studies. *Am J Clin Nutr* 66 (Suppl): S1513-S1522, 1997.
6. Bartsch H, Nair J and Owen RW: Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 20: 2209-2218, 1999.
7. Welsch CW: Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: a review and critique. *Cancer Res* 52 (Suppl): S2040-S2048, 1992.
8. Ip C: 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 (Suppl): S1523-S1529, 1997.
9. Weisburger JH: Dietary fat and risk of chronic disease: mechanistic insights from experimental studies. *J Am Diet Assoc* 97 (Suppl): S16-S23, 1997.
10. El-Ela SH, Prasse KW, Carroll R and Bunce OR: Effects of dietary primrose oil on mammary tumorigenesis induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Lipids* 22: 1041-1044, 1987.
11. Fay MP, Freedman LS, Clifford CK and Midthune DN: Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res* 57: 3979-3988, 1997.

12. Carroll KK and Khor HT: Effect of level and type of dietary fat on incidence of mammary tumors induced in female Sprague-Dawley rats by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Lipids* 6: 415-420, 1971.
13. Cohen LA, Thompson DO, Maeura Y, *et al*: 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, 1986.
14. Wynder EL, Cohen LA, Muscat JE, *et al*: Breast cancer: weighing the evidence for a promoting role of dietary fat. *J Natl Cancer Inst* 89: 766-775, 1997.
15. Guthrie N and Carroll KK: Specific versus non-specific effects of dietary fat on carcinogenesis. *Prog Lipid Res* 38: 261-271, 1999.
16. Lipworth L, Martínez ME, Angell J, Hsieh C and Trichopoulos D: Olive oil and human cancer: an assessment of the evidence. *Prev Med* 26: 181-190, 1997.
17. Assmann G, De Backer G, Bagnara S, *et al*: International consensus statement on olive and the Mediterranean diet: implications for health in Europe. *Eur J Cancer Prev* 6: 418-421, 1997.
18. Zusman I, Gurevich P, Madar Z, *et al*: Tumor-promoting and tumor-protective effects of high-fat diets on chemically induced mammary cancer in rats. *Anticancer Res* 17: 349-356, 1997.
19. Martín-Moreno JM: The role of olive oil in lowering cancer risk: is this real gold or simply pinchbeck? *J Epidemiol Community Health* 54: 726-727, 2000.
20. Solanas M, Moral R and Escrich E: Effects of dietary (n-6) polyunsaturated lipids on experimental mammary carcinogenesis. *J Women's Cancer* 2: 67-72, 2000.
21. Escrich E, Solanas M, Soler M, *et al*: Dietary polyunsaturated n-6 lipids effects on the growth and fatty acid composition of rat mammary tumors. *J Nutr Biochem* 12: 536-549, 2001.
22. Solanas M, Moral R and Escrich E: The stimulating effect of a high-fat n-6 polyunsaturated diet on rat DMBA-induced mammary tumors is not related to changes in c-Ha-ras1 mRNA tumor expression. *Nutr Res* 21: 1261-1273, 2001.
23. Huggins C, Morii S and Grand LC: Mammary cancer induced by a single dose of polynuclear hydrocarbons: routes of administration. *Ann Surg* 154: 315-318, 1961.
24. Tseng L and Gurdip E: Effects of progestins on estradiol receptor levels in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 41: 402-404, 1975.
25. Escrich E: Mammary cancer model induced by dimethylbenz(a)anthracene: a good experimental tool for the study of tumour markers. *Int J Biol Markers* 2: 109-119, 1987.
26. Escrich E, Solanas M and Segura R: Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: I, diet definition. *In vivo* 8: 1099-1106, 1994.
27. Escrich E, Solanas M, Ruiz de Villa MC, *et al*: Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: II, suitability of the diets. *In vivo* 8: 1107-1112, 1994.
28. Young S and Hallows RC: Tumours of the mammary gland. In: *Pathology of Tumours in Laboratory Animals*. Vol. 1. Turusov V (ed). IARC Sci Publ., Lyon, pp31-74, 1973.
29. Pinheiro JC and Bates DM: Fitting linear mixed-effects models. In: *Mixed-Effects Models in S and S-Plus*. Chambers J, Eddy W, Härdle W, Sheater S and Tierney L (eds). Springer-Verlag, New York, pp133-200, 2000.
30. Martín-Moreno JM, Willett WC, Gorgojo L, *et al*: Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. *Int J Cancer* 58: 774-780, 1994.
31. Landa MC, Frago N and Tres A: Diet and risk of breast cancer in Spain. *Eur J Cancer Prev* 3: 313-320, 1994.
32. Trichopoulou A, Katsouyanni K, Stuver S, *et al*: Consumption of olive oil and specific food groups in relation to breast cancer risk in Greece. *J Natl Cancer Inst* 87: 110-116, 1995.
33. La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, *et al*: Olive oil, other dietary fats, and the risk of breast cancer (Italy). *Cancer Causes Control* 6: 545-550, 1995.
34. Dayton S, Hashimoto S and Wollman J: Effect of high-oleic and high-linoleic safflower oils on mammary tumors induced in rats by 7,12-dimethylbenz(alpha)anthracene. *J Nutr* 107: 1353-1360, 1977.
35. Kossy G, Yarden G, Ben-Hur H, *et al*: Comparative effects of dimethylbenz(a)anthracene and a 15% olive-oil diet on cellular components and expression of apoptosis-related proteins in the spleen and mammary gland tumors of rats. *Oncol Rep* 8: 435-439, 2001.
36. Menéndez JA, Barbacid MM, Montero S, *et al*: Effects of gamma-linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells. *Eur J Cancer* 37: 402-413, 2001.
37. Menéndez JA, Roperio S, Barbacid MM, *et al*: Synergistic cytotoxicity of vinorelbine with gamma-linolenic acid and oleic acid in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 72: 203-219, 2002.
38. Russo J and Russo IH: Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5: 187-200, 2000.
39. Russo J, Russo IH, van Zwieten MJ, Rogers AE and Guterson B: Classification of neoplastic and non-neoplastic lesions of the rat mammary gland. In: *Integument and Mammary Glands of Laboratory Animals*. Jones TC, Mohr U and Hunt RD (eds). Springer-Verlag, Berlin, pp275-304, 1989.
40. Russo J, Russo IH, Rogers AE, van Zwieten MJ and Guterson B: Tumors of the mammary gland. In: *Pathology of Tumors of Laboratory Animals*. Vol. 1. Turusov V and Mohr H (eds). IARC Sci Publ., Lyon, pp47-78, 1990.
41. Rosen PP and Oberman HA: Tumors of the Mammary Gland. Rosai J and Sobin LH (eds). AFIP, Washington DC, 1992.
42. Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, *et al*: Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 62: 244-278, 1990.
43. Cohen LA, Epstein M, Pittman B and Rivenson A: The influence of different varieties of olive oil on N-Methylnitrosourea(NMU)-induced mammary tumorigenesis. *Anticancer Res* 20: 2307-2312, 2000.
44. Owen RW, Mier W, Giacosa A, *et al*: Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol* 38: 647-659, 2000.
45. Newmark HL: Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6: 1101-1103, 1997.
46. Owen RW, Giacosa A, Hull WE, *et al*: The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer* 36: 1235-1247, 2000.
47. Yang CS, Landau JM, Huang MT and Newmark HL: Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* 21: 381-406, 2001.
48. Awad AB, Chen YC, Fink CS and Hennessey T: b-sitosterol inhibits HT-29 human colon cancer growth and alters membrane lipids. *Anticancer Res* 16: 2797-2804, 1996.
49. Birt DF, Hendrich S and Wang W: Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther* 90: 157-177, 2001.

RESULTADOS

Antecedentes, resumen de los resultados y datos adicionales:

En este trabajo se estudiaron los efectos clínicos de dos dietas diferentes, una rica en aceite de maíz (grupo M) y otra rica en aceite de oliva virgen extra (grupo O), en relación a una dieta normolipídica (grupo C), en la fase de promoción de la carcinogénesis mamaria experimental, a lo largo del experimento y en el momento del sacrificio de los animales, y se integraron los resultados del análisis histopatológico de los carcinomas de mama. Se incluyó, además, un cuarto grupo de dieta hiperlipídica que combina ambas grasas (grupo MO), que se administraron consecutivamente (primero la dieta rica en aceite de maíz y luego la rica en aceite de oliva, tal como se detalla en el apartado de “Material y Métodos” del artículo). Como se ha comentado en el apartado D de la “Introducción” y se discutirá en el apartado correspondiente de la “Discusión”, diversos estudios experimentales sugieren un papel promotor de los ácidos poliinsaturados (PUFA) n-6 y un papel menos evidente de los ácidos grasos monoinsaturados en cáncer de mama. En concreto, el objetivo de este trabajo fue el de ampliar los conocimientos sobre la modulación clínica del cáncer de mama y su posible correlación con el fenotipo morfológico de los tumores desarrollados, por estas grasas, en un diseño experimental propio.

Se estudiaron diversos parámetros clínicos, que se analizaron a lo largo del experimento y/o al final del estudio y cuyos resultados se esquematizan en las Tablas A8 y A9 (A: adicional al artículo). En resumen, la latencia tumoral fue mayor en el grupo control (102,5±42,3) que en el M (77,3±32,1) y el MO (78±34,3) (diferencias casi significativas), con valores similares entre C y O (102,3±47,4).

Tabla A8: Parámetros clínicos (I)

Latencia tumoral	M~MO<O~C C/M y C/MO 0,1<P<0,05
Regresión tumoral	M<C<MO<O ns

ns: no significativo

Los parámetros que se analizaron a lo largo del experimento mostraron los siguientes resultados: 1) la incidencia tumoral (porcentaje de animales portadores de al menos un tumor maligno) fue significativamente mayor en los grupos M, MO y O respecto a C, en el orden M>MO>O>C (Figura 3a del artículo); 2) la multiplicidad tumoral (número acumulativo total de carcinomas en cada grupo experimental) también fue mayor en M y menor en O, ambos de forma significativa respecto a C, a lo largo de todo el experimento, mientras que MO presentó

una curva inicial similar a M y luego una tendencia parecida a O (Figura 3b del artículo); 3) el volumen tumoral total (VTT) en el grupo alimentado con la dieta rica en aceite de maíz fue significativamente mayor que en el grupo C, mientras que el grupo O mostró los valores significativamente menores y el grupo MO se comportó al inicio del experimento como el grupo M, disminuyendo los valores al final del mismo por debajo de los del grupo control, pero por encima de los de O, con diferencias significativas con C (Figura 3c del artículo); 4) el análisis del volumen tumoral medio (VTM=VTT/multiplicidad tumoral) mostró las mismas diferencias entre los grupos experimentales que el parámetro anterior, excepto en MO que registró los valores significativamente mayores (Figura 3d del artículo).

En el momento del sacrificio, las diferencias observadas en cada parámetro fueron las mismas, pero sin significación estadística, excepto entre los grupos C y O en el análisis del VTM (Tabla V del artículo). Asimismo, se estudió la regresión tumoral, que fue parcial, ya que no se recogieron casos de remisión completa, y que se observó en todos los grupos experimentales. El porcentaje de tumores regresados fue mayor en O y MO (7,2% y 7,1% de los tumores, respectivamente) que en C (6,9%) y M (2,1%) (diferencias estadísticamente no significativas), y con grados de regresión similares (valores en el artículo).

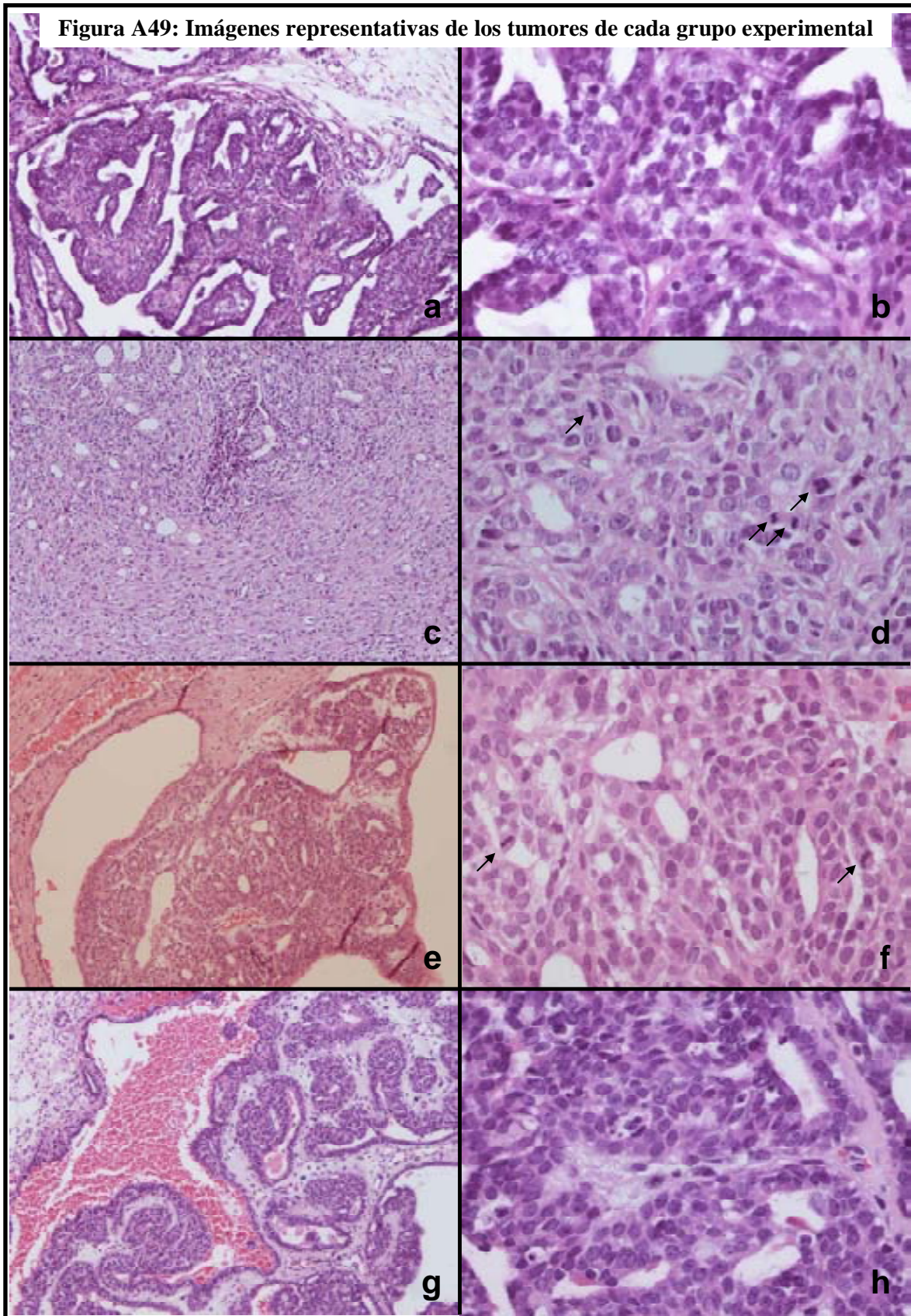
Tabla A9: Parámetros clínicos (II)

	A lo largo del experimento	En el sacrificio
Incidencia tumoral	C<O<MO<M C/M y C/MO $P<0,0001$ C/O $P<0,001$	C<O=MO<M ns
Multiplicidad tumoral	O<C<M C/M y C/O $P<0,0001$ MO 1°~M, después~O C/MO ns	MO<O<C<M ns
Volumen tumoral total	O<C<M C/M y C/O $P<0,0001$ MO 1°~M, después~O C/MO $P<0,0001$	O<MO<C<M ns
Volumen tumoral medio	O<C<M<MO C/M, C/O y C/MO $P<0,0001$ M/MO $P<0,001$	O<C~M<MO C/O $P<0,005$

ns: no significativo

Finalmente, el patrón de distribución anatómico de los carcinomas no varió a consecuencia de la dieta administrada, siendo, en los cuatro grupos experimentales, las glándulas mamarias torácicas y abdominales de las ratas las más frecuente y significativamente afectadas (Figura 4 del artículo).

Los resultados del estudio histopatológico (Tabla IV del artículo) mostraron que los adenocarcinomas del grupo M tendían a un mayor grado arquitectural y nuclear y a una mayor actividad mitótica que el resto de los grupos (diferencias casi significativas entre M y C, respecto al grado arquitectural, y significativas, respecto a las mitosis). Los tumores de los grupos que incluían la dieta rica en aceite de oliva virgen extra (O y MO) exhibieron características morfológicas similares a los del grupo C. En concreto, los tumores MO fueron los que tenían las características histológicas de mayor diferenciación y menor agresividad morfológica, con diferencias significativas en la distribución del grado arquitectural, con el grupo control. En cuanto a la reacción estromal al tumor, las diferencias entre los cuatro grupos no fueron significativas, aunque C y M mostraron mayor porcentaje de carcinomas con reacción estromal y desmoplasia que O y MO. En la Figura A49 se adjuntan imágenes adicionales representativas de los tumores cada grupo experimental (a, c, e y g H&E x100; b, d, f y h H&E x400). Las imágenes a y b representan a un carcinoma de mama del grupo C, con buena delimitación y diferenciación arquitectural (a) y leve atipia citológica y baja actividad mitótica (b). Las imágenes c y d corresponden a un carcinoma de mama del grupo M, con imágenes de desmoplasia y de poca diferenciación arquitectural (c), con núcleos pleomórficos y vesiculares y numerosas figuras de mitosis (d). Los grupos O y MO están representados en las imágenes e y f, y g y h, respectivamente, que muestran la buena delimitación y diferenciación de los tumores, con patrón papilar (e y g), la escasa atipia citológica (f y h) y la moderada actividad mitótica en O (f), que fue menor en MO (h).



6. ARTÍCULO 6

Identification of novel differentially expressed genes by the effect of a high-fat n-6 diet in experimental breast cancer.

E. Escrich, R. Moral, G. Garcia, **I. Costa**, J.A. Sánchez, M. Solanas

Molecular Carcinogenesis 2004; 40:73-78

RESULTADOS

Identification of Novel Differentially Expressed Genes by the Effect of a High-Fat n-6 Diet in Experimental Breast Cancer

Eduard Escrich,^{1*} Raquel Moral,¹ Gemma García,¹ Irmgard Costa,^{1,2} Josep Anton Sánchez,³ and Montserrat Solanas¹

¹Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Physiology Unit, Medical School, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain

²Department of Pathology, Hospital General de Granollers, Granollers, Barcelona, Spain

³Department of Statistics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

In previous studies, we demonstrated that high corn oil diets promote the development of 7,12-dimethylbenz(α)anthracene (DMBA)-induced mammary tumors. In this study, we have investigated whether modulation of gene expression is one of the mechanisms by which this high-fat diet exerts such effects. Female Sprague-Dawley rats were induced with DMBA and fed normolipidic (3% corn oil) or high-fat (20% corn oil) diet. Screening of genes differentially expressed in adenocarcinomas from the high corn oil diet group compared to the control diet group was performed with cDNA microarrays. The resulting six upregulated and nine downregulated genes were validated by Northern blot and/or reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). Further investigation in a higher number of adenocarcinomas showed that in the high-fat n-6 diet group, where the tumor phenotype was verified to be more aggressive, the expression of submaxillary gland α -2u globulin, vitamin D₃-upregulated protein 1 (VDUP1), H19, and the unknown function gene that codifies the expressed sequence tag (EST)-Rn.32385 was significantly decreased in comparison with the control group (C). These results, together with the fact that VDUP1, H19, and this globulin have been associated with cell proliferation and differentiation, open a new line of research about how the underexpression of these genes contributes to the stimulating effect of a high corn oil diet on experimental mammary carcinogenesis. © 2004 Wiley-Liss, Inc.

Key words: high-fat n-6 diet; breast cancer; DMBA; gene expression; cDNA microarrays

INTRODUCTION

Mammary cancer is a significant cause of mortality in women worldwide [1]. The geographical variation of incidence rates suggests that environmental factors, especially diet, influence breast cancer risk [2]. Animal and some epidemiological studies have shown an important role of dietary fat in the etiology of this disease [3]. The amount and the type of fat consumed seem to be the key factors in this relationship. Thus, several tumor models have provided evidence that a high intake of n-6 polyunsaturated fatty acids stimulates development of mammary cancer at several stages, especially in the promotion phase [3–5]. Although the specific mechanisms by which dietary fat modulates carcinogenesis have not been well elucidated, currently it has become increasingly clear that it may have a role in the control of gene expression [6,7]. In previous studies, with the rat 7,12-dimethylbenz(α)anthracene (DMBA)-induced mammary carcinogenesis model, in which we have analyzed the tumor-stimulating

effect of a high-fat corn oil diet (rich in n-6 polyunsaturated fatty acids) [8–10], we found no effect of this diet on the expression of *c-Ha-ras1* [8] or *neu/erbB2* oncogenes, and a slight effect on epidermal growth factor receptor (*EGFR/c-erbB1*) mRNA levels [10]. Now, to explore further the role of dietary lipids in breast cancer, we have performed a wide screening to find possible genes whose expression is modulated by dietary lipids in experimental mammary tumors.

*Correspondence to: Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Physiology Unit, Medical School, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.

Received 18 September 2003; Accepted 25 February 2004

Abbreviations: DMBA, 7,12-dimethylbenz(α)anthracene; C, control group; HCO, high corn oil group; RT-PCR, reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR); EST, expressed sequence tag; VDUP1, vitamin D₃-upregulated protein 1.

DOI 10.1002/mc.20028

To do this, we have carried out a cDNA microarrays analysis in a high-fat n-6 diet tumor related to a low-fat diet tumor, the validation of results by a second gene expression analysis technique, and finally we have analyzed the expression of the selected genes in a high number of tumor samples from both experimental groups. The identification of differentially expressed genes may provide an insight into the mechanisms by which dietary lipids may influence mammary tumor development.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Mammary Tumors

Experimental mammary tumors were obtained in a previous study from 40 female Sprague-Dawley rats induced with 5 mg DMBA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) and fed a normolipidic 3% corn oil diet (control group, C) or a high 20% corn oil diet (high corn oil group, HCO) following a promotion design [9]. Only confirmed mammary adenocarcinomas were included in this study.

cDNA Microarrays Analysis

Rat GENEFILTERS[®] I, GF300 Microarrays filters containing 5184 rat cDNA were obtained from Research Genetics (Huntsville, AL). RNA isolated by guanidinium isothiocyanate method [11] were [³³P] labeled and the membranes were hybridized following the recommendations of the manufacturer. Images of the hybridized filters were stored on Cyclone[™] Storage Phosphor System, and scanned with OptiQuant software (Packard Instrument Company, Meriden, CT). Data normalization and analysis were performed with Pathways[™] analysis software (Research Genetics). After comparison of membranes from different conditions (tumor from high-fat group vs. tumor from control group), genes with changes in expression levels of twofold or more were selected. This assay was performed in triplicate and genes with reproducible results were considered for further investigation.

Northern Blot Analysis

Chemiluminescent Northern blot analyses were performed as previously described [12]. Densitometric scanning of bands was carried out with the Gel Doc 2000 image analyzer system and the Quantity One software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Ribosomal phosphoprotein *P0* mRNA was used to normalize. Probes were obtained as cultures of *E. coli* DH10B transformed with the correspondent I.M.A.G.E. Consortium Collection insert and amplified with cDNA Primer GF-200 (Research Genetics). Sequences of some of the probes were verified by automated DNA sequencing with fluorescent labels (Applied Biosystem, Foster City, CA). Control transcript was detected with a 756-bp rat p0 cDNA (kindly provided by Dr. Y.L. Chan).

Reverse Transcription (RT)-Polymerase Chain Reaction (PCR)

Five micrograms of tumor total RNA was reverse transcribed with 0.2 μg of random hexamers (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) using the "Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads" system (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Five microliters of the obtained cDNA was amplified by specific primers pairs (Invitrogen) using the "Ready-To-Go PCR Beads" system (Amersham Biosciences). PCR amplification of sequence expressed sequence tag (EST)-Rn.32385 were: 94°C for 2 min, then 35 cycles at 94°C for 15 s, 58°C for 30 s, 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 5 min. For all other sequences, amplifications were: 95°C for 5 min, then 29–32 cycles at 94°C for 1 min, 56°C for 1 min, and 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 5 min. PCR products were visualized on ethidium bromide 2% agarose gels and images were captured with the Gel Doc 2000 system and analyzed by the Quantity One software system (Bio-Rad Laboratories). Data normalization was made with control fragment p0.

Characterization of Tumor Malignant Phenotype

In order to characterize the tumor malignant phenotype, we determined the degree of tumor morphological aggressiveness and the tumor growth. On the one hand, we applied in each carcinoma the modified Scarff-Bloom-Richardson grading method adapted to rat mammary carcinomas that we have previously described [13]. This global histopathologic grade adds together the pattern differentiation, the nuclear pleomorphism and the mitotic index and scores 3–5 points (grade I or well differentiated adenocarcinomas), 6–8 points (grade II or moderately differentiated adenocarcinomas), and 9–11 points (grade III or poorly differentiated adenocarcinomas). Tumor mitotic activity was distributed in five categories, according to the number of mitoses reported in 10 high power fields, at 400× magnification: (1) ≤3 mitosis, (2) 4–6 mitosis; (3) 7–9 mitosis; (4) 10–19 mitosis; and (5) ≥20 mitosis. On the other hand, tumor growth was characterized by means of several statistics based on the tumor volume and the tumor age. Tumor volume was measured throughout the study as $V = 4/3\pi (d_1/2) \times (d_2/2)^2$, where d_1 and d_2 were the two diameters of the tumor ($d_1 > d_2$), and at sacrifice, with the three diameters ($V = 4/3\pi (d_1/2) \times (d_2/2) \times (d_3/2)$). The statistics analyzed were: tumor volume at sacrifice, V_s ; area below the tumor growth curve, area; rate of linear growth ($V/\text{tumor age}$), V/age ; rate of constant evolution (area/tumor age), area/age; area below linear growth ($V \times \text{tumor age}/2$), $V \times \text{age}$.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with the SPSS software (version 11.5). Because data did not follow a

normal distribution and variances were heterogeneous, data were analyzed with the nonparametric Mann-Whitney's *U* test and also with a qualitative analysis based on the chi-squared test. The level of significance was established at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

As we have previously demonstrated, dietary n-6 polyunsaturated fatty acids exert a stimulating effect in DMBA-induced breast cancer. In this way, groups of animals fed a high-fat n-6 diet show lower tumor latency time, and greater tumor incidence, tumor yield, and tumor volume than control groups [8–10]. Added to this more aggressive clinical behavior, these tumors show histopathological features of a higher degree of malignancy [9,13]. To clarify the mechanisms underlying the promoting effect of n-6 dietary lipids on mammary carcinogenesis, we then searched for genes differentially expressed in tumors from animals fed control or high corn oil diet.

A cDNA microarrays analysis in one tumor from each experimental group was used to perform a screening of up- or downregulated genes in these adenocarcinomas. This analysis, carried out in triplicate, identified four sequences consistently upregulated and nine sequences downregulated. We also considered two sequences (transferrin and GTP-binding protein ral A), with changes in their expression in two of the three assays, because of their possible relationship to cancer [14–16]. Sequences of all these cDNAs were obtained from UniGene and Genbank references, and some of the codifying genes were identified in standard database searches (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Thus, the referenced "Rat GTP-binding protein (ral A)" did not correspond to oncogene ral A but to the ribosomal protein *L27a* gene, as we confirmed in later Northern blot analyses. Therefore, six upregulated genes (including one of unknown function), and nine downregulated genes (three of them of unknown function) were considered for further investigation (Table 1).

To validate the microarrays results, tumor RNAs were also analyzed by Northern blotting. In all cases, the sizes of the mRNAs detected were in accordance to those previously described. Only genes with an expression level below the sensibility of the Northern blotting technique were analyzed by means of RT-PCR. *bcl-x* expression was also determined by RT-PCR in order to differentiate its two alternative spliced transcripts. The amplified fragments had the expected size calculated from UniGene and Genbank databases.

Results of the validation are shown in Table 1, where for each gene mRNA normalized level in tumor from HCO group relative to that from C group is indicated (HCO/C). Thus, three of the six upregulated genes (*L6* antigen, transferrin, and *L27a*) and four of the nine downregulated genes (α -2u globulin, vitamin D₃-upregulated protein 1 (*VDUP1*), *H19* and

the unknown function sequence EST-Rn.32385) identified in microarrays were validated.

The expression levels of genes resulting from cDNA microarrays screening were analyzed in a higher number of mammary adenocarcinomas. Figure 1 shows representative Northern blotting (A) and RT-PCR (B). Figure 2 shows data from these expression analyses (A) and the fold \times median difference in the high-fat diet group related to median in control group (B). Results indicated significant lower mRNA levels ($P < 0.05$) of submaxillary gland α -2u globulin (mean and median twofold lower), *VDUP1* (mean 1.7-fold lower, median 1.4-fold lower), *H19* (mean and median sixfold lower), and EST-Rn.32385 (mean 1.9-fold lower, median 1.7-fold lower) in mammary tumors from animals fed the high corn oil diet. We verified that this group of tumors, with underexpression of these genes, also showed a more malignant phenotype than those from control group. Thus, they displayed a higher tumor morphological malignancy (greater degree of the Scarff-Bloom-Richardson scheme and mitotic index) and more aggressive tumor growth (higher values of the parameters related to the tumor volume) (Table 2). In the above mentioned studies previously performed, where several experimental series with a great number of tumor samples were analyzed, these differences in the malignant phenotype are statistically significant [8–10,13].

As far as we are concerned, there are no published investigations about the influence of high-fat diet on expression of these genes up to now. Submaxillary gland α -2u globulin is a member of rat α -2u globulins multigene family. Rat mammary gland express 18–20 isoforms, and their expression peaks just past midgestation and falls sharply at parturition [17]. Although to date there are no studies about this isoform in relationship to cancer, it has been described that hepatic isoform decreases in malignant transformation [18]. Related to *VDUP1*, it binds and inhibits thioredoxin, a protein involved in stimulation of cell growth and inhibition of apoptosis [19,20]. In fact, it has been proposed that one of the mechanisms by which vitamin D₃ has a cell growth inhibitory effect would be the downregulation of thioredoxin activity mediated by *VDUP1* [20]. *H19* is a gene paternally imprinted which acts as a ribo-regulator probably at specific stages of development, especially during initiation of differentiation. *H19* gene expression has been involved in both normal organogenesis and pathological events of the mammary gland [21,22]. Moreover, the inverse correlation observed between the expression of *H19* and the growth factor *igf2/IGF2* during normal murine and human development and in some human malignancies may be due to the opposite functions of these genes: induction of proliferation by *igf2/IGF2* and of differentiation/maturation by *H19* [21].

Table 1. Results Obtained in the Three Microarrays Assays and Their Validation by Northern Blotting and/or Reverse Transcription (RT)-Polymerase Chain Reaction (PCR) Analyses*

Description	UniGene cluster	GeneBank entry	Gene	HCO/C ¹	HCO/C ²	HCO/C ³	Validation (Northern blotting or RT-PCR) HCO/C
Overexpressed sequences (cDNA microarrays)							
<i>Rattus norvegicus</i> SOD gene, complete CDS	Rn.10358	AA963644	Extracellular superoxide dismutase (SOD3)	+2.4	+4.8	+5.1	1.0
EST	Rn.16943	AA859013	Unknown	+2.2	+3.8	+3.6	-2.1
ESTs	Rn.2884	AA875336	L6 antigen	+2.2	+2.8	+3.6	+5.0
ESTs	Rn.7941	AA955261	<i>bcl-x</i>	+2.1	+2.3	+3.8	1.0
<i>R. norvegicus</i> mRNA for transferrin	Rn.2514	AA858975	Transferrin	+7.5		+2.8	+5.3
Rat GTP-binding protein (<i>ralA</i>) mRNA, complete cds	Rn.2722	AA900726	Ribosomal protein L27a	+3.6		+3.1	+2.2
Underexpressed sequences (cDNA microarrays)							
<i>R. norvegicus</i> clone BB.1.4.1. unknown Glu-Pro dipeptide repeat protein mRNA, complete cds	Rn.31772	AA955087	clone BB.1.4.1.	-4.0	-2.3	-2.3	+1.2
Rat β -casein mRNA	Rn.10745	AA964718	β -casein	-6.4	-5.9	-7.0	+1.2
<i>R. norvegicus</i> submaxillary gland α -2u globulin mRNA, complete cds	Rn.33340	A1044091	Submaxillary gland α -2u globulin	-13.2	-12.3	-5.4	-34
<i>R. norvegicus</i> clone N27 mRNA	Rn.2758	AA859566	VDUP1	-2.9	-5.3	-2.4	-2.5
Rat casein- α mRNA	Rn.10744	AA997495	α -casein	-3.1	-4.0	-2.3	+1.7
EST	Rn.15197	AA901209	Unknown	-15.3	-3.7	-2.7	+1.1
ESTs	Rn.3968	AA899887	H79	-5.8	-12.5	-6.9	-65
EST	Rn.32385	AA899386	Unknown	-3.5	-2.8	-2.1	-2.3
ESTs	Rn.24860	AA923927	Unknown	-7.1	-4.4	-3.4	+1.2

*C, control diet group; HCO, high corn oil diet group; HCO/C, mRNA level in HCO tumor relative to that from C (positive values indicate that the transcript is more abundant in tumor from HCO and negative values, the opposite); RT-PCR, reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR); EST, expressed sequence tag; VDUP1, vitamin D₃-upregulated protein 1.

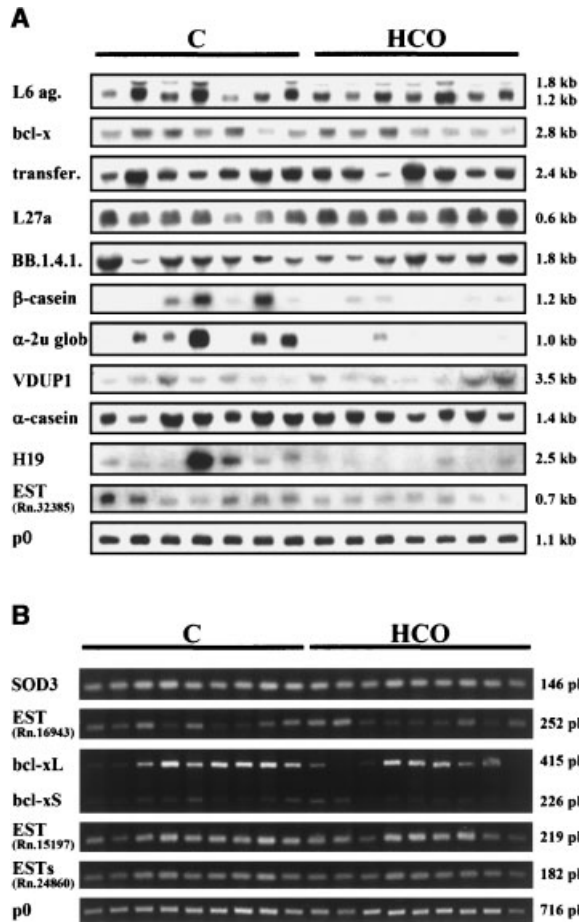


Figure 1. (A) Representative Northern blots, and (B) representative reverse transcription (RT)-polymerase chain reactions (PCRs) for cDNA microarrays selected genes in tumors from control, (C) and high corn oil diet (HCO)-groups. In each case mRNA and amplified fragments sizes are indicated on the right.

A

	C				HCO			
	n	M	SD	m	n	M	SD	m
SOD3	10	1.46	0.52	1.49	9	1.3	0.8	1.25
EST (Rn.16943)	10	0.91	0.31	0.94	9	1.75	1.01	2.54
bcl-xL	14	6.66	3.40	6.52	1	6.71	2.61	6.46
bcl-xS	20	1.48	0.63	1.79	22	1.11	0.77	0.7
VDUP1	10	1.02	0.33	1.05	9	1.52	0.95	1.9
transferin	19	0.95	0.25	1.02	9	1.22	0.78	1.9
BB.1.4.1	10	0.45	0.17	0.44	9	0.51	0.18	0.46
beta-casein	16	1.11	1.22	1.09	16	1.26	1.11	1.17
alpha-2u glob	8	2.01	0.82	1.97	8	2.25	0.91	2.09
alpha-casein	9	0.92	0.33	0.85	8	0.87	0.31	0.80
VDUP1	11	0.82	0.90	0.59	10	1.13	0.7	1.41
EST (Rn.32385)	10	2.22	2.85	1.42	22	1.94	0.73	0.76
H19	11	0.59	0.17	0.53	22	0.75	0.25	0.75
EST (Rn.15197)	19	1.01	0.72	0.90	21	1.74	0.9	2.40
ESTs (Rn.24860)	10	0.97	0.29	0.96	9	1.2	0.66	0.69
p0	12	1.47	2.37	0.24	12	0.24	0.11	0.18
EST (Rn.32385)	12	1.15	0.74	1.04	11	0.84	0.50	0.65
EST (Rn.24860)	10	0.67	0.17	0.65	9	1.04	0.41	0.95

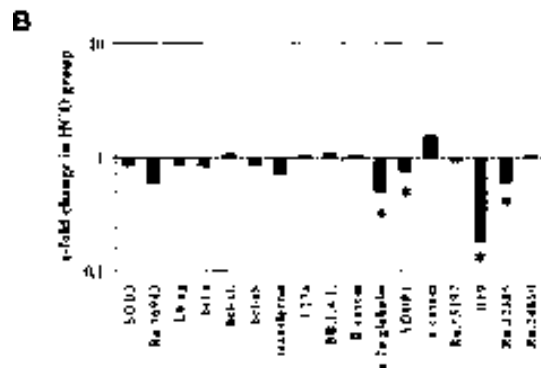


Figure 2. Differential gene expression in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary tumors by effect of dietary lipids (A) results of Northern blotting and RT-PCR expression analyses for cDNA microarrays selected genes in tumors from control, C, and HCO diet groups. (B) fold \times change in the median of mRNA levels from HCO group relative to median from C group for each selected gene. n, number of analyzed tumors; M, mean; SD, standard deviation; m, median; *, significant mRNA levels changes ($P < 0.05$).

Table 2. Characterization of Tumor Malignant Phenotype

	C		HCO					
	n	m	n	m				
SBR	17	1	22	2				
Mitosis*	17	1	22	3				
	C				HCO			
	n	M	SD	m	n	M	SD	m
Vs [†]	18	4.56	7.22	0.80	21	6.00	9.58	1.25
Area [‡]	18	46.0	75.2	9.30	19	88.8	175.2	20.1
V/age [§]	18	0.40	0.54	0.08	20	0.56	0.86	0.14
Area/age	18	3.31	4.50	0.86	18	5.39	7.67	2.52
V/age ^{**}	18	34.2	68.5	4.54	20	54.4	98.8	10.7

C, control diet group; HCO, high corn oil diet group; SBR, modified Scarff-Bloom-Richardson grading method; n, number of analyzed tumors; M, mean; SD, standard deviation; m, median. In categoric parameters (SBR and mitosis), only median (m) is considered.

*Mitosis, tumor mitotic activity.

[†]Vs, tumor volume at sacrifice.

[‡]Area, area below the tumor growth curve.

[§]V/age, rate of linear growth.

^{||}Area/age, rate of constant evolution.

**V/age, area below linear growth.

These lines of evidence support that these genes, especially VDUP1, are potentially involved in cell proliferation and differentiation. New studies about the function of these genes in the mammary tumors of this experimental model are necessary to clarify their role and contribution in the stimulating effect of the n-6 dietary lipids on the mammary carcinogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants from "Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya i Balears 2002," and "Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología" and FEDER (BFI 2003-07341). We thank Dr. Irma and Dr. José Russo at the Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, for their technical advice in the use of the cDNA array in the mammary gland. We also thank Miss Laura Grau for her technical assistance.

REFERENCES

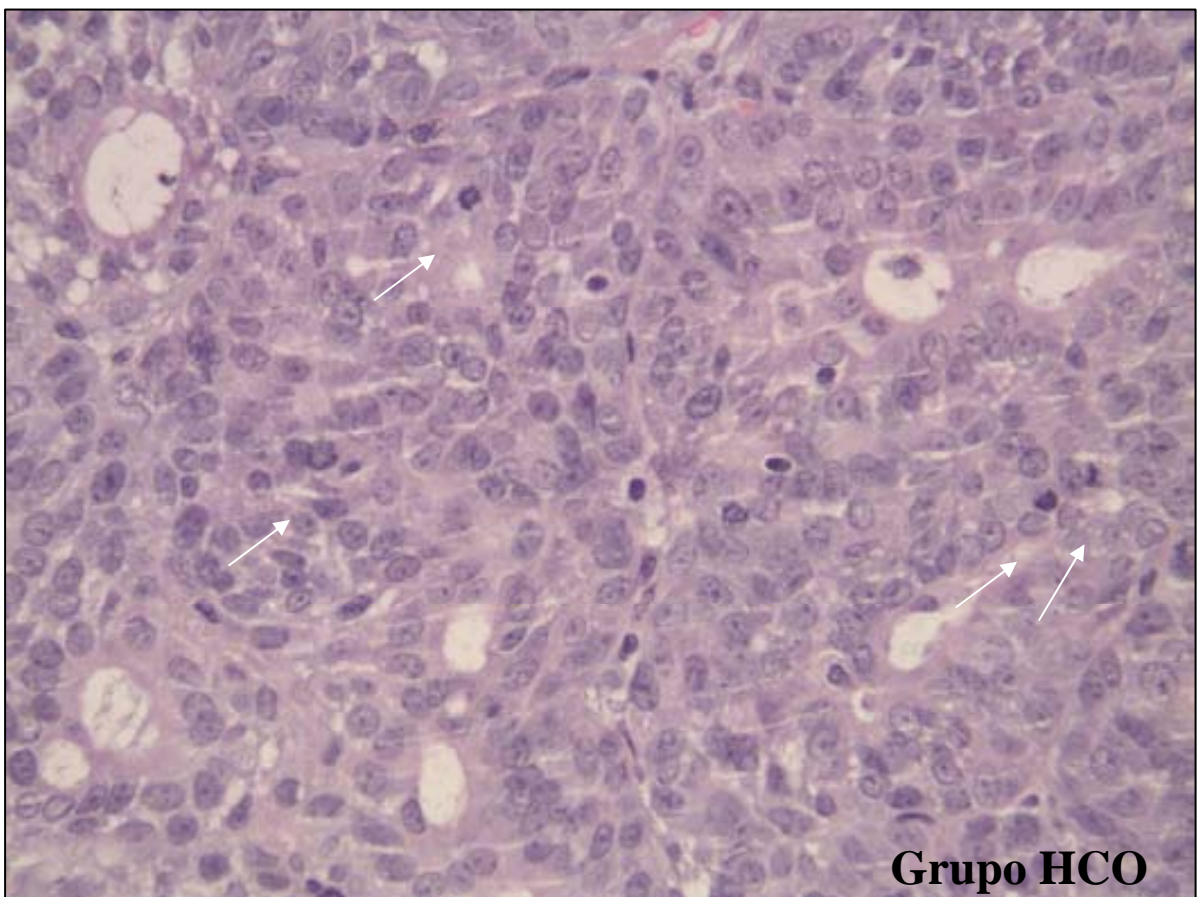
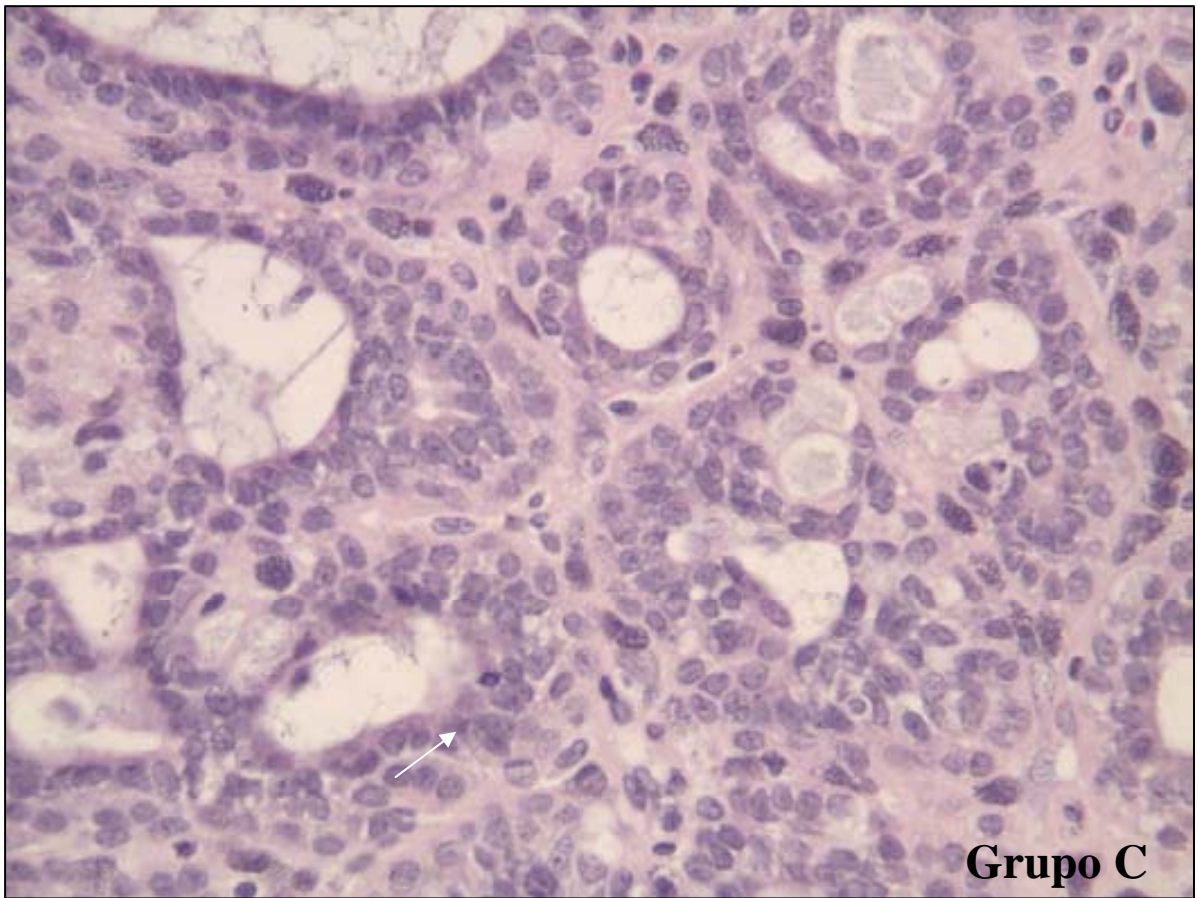
- Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2002;52:23–47.
- World Cancer Research Fund in association with American Institute for Cancer Research. Food, nutrition and the prevention of cancer: A global perspective. World Cancer Research Fund. Washington (DC), 1997.
- Wynder EL, Cohen LA, Muscat JE, Winters B, Dwyer JT, Blackburn G. Breast cancer: Weighing the evidence for a promoting role of dietary fat. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:766–775.
- Bartsch H, Nair J, Owen RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: Emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 1999;20:2209–2218.
- Welsch CW. Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: A review and a critique. *Cancer Res* 1992;52:2040s–2048s.
- Glauert HP. Dietary fat, gene expression, and carcinogenesis. In: Berdanier CD, Hargrove JL, editors. Nutrition and gene expression. Florida: Crc Press, Inc., 1993. pp 248–268.
- Jump DB, Clarke SD. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr* 1999;19:63–90.
- Solanas M, Moral R, Escrich E. The stimulating effect of a high-fat n-6 polyunsaturated diet on rat DMBA-induced mammary tumors is not related to changes in *c-Ha-ras1* mRNA tumor expression. *Nut Res* 2001;21:1261–1273.
- Solanas M, Hurtado A, Costa I, et al. Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA-induced mammary tumors compared with a high corn oil diet. *Int J Oncol* 2002;21:745–753.
- Moral R, Solanas M, García G, Colomer R, Escrich E. Modulation of EGFR and neu expression by n-6 and n-9 high-fat diets in experimental mammary adenocarcinomas. *Oncol Rep* 2003;10:1417–1424.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–159.
- Solanas M, Moral R, Escrich E. Improved nonradioactive Northern blot protocol for detecting low abundance mRNAs from mammalian tissues. *Biotechnol Lett* 2001;23:263–266.
- Costa I, Moral R, Solanas M, Escrich E. High-fat corn oil diet promotes the development of high histologic grade rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not. *Breast Cancer Res Treat*, (in press).
- Rossiello R, Carriero MV, Giordano GG. Distribution of ferritin, transferrin and lactoferrin in breast carcinoma tissue. *J Clin Pathol* 1984;37:51–55.
- Vyhldal C, Li X, Safe S. Estrogen regulation of transferrin gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *J Mol Endocrinol* 2002;29:305–317.
- Urano T, Emkey R, Feig LA. Ras-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *EMBO J* 1996;15:810–816.
- MacInnes JI, Nozik ES, Kurtz DT. Tissue-specific expression of the rat $\alpha_2\mu$ globulin gene family. *Mol Cell Biol* 1986;6:3563–3567.
- Nakhasi HL, Lynch KR, Dolan KP, Unterman R, Antakly T, Feigelson P. Modifications in alpha 2u globulin gene structure, transcription, and mRNA translation in hepatomas. *J Biol Chem* 1982;257:2726–2729.
- Junn E, Han SH, Im JY, et al. Vitamin D3 upregulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *J Immunol* 2000;164:6287–6295.
- Nishiyama A, Matsui M, Iwata S, et al. Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D₃ upregulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J Biol Chem* 1999;274:21645–21650.
- Looijenga LH, Verkerk AJ, De Groot N, Hochberg AA, Oosterhuis JW. H19 in normal development and neoplasia. *Mol Reprod Dev* 1997;46:419–439.
- Adriaenssens E, Dumont L, Lottin S, et al. H19 overexpression in breast adenocarcinoma stromal cells is associated with tumor values and steroid receptor status but independent of p53 and Ki-67 expression. *Am J Pathol* 1998;153:1597–1607.

Antecedentes, resumen de los resultados y datos adicionales:

Este trabajo tiene como objetivo identificar los genes que se expresan diferencialmente en los tumores de mama obtenidos de ratas alimentadas con una dieta rica en aceite de maíz (grupo HCO), respecto a las de un grupo control (C), y su correlación con la agresividad clínica y morfológica de éstos. En concreto, se enmarca dentro del estudio de los mecanismos que sobre la expresión génica pueden ejercer los lípidos de la dieta en la carcinogénesis mamaria. El análisis molecular se basó, en primer lugar, en un “screening” o cribado mediante “microarrays” de ADN complementario (ADNc), de un tumor de cada grupo experimental, para hallar genes cuya expresión fuera modulada por los lípidos de la dieta. Para ello, se utilizaron los filtros Rat GENEFILTERS I, GF3000 (Research Genetics), tal como se detalla en el apartado de “Material y Métodos” del artículo. El análisis se realizó por triplicado y se seleccionaron las secuencias con diferencias en los niveles de expresión, entre los dos grupos experimentales. Las secuencias de estos ADNc se obtuvieron de referencias de UniGene y Genbank y algunos de los genes fueron identificados en bases de datos estándar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Para validar estos resultados, los ARNms de los tumores se analizaron con “Northern blot” y/o por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa). Se identificaron seis genes suprarregulados en el grupo HCO (antígeno L6, transferrina, proteína ribosomal *L27a*, *bcl-x*, dismutasa superóxido extracelular-*SOD3*- y uno con función desconocida) y nueve infrarregulados (α -caseína, *H19*, *VDUP1*-proteína 1 suprarregulada por la vitamina D3-, globulina α -2u de la glándula submaxilar, β -caseína, clon BB.1.4.1 y tres desconocidos). En la validación de estos resultados por “Northern blot” y/o RT-PCR, se confirmaron los tamaños esperados de los ARNms detectados y se normalizaron los niveles de ARNm de los genes diferenciados hallados en HCO respecto a los del grupo C (HCO/C). Así, tres de los seis genes suprarregulados (antígeno L6, transferrina, proteína ribosomal *L27a*) y cuatro de los nueve infrarregulados (*H19*, *VDUP1*-proteína 1 suprarregulada por la vitamina D3, globulina α -2u de la glándula submaxilar y la secuencia de función desconocida EST-Rn.32385), identificados en los “microarrays”, fueron validados. Estos resultados están plasmados en la Tabla 1 del artículo. Al analizar la expresión de estos genes en un mayor número de carcinomas, por “Northern blot” y/o RT-PCR, se confirmaron unos niveles significativos menores de ARNm de globulina α -2u de la glándula submaxilar, *VDUP1*, *H19* y EST-Rn.32385 en los tumores del grupo HCO, respecto el grupo control (Figura 2 del artículo). Estos resultados se correlacionaron con el fenotipo tumoral maligno de los carcinomas, que se determinó en base a la evaluación de unos parámetros morfológicos,

en los que la doctoranda participó directamente, y clínicos. Así, las neoplasias del grupo HCO mostraron mayor malignidad histológica que las del grupo control, así como mayores valores de los parámetros relacionados con el volumen tumoral, que se describen en el apartado correspondiente de “Material y Métodos” del Artículo 6, y cuyos resultados se plasman en la Tabla 2 del artículo. En concreto, se observó un mayor grado histológico y una mayor actividad mitótica en los carcinomas del grupo HCO (mediana de grado 2 y mediana de 3 mitosis por 10 campos de gran aumento) que en los del grupo C (mediana de grado 1 y mediana de 1 mitosis por 10 campos de gran aumento). En la Figura A50 (A: adicional al artículo) se incluyen imágenes histológicas representativas de un carcinoma del grupo C y del grupo HCO (H&E x200), donde se observan el menor grado histológico y la muy escasa actividad mitótica del primero y la mayor agresividad morfológica y proliferación del segundo. Las funciones y las características de algunos de estos genes, así como los resultados de este estudio, se discuten en el artículo y en el apartado correspondiente de la “Discusión” de este trabajo. Los hallazgos descritos en este artículo fueron la base del Artículo 9.

Figura A50: Imágenes grupo C y HCO



.....

7. ARTÍCULO 7

Are the olive oil and other dietary lipids related to cancer? Experimental evidence.

E. Escrich, M. Solanas, R. Moral, **I. Costa**, L. Grau.

Clinical and Translational Oncology 2006; 8: 868-883

RESULTADOS

Are the olive oil and other dietary lipids related to cancer? Experimental evidence

Eduard Eserich, Montserrat Solanas, Raquel Moral, Irmgard Costa and Laura Grau

Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Physiology Unit, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain.

There is a wealth of evidence supporting the relationship between dietary lipids and cancer, particularly those of the breast, colon and rectum and prostate. The main support comes from the international correlational studies and, especially, from experimental ones. The evidence from human analytical studies is less consistent because of several conflicting findings, probably due to methodological issues. Experimentally, it has been clearly demonstrated that quantity and type of dietary lipids as well as the particular critical phases of the carcinogenesis in which they act, are the essential factors in this relationship. Thus, whereas high dietary intake of *n-6* polyunsaturated fatty acids (PUFA), primarily LA, and saturated fat has tumor-enhancing effects, long chain *n-3* PUFA, CLA and GLA have inhibitory effects. Monounsaturated fatty acids (MUFA), mainly OA, present in high quantities in olive oil, seem to be protective although some inconsistent results have been reported. Bioactive compounds of virgin olive oil may also account for the protective effect of this oil, which is the main source of fat in the Mediterranean diet. Experimental studies have also provided evidence of several putative mechanisms of action of dietary lipids on cancer. Lipids can influence the hormonal status, modify cell membranes structure and function, cell signalling transduction pathways and gene expression, and modulate the function of the immune system. Although further studies are needed to evaluate and verify these mechanisms in humans, based on the multiple ways dietary lipids can act, they may have an important influence on tumorigenesis.

Key words: cancer, olive oil, dietary lipids, Mediterranean diet, mechanisms of action.

Correspondence: E. Eserich,
Department of Cell Biology, Physiology and Immunology,
Physiology Unit, Faculty of Medicine,
Universitat Autònoma de Barcelona,
08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.
E-mail: Eduard.Eserich@uab.es

Received 1 May 2006; Revised 27 July 2006;
Accepted 27 July 2006

Eserich E, Solanas M, Moral R, Costa I, Grau L. Are the olive oil and other dietary lipids related to cancer? Experimental evidence. Clin Transl Oncol. 2006;8(12):868-83

INTRODUCTION

Cancer is the second cause of mortality after cardiovascular disease in developed countries and the first one when early deaths are considered. The most common cancers worldwide (excluding skin cancers other than melanoma) are lung, breast and colorectal cancer. Lung, prostate, stomach, colorectal and hepate cancers are the most frequent in men, while breast, cervix uteri, colon and rectum, lung and stomach cancer are the most frequent in women¹. However, the incidence and mortality rates of cancer show different geographical distribution, with great differences in total burden between developed and developing countries (fig. 1). Moreover, migrating populations attain the rates of the adopted countries in two to three generations. Thus, besides genetic and endocrine factors, lifestyle and environment should be involved in cancer aetiology, diet being one of the most important factors to cancer risk². In fact, it is estimated that a third of all cancers are caused by inadequate diet and these could be reduced through individual and social actions³.

Numerous dietary compounds play a role in cancer. Epidemiological and experimental studies support that dietary lipids are one of the most remarkable, and their relation with only certain type of tumours suggests specific actions beyond the caloric supply^{2,4,5}. The most consistent data for a dietary fat-cancer relationship are for breast, colorectal and, in much less extent, prostate cancers. Other cancers have been occasionally related with dietary fat and the evidence, mainly epidemiological, of a real relationship is, up to now, much lower. For this reason, in this article we have focused on the mentioned ones, which also are some of the most frequent cancers worldwide.

Epidemiological studies are controversial regarding the role of dietary lipids in cancer. Ecological studies found a positive association between *per capita* fat consumption and the mortality rates of the above mentioned cancers, especially with animal and satu-

rated fat. Interestingly, countries with a Mediterranean diet, characterised by high consumption of fibre, fish, fruits, vegetables and olives and olive oil, show middle values for these cancers. However, it has been argued that other factors such as lean body mass, obesity, sedentary lifestyle or reproductive ones, more than fat intake, can be major determinants of the international differences in cancer rates. On the other hand, analytic epidemiology has generated conflicting results, probably due to methodological reasons. Thus, in relation to breast cancer, the results from case-control studies have been equivocal, and taken together, the prospective cohort studies do not support a strong association between fat intake during adult life and this cancer. Recently, however, Freedman et al. have shown a statistically significant positive association between dietary fat and breast cancer in the largest cohort study (with over 600 cases of breast cancer) carried out up to now⁷. Several pooled analyses have examined a wide range of fat intake and, overall, no association between intake of total, saturated, monounsaturated or polyunsaturated fat and risk of breast cancer has been observed. Randomized trials of fat reduction have been suggested as the only means of establishing the relation between dietary fat and cancer. However, they can be unable to distinguish between the effect of fat reduction and that of increasing intake of fruits and vegetables, or to elucidate whether dietary fat reduction at an early age may reduce breast cancer risks decades later^{6,8,9}. Therefore, the association between dietary lipids and cancer in human populations remains largely unresolved and so properly designed epidemiological studies are needed. Taking into account the limitations of space and the fact that the epidemiological approaches are not the scope of this article, the reader is referred to the above mentioned literature for studying this subject in depth.

EXPERIMENTAL EVIDENCE OF THE RELATIONSHIP BETWEEN DIETARY FAT AND CANCER

The relationship between dietary lipids and cancer has been clearly established in animal studies, breast cancer being the most exhaustively studied. Experimentally, it has been demonstrated that the effect of dietary lipids on cancer depends on the type and quantity of fat consumed, as well as on the particular critical phases of the carcinogenesis where they act^{2,4,10,11}.

Most human diets contain a variety of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids (Fig. 2). n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), from vegetable oils, highly consumed in Northern Europe, have been shown to have a stimulating effect on breast cancer in animal models, mainly the linoleic acid (LA) (18:2n-6)^{4,12-14}. We demonstrated that high

corn oil diets confer to the rat dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary adenocarcinomas a clinical behaviour compatible with a greater degree of malignancy in comparison with low corn oil control diet⁵. Thus, animals fed this high n-6 PUFA diet showed lower latency time, and greater incidence of affected animals, tumour content and tumour volume than control animals. This effect was mainly exerted during the promotion stage of the carcinogenesis, although the results were also compatible with an influence during the initiation, probably acting as co-carcinogens. However, no significant effect was observed on the growth of tumours already established^{14,15} (Fig. 3). Moreover, we showed that high corn oil diets, particularly when acting during the promotion, increased the tumour morphological aggressiveness, leading to the development of adenocarcinomas of a higher histopathological grade, with a frequent infiltrative pattern of growth, more prominent tumoral necrosis and prevalent cribriform areas in comparison with the control group^{19,21} (Fig. 4).

In relation to colon cancer, high n-6 PUFA diets have been shown to increase risk of chemically induced colon carcinogenesis and metastasis²². The few animal studies on prostate cancer have also reported a tumour growth promotion by oils high in LA⁷.

High saturated fat diets, mainly from animal origin, have shown a tumour-enhancing effect, although lower than the high n-6 PUFA diets. Such effect has also been observed during the initiation phase of colonic cancer. On the other hand, high levels of n-3 PUFA inhibit tumour growth and metastasis. This effect is mainly exerted by the long chain ones, eicosapentaenoic acid (EPA) (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA) (22:6n-3), from oily fish and fish oils and also derived from α -linolenic acid (ALA) (18:3n-3), found in vegetable oils, red meat and dairy products. Unlike breast and colon cancers, the role of n-3 PUFAs in prostate cancer is unclear, and experimental data suggest a tumour suppression effect of long chain n-3 PUFA and a tumour promotion effect of high ALA oils. Conjugated linoleic acid (CLA), from meat and ruminant-derived dairy products, has shown inhibitory effect on cancer. γ -linolenic acid (GLA) (18:3n-6), found in evening primrose oil, has shown antiproliferative effects^{4,5,22,23}.

There is growing evidence that monounsaturated fatty acids (MUFA) such as oleic acid (OA) (18:1n-9), present in high levels in olive oil, the main source of fat in Mediterranean countries, have a protective effect on breast cancer. However, non-promoting, weak promoting and even promoting effects have been reported^{4,23,25}. We studied the effects of a high virgin olive oil diet on the DMBA induced mammary carcinogenesis compared to high and low corn oil diets. Animals fed the high olive oil diet showed higher tumour latency time, decreased tumour incidence (low-



Fig. 1. Age-standardized incidence of breast cancer per 100,000 by area¹.

er than high fat corn oil group and higher than low fat group), and the lowest tumour content and volume (fig. 3). Tumour regression was also analysed as a proposed protective effect for this high olive oil diet, observing a slow progression of the tumour growth

rather than a real regression¹⁷. Besides being less aggressive biologically, olive oil tumours displayed features of low morphological malignancy, such as a low histopathological grade, unusual invasive growth and few necrotic areas, similar to the control group (a

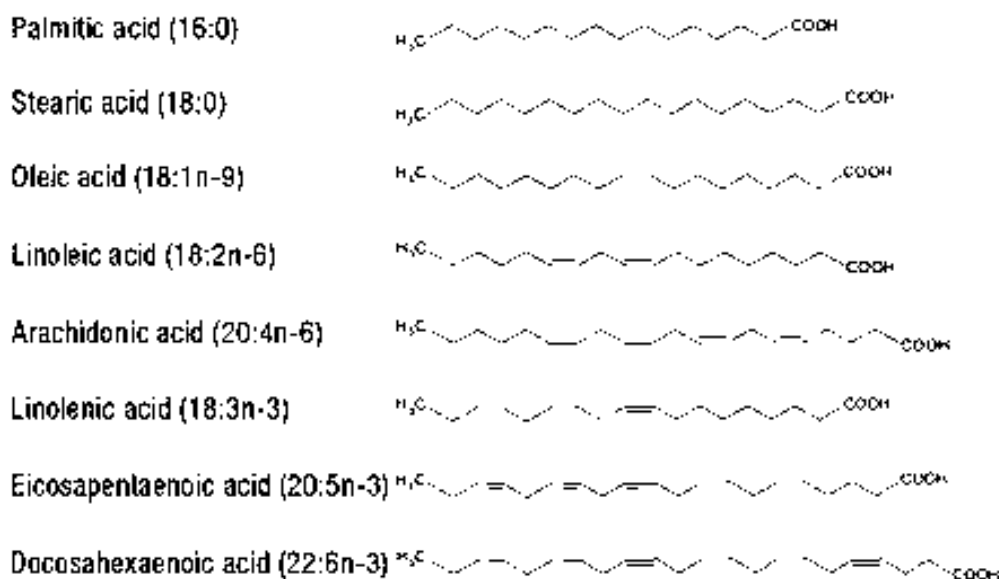


Fig. 2. Some important dietary saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids.

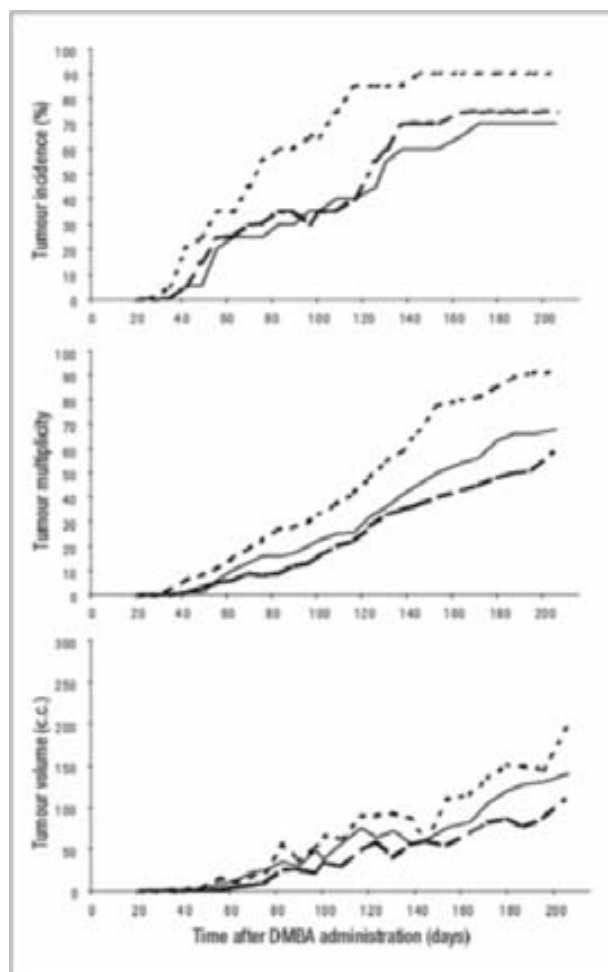


Fig. 3. Influence of high corn and virgin olive oil on the promotion of the DMBA-induced mammary carcinogenesis. Representative schematic curves of three parameters of the carcinogenesis through the time are shown (tumour incidence—as percentage of rats with palpable mammary tumours—, tumour multiplicity—as cumulative total number of palpable mammary tumours—, and total tumour volume—as total volume of palpable mammary tumours—). From weaning at 22 days of age, female Sprague-Dawley rats were given the control low fat diet—containing 3% corn oil—until 53 days of age, when they received a single dose of 5 mg of 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA). Rats were then randomly placed into three groups of 20 each one. The rats in control group (—) were maintained on the low fat diet and the rats in the other two groups were fed a high corn oil diet—containing 20% corn oil—(---) or a high virgin olive oil diet—containing 3% corn oil and 17% olive oil—(-·-) until the end of the study. Approximately 30 weeks after DMBA administration, the rats were killed by decapitation at the diestrus phase of the estrus cycle.

tumours, as well as extensive papillary areas²¹ (fig. 4). Fewer studies have addressed the effects of n-9 MLEFA on colorectal cancer, reporting an effect or a protective effect²⁶⁻²⁸. With regard to prostate cancer, experimental data on n-9 MLEFA effects are still very limited, having shown an inhibitory effect of OA on PC-5 colon tumour cell growth²⁹. Anyway, besides

the OA, certain minor components from the unsaponifiable fraction of the virgin olive oil, such as phenolic compounds, phytoosterols, flavonoids and squalene, are major factors contributing to the putative beneficial effects of this oil on cancer^{30,31}. In fact, the different relative content of these minor compounds in the different types of olive oil could be the cause of the discrepancies among studies.

Increased knowledge points out the modulation of carcinogenesis by dietary fat at different levels: carcinogenesis stages, hormonal levels, structure and function of cell membranes, cell signalling transduction pathways, regulation of gene expression and immune system. *In vivo*, lipids may act through all these mechanisms in an integrated, simultaneous and/or sequential way (fig. 5). In the next section the scientific evidence on these mechanisms will be reviewed and our main results will be summarised.

MOLECULAR MECHANISMS OF THE DIETARY LIPID ACTION ON CANCER

Influence on the carcinogenesis stages

Dietary lipids affect the different stages of the carcinogenesis, mainly the promotion, although there is also evidence of a role during the initiation, directly or indirectly. Firstly, they can act as co-carcinogens, facilitating the genotoxic action of several agents³². Indeed, lipids could alter the accessibility of carcinogens, DNA repair and/or the access of the transcription machinery to specific genes by altering the structure of the chromatin. Actually, *in vitro* studies have shown that the electrostatic interactions between histones and DNA can be affected by membranes containing acidic phospholipids and sphingosine, suggesting an effect of specific lipids in the regulation of chromatin structure and function³³. Moreover, there is evidence that the lipid component of chromatin, mostly sphingomyelin and phosphatidylserine, plus analogues and cholesterol, may play crucial roles in transcriptional regulation and modulation of cell proliferation, differentiation and apoptosis³⁴. Furthermore, it has been proposed that the stimulating effect of a high n-6 PUFA diet in the rat 2-amine-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP)-induced mammary cancer model may in part involve a further fixation of adduct-induced mutations through an enhanced proliferative stimulus of epithelial cells in terminal end buds (TEBs) of the mammary gland rather than by an inhibition of PhIP-DNA adduct repair processes³⁵. Other studies have demonstrated that the exposition to CLA during the maturation period of the rat mammary gland provides a protective effect in the initiation of the carcinogenesis by modifying the potential development of the target cells susceptible to carcinogen-induced transformation³⁶.

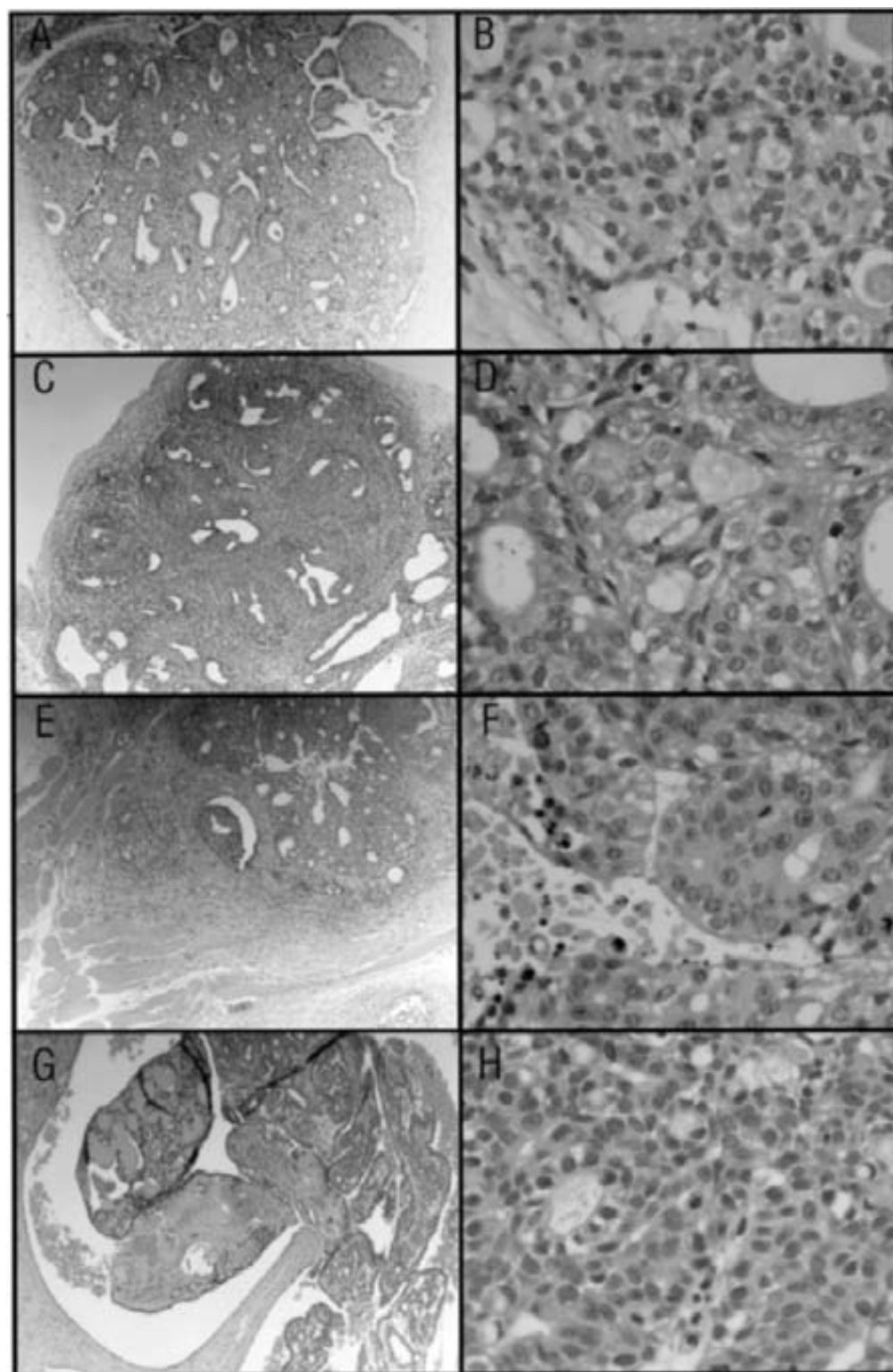


Fig. 4. Influence of high corn and virgin olive oil on the histopathological features of experimental mammary adenocarcinomas. Most of the low fat diet adenocarcinomas are well circumscribed, with papillary and cribriform areas (A), a low nuclear atypia and no or very scanty mitotic activity (B). Carcinomas from high corn oil diet group, when fat acts during the initiation stage of carcinogenesis, show a less expansive growth, with less well-defined margins, a prominent lymphoplasmacytic reaction and a prevalent cribriform pattern (C), with nuclear atypia, but with few mitotic figures (D). Carcinomas developed in the promotion high corn oil diet groups are the most histologically aggressive tumours, with an infiltrative pattern of growth, invading neighbouring tissue (E), a high nuclear grade, tumoral necrosis and a high mitotic count (F). Olive oil adenocarcinomas are well differentiated, with extensive papillary areas, no or light stromal reaction (G), low nuclear atypia, but exhibiting mitotic figures (H). (Hematoxylin and eosin staining; original magnification x 40 (A, C, E, G); x 400 (B, D, F, H)).

Lipid peroxidation and the subsequent oxidative DNA damage is another mechanism by which lipids may act stimulating the initiation and development of human malignancies. PLFA peroxidation by free radicals and reactive oxygen (ROS) and nitrogen species

(RNS) produced in cells generates reactive α,β -unsaturated aldehydes, such as *trans*-4-hydroxy-2-nonenal and malondialdehyde, which can form promutagenic exocyclic DNA adducts. *trans*-4-hydroxy-2-nonenal, one of the major lipid peroxidation products, is formed

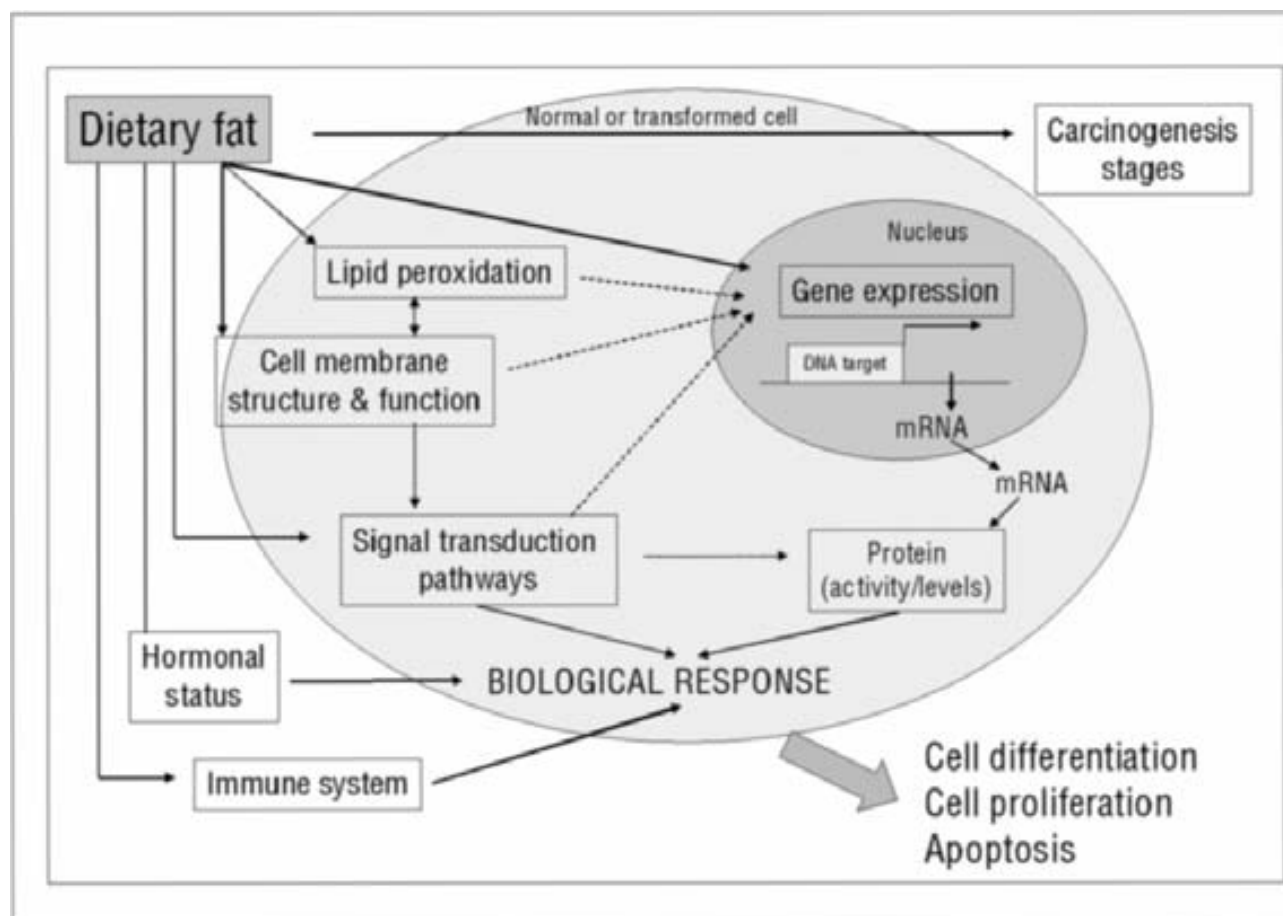


Fig. 5. Hypothesis on the effects of high fat diets on mammary tumorigenesis. Dietary fat may modulate mammary tumorigenesis altering the cell function through a variety of molecular mechanisms, which would act in a simultaneous and/or sequential way. These mechanisms would not act independently each other but they also could be interconnected. The output of all these actions at different levels would modify cell behaviour influencing essential cell pathways such as cell differentiation, proliferation or apoptosis. Dietary lipids effects may be exerted both on the normal mammary epithelial cell and the transformed cell, thus contributing to the cancer initiation, promotion as well as to progression (see the text for details).

by oxidation of n-6 PUFA, LA or arachidonic acid (AA, 20:4n-6), and is readily oxidized by fatty acid peroxidases to form 2,5 epoxy-4-hydroxymenol⁵. To date, however, the role of lipid peroxidation in the modulation of tumour growth *in vivo* is controversial, especially in the case of n-3 PUFA. Long chain n-3 PUFA, even being highly unsaturated, seem to inhibit cell growth, probably related to the formation of oxidation products that lead to cell growth arrest and apoptosis^{41,57,58}. On the other hand, CLA is suggested to suppress peroxidation of unsaturated fatty acids, which would reduce oxidative damage²³. Olive oil could protect from oxidative damage because of both its high content of OA, which is far less susceptible to oxidation than n-6 PUFA, and its richness of minor antioxidant components. This property may account for the anti-tumour effects proposed for the virgin olive oil^{50,51}. Finally, in colon tumorigenesis the effects of bile acids must be considered. Several studies have indicated that high saturated or n-6 fat diets increase the

concentration of colonic luminal secondary bile acids, whereas high fish oil diets have no such enhancing effect. Secondary bile acids can induce cell proliferation and act as promoters in colon carcinogenesis. The secretion of these acids is not modified by high olive oil diets. The beneficial effects of this oil could be related with the modulatory effect of squalene on the biosynthesis of the colon tumour promoting bile acids^{59,60}.

Effects on hormonal status

Dietary lipids could influence the development of hormone-dependent breast and prostate cancers through modifications in the availability of sex hormones, such as oestrogens and testosterone respectively. It is well known that these hormones have proliferative effects on hormone sensitive tissues and that high concentrations may increase the risk of these cancers and of some other hormone-dependent cancers.

Alteration of oestrogen metabolism is a potential mechanism whereby dietary lipids may modify the carcinogenic process. The higher breast cancer rates observed in postmenopausal and obese women support that a high fat intake can increase the adipocytes number and, as a consequence, increase peripheral oestrogen synthesis through cytochrome P450 aromatase (CYP19) which forms aromatic G18 estrogens from G19 androgens⁴¹. Prostaglandin E₂ (PGE₂), an AA metabolite, has been shown to directly enhance aromatization by stimulating the activity and expression of aromatase P450 in human adipose stromal cells. In contrast, PGE₃, a product of EPA metabolism, does not activate aromatase P450. Hence, an increased intake of EPA, which leads to increased production of PGE₃ and decreased production of PGE₂, is expected to decrease local oestrogen production and thus reduce oestrogen-stimulated cell growth. However, this issue has not been yet examined directly in humans³⁸. High intake of the n-6 PUFA could also increase oestrogenicity at other levels: displacing the oestrogens from sex-hormone binding globulin, thus increasing concentrations of unbound (free) oestrogen; increasing the oestrogen affinity for its receptor; and inhibiting 17 β dehydrogenase enzyme activity and recycling. In this way, the conversion of oestradiol (the most active oestrogen) into estrone^{41,42}.

Moreover, a high fat intake has been described to cause an increase in the secretion of bile acid, which together with cholesterol derivatives can be transformed into oestrogens by certain bacteria of the intestinal flora⁴³. On the other hand, lignans, which are minor components of olive oil, seem to have anti-oestrogenic effects, because of their structural similarities with oestradiol and the synthetic anti-oestrogen tamoxifen. Thus, in MCF-7 human breast carcinoma cells, lignans have been shown to inhibit oestradiol-induced proliferation and stimulate sex hormone binding globulin synthesis, with a subsequent decrease in free oestradiol⁴⁴.

Recently, LA has also been shown to increase expression of the oestrogen receptor α (ER α) mRNA and decrease expression of the androgen receptor (AR) in human mammary tumour cells T47D⁴⁵.

Despite the aforementioned relationships between dietary lipids and sex hormones, inconsistent results exist on the effect of fat intake on plasmatic levels of gonadal steroid levels or their receptors and cancer risk⁴¹.

Dietary fat may also affect prostate cancer through its effects on male sex hormone levels, but few and inconsistent results about this possibility have been reported. Whereas in athymic nude mice bearing human prostate cancer xenografts and fed a low fat diet no changes in serum testosterone levels have been reported⁴⁶, in a transplantable prostate cancer model in rats a high corn oil diet slightly increased these levels⁴⁷. In two human studies, a high fat diet with a

high ratio of saturated to polyunsaturated fat increased total urinary androgens and total plasma testosterone respectively. In another trial, a reduction in intake of dietary fat led to a decrease in serum testosterone and androstenedione levels. A strong association between increasing plasma testosterone levels and risk of prostate cancer was found in a prospective cohort study after adjustment for sex hormone binding globulin levels³.

Prolactin, insulin, thyroxine, growth hormone and corticosterone have also been studied in relation to dietary lipids and breast cancer, but results are controversial⁴⁸⁻⁵². We studied the effect of a high corn oil diet on plasma levels of the main regulating hormones of the mammary development (17 β -oestradiol, progesterone, insulin, prolactin and corticosterone) on the tumour content of steroidal receptors (oestrogen and progesterone receptors) in different stages of the rat DMBA-induced breast carcinogenesis, finding no modifications due to fat intake^{49,50}. Moreover, among the various plasmatic biochemical parameters studied we only found a hypocholesterolemic effect of the high corn oil diet⁵¹.

Finally, leptin has also been related to the effects of a high fat diet on carcinogenesis. In particular, in the rat DMH-induced colon cancer model, it has been hypothesised that a high corn oil diet may enhance colon carcinogenesis by elevating cell proliferation through higher serum leptin⁵². Leptin has also been shown to control the proliferation of both normal and malignant breast epithelial cells, suggesting a novel association of diet-induced obesity, mammary gland development and the risk for breast cancer⁵³.

Modification of cell membranes structure and function

The finely regulated composition of polar lipids (phospholipids, sphingomyelin and cardiolipin in mitochondria) and the cholesterol content of cell membranes can vary depending on the lipids habitually ingested⁵⁴⁻⁵⁶. The changes in the lipid profile of the cell membranes due to the intake of a particular type of dietary fat can, in turn, modify cell behaviour by influencing membrane structure and fluidity, lipid mediated cell signalling transduction pathways and the degree of lipid peroxidation in the cell membranes.

Studies in the authors' laboratory developed in the DMBA-induced mammary cancer model have provided data about the influence of dietary lipids on tumour fatty acid composition and growth. Thus, adenocarcinomas from rats fed a high corn oil diet, which have a more aggressive clinical behaviour and a higher histopathological degree in comparison with the control diet tumours, displayed a significant increase of the LA relative content and a decrease of that of OA in phosphatidyletholine, phosphatidyletha-

cholamine and PFA. The hydrolysis products of these phospholipids as well as FFA have been linked to tumour cell proliferation. These results are in agreement with the experimental and epidemiological studies above mentioned about the stimulating role of high LA diets and the likely protective role of high virgin olive oil diets, rich in OA, on mammary carcinogenesis¹³.

Lipid changes in membranes have important consequences as membrane lipids can influence the function of membrane proteins. An increase in membrane fluidity due to PUFA enrichment may affect the lateral mobility of specific integral and membrane bound proteins, its conformation and its interaction with other membrane components, producing functional changes. Thus, it has been described a reduction in the number of sodium channels, changes in adenylate cyclase and Na⁺ K⁺-ATPase activities, as well as in the binding of ligands to receptors as in the case of the insulin receptor^{54,55}. In general, saturated and *trans*-unsaturated fatty acids have been reported to have the opposite effect, and MUFA a lower effect in comparison with PUFA^{54,56}. Amphitropic proteins, which are membrane proteins that associate reversibly with membrane lipids under appropriate conditions, can be regulated by specific lipids that modify their assembly, folding or topological organization. Proteins functioning in signalling pathways from cell membranes, such as Small GTPases Ras, Src-family protein tyrosine kinase (SFK), Ras-guanine nucleotide exchange factor, GTP: phosphocholine cytidyltransferase, Protein kinase C (PKC) and phospholipase C (PLC) as well as several extracellular matrix and cytoskeletal-related proteins, are commonly regulated by amphitropism⁵⁷. Moreover, increasing evidence have suggested a role for lipids in the organization of the plasma membrane into microdomains, such as the sphingolipid and cholesterol-rich membrane microdomains called lipid rafts, that recruit and regulate specific proteins involved in processes like signal transduction, protein sorting in polarized cells, endocytosis and cell adhesion⁵⁸. In a mouse colon cancer model, dietary n-3 PUFA, compared with n-6 PUFA, have been demonstrated to profoundly alter the microenvironment of caveolae (a subtype of lipid raft), thereby influencing cellular signalling⁵⁹.

On the other hand, modulation of the membrane lipid structure (lamellar bilayer- and nonlamellar non-bilayer- phases or propensity to form them) by dietary lipids has also been shown to regulate the protein-membrane interactions and mobilization upon activation. Thus, the presence of lipids prone to form inverted nonlamellar phases, hexagonal phase H_{II} in particular, such as phosphatidylethanolamine (PE), modulates the localization of peripheral proteins, like PKC, G proteins and PLA₂ among others, which are

capable of translocating from the membrane to the cytosol and propagate intracellular signals⁶⁰. Model systems have shown that OA confers an increased H_{II} phase propensity to the PE membranes, whereas *trans* mono-unsaturated and saturated fatty acids exert very modest effects on PE structural properties. This property of OA has been postulated to account for the modulation exerted by this fatty acid on membrane and cell functions. According to this, it has been shown that OA, unlike the other fatty acids, not only regulates G protein localization but also its function⁶¹. Dietary lipid composition can also alter the phospholipid fatty acid profile of the nuclear membrane, resulting in altered membrane function. The activity in DNA replication, transcription and recombination of some DNA binding proteins which interact with phospholipid membranes are likely to be regulated *in vivo* by these phospholipids, especially if they contain unsaturated fatty acids⁶². Moreover, high dietary LA levels, in comparison with a low LA diet, have been demonstrated to increase the nucleoside triphosphatase (NTPase) activity and consequently the RNA nucleocytoplasmic export in rat liver⁵⁵. Nuclear membrane fluidity changes caused by the increase of unsaturated fatty acids have been suggested to affect the phosphorylation, and consequently the activities and function, of the nuclear membrane associated enzymes involved in this RNA transport⁶³.

Moreover, as mentioned above, dietary fat can modify the degree of lipid peroxidation in the cell membranes. Persistent cellular oxidative stress leads to macromolecular damage and disruption of signalling pathways stimulating the development of cancer. The fatty acid unsaturation degree of the membrane phospholipids determines the susceptibility to peroxidation, thus high unsaturation levels leading increased oxidative stress. Hence, polyunsaturated fat source will lead to membranes more prone to oxidation than a saturated or a monounsaturated source.

Finally, dietary lipids could also influence the carcinogenesis at membrane level by modulating the gap junction-mediated intercellular communication (GJIC). In rat DMBA-induced mammary tumours n-6 PUFA inhibit this kind of cell to cell communication, resulting in a blockade of the transfer of growth inhibitory signals among tumour cells via gap junctions. Reduced GJIC is associated with excessive proliferation, increased cell motility, invasion and metastasis⁶⁴. On the other hand, CLA reduces *in vitro* adhesion of human breast and colon cancer cells to the endothelium partly by improved GJIC of this endothelium⁶⁵.

Effects on signal transduction pathways

The action of phospholipases A₂, C and D, activated by agonist-receptor complexes, on the membrane

lipids generates bioactive molecules, such as inositol triphosphate (IP₃), diacylglycerol (DAG), free fatty acids (FFA) and phosphatidic acid (PA), which play an important role as second messengers or as modulators in the intracellular signalling network. Changes in the physicochemical properties of the membrane due to dietary fat intake will affect the production and the composition of these bioactive molecules whereby affecting gene expression and cell function^{66,67}. FFA modify the activity of phospholipases A₂, C and D, PKC, AMPc-dependent protein kinase (PKA), Ca²⁺/Calmoduline-dependent protein kinase II (CaM-K II), G proteins, adenylate and guanylate cyclases, as well as some channels and calcium mobilization⁵³⁻⁵⁶. Moreover, it is well known that PKC, a pivotal enzyme in the intracellular signalling, is regulated by many different lipids, including DAG, phosphatidylserine, FFA, lysophospholipids, and phosphatidylinositol. Lipid- and calcium-mediated control of PKC activity is subtype specific⁶⁸. For example, n-6 PUFA, but not OA, have been shown to modulate human breast cancer cell adhesion to collagen IV by selectively activating PKC ϵ and PKC δ isozymes, which leads to the activation of $\beta 1$ integrins⁶⁹. However, dietary n-3 fatty acids inhibit PKC β activity and suppress PKC β -mediated hyperproliferation and colon carcinogenesis *in vivo*⁷⁰.

The effects of fatty acids on membrane receptors, which are mitogenic signal cascade effectors, irrespective of those derived from changes in the structure of cell membranes mentioned above, are not well known. Our preliminary results show that EGFR is not activated in experimental mammary adenocarcinomas and that this status is not modified due to either a high n-6 PUFA diet (corn oil) or high MUFA diet (virgin olive oil). In contrast, Neu has been found activated in these tumours, but its activity does not seem to be modified by these dietary lipids⁷¹.

Dietary lipids have also been shown to affect the activation of Ras proteins, which are critical regulators of cell function, including growth, differentiation, and apoptosis. However the mechanisms of this effect are unknown. In the AOM-induced colon cancer model, a high fish oil diet decreased membrane bound Ras, probably by interfering with posttranslational modification of the protein, whereas a high corn oil diet seemed to exert its promoting activity on colon carcinogenesis by increasing membrane localization of Ras⁷². However, in colonocytes and colon tumours other authors have demonstrated that, in comparison to n-6 PUFA, n-3 PUFA decrease the Ras membrane to cytosol ratio but not Ras farnesylation and palmitoylation⁷³. On the other hand, the tumour-inhibitory effect of squalene on rat AOM induced colonic aberrant crypt foci has been mainly attributed to its strong inhibitory activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase, the rate limiting

enzyme in the mevalonate pathway, a precursor of nonsterol isoprenoids which are required for Ras pre-acylation⁷⁴. In experimental breast cancer, we have demonstrated that a high virgin olive oil diet, in comparison with high and low corn oil diets, regulates Ras activation, decreasing the GTP-bound (activated) Ras levels, but not Ras localization. This suggests that the modulating effect of olive oil-based diet on this cancer may be exerted by modifying Ras activation and Ras dependent signalling⁷¹.

Unsaturated fatty acids removed from the sn-2 position of the membrane phospholipids also serve as substrates for cyclooxygenases (COX-1 and COX-2), lipoxygenases (LOX) or cytochrome P450 monooxygenases (MOX). The products are a number of eicosanoids (prostaglandins -PGE- and thromboxanes -TX- from COX action; leukotrienes -LT-, hydroxyl fatty acids and lipoxins from LOX action; and hydroxylfatty acids, dihydroxyfatty acids and epoxy fatty acids from MOX action). Eicosanoids derived from the LA, via AA, and those derived from the LNA, via EPA, are synthesized using the same enzymes but they have different and, in some cases, contrary effects. Eicosanoids derived from LA have been linked to increased growth, inhibited apoptosis, angiogenesis and metastasis^{37,38}. In fact, the tumour promoting effect of high fat diets on breast cancer has been correlated with a greater production of eicosanoids from a 6 PUFA⁴. The protective effect of n-3 fatty acids on cancer could be exerted, at least partially, through their suppressing effect on the biosynthesis of AA-derived eicosanoids, in favour of EPA derived eicosanoids. This suppression can result from a decrease in the availability of AA precursors into membrane phospholipids, a competition with n-6 PUFA for desaturases and elongases for which they have greater affinities, and a suppression of COX-2³⁸. Likewise, the modulatory effect of CLA has been associated with a decrease in LA desaturation products needed for eicosanoid synthesis⁷⁴. The possible tumour protective effect of olive oil has also been partly attributed to the competition between OA and LA for the desaturation process. Thus, although OA has lower affinity for the $\Delta 6$ desaturase than LA, at relatively high concentrations OA may inhibit the conversion of LA to GLA and, hence, its entry into the eicosanoid biosynthetic pathways⁴. Moreover, hydroxytyrosol, a minor component of olive oil, can inhibit lipoxygenase, responsible for leukotriene synthesis³⁰. The preventive effect of olive oil based diets on experimental colon carcinogenesis has been related to the modulation of AA metabolism⁷⁵.

Effects on gene expression

It is widely known that dietary lipids and other dietary components can modulate specifically the gene

transcription, processing and stability of the transcripts of genes involved in metabolism. Dietary lipids may also affect the expression of genes potentially involved in cell transformation and tumorigenesis. The effect on gene expression can be a consequence of the above mentioned changes in cell membranes and signal transduction pathways to the nucleus. Moreover, lipids could exert a direct, fast and acute control of the expression of target genes⁷⁵. This effect of fatty acids or their metabolites may be directly mediated by binding to various nuclear receptors (PPAR, LXR, RXR, HNF-4 α) and activating their transcription factor action, or indirectly mediated as the result of changes in the abundance of regulatory transcription factors (SREBP-1c, NF κ B, c/EBP β , HIF-1 α). Some of them have recently appeared to regulate cell proliferation, differentiation and survival⁷⁶. Dietary lipids and their metabolites may exert some of their effects on carcinogenesis by affecting gene expression or the activities of molecules involved in signal transduction pathways, such as ErbB-Ras-MAPK. Thus, the treatment with high concentrations of EPA correlated with increases in c-erbB2/neu mRNA levels in γ -*Ha-ras*-transfected MCF-7 cells, whereas no significant effect of LNA or EPA was observed in MCF-7 breast cancer cells, suggesting that EPA effect on the HER 2/neu expression is enhanced by the presence of high levels of another oncogene⁷⁶. In another study c-*Ha-ras* protein levels were shown to decrease in MCF-7 mammary tumours of mice fed fish oil⁷⁷. We have later shown that high corn and olive oil diets differentially modulate the expression of ErbB genes in experimental breast cancer. The stimulating effect of the high corn oil diet was associated with an increase in the ratio between the levels of the 9.5 kb transcript and the 2.7 kb transcript of c-erbB1, whereas the protective effect of the high olive oil diet was associated with a decrease in that ratio. The 9.5 kb mRNA codes the 170 kDa functional EGF receptor and the 2.7 kb mRNA corresponds to a truncated form without enzymatic activity and which, once secreted, seems to act as a negative regulator of different members of the ErbB family. The high olive oil diet also tended to decrease c-erbB2/neu mRNA and p185RbB2/Neu protein levels, whereas the high corn oil diet did not modify the expression of this receptor^{18,71}. Other authors have later reported that *in vitro* treatment with OA decreases c-erbB2/Neu expression in breast cancer cells with *neu* amplification⁷⁸. Moreover, we have not found changes in the c-*Ha-ras*1 mRNA levels in DMBA-induced mammary adenocarcinomas due to high corn or olive oil diets. In contrast, as mentioned above, dietary lipids seem to differentially modulate the Ras activity^{18,71}. We have also analyzed the expression of the PCPH gene, a protooncogene that acts synergistically with *ras*. We found an association between the PCPH expression pattern and cell

differentiation degree, and a down-regulation of this gene in response to a high n-6 lipid diet^{71,79}.

As discussed previously, the modulating effect of high fat diets on tumorigenesis may be mediated through changes in eicosanoid signaling, by regulating the activity and/or the expression of the enzymes involved in their production. The promoting effect of n-6 PUFA on mammary and colon tumorigenesis have been associated with overexpression of COX2 and, to some extent, COX1 genes, whereas the antitumoral effect of n-3 PUFA could be exerted through the inhibition of the COX2 expression^{57,58,80,81}. In CaCo-2 colon cancer cells, DHA has also been shown to inhibit inducible nitric oxide synthase (iNOS) and expression of related proinflammatory genes⁸². However, in the rat AOM induced colon cancer model, neither iNOS nor COX2 expression were affected by DHA⁸³. Some hydroperoxides aroused from LA have also been shown to upregulate the COX2 expression in human colon adenoma and carcinoma cells⁸⁴.

Several nuclear proteins have also been reported to be regulated, either directly or indirectly, by fatty acids. Thus, high fish oil diet reduced c-myc expression in murine MCF7 breast tumours⁷⁷, whereas diets rich in LA increased the expression of this oncogene in normal mammary gland and in rat PhIP-induced benign breast tumours⁸⁵. Fatty acids have also been shown to regulate p53 expression. Thus, in mammary tumour cells, the addition of LA increased DNA synthesis and decreased p53 protein levels, whereas DHA induced further suppression of cell proliferation and upregulated expression of p53⁸⁶. On the other hand, in the AOM induced colon cancer model, dietary corn oil (10%) did not modify p53 mRNA and protein levels, but decreased mitochondrial localization of p53 and increased inactive cytosolic p53, reducing its activity⁸⁷. In human prostate cancer PC-3 cells the growth stimulating effect of AA, which was not observed with EPA and OA, has been related with an induction of c-*fos* and COX 2 mRNA in a dose-dependent manner²⁹. Dietary lipids can also affect the expression of the suppressor genes BRCA1 and BRCA2. MCF-7 tumour cells treated with LA and oestradiol showed an appreciably decreased expression of BRCA1 mRNA compared with controls or cells treated with LA or oestradiol alone, suggesting a synergistic effect between both factors⁸⁸. In contrast, treatment with n-3 PUFA (EPA and DHA) increases the BRCA1 and BRCA2 mRNA expression in MCF 7 and MDA MB231 tumour cell lines, but no effects were observed with n-6 PUFA (AA) treatment⁸⁹.

Some fatty acids have also been reported to affect the expression of cell to cell adhesion molecules, such as E-cadherin. In lung, colon, breast, melanoma, and liver cancer cells GLA, but not LA and AA, have been associated with upregulation of E-cadherin and this increased expression has been correlated with re-

duced *in vitro* invasion and increased aggregation, in accordance with the anticancer properties of GLA⁹⁰. GLA has also been found to upregulate the expression of maspin mRNA and protein, which is associated with a reduced motility of cancer cells. LA had an inhibitory effect and LNA and AA had no significant effect⁹¹.

Another mechanism of action of the dietary lipids on cancer may be related to a unspecific effect due to their energetic supply. We have associated this effect with an influence on the regulation of the hepatic expression of lipid metabolism-involved genes, such as CPT I and mitochondrial HMG-CoA synthase. The expression results, together with observed changes in the lipid profile and in the body weight and mass, suggested that the mammary cancer-bearing state modified the normal regulation of expression of these genes by dietary lipids, and that changes in the PPAR α mRNA expression could have contributed to such alterations. The fat mobilization and the non-induced hepatic fatty acid oxidative capacity in mammary tumour-bearing animals fed a high corn oil diet suggested a preferential redirection of long chain fatty acids into energetic and specific pathways of the extra hepatic cancer cells. This effect was more remarkable with increasing tumour aggressiveness⁵⁴. New high throughput molecular technologies are allowing examining even subtle gene expression changes following dietary lipid administration or fatty acid treatment. Hence, using cDNA microarrays we have identified and validated 4 new differentially expressed genes in experimental mammary adenocarcinomas due to a high corn oil diet: submaxillary gland α -2u globulin, VDUP1 (vitamin D3-upregulated protein 1), the paternally imprinted gene H19 and the unknown expressed sequence tag (EST) Bn.52585. The downregulation of these genes in the high n-6 fat diet tumours was associated with their clinical behaviour and anatomopathological features⁹². We have also determined that the expression of these genes is not modified by a high virgin olive oil diet. Given that VDUP1, the riboregulator H19 and α -2u globulin have been associated with cell proliferation and differentiation, our results suggest that the differential modulating effects of high corn oil and virgin olive oil diets on experimental mammary carcinogenesis could be, at least partially, mediated by changes in their expression⁷¹.

In the human breast cancer cell line T47D, microarray analysis has revealed that treatment with LA induces changes in oestrogen receptor α , G13 α G protein and p38 MAP kinase gene expression, as well as in genes involved in RNA transcription and cell cycle regulation⁹³. In the ACl rat model for spontaneous, age-onset prostate cancer, a number of genes have been shown differentially expressed due to a high beef fat diet. They are genes involved in inflamma-

tion, glucose and fatty acid metabolism, androgen metabolism, potential tumour suppression and protein kinase activity, as well as intracellular and extracellular matrix molecules, growth factors and androgen responsive genes⁹⁴. Furthermore, microarray analysis has linked the protective effect of dietary n-3 PUFA on AOM induced colon carcinogenesis with specific alterations of the gene expression profile in comparison with n-6 PUFA and n-9 MUFA, which generate a similar pattern of expression. Interestingly, in this study, n-9 MUFA did not have chemopreventive activity, probably because of the presence in the diet of a highly fermentable fiber source⁶⁵.

Table 1 shows a summary of the data available up to now, which have already been described in this section, about the modulatory effects of dietary lipids on gene expression in cancer.

Modulation of the immune response

Dietary lipids are able to modulate the immune response and modify inflammatory cytokine production⁷⁸. Eicosanoids could be involved in the immunosuppressive effect of dietary PUFA that has been observed in several studies^{95,96}. Thus, eicosanoids modulate the inflammatory and immune response, besides playing a critical role in platelet aggregation, and cell growth and differentiation. In general, AA-derived eicosanoids have proinflammatory effects -although PGE₂ has been suggested to have also anti-inflammatory properties- whereas EPA-derived eicosanoids have antiinflammatory effects^{97,98}. Therefore, diets with a high ratio n-6:n-3 PUFA would likely increase the generation of inflammatory eicosanoids, whereas diets with a low ratio of n-6:n-3 would decrease such production⁹⁷. PGE₂ inhibits the immune response by inhibiting macrophages, T- and B-lymphocytes, and stimulating immunosuppressor cells. PGE₂ can also inhibit the production of T-helper type 1 cytokines such as interleukin (IL)-2, interferon- γ , and IL-12, whereas it can increase the production of T-helper type 2 cytokines (IL-4, IL-5 and IL-10). Consuming n-3 PUFA has also been shown to reduce the production of IL-1, IL-2 and tumour necrosis factor (TNF) *in vitro* and *in vivo*^{95,92}. Since n-3 PUFA suppress the tissue levels of AA and production of PGE₂, increased intake of n-3 PUFA would lead to enhancement instead of suppression of immune responses. This fact indicates that antiinflammatory and immunomodulatory actions of n-3 PUFA may be mediated by eicosanoids independent mechanisms, including actions upon intracellular signalling pathways, transcription factor activity, and antioxidant status^{95,96}. Some nuclear receptors are reasonable candidates to mediate PUFA actions in the immune system. For example, PPAR activation by fatty acids has been shown to suppress the expression of cy-

TABLE 1. Dietary lipids and gene expression in cancer

Type of tumour	Dietary fatty acid involved	Regulated genes	Dietary lipid effect	Ref
Breast				
v-Ha-ras transfected MCF-7 cells	EPA	c-erbB2/neu (mRNA)	upregulation	76
rat DMBA-induced breast tumours	HCO diet vs HVOO diet	c-erbB1 (9.5 Kb mRNA) c-erbB1 (2.7 Kb cDNA)	upregulation downregulation	18, 71
	HVOO diet vs LCO diet	c-erbB2/neu (mRNA and protein)	downregulation	18, 71
	HVOO diet vs HCO or LCO diets	p21 Ras (protein activity)	downregulation	16, 71
	HCO diet vs LCO diet	PCPH (mRNA)	downregulation	71, 79
BT 474 and SKBr-3 human breast cancer cells	OA	c-erbB2/neu (protein)	downregulation	78
murine MCF-7 breast tumours	HCO diet vs HFO diet	p21Ras (protein)	upregulation	77
rat NMU-induced mammary tumours	high n-3 PUFA diet vs high n-6 PUFA diet	COX-1 and COX-2 (protein)	downregulation	80
murine MCF-7 breast tumours	HCO diet vs HFO diet	c-myc (mRNA)	upregulation	77
rat PNP-induced benign breast tumours	high LA diet vs control low-lal diet	c-myc (mRNA)	upregulation	85
MNU rat mammary tumour cells	LA vs DHA	p53 (protein)	downregulation vs upregulation	86
MCF-7 human breast cancer cells	LA plus oestrogen	BRCA1 (mRNA)	downregulation	88
MCF-7 and MDA-MB231 human breast cancer cells	EPA and OHA	BRCA1 and BRCA2 (mRNA)	upregulation	89
MCF-7 human breast cancer cells	LA	E-cadherin (protein)	downregulation	90
rat DMBA-induced breast tumours	HCO diet vs HVOO or LCO diets	submaxillary gland alpha-2u globulin (mRNA) VDUP-1 (mRNA) H19 (mRNA) EST (n. 22385) (mRNA)	downregulation	71, 92
T47D human breast cancer cells	LA	44 genes - involved in transcriptional regulation, cell cycle, G protein signaling and MAPK cascade (mRNA)	35 upregulated genes 9 down-regulated genes	83*
Colorectal				
rat AOM-induced colon cancer tumours	HSFA diet vs LCO or HFO diets	COX-2 (protein)	upregulation	81
LT97 adenoma and SW480 carcinoma colon cells	LA hydroperoxide	COX-2 (mRNA)	upregulation	84
rat AOM-induced colon tumours	HCO diet	p53 (protein activity)	downregulation	87
CaCo-2 human colon cancer cells	DHA	MOS (mRNA) FNS (mRNA) cyclic GMP (mRNA) NFKB (mRNA)	downregulation downregulation downregulation downregulation	82*
rat AOM-induced colon tumours	high n-3 PUFA diet vs high n-6 PUFA diet	Initiation stage: 7 genes - kinases, metabolism/redox, trafficking and transport, transcription	3 upregulated / 4 downregulated	83*
	or n-9 MUFA diets	Promotion stage: 17 genes - apoptosis, cell cycle, transport, cytoskeleton, metabolism/redox, transcription, kinases and receptors (mRNA)	9 upregulated / 8 downregulated	
Prostate				
PC-3 human prostate cancer cells	AA	c-fos and COX-2 (mRNA)	upregulation	29
AC1 rat prostate tumours	HSFA diet	55 genes - inflammation, glucose and fatty acid metabolism, androgen metabolism potential tumour suppression, protein kinase activity, intracellular/extracellular matrix, growth factors, androgen responsive genes (mRNA)	27 upregulated genes 28 downregulated genes	94*
Others				
human lung, colon, breast, melanoma and liver cancer cells	OLA	E-cadherin (protein)	upregulation	90
human colon, breast and melanoma cancer cells	OLA vs LA	maspin (mRNA)	upregulation	91

LA: linoleic acid; OLA: gamma-linolenic acid; OA: oleic acid; AA: arachidonic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid; HCO: high corn oil diet; LCO: low corn oil diet; HFO: high fish oil diet; HSFA: high saturated fatty acids diet; HVOO: high virgin olive oil diet; results obtained by means of gene expression array technology

tokines and other molecules involved in the inflammatory response⁸⁷.

Although the effects of olive oil on the immune system are less known, the available data indicate that it may be a potent mediator of the immune response and modify inflammatory cytokine production²⁸. OA has been demonstrated to have anti-inflammatory effects⁹⁵. Moreover, some phenols in extra virgin olive oil can inhibit the production of inflammatory eicosanoids and cytokines *in vitro* and *in vivo*⁹⁸. Feeding rats a 15% olive oil diet had a colon cancer-inhibiting role in their offspring, predominantly by increasing the total number of lymph cells and the number of CD8(+) lymphocytes⁹⁹. However, consumption by healthy human subjects of a diet rich in OA did not appear to bring about general suppression of immune cell functions¹⁰⁰.

CONCLUSIONS AND PROSPECTS

As it has been discussed in this article, there is a wealth of evidence supporting the relationship between dietary lipids and cancer, particularly those of the breast, colon and rectum and prostate. The main support comes from the international correlational studies and, especially, from experimental ones. The evidence from human analytical studies is less consistent because of several conflicting findings, probably due to methodological issues. Although further studies in humans are needed to state unequivocally the link between dietary lipids and cancer, the current available data show that dietary lipids may modulate the multistep carcinogenesis process. Experimentally, it has been clearly demonstrated that quantity and type of lipids in the diet are the essential factors in this relationship. Thus, whereas high dietary intake of n-6 PUFA, primarily LA, or saturated fat has tumor-enhancing effects, that of long chain n-3 PUFA, EPA or GLA would have inhibitory effects. MUFA, mainly OA, present in high quantities in olive oil, seem also to be protective although some inconsistent results have been reported. This fact is probably related to the great diversity of types and varieties of commercially available olive oil, not only with a variable relative content of LA and OA, but also, and maybe more important, with different content of its minor compounds. Abundant data exist about their role as bioactive compounds. We have obtained important results showing that high virgin olive oil diets have a negative modulating effect on the experimental mammary carcinogenesis in comparison with the clear stimulating effect of high corn oil diets. This effect is translated both into a tumour clinical behaviour and histopathological features compatible with a lower degree of malignancy. However, the effect of high virgin olive oil diet is not as strong as to regress mammary tumours already established, indicating an

effect on reduction of the tumour growth rate rather than on a real tumour regression. These results also suggest the unsuitability of using high olive oil diets as therapeutic agents of cancer *per se*. On the other hand, it can be considered the administration of certain fatty acids in combination with cancer drugs as modulators of their cytotoxicity. This attractive possibility is based on *in vitro* studies showing a synergistic interaction between specific fatty acids and some drugs.

Furthermore, experimental studies have provided evidence of several putative mechanisms of action whereby dietary lipids may modulate several stages in the carcinogenic process. Lipids, especially during the cancer promotion but also during the initiation, can act influencing the hormonal status; modifying cell membranes structure and function; signal transduction pathways and gene expression; and modulating the immune system. Again, there is accumulated experimental evidence about the effects of the minor compounds of virgin olive oil in some of these processes. Although further studies are needed to evaluate and verify these mechanisms in humans, based on the multiple ways dietary lipids can act, they may have an important influence on carcinogenesis.

The current knowledge about the link between dietary lipids and cancers allow to characterise dietary lipids as functional foods, what implies that they may have a biological activity beyond their nutritional value, and, as such, to have a potential impact on the population health and the risk of disease. Consequently, from the point of view of public health, studies supporting a protective role for certain dietary lipids in cancer would be placed in the primary and secondary prevention of cancer field, and should allow us to specify scientifically healthy dietary advices to the population. Particularly, and as a good example of this situation, the available scientific data about the beneficial effects of virgin olive oil intake on health may allow designing future prevention strategies based on the regular intake of this oil in the diet¹⁰¹. The beneficial effects of the virgin olive oil intake to prevent cancer should be contextualized within the concept of the dietetic and lifestyle habits, especially from the early decades of life with an special attention to the adolescence. Anyway, it must be taken into account that human diet involves the interaction between its multiple components and with other factors, for instance, environmental ones, and that their final effects depend on the individual genetic and epigenetic background.

In conclusion, although some important questions remain to be answered, compelling evidence exists about the modulating effect of olive oil and other dietary lipids on the appearance and progression of some cancers, mainly of the breast, colon and prostate. The better knowledge of their differential ef-

fects and their mechanisms of action is essential to design future strategies of cancer prevention based on nutritional and lifestyle habits of the population.

ACKNOWLEDGEMENTS

The works of the authors cited in this were supported in part by grants from *Comissió Interministerial de Ciència y Tecnologia* (CICYT SAF92 0557), *Pla de Recerca de Catalunya, Generalitat de Catalunya*

(GRQ93-2004, 1995SGR-495), *Comissió Interministerial de Ciència y Tecnologia* (CICYT OLI96-2114), *Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya i Balears* (ACMIB-2002 165.985), *Plan Nacional de I+D+D 2000-2003* and FEDER (BFU 2005-07541).

Laura Grau has a Pre doctorate scholarship from *Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeus*.

References

1. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *GLOBAL CAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide*. IARC Cancer Base No. 5, Version 2.0. Lyon: IARC Press, 2004. <http://www.dep.iarc.fr>
2. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a global perspective*. Washington, DC: American Institute for Cancer Research, 1997.
3. Goldthorpe SA, Sengulim Salgado M, Ryan GT, et al. *Harvard report on cancer prevention*, volume 5: fulfilling the potential for cancer prevention: policy approaches. *Cancer Causes Control*, 2002;13:199-212.
4. Kralovich R, Nati J, Owen RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colon: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*, 1989;20:2209-18.
5. Kulkarni LN, Nataraja AS, Ganney RV. Dietary fat and prostate cancer: current status. *J Natl Cancer Inst*, 1990;81:434-38.
6. Lee MM, Lin SS. Dietary fat and breast cancer. *Anti Rev Nutr*, 2000;20:221-48.
7. Freedman LS, Pollockman N, Kupus V, et al. A comparison of 39 diets: dietary adjustments for evaluating the fat-breast cancer relationship. *Int J Epidemiol*, 2000;May 3.
8. Kusin I, Vlasovans E. Dietary fat and cancer. *Am J Med*, 2002;113 (Suppl 9B): S65-70.
9. Dennis LB, Sureshwar LG, Smith BL, Stewart RK, Robbins ME. Problems with the assessment of dietary fat in prostate cancer studies. *Am J Epidemiol*, 2004;160: 430-44.
10. Rose DP. Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancers: evidence from *in vivo* experiments and animal studies. *Am J Clin Nutr*, 1997;66(6 (Suppl): S154-22.
11. Wynder RL, Cohen LA, Mutsaers R, Willets B, Dwyer JT, Blackburn G. Breast cancer: weighing the evidence for a protective role of dietary fat. *J Natl Cancer Inst*, 1997;89:706-15.
12. Carroll KK, Khoo HC. Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Prog Biochem Pharmacol*, 1975;10:549-55.
13. Ip C. Fat and essential fatty acid in mammary carcinogenesis. *Am J Clin Nutr*, 1987;43:8218-24.
14. Escrich E, Muntané I, Ribolla T, Goloni I, Solanas M, Segura R. Efectos de una dieta hiperlipídica sobre la carcinogénesis mamaria experimental: contenido lipídico de tumores. *Neoplasia*, 1992;9:54-6.
15. Escrich E, Solanas M, Sàez M, et al. Dietary polyunsaturated n-6 lipids effects

- on the growth and fatty acid composition of rat mammary tumours. *J Nutr Biochem*, 2001;12:536-40.
16. Solanas M, Moral R, Escrich E. The stimulating effect of a high fat n-6 polyunsaturated diet on rat DMBA induced mammary tumours is not related to changes in c-Myc and bcl-2 mRNA tumour expression. *Nutr Res*, 2001;21:1261-73.
17. Solanas M, Huelado A, Costa I, et al. Effects of high caloric diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA induced mammary tumours composed with a high corn oil diet. *Int J Oncol*, 2002;21:745-53.
18. Moral R, Solanas M, Garcia G, Colomer R, Escrich E. Modulation of EGFR and Her expression by n-6 and n-9 high fat diets in experimental mammary adenocarcinomas. *Oncol Rep*, 2005;13:1417-24.
19. Costa I, Espadas J, Solanas M, Moral R, Escrich E. Histopathologic characteristics of chemopically induced mammary adenocarcinomas in rats fed diets high in n-6 polyunsaturated lipids. *Vitamins Arches*, 2001;45:510-1.
20. Costa I, Solanas M, Escrich E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz[a]anthracene in the rat. A comparative analysis with human breast tumours. *Arch Pathol Lab Med*, 2002;126: 915-22.
21. Costa I, Moral R, Solanas M, Escrich E. High fat with cholesterol promotes the development of high histologic grade rat DMBA induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not. *Breast Cancer Res Treat*, 2004;86:225-35.
22. Kluefel DM, Bell CW. Fatty acids and colon cancer in experimental models. *Am J Clin Nutr*, 1997;66(6 (Suppl):S1530-8.
23. Ip C. 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*, 1997;66 (6 (Suppl):S1525-9.
24. Welsh JW. Relationship between dietary fat and experimental mammary tumour genesis: a review. *Anticancer Cancer Res*, 1992;52(7 (Suppl):S2040-8.
25. Zisman L, Shrivasth P, Madar Z, et al. Tumor promoting and tumor protective effects of high-lipid diets on chemically induced mammary cancer in rats. *Anticancer Res*, 1997;17:549-58.
26. Takegishi M, Ueda H, Shirota K, Higuchi Y, Yoshida S. Lack of promotion of carcinogenesis by high-dose safflower oil. *Cancer*, 1997;80:457-63.
27. Barbot R, Fernandez-Baños F, Navarro E, et al. Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabo-

- lism and local prostaglandin E(2) synthesis. *Carc*, 2000;34:191-9.
28. Stark AM, Madar Z. Olive oil as a functional food: pharmacology and nutritional approaches. *Nutr Rev*, 2002;60(1):70-6.
29. Hughes-Fulford M, Chen Y, Pandeywala BB. Fatty acid regulates gene expression and growth of human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis*, 2001;22: 201-7.
30. Gith G, Yasuda F. Antioxidant and other activities of phenolics in olive-olive oil, typical components of the Mediterranean diet. *Lipids*, 1999;34 (Suppl):S25-6.
31. Owen RW, Haubner B, Watzels G, Hilde, Spiegelhalder B, Ritsch H. Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur J Cancer Prev*, 2004;15:104-28.
32. Kurbeski D, Weber BS, Atarfi H, DM. Dietary fat versus colon content at initiation and promotion of 7,12 dimethylbenzo[*a*]anthracene-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res*, 1984;44:3174-7.
33. Korkalainen PK, Korp A, Lehtinen J, Kytömaa M, Mustonen P. Lipid dynamics and peripheral effects of n-6 polyunsaturated fatty acids. *Clin Phys Physiol*, 1993;27(1):1-7.
34. Aho E, Aro Magu MP. The role of n-6 saturated lipids. *Biol Cell*, 2004;96:657-67.
35. Svederwae K, Davis CD. Proliferation, development and DNA adduct levels in the mammary gland of rats given 2-amino-1-methyl phenylantazo [3,5-*b*] pyridine and a high fat diet. *Carcinogenesis*, 1988;9(1):269-85.
36. Thompson H, Zhu Z, Bann S, Hays K, Loftus T, Ip C. Morphological and biochemical status of the mammary gland as influenced by a conjugated linoleic acid: implications for a reduction in mammary cancer risk. *Cancer Res*, 1997;57:3667-72.
37. Soti HA. N-3 fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. *Br J Nutr*, 2002;87:193-8.
38. Larsson S, Kumpul M, Tegeblom-Sundberg M, Wolk A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr*, 2004;79(3):45-55.
39. Reddy BS, Masura Y. Tumor promotion by dietary fat in azoxymethane induced colon carcinogenesis in female F344 rats: influence of amount and source of dietary fat. *J Natl Cancer Inst*, 1984;72:743-50.
40. Kim GN, Newmark HE, Reddy BS. Chemopreventive effect of sphonol on colon cancer. *Carcinogenesis*, 1996;19:287-90.
41. Hesthaven JP, Verboom L, Vermeulen A. Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*, 1987;61:164-70.
42. Marfat M, Aracki R, Brumsey G, Nunez EA. Modifications of fiber properties

- of human sex steroid binding protein by monosterified fatty acids. *J Biol Chem*. 1989;264:2934-9.
45. Hill DJ, Goldfarb P, Williams REO. Gut bacteria and aetiology of cancer of the breast. *Lancet*. 2011;2:472-3.
46. Reyes N, Reyes L, Tawari R, Gelinetti J. Effect on histone acetylase proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D. *Cancer Lett*. 2004;209:25-35.
47. Ghimic SK, Muthay AL, Lu SP, Mangano HJ, Vasek WL. Dietary fat and protein intake differ in modulation of prostate tumor growth, prostatic secretion and metabolism, and prostate gland prostatic binding capacity in rats. *J Nutr*. 1997;127:225-32.
48. Cohen EA. Mechanisms by which dietary fat may stimulate mammary carcinogenesis in experimental animals. *Cancer Res*. 1984;44:5908-10.
49. Sylvester PY, Russell EJ, Ep BE. 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*. 1980;40:57-62.
50. Luzzani F, Khabkhar MA, Dandona P. Unsaturated fatty acids potentiate insulin action on adipocytes. *Prog Lipid Res*. 1988;27:511-5.
51. Escrich E. Hormonal Dependence of Experimental Mammary Tumours. *Rev Esp Fisiol*. 1991;36:81-93.
52. Escrich E. Endocrine Aspects of Breast Cancer. In: Cardoso F, editor. *Seminology: Gynecology: Mammary Gland*. Ediciones 1986; p. 399-403.
53. Moral R, Solanas M, Mantzavinos EM, Hara D, Escrich E. Influence of DMSA produced mammary cancer on the liver CYP1A and HMG-CoA synthase and PPAR mRNA expression in rats fed low or high energy diet. *Int J Mol Med*. 2004;14:285-7.
54. Liu Z, Desaki T, Watanabe H, Kato N. High fat diet enhances colon cell proliferation and carcinogenesis in rats by elevating serum leptin. *Int J Oncol*. 2001;19:1039-44.
55. Hu X, Jitrapa S, Marble NJ, Cleary MP. Leptin a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:1304-11.
56. Spector AA, Burns CP. Biological and therapeutic potential of membrane lipid modification in tumors. *Cancer Res*. 1987;47:329-37.
57. Chandran MT, Chelima S, Field CE, Grau ML, Venkatarajan J, Chandrasekhar TE. Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J*. 1991;5:2701-8.
58. Hillbert A, Turner N, Storch LH, Elise PL. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Redox Rev Cardio Physiol Sci*. 2005;30:135-49.
59. Dochow W, Milyukovskaya E, Bogdanov M. Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1688:19-30.
60. Samson K, Komen K. Functional fatty acid membranes. *Nature*. 1992;359:72.
61. Ma DWL, Seo I, Davidson LA, et al. n-3 PUFAs alter vascular lipid composition and resist protein localization in mouse colon. *FASEB J*. 2004;18:1040-2.
62. Escrich PY, Ocano A, Bhas C, et al. Role of lipid polymorphism in G-protein membrane interactions: monomeric-phospholipids and peripheral proteins binding to membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:11375-80.
63. Yang X, Alemany R, Casas J, Kuroki K, Langer SM, Escrich PY. Influence of the membrane lipid structure on signal processing via G-protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol*. 2005;68:210-7.
64. Sekizawa K. Interactions between DNA replication related proteins and phospholipid vesicles at early. *Chem Phys Lipids*. 1994;75:225-30.
65. Tontasou ML, Anvari D, Magari MV. Changes of nuclear membrane lipid composition affect RNA nucleocytoplasmic transport. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;258:470-80.
66. Haddad W, Elmour K, Barret D. 1993. Gap junction function and cancer. *Cancer Res*. 1993;53:3475-85.
67. Jiang WG, Bryce RP, Mansel RE, Gannon JB. Inhibits and regulates gap junction communication in epithelial cells and their interaction with tumor cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1997;6:707-16.
68. Sumida G, Graber K, Nunez E. Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1995;48:107-22.
69. Jump DB. Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2004;41:31-78.
70. Yoshitaka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J*. 1991;5:484-93.
71. Palaniappan R, George MB, Akavali SB, Walker FM, Oller K, Roberts JD, et al. Polyunsaturated fatty acids stimulate $\beta 1$ integrin mediated adhesion of human breast carcinoma cells to type I collagen by activating protein kinases C and μ . *Cancer Res*. 2001;61:2445-52.
72. Murray KR, Wagers O, Chen LX, et al. Protein kinase C $\beta 1$ and $\beta 2$ in α 3 fatty acid-mediated inhibition of colon carcinogenesis. *J Cell Biol*. 2002;157:915-24.
73. Escrich E, Solanas M, Mora M. Olive oil and other dietary lipids: an aetiological experimental approach. In: Olive Oil and Health. J L, Quiles C, Ramirez-Tortosa M, Lopez-Jarama J, eds. CAB International, Wallingford; 2006. p. 517-74.
74. Singh I, Haddad W, Reddy BS. Dietary fat and colon cancer: modulating effect of type and amount of dietary fat on ras p21 function during promotion and progression stages of colon cancer. *Cancer Res*. 1997;57:233-8.
75. Davidson LA, Lipton RB, Jiang X, Ghapkar BS. Carcinogen and dietary lipid regulate ras expression and localization in rat colon without affecting farnesyltransferase kinetics. *Carcinogenesis*. 1999;20:785-91.
76. Kuroki K, Arigome Y, Goto Y, et al. Decrease in histone H3 and methylene as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis*. 1999;20:1019-24.
77. Clarke SD, Jump DB. Regulation of gene transcription by polyunsaturated fatty acids. *Prog Lipid Res*. 1993;32:439-80.
78. Tewari BK, Mukhopadhyay K, Telang SC, Osborne MP. Modulation of gene expression by selected fatty acids in human breast cancer cells. *Anticancer Res*. 1991;11:1785-9.
79. Fernandes G, Venkatarajan J, Chandrasekhar TE. Modulation of breast cancer growth in nude mice by n-3 lipids. *World Rev Nutr Diet*. 1991;66:489-503.
80. Meunier JL, Vellou L, Golomer E, Lajth B. Oleic acid, the main mono-unsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/Neu (erb B-2) expression and synergistically enhances the growth-inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin) in human breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification. *Anticancer Res*. 2007;27:309-11.
81. Solanas M, Kewali K, Bouquet A, Costa I, Martinez A, Notari V. Down-regulated expression of the P191 protein oncogene in coloblastoma tumours induced with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Mol Carcinog*. 2002;15:219-27.
82. Haddad W, Song L. Inhibition by dietary modulation of cyclooxygenase 1 and 2 in N615-induced rat mammary tumors. *Int J Lipid*. 1999;4:523-8.
83. Rao CV, Moore T, Ishikawa C, Reddy BS. Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. *Cancer Res*. 2001;61:1927-33.
84. Narayanan BK, Narayanan NK, Saha B, Reddy BS. Modulation of inducible nitric oxide synthase and related pro-inflammatory genes by the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in human colon cancer cells. *Cancer Res*. 2003;63:972-8.
85. Davidson LA, Nguyen DV, Hekkanen RM, et al. Chemopreventive n-3 polyunsaturated fatty acids reprogram growth signals during colon cancer initiation and progression in the rat. *Cancer Res*. 2004;64:6797-804.
86. Innek D, Jilkaev S, Jozkowiec A, Nohl H, Mattar B, Schulte-Hermann R. Dietary lipid hydroperoxides enhance expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human colorectal tumour cells. *FASEB J*. 2005;19:970.
87. Davis CD, Strydom E. Analysis of EGF, TGF α , and α 5 in 2-aminofluorenyl (2-aminofluorenyl) [4,5] pyrene diol induced mammary tumors using RT-PCR. *Carcinogenesis*. 1993;14:3087-92.
88. Tibbitts JB, Duzynkiewicz Z, Cohen LA, Bonn Z. Effects of linoleic acid on mammary tumor cell proliferation are associated with changes in p53 protein expression. *Int J Oncol*. 1995;5:81-7.
89. Wei H, Wu X, Oller K, et al. Dietary corn oil promotes colon cancer by inhibiting non-leukemia-dependent apoptosis in azoxymethane-treated rats. *Exp Biol Med*. 2004;229:1017-25.
90. Katchhap S, Dange P, Ghosh SN. Effect of n-6 polyunsaturated fatty acid (linoleic acid) on BRC41 gene expression in MCF-7 cell line. *Cancer Lett*. 2000;150:115-20.
91. Bernad-Gilish D, Vissa Soliman C, Antoine Vincent D, et al. Differential effects of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on BRC41 and BRC42 gene expression in breast cell lines. *Br J Nutr*. 2002;87:281-9.
92. Jiang WG, Haseoy S, Horiuchi DF, Bryce RP, Mansel RE, Gannon JB. Inhibits and regulates expression of insulin and the mobility of cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;237:639-44.
93. Escrich E, Mora M, Garcia G, Costa I, Sanchez LA, Solanas M. Identification of novel differentially expressed genes by

- the effect of a high fat diet on experimental breast cancer. *Mol Carcinog.* 2001;20:75-8.
93. Reyes N, Reyes L, Ertava B, Giebelier J. Effect on function and on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D. *Cancer Lett.* 2004;209:25-35.
94. Reyes N, Latopentes M, Mitaldinas A, Giebelier J. Microarray analysis of diet-induced alterations in gene expression in the M3 rat prostate. *Eur J Cancer Prev.* 2002;11(Suppl 2):S17-2.
95. Hwang D. Fatty acids and immune responses - A new perspective in searching for clues to mechanism. *Ann Rev Nutr.* 2000;20:431-56.
96. Calder PC, Yaqoob P, Times E, Wallace FA, Miles EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Brit J Nutr.* 2002;87(Suppl 1):S51-8.
97. Smitig TM. Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: mechanisms and effects. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 2005;152:510-24.
98. Miles EA, Zamboni P, Calder PC. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition.* 2009;25:589-94.
99. Kossy G, Manta Z, Repkoti H, et al. Transplacental effect of a 15% olive oil diet on functional activity of immune components in the spleen and colon tissues of rat offspring. *Obstet Rep.* 2001;36:1945-9.
100. Yaqoob P, Knapper DA, Wootly JH, Williams GM, Newsholme EA, Calder PC. Effect of olive oil on immune function in middle aged men. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67:129-35.
101. Alvarez de Cienfuegos G, Badimon L, Barja G, et al. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. Consensus report. *Lipids (Spring).* 2004. *Eur J Clin Invest.* 2005;35:421-4.

Antecedentes y resumen de los resultados:

En este artículo se remarca la importancia de las evidencias experimentales en el estudio de la relación de los lípidos de la dieta con el cáncer, en particular en los de colon, recto, próstata y, en especial, en el cáncer de mama, dado que ha sido el más estudiado. Se recogen los resultados y las conclusiones más aceptadas sobre esta relación, y los mecanismos que intervienen, en base a lo publicado en la literatura, tanto por el grupo investigador como por otros autores. En concreto, este artículo, del que la doctoranda es coautora, integra, de forma detallada y extensa, los conocimientos adquiridos por el GMECM, a partir de los múltiples estudios y trabajos realizados y publicados en la literatura y que se incluyen en este artículo, sobre la relación lípidos de la dieta y cáncer de mama, con otros similares y complementarios en este tema y ampliados a otros cánceres. Este artículo se presenta como parte de esta Tesis Doctoral ya que incluye resultados de los estudios morfológicos llevados a cabo, específicamente, por la doctoranda y recoge algún dato inédito, que se comenta a continuación.

El cáncer ocupa el segundo lugar como causa de mortalidad, después de las enfermedades cardiovasculares, en los países desarrollados, por su elevada incidencia y, aún, subóptimo manejo. Mientras que, a nivel mundial, en el hombre, el cáncer más común es el de pulmón, seguido por el de próstata, estómago, colon y recto, en las mujeres, el más frecuente es el de mama, seguido del de cérvix, colon y recto, pulmón y estómago. No obstante, como ya se ha tratado en el apartado B de la “Introducción”, se recogen diferentes tasas de incidencia y mortalidad, de los diversos cánceres, según las áreas del mundo que se analizan, observándose las mayores diferencias entre los países desarrollados y los no desarrollados. Es de destacar que la población emigrada de un país de origen a otro de adopción asume las tasas de incidencia y de mortalidad por cáncer del último en un período de una a dos generaciones. Estas diferencias geográficas sugieren un papel ambiental en la etiopatogenia del cáncer, siendo la nutrición uno de los factores más relevantes. En este sentido, se cree que un tercio de todos los cánceres se asocian a dieta y que, por tanto, cambios en hábitos individuales y sociales podrían reducirlos. Entre los numerosos componentes de la dieta que se han relacionado con el cáncer, los lípidos se han revelado como uno de los más significativos. Estudios epidemiológicos y experimentales han establecido una relación entre grasa de la dieta y los cánceres de mama, colon y recto y próstata, como ya se ha comentado en el apartado B.1.c de la “Introducción”. Otros tumores de otras localizaciones como piel (melanoma), cavidad oral, tracto digestivo superior, estómago, páncreas, hígado, endometrio y ovario, entre otros, también podrían mostrar esta relación con los lípidos de la dieta, aunque en menor medida. Mientras que los datos

humanos que analizan esta asociación son discordantes, los estudios experimentales permiten obtener resultados más claros y reproducibles. En resumen, como se ha detallado en la “Introducción” y repetido en diversos apartados de este trabajo, se reconoce que el efecto de las grasas de la dieta en el cáncer depende del tipo de grasa y de la cantidad consumida, así como de la fase de la carcinogénesis en la actúan. En este sentido, se describen las evidencias que demuestran el efecto estimulador de los PUFAs n-6, y en especial del ácido linoleico, de las grasas saturadas y de los lípidos insaturados *trans* en la carcinogénesis mamaria, principalmente cuando actúan durante la fase de la promoción, así como el efecto inhibitor tumoral de los PUFA n-3 de cadena larga, del ácido linoleico conjugado y del ácido γ -linolénico. En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados, en especial el ácido oleico, presente en elevadas cantidades en el aceite de oliva, el efecto parece ser protector, aunque se han reportado resultados menos consistentes. Se recuerda que este aceite contiene, además, otros componentes bioactivos que podrían participar en su efecto modulador negativo. Los estudios experimentales también han puesto en evidencia los posibles mecanismos a través de los cuales los lípidos de la dieta ejercen sus efectos en el cáncer. Tal como se ha comentado en el apartado D de la “Introducción”, los lípidos de la dieta influyen en los diferentes estadios de la carcinogénesis, en el estado hormonal, en la estructura y función de las membranas celulares, en las vías de transducción de señales, en la expresión génica y en la respuesta inmune. En este artículo se detallan y amplían los mecanismos ya expuestos, en relación con el cáncer de mama, y se extienden los datos a los descritos, en la literatura, en la relación lípidos de la dieta y cáncer de colon y próstata. Entre los datos expuestos, se recoge uno de nuevo, no reportado con anterioridad, sobre la expresión de los genes descritos como infrarregulados (globulina α -2u de la glándula submaxilar, VDUP1, H19 y EST-Rn.32385) por una dieta rica en aceite de maíz y que constituye el trabajo del Artículo 6 de este compendio de publicaciones. En este sentido, estudios posteriores llevados a cabo por el grupo investigador, han mostrado que la expresión de estos genes no se ha visto modificada por el efecto de una dieta rica en aceite de oliva virgen extra.

Asimismo, en este artículo se destaca el papel biológico que comportan los lípidos de la dieta lo que, añadido a su valor nutritivo, permite caracterizarlos como alimentos funcionales, con un impacto potencial en la salud pública y en el riesgo de padecer cáncer. Dadas las características de este artículo, su contenido se tratará en el apartado D de la “Discusión”, conjuntamente con el del Artículo 8.

8. ARTÍCULO 8

Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer.

E. Escrich, R. Moral, L. Grau, **I. Costa**, M. Solanas.

Molecular Nutrition and Food Research 2007; 51: 1279-1292

RESULTADOS

Review

Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer

Eduard Escrich, Raquel Moral, Laura Grau, Irmgard Costa, Montserrat Solanas

Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Medical Physiology Unit, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Cancer is one of the main causes of mortality worldwide. Geographical differences in incidence rates suggest a key effect of environmental factors, especially diet, in its aetiology. Epidemiologic and experimental studies have found a role of dietary lipids in cancer, particularly breast, colorectal, and prostate cancers. Their incidence in the Mediterranean countries, where the main source of fat is olive oil, is lower than in other areas of the world. Human studies about the effects of dietary lipids are little conclusive, probably due to methodological issues. On the other hand, experimental data have clearly demonstrated that the influence of dietary fats on cancer depends on the quantity and the type of lipids. Whereas a high intake of n-6 PUFA and saturated fat has tumor-enhancing effects, n-3 PUFA, conjugated linoleic acid and γ -linolenic acid have inhibitory effects. Data regarding MUFA have not always been conclusive, but high olive oil diets seem to have protective effects. Such effects can be due to oleic acid, the main MUFA in olive oil, and to certain minor compounds such as squalene and phenolic compounds. This work aims to review the current knowledge about the relationship between dietary lipids and cancer, with a special emphasis on olive oil, and the molecular mechanisms underlying these effects: modifications on the carcinogenesis stages, hormonal status, cell membrane structure and function, signal transduction pathways, gene expression, and immune system.

Keywords: Cancer / Dietary lipids / Mediterranean diet / Oleic acid / Olive oil

Received: December 4, 2006; revised: June 11, 2007; accepted: June 19, 2007

1 State of the art of the relationship between dietary lipids and cancer

Every year approximately ten million people are newly diagnosed with cancer and more than six million people die from this disease worldwide. In general the most common cancer site in men is lung, followed by prostate, stomach, colon and rectum and liver, while in women the most fre-

quent is breast and then *cervix uteri*, colon and rectum, lung and stomach [1, 2]. Geographical differences in cancer incidence rates indicate a role of environment in the aetiology of this disease, nutrition being one of the most relevant environmental factors involved [3]. It has been estimated that a third of all cancers can be associated to diet and that they could be reduced through individual and social actions [4]. Among the numerous dietary compounds that have been related to cancer, dietary lipids have been revealed as significant ones. Epidemiologic and especially experimental studies have established a relationship between dietary fat and cancers of the breast, colon and rectum and, to a lesser extent, prostate. Scanty studies have also related non-melanoma skin cancer, and cancers of the oral cavity, upper digestive tract, stomach, pancreas, liver, pharynx, larynx, lung, endometrium and ovary with dietary lipids [3, 5, 6].

Human data regarding the association between dietary lipids and cancer is controversial. Descriptive epidemiologic studies (correlation and migration studies) have suggested a positive association between the total fat intake and the risk of breast, colorectal and prostate cancers [7]. Interestingly, countries with a Mediterranean diet, characterized by a high consumption of fibre, fish, fruits, vegeta-

Correspondence: Dr. Eduard Escrich, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Physiology Unit, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra Barcelona, Spain

E-mail: Eduard.Esrich@uab.es

Fax: +34-93-581-2986

Abbreviations: AA, arachidonic acid; CLA, conjugated linoleic acid; COX2, cyclooxygenase-2; DMBA, 7,12-dimethylbenz(α)anthracene; DHA, docosahexaenoic acid; EGFR, epidermal growth factor receptor; EPA, eicosapentaenoic acid; FFA, free fatty acids; GJIC, gap junction-mediated intercellular communication; GLA, γ -linolenic acid; LA, linoleic acid; LNA, α -linolenic acid; OA, oleic acid; PE, phosphatidylethanolamine; PGE₂, prostaglandin E₂; PGE₃, prostaglandin E₃; PL, phospholipase; PKC, protein kinase C; SHBG, sex hormone-binding globulin

bles and olives and olive oil, show middle values for these cancers. An expanding number of retrospective case-control investigations have also found an increase in cancer risk with increasing fat intake, especially with animal and saturated fat intake [7]. However, it is difficult to draw clear conclusions from these studies because of the recall bias and confounding [8]. Regarding the prospective cohort studies, more properly conducted, taken together they do not support a strong association between total fat or individual fatty acid intake during adult life and cancer [9, 10]. Several pooled analyses have examined a wide range of fat intake and, overall, no association between intake of total, saturated, monounsaturated or polyunsaturated fat and risk of cancer has been observed [9, 10]. Interventional trials are needed to answer the question whether an increased consumption of certain fatty acids influences cancer risk [7, 8, 11]. Recently, the results obtained by The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) have been published. This multicenter prospective study was specifically designed to investigate the relationship between diet and cancer. To date, results do not support a strong association between fat or individual fatty acid intake during adult life and cancer, although some data suggest an increased risk of breast cancer by a high intake of saturated fat [12]. Therefore, the association between dietary lipids and cancer in human populations remains largely unresolved.

Animal studies have provided strong data supporting a relationship between dietary lipids and cancer, especially breast cancer. Experimental results have demonstrated that the effect of the lipids of the diet on cancer depends on the quality and amount of fat consumed, in addition to the stage of the carcinogenesis where they act. Carcinogenesis models have also provided abundant evidence for a lipid specific action beyond their caloric supply [3, 5, 6, 13, 14].

n-6 PUFAs, especially linoleic acid (LA) (18:2n-6), have shown a stimulating effect on breast, colorectal and prostate cancers in animal models. These PUFAs, found in vegetable oils, are highly consumed in Northern Europe. Diets with a high content in saturated fat, mainly from animal origin, have also a tumor-enhancing effect, although such effect is lower than the one exerted by high LA diets. On the other hand, high levels of n-3 PUFA inhibit breast and colon tumor growth and metastasis. This inhibitory effect is mainly exerted by the long chain n-3 PUFAs, eicosapentaenoic acid (EPA) (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA) (22:6n-3), from oily fish and fish oils and also derived from α -linolenic acid (LNA) (18:3n-3), found in vegetable oils, red meat and dairy products. The role of n-3 PUFA in prostate cancer still remains unclear, but experimental studies suggest that long chain n-3 PUFA have a tumor-suppression effect while high LNA diets promote tumor development. Conjugated linoleic acid (CLA), a naturally occurring compound found in ruminants products, has shown an inhibitory effect on cancer. Furthermore, anti-

proliferative effects of γ -linolenic acid (GLA) (18:3n-6), found in evening primrose oil, have also been reported [5, 6, 15–19].

The role of MUFA, primarily oleic acid (OA) (18:1n-9), has attracted much attention, especially in the last years. Mediterranean diet, whose hallmark is the high consumption of olive oil, rich in this MUFA, has been traditionally linked to a protective effect on cardiovascular disease and cancer [20]. Considerable amounts of OA are also contained in animal fats (30–55%) and other plant oils (25–75%). As it was discussed above, epidemiologic studies about the relationship between dietary lipids and cancer are inconclusive, and the particular case of OA is not different to the rest of fatty acids. In this case, in addition to the methodological issues already pointed out, this fact can be due to the difference between single chemically defined nutrients (OA) and foodstuff (olive oil) [21]. Thus, the later contains not only this specific fatty acid as nutrient but also many minor compounds in the unsaponifiable fraction of the virgin olive oil, some of which have been defined as “bioactive compounds” [22] and as such exert chemopreventive effects on cancer [23]. In Table 1 the chemical composition of olive oil is shown [24].

Extra-virgin olive oil, the first-pressed olive oil, contains an abundance of squalene and phenolic antioxidants including simple phenols (hydroxytyrosol, tyrosol), aldehydic secoiridoids, flavonoids and lignans (acetoxypinoresinol, pinoresinol). Interestingly, it contains significantly higher concentrations of phenolic antioxidants and squalene than refined virgin oil and seed oils. In addition, seed oils, which contain very low amounts of squalene, have none of the phenolic antioxidants that are present in virgin and refined olive oils [23, 25]. The exact composition of olive oil does not only depend on the growth conditions in the respective year preceding the harvest but also on the degree of ripeness of the fruit and the technical processing (*e. g.* cold pressing, refining) [21].

There are few experimental studies addressing the role of OA and olive oil on cancer if compared to the investigations about the role of other dietary lipids. Such studies have been mainly conducted in breast cancer, where it has been described a potential protective effect of olive oil and OA. However, other inconsistent results have also been obtained, including non-promoting, weak-promoting, and even promoting effects on tumor growth [3, 5, 19, 26–31]. The effects of high extra virgin olive oil diet on 7,12-dimethylbenz(α)anthracene (DMBA)-induced mammary carcinogenesis have been compared to the effects of high and low corn oil diets. High olive oil diet increased tumor latency, decreased tumor incidence (compared to the high corn oil diet), and reduced the tumor content and volume (in comparison to both high and low corn oil diets). The study of tumor regression, as a proposed protective effect for this high olive oil diet, showed a slow progression of tumors in the animals fed that diet rather than a real regression [32].

Table 1. Chemical composition of olive oil

Saponifiable fraction (98–99%)	Unsaponifiable fraction (about 2%)
Main fatty acids present in triacylglycerols:	Non-glyceride esters (alcoholic and sterol compounds, waxes)
Oleic acid (18:1n-9)	Aliphatic alcohols
Palmitic acid (16:0)	Triterpene alcohols
Linoleic acid (18:2n-6)	Sterols (B-sitosterol, campesterol, stigmasterol, ...)
Stearic acid (18:0)	Hydrocarbons (squalene, B-carotene, lycopene, ...)
Palmitoleic acid (16:1n-9)	Pigments (chlorophylls, ...)
Linolenic acid (18:3n-3)	Lipophilic phenolics (tocopherols and tocotrienols)
Miristic acid (14:0)	Hydrophilic phenolics (phenolic acids, phenolic alcohols, secoiridoids, lignans and flavones)
	Volatile compounds

Table 2. Main mechanisms of action of olive oil on cancer and component involved in such mechanism when known

Mechanism	Component involved	References
Influence on the carcinogenesis stages		
Influence on carcinogen metabolism	Phenolic compounds	[38]
Protective effect from oxidative DNA damage	OA and antioxidants	[41], [42], [45]
Modulatory action of biosynthesis of the colon cancer promoters bile acids	Squalene	[52]
Alteration of the hormonal status		
Decreased estrogen synthesis in adipose tissue (aromatization)	OA	[14], [40]
Antiestrogenic effects by structural similarity with estrogens	Lignans	[42]
Decrease in free oestradiol by stimulating SHBG synthesis	Lignans	[42]
Modification of cell membranes structure and function		
Functional changes in integral and membrane-bound proteins by changes in membrane fluidity	OA	[73], [75]
Influence on membrane structural properties (increase in propensity of PE membranes to form HII phases)	OA	[80]
Changes in the degree of membrane peroxidation	OA and antioxidants	[41], [42]
Modulation of signal transduction pathways		
Decrease in biosynthesis of AA-derived eicosanoids by competition for $\Delta 6$ desaturase with LA	OA	[5], [29], [88]
Inhibition of lipoxygenase, enzyme responsible for leukotriene synthesis	Hydroxytyrosol	[41]
Modulation of prenylation of certain proteins by strong inhibitory activity of HMG-CoA ^a reductase	Squalene	[52]
Decrease in Ras activation		[93]
Regulation of gene expression		
Modulation of genes involved in cell proliferation	OA, minor compounds?	[93], [100], [101]
Alteration of the immune system		
Antiinflammatory and immunomodulatory effects	OA and phenolic compounds	[123]–[125]

a) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A

In addition, tumors from animals fed the high olive oil diet, besides being less aggressive biologically, displayed features of low morphological malignancy, such as a low histopathological grade, unusual invasive growth and few necrotic areas, similar to the tumors from the low corn oil control diet group, as well as extensive papillary areas [33].

In addition to the different relative content of the minor compounds in the different types and varieties of olive oil, to explain the apparent inconsistency among the studies, some authors have proposed that the null or the cancer-sup-

pressive response of olive oil is not a function of the high 18:1 content in this oil but it is due to the lower content of 18:2n-6 [19]. A certain amount of this fatty acid, by virtue of its role as a precursor of eicosanoids, would be necessary for optimal promotion of mammary carcinogenesis [13]. Related to this hypothesis, a competitive inhibition by OA of the $\Delta 6$ -desaturase, the first step of the eicosanoid biosynthesis leading from LA to arachidonic acid (AA), could explain, in part, that the tumor growth progresses slower with high olive oil feeding [14]. However, other authors that

have found a tumor promoting effect of diets enriched with OA have attributed such effect to the development of essential fatty acid deficiency [34, 35].

At present, there is an increasing understanding of the specific mechanisms by which dietary fat in general and high olive oil diets in particular may exert their modulatory effects on cancer. Those that stand out are: influence on the stages of the carcinogenesis process, alteration of the hormonal status, modification of the structure and function of cell membranes, modulation of cell signaling transduction pathways, regulation of gene expression and influence on the immune system. It is probable that, *in vivo*, lipids may act through all these mechanisms in an integrated, simultaneous and/or sequential way. Next, the scientific evidence on these mechanisms, with a special emphasis in the scarce available olive oil data, will be reviewed. In Table 2 the most important mechanisms that have been experimentally demonstrated for the olive oil are shown.

2 Mechanisms of action of dietary lipids on cancer

2.1 Influence on the carcinogenesis stages

Tumorigenesis is a multi-step process whose steps reflect structural or epigenetic alterations in genes controlling proliferation, differentiation and programmed cell death or apoptosis. This drives the progressive transformation and evolution of normal cells into highly malignant derivatives [36, 37]. Dietary lipids may affect the different stages of the carcinogenesis, mainly the promotion although they can also act during the initiation. Firstly, it must be taken into account the possible initiating action of substances that accompany the dietary fats, such as food pollutants, additives and hormones. In this sense, it has been noted that the anticarcinogenic activity of olive oil phenols in the first stages of the carcinogenesis may be due to their ability to reduce the bioavailability of food carcinogens and to inhibit their metabolic activation [38]. But the main mechanism described by which dietary lipids may act stimulating the initiation of human malignancies is lipid peroxidation and the subsequent oxidative DNA damage. Peroxidation of n-6 PUFA by free radicals and reactive oxygen and nitrogen species produced in cells generates reactive α,β -unsaturated aldehydes, such as *trans*-4-hydroxy-2-nonenal and malondialdehyde. These aldehydes can form exocyclic DNA adducts, highly miscoding lesions that initiate the carcinogenic process through specific point mutations [5]. However, the role of lipid peroxidation in the modulation of tumor development is currently controversial, especially in the case of n-3 PUFA, which seem to inhibit cell growth even being highly unsaturated. Nevertheless this effect of n-3 PUFA has been related to the induction of growth arrest and apoptosis by the formation of oxidation products [13, 39, 40]. On the other hand, CLA has been reported to sup-

press peroxidation of unsaturated fatty acids, thus reducing oxidative damage [19]. The anti-tumor properties proposed for the virgin olive oil have been related to its protective effect from oxidative DNA damage because of both its high content of OA, which is far less susceptible to oxidation than n-6 PUFA, and its richness of minor antioxidant components, such as hydroxytyrosol, oleuropein and caffeic acid, which are potent scavengers of reactive species [23, 41, 42]. However, Yu *et al.*, [43] have proposed that OA could be a potential breast initiating carcinogen after the 17 β -oestradiol (E2) epoxidation, being its effect stronger than that of palmitoleic acid and LNA. Hydroxyl radical-induced DNA damage has also been linked to the progression of human cancers to the metastatic stage, notably because it results in loss of cell adhesion, which is a prerequisite for cellular detachment and invasion of host tissues [44]. Phenols extracted from virgin olive oil have been demonstrated to significantly decrease the invasiveness of colon cancer cells [45].

Dietary lipids can also have an indirect role in the initiation stage of the carcinogenesis, acting as co-carcinogens by enhancing the genotoxic effect of other compounds [46]. Actually, lipids may alter the structure of the chromatin, and thus affect the accessibility to specific genes of carcinogens, DNA repair factors and/or transcription complexes. *In vitro* studies have shown that the electrostatic interactions between histones and DNA can be affected by membranes containing acidic phospholipids and sphingosine, suggesting an effect of specific lipids in the regulation of chromatin structure and function [47]. Moreover, there is evidence that the lipid component of chromatin, mostly sphingomyelin and phosphatidylserine, plasmalogens and cholesterol, may play crucial roles in transcriptional regulation and modulation of cell proliferation, differentiation and apoptosis [48].

Dietary lipids can also have a role in the development of colon cancer, specifically modifying bile acid action. Dietary lipids have been reported to induce cell proliferation in the colonic mucosa and act as tumor promoters. The concentration of bile acids in the colonic lumen is increased by the effect of diets rich in lard, beef tallow or corn oil, but not by high fish oil diets [49, 50]. Interestingly, the secretion of bile acids does not increase due to high olive oil diets [51]. Moreover, squalene, a constituent of olive oil, has a chemopreventive effect on colon carcinogenesis itself, which can be partially exerted by a modulatory action on bile acid biosynthesis [52].

2.2 Alteration of the hormonal status

It has long been known that sex hormones have proliferative effects on tissues sensitive to their actions, and that high levels of such hormones can be related to increased risk of hormone-dependent cancers. Dietary lipids could induce modifications in the availability of sex hormones, such as

estrogens and testosterone, and thus influence the development of breast and prostate cancers.

Alteration of estrogen metabolism is a potential mechanism whereby dietary lipids may modify the mammary carcinogenesis process. The augmented risk of breast cancer among post-menopausal obese women [53, 54] support that a high fat intake can increase the adipocyte number and, as a consequence, increase peripheral estrogen synthesis through cytochrome P450 aromatase, which forms aromatic C18 estrogens from C19 androgens [55]. Prostaglandin E₂ (PGE₂), an AA metabolite, has been shown to directly enhance aromatization by stimulating the activity and expression of aromatase P450 in human adipose stromal cells. In contrast, PGE₃, a product of EPA metabolism, does not activate aromatase P450. Hence, an increased intake of EPA, which leads to increased production of PGE₃ and decreased production of PGE₂, is expected to decrease local estrogen production and thus reduce estrogen-stimulated cell growth [40]. In the case of the olive oil, the competitive inhibition by OA of the Δ 6-desaturase, already mentioned above, could also act decreasing the PGE₂ production thus reducing the hormone-stimulated tumor growth. However, this issue has not been yet examined directly in humans.

Dietary lipids have also been described to increase estrogenicity at other levels. For instance, high intake of n-6 PUFA can displace estrogens from sex hormone-binding globulin (SHBG) and thus increase free estrogens level, it can enhance the estrogen affinity for its receptor, and it can also inhibit the activity of 17 β -dehydrogenase avoiding in this way the conversion of oestradiol (the most active estrogen) in estrone [5, 14, 56]. In addition, a high fat intake has been described to cause an increase in the secretion of bile acid, which together with cholesterol derivatives can be transformed into estrogens by certain bacteria of the intestinal flora [57]. Recently, LA has also been shown to increase expression of the estrogen receptor α mRNA and decrease expression of the androgen receptor in human mammary tumor cells T47D [58]. On the other hand, lignans, which are minor components of olive oil, seem to have antiestrogenic effects, because of their structural similarities with oestradiol and the synthetic antiestrogen tamoxifen. Thus, in MCF-7 human breast carcinoma cells, lignans have been shown to inhibit oestradiol-induced proliferation and stimulate SHBG synthesis, with a subsequent decrease in free oestradiol [42]. Despite the relationship between dietary lipids and sex hormones, the data reported on the literature about the effect of high fat intake on plasma levels of gonadal steroid levels or their receptors and breast cancer risk is inconclusive [14]. Few studies have addressed the role of other hormones, like prolactin, insulin, thyroxine, growth hormone and corticosterone in the relation of dietary lipids and breast cancer, with inconsistent results [59–61].

The effects of dietary fat on prostate cancer are unclear, although a potential mechanism through the regulation of androgen actions has been proposed [62]. In this regard, a

rat experimental model has shown that a high dietary fat and caloric intake (from corn oil) increases the conversion of testosterone to dihydrotestosterone, a more potent androgen, through the induction of the 5 α -reductase-2 gene expression, thus stimulating prostate growth in neonatal, but not adult rats [63]. This effect was also observed in a transplantable prostate cancer model in rats, in which a high corn oil diet slightly increased serum testosterone levels [64]. On the other hand, in athymic nude mice bearing human prostate cancer xenografts the administration of a low fat diet did not modify serum testosterone levels [13]. Two studies in humans reported that a high fat diet with an elevated ratio of saturated to polyunsaturated fat increased total urinary androgens [65] and total plasma testosterone respectively [66]. Another trial concluded that a reduction in intake of dietary fat led to a decrease in serum testosterone and androstenedione levels [67]. Interestingly, a prospective cohort study found a strong association between increasing plasma testosterone levels and risk of prostate cancer after adjustment for SHBG levels [6]. On the other hand, a study in adolescent boys reported that modest reductions in total fat, saturated fat, and possibly energy intake did not alter serum sex hormone concentrations [68].

Finally, leptin has also been suggested to have a role in the effects of high fat diets on carcinogenesis. Results in the DMH-induced colon cancer model in rats hinted that high corn oil diet might enhance colon carcinogenesis by elevating cell proliferation through higher serum leptin [69]. Other studies also reported that this hormone controls the proliferation of both normal and malignant breast epithelial cells, providing a new level in the association of diet-induced obesity, mammary gland development and the risk for breast cancer [70]. There is also evidence for a relationship between leptin, dietary fat and prostate cancer [71].

2.3 Modification of cell membranes structure and function

The intake of a particular type of dietary fat can induce changes in the lipid profile of cell membranes, modifying cell behavior. The influence of dietary lipids on tumor fatty acid composition and growth has been studied in the DMBA-induced mammary cancer model. Adenocarcinomas from rats fed a high corn oil diet, more aggressive clinically and histopathologically in comparison with control diet tumors, displayed a significant increase in the LA relative content and a decrease in that of OA in the phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine (PE) and free fatty acids (FFA) lipid fractions. Since the hydrolysis products of these phospholipids and FFA have been linked to tumor cell proliferation, these results are in accordance with experimental and epidemiologic studies showing the stimulating role of high LA diets and the likely protective role of high virgin olive oil diets, rich in OA, on mammary carcinogenesis [72].

Changes in the lipid profile of cell membranes caused by dietary lipids can affect the membrane structure and fluidity, the signalling transduction pathways mediated by lipids, and the degree of lipid peroxidation in the cell membranes [73–75]. Thus, changes in membrane fluidity due to PUFA enrichment may produce functional changes of specific integral and membrane-bound protein, since their lateral mobility, conformation and interaction with other components can be altered. For instance, PUFA enrichment has been shown to reduce the number of sodium channels, whereas saturated and *trans*-unsaturated fatty acids have the opposite effect and OA does not produce any change [73]. Unsaturated fatty acids can also increase adenylate cyclase and Na⁺-K⁺-ATPase activities, and change the binding of insulin receptor to its ligand [74, 75]. In all these cases, PUFA have a greater effect than MUFA [75]. Proteins with a role in signaling pathways from cell membranes are commonly regulated by amphitropism. Such proteins, as Small GTPases Ras, Src-family protein tyrosine kinases, Ras-guanine nucleotide exchange factor, CTP:phosphocholine cytidyltransferase, Protein kinase C (PKC), phospholipase C (PLC), several extracellular matrix and cytoskeletal-related proteins, can be regulated by specific lipids which modify their assembly, folding or topological organization [76]. Lipids can influence, moreover, the organization of the plasma membrane into microdomains. These domains are involved in important cell functions, like the sphingolipid- and cholesterol-rich membrane microdomains named lipid rafts, that recruit and regulate specific proteins with a role in signal transduction, protein sorting in polarized cells, endocytosis and cell adhesion [77]. In this way, a colon cancer model in mouse showed that dietary n-3 PUFA, in comparison to n-6 PUFA, strongly altered the microenvironment of a subtype of lipid raft (caveolae), thus modifying cell signaling pathways [78].

Furthermore, modulation of the membrane lipid structure by dietary lipids has also been shown to regulate the protein membrane interactions and mobilization upon activation. Thus, the presence of lipids such as PE modulates the localization of peripheral proteins, like PKC, G proteins and PL A₂ among others, which are capable of translocating from the membrane to the cytosol and propagate intracellular signals [79]. Model systems have shown that OA enhances these properties of PE membranes, whereas *trans*-monounsaturated and saturated fatty acids have little influence. This effect of OA has been suggested to be one of the mechanisms of the modulation of this fatty acid on membrane and cell functions. In this sense OA, but not other fatty acids, has been reported to regulate G protein localization and function [80].

The composition of dietary fat can also induce changes in phospholipid fatty acid profile of the nuclear membrane, altering its function. Phospholipids of this membrane, especially if they contain unsaturated fatty acids, can regulate *in vitro* the activity of some DNA binding proteins with which

they interact, like DNA replication, transcription and recombination proteins [81]. In addition, diets with a high content in LA, compared with a low LA diet, increased the activity of the nucleosidetriphosphatase in rat liver, and consequently the RNA export from the nucleus to the cytoplasm [74]. An increase of unsaturated fatty acids in the nuclear membrane, resulting in changes in its fluidity, has been suggested to affect the phosphorylation, and consequently the activity and function, of the nuclear membrane-associated enzymes involved in this RNA transport [82].

Dietary lipids can also modify, as already mentioned, the degree of lipid peroxidation in cell membranes. Persistent cellular oxidative stress leads to macromolecular damage and disruption of signaling pathways stimulating the development of cancer. The degree of unsaturation of the fatty acids found in the membrane phospholipids determines the susceptibility to peroxidation. Therefore, high unsaturation levels lead to an increase in cell oxidative stress. In this way, a source of polyunsaturated fat will lead to membranes more susceptible to oxidation, compared to sources of saturated or monounsaturated fats [39–42].

Finally, dietary lipids could also influence the carcinogenesis at the membrane level by modulating the gap junction-mediated intercellular communication (GJIC). The reduced GJIC in tumor cells is associated with excessive proliferation, increased cell motility, invasion and metastasis. n-6 PUFA have been described to inhibit this kind of cell-to-cell communication in an experimental breast cancer model [83], whereas GLA has been shown to reduce *in vitro* adhesion of human breast and colon cancer cells to the endothelium partly by improving GJIC [84].

2.4 Modulation of signal transduction pathways

Changes in the physicochemical properties of the membrane due to dietary fat intake may affect the production and the composition of bioactive molecules generated from membrane lipids, such as inositol triphosphate, diacylglycerol, FFA and phosphatidic acid, by the action of PL A₂, C and D. These molecules play important roles as second messengers or as modulators in the intracellular signaling network and, consequently, these changes will affect gene expression and cell function [85, 86]. Unsaturated fatty acids removed from the sn-2 position of the membrane phospholipids also serve as substrates for the eicosanoid synthesis. Eicosanoids derived from the LA, via AA, and those derived from the LNA, via EPA, are synthesized using the same enzymes but they have different and, in some cases, contrary effects. Thus, the first ones have been linked to increased growth, inhibited apoptosis, angiogenesis and metastasis [39, 40]. In fact, the tumor promoting effect of high n-6 PUFA diets on breast cancer has been correlated with a greater production of eicosanoids [5]. In contrast, the protective effect of n-3 fatty acids on cancer could be exerted, at least partially, through their suppressing effect

on the biosynthesis of AA-derived eicosanoids, in favor of EPA-derived eicosanoids. This suppression is achieved at different levels: decreasing the availability of AA precursors into membrane phospholipids; by the competition of n-3 PUFA with n-6 PUFA for desaturases and elongases, for which n-3 fatty acids have greater affinities; and suppressing the cyclooxygenase-2 (COX-2) [40]. Likewise, the effect that CLA can have in cancer risk reduction has been associated with a decrease in LA metabolites that are substrates for eicosanoid biosynthesis [87]. In relation to this, the possible tumor protective effect of olive oil can also be related, at least in part, to the competition between OA and LA for desaturation enzymes. Although OA has lower affinity for $\Delta 6$ desaturase than LA, relatively high concentrations of OA can reduce the conversion of LA to GLA and consequently its entry into the eicosanoid biosynthetic pathways [5]. In addition, the minor component of olive oil hydroxytyrosol has been reported to inhibit lipoxygenase, enzyme responsible for leukotriene synthesis [41]. An experimental model of carcinogenesis in colon showed that the modulation of AA metabolism is one of the mechanisms of the preventive effect that olive oil based diets exerts [29]. The inhibition of PGE₂ production, together with an inactivation of the Erk cascade, have been also proposed to account for the suppressive effect of a high OA oil on chemically-induced lung tumorigenesis in mice [88].

FFA are also known to modify the activity of PL A₂, PL C, PL D, PKC, AMPc-dependent protein kinase, Ca²⁺/Calmoduline-dependent protein kinase II, G proteins, adenilate and guanylate cyclases, as well as ionic channels and calcium mobilization [73–75]. PKC, for example, is a pivotal enzyme in the intracellular signaling which is regulated by many different lipids, including diacylglycerol, phosphatidylserine, FFA, lysophospholipids, and phosphatidylinositol. Lipid- and calcium-mediated control of PKC activity is subtype specific [89]. n-6 PUFA, but not OA, have been described to induce changes in cell adhesion to collagen IV in human breast cancer cells. This effect was exerted by selectively activating PKC ϵ and PKC μ isozymes, which leads to the activation of $\beta 1$ integrins [90]. However, dietary n-3 fatty acids inhibit PKC β II activity and suppress PKC β II-mediated hyperproliferation and colon carcinogenesis *in vivo* [91].

Fatty acids can also have an influence on membrane receptors involved in the mitogenic signaling pathways. However, their effects on such proteins, irrespective of those derived from changes in the structure of cell membranes mentioned above, are not well known. Unsaturated FFAs including oleate but not saturated FFAs have been shown to trigger tyrosine phosphorylation and epidermal growth factor receptor (EGFR) activation in an endothelial cell line [92]. However, EGFR is not activated in experimental mammary adenocarcinomas and either a high n-6 PUFA diet (corn oil) or a high MUFA diet (virgin olive oil) do not modify this state. In contrast, Neu is activated in

these tumors, although its activity does not seem to be modified by these dietary lipids [93]. In MDA-MB-231 breast cancer cells, EGFR is not activated by oleate either although, interestingly, this fatty acid stimulates proliferation in these cells whereas palmitate induces apoptosis. This proliferative effect of oleate are mediated at least in part via the G protein-coupled receptor GPR40, and many downstream signal transduction pathways, including PL C, Src, MEK1/2, PI3K, and PKC ξ may participate in this effect [94].

Dietary lipids can also have an effect on the activation of Ras proteins, which are critical regulators of cell function, including growth, differentiation and apoptosis. The mechanisms of this modulation are unknown. A high fish oil diet decreased membrane-bound Ras in the AOM-induced colon cancer model, probably by interfering with posttranslational modifications of the protein. On the contrary, in the same model a high corn oil diet increased the membrane localization of Ras, being one possible mechanism of the promoting effect on colon carcinogenesis of this diet [95]. However, in colonocytes and colon tumors other authors have demonstrated that n-3 PUFA, in comparison to n-6 PUFA, decreased the Ras membrane-to-cytosol ratio, but not Ras farnesylation and palmitoylation [96]. Furthermore, the tumor-inhibitory effect of squalene on rat AOM-induced colonic aberrant crypt foci has been mainly attributed to its strong inhibitory activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, the rate-limiting enzyme in the mevalonate pathway, a precursor of nonsterol isoprenoids which are required for Ras prenylation [52]. In experimental breast cancer, a high virgin olive oil diet, in comparison with high and low corn oil diets, has also been shown to regulate Ras activation, decreasing the GTP-bound (activated) Ras levels, but not Ras localization. This suggests that the modulating effect of the olive oil-based diet on this cancer may be exerted by modifying Ras activation and Ras-dependent signaling [93].

2.5 Regulation of gene expression

Dietary lipids can also have an influence on cancer development by modulating the expression of genes potentially involved in cell transformation and tumorigenesis. Actually, it has been widely described that regulation of transcription, RNA processing and stability of genes with a role in metabolism are done by dietary lipids and other dietary components. The effect of those lipids on gene expression can be due, at least in part, to the already mentioned changes in cell membranes and signal transduction pathways to the nucleus. However, a direct, fast and acute control of gene transcription has also been considered [97]. In this last case, the effect of fatty acids or their metabolites may be directly mediated by binding to various nuclear receptors (PPAR, LXR, RXR, HNF-4 α) and activating their transcription factor action, or indirectly mediated as the

result of changes in the abundance of regulatory transcription factors (SREBP-1c, NF κ B, c/EBP β , HIF-1 α). Some of these molecules have been described to regulate cell proliferation, differentiation and survival [86].

Dietary lipids and their metabolites may exert some of their effects on carcinogenesis by modifications in gene expression or activities of molecules involved in signaling pathways, like the ErbB-Ras-MAPK one. Supporting this hypothesis, the treatment of *v-Ha-ras*-transfected MCF-7 cells with high concentrations of EPA resulted in an increase in c-erbB2/neu mRNA levels, but no significant effect was found when non transfected cells were treated with LNA or EPA. These data suggested that the effect of EPA on HER-2/neu expression was enhanced by the presence of high levels of another oncogene [98]. Other studies reported a decrease in c-Ha-ras protein levels in MCF-7 mammary tumors grown in nude mice fed fish oil [99]. In experimental breast cancer, high corn oil and high olive oil diets had a different effect on the modulation of the gene expression of the ErbB family. High corn oil diet had a stimulating effect on mammary carcinogenesis that was associated with an increase in the ratio between the levels of the 9.5 kb transcript and the 2.7 kb transcript of c-erbB1. On the contrary, high olive oil diet exerted a protective effect on carcinogenesis, concomitantly with a decrease in that ratio. The 9.5 kb mRNA is translated to the 170 kDa functional EGF receptor, whereas the 2.7 kb mRNA codes for a truncated form without enzymatic activity that can be secreted and act as a negative regulator of different members of the ErbB family. In addition, the high olive oil diet had a trend to decrease c-erbB2/neu mRNA and p185ErbB2/Neu protein levels, whereas the high corn oil diet did not modify the expression of this receptor [93, 100]. Other authors have later described in breast cancer cells with *neu* amplification that OA treatment decreased c-erbB2/Neu expression [101]. In the former model of DMBA-induced mammary cancer, c-Ha-ras1 mRNA levels were not modified by high corn or olive oil diets. In contrast, as mentioned above, these diets have different effects on Ras activity [93, 102]. Furthermore, the analysis of the gene expression of PCPH, a protooncogene that acts synergistically with Ras, showed an association between its expression and the cell differentiation degree, and it also suggested a down-regulation of PCPH expression in response to a high n-6 lipid diet [93, 103].

High fat diets can exert a modulating effect on tumorigenesis through changes in the activity and/or expression of enzymes involved in eicosanoid production, as it has been already discussed. These diets can thus regulate the eicosanoid signaling. For example, high n-6 PUFA diets have a promoting effect on mammary and colon tumorigenesis that has been associated with overexpression of COX2 and, to some extent, with COX1 genes. On the contrary, high n-3 PUFA diets have an antitumoral effect that could be exerted through the inhibition of the COX2 expression [39, 40, 50,

104]. Furthermore, DHA has been shown to inhibit the inducible nitric oxide synthase and expression of related proinflammatory genes in CaCo-2 colon cancer cells [105]. However, in the *in vivo* rat AOM-induced colon cancer model, DHA did not influence nitric oxide synthase or COX2 expression [106]. Some hydroperoxides produced from LA have also been shown to upregulate COX2 expression in human colon adenoma and carcinoma cells [107].

Fatty acids have also been reported to regulate several nuclear proteins, either directly or indirectly. Results in MCF-7 breast tumors grown in nude mice showed that a high fish oil diet reduced c-myc expression [99], while in rat normal mammary gland and in PhIP-induced benign breast tumors diets rich in LA increased the expression of this oncogene [108]. In human prostate cancer PC-3 cells AA had a growth stimulating effect, not observed with EPA and OA. This stimulating influence of AA was related with an induction of c-fos and COX-2 mRNA in a dose-dependent fashion [31]. The gene function of tumor suppressor genes can also be regulated by fatty acids. Thus, in mammary tumor cells, the addition of LA increased cell proliferation and decreased p53 protein levels, whereas DHA induced further suppression of DNA synthesis and upregulated expression of p53 [109]. On the other hand, other studies *in vivo* concluded that a 10% corn oil diet did not modify p53 mRNA and protein levels in AOM-induced colon tumors, but this diet decreased mitochondrial localization of p53 and increased inactive cytosolic p53, reducing its activity [110]. Furthermore, dietary lipids have also been shown to affect the expression of the suppressor genes BRCA1 and BRCA2. Thus, LA and oestradiol exerted a synergistic effect on the gene expression of BRCA1 in MCF-7 tumor cells, as they decreased the mRNA levels of this gene compared with controls or with cells treated with LA or oestradiol alone [111]. On the contrary, in MCF-7 and MDA-MB231 tumor cell lines treatment with n-3 PUFA (EPA and DHA) increased the BRCA1 and BRCA2 mRNA expression, but no effects were observed with n-6 PUFA (AA) treatment [112].

Dietary fatty acids can also induce changes in the expression of cell-to-cell adhesion molecules, such as E-cadherin. In different cancer cell lines, like lung, colon, breast, melanoma, and liver tumor cells, GLA, but not LA and AA, has been associated with upregulation of E-cadherin. Higher levels of E-cadherin expression have been correlated with reduced *in vitro* invasion and increased aggregation, in accordance with the anticancer properties of GLA [113]. GLA can also regulate the expression of maspin and the motility of cancer cells. Hence, GLA upregulated maspin mRNA and protein levels, what was associated with a reduced motility in different human cell lines. In addition, LNA and AA had no significant effect whereas LA had an inhibitory influence on maspin levels [114].

With the development of powerful new methodologies for the high-throughput analysis of expression, even subtle

effects of lipids on gene expression can be studied. Thus, in DMBA-induced breast tumors, the use of cDNA microarrays allowed to identify four genes that were downmodulated by the effect of a high corn oil diet. These genes, identified and validated, were submaxillary gland α -2u globulin, vitamin D3-upregulated protein 1, the paternally imprinted gene H19 and the unknown expressed sequence tag Rn.32385. Tumors from high n-6 fat diet animals, showing downregulation of these genes, were associated with clinical behavior and anatomopathological features of higher malignancy than control tumors [115]. Moreover, the expression of these genes was not modified by the effect of a high virgin olive oil diet. Other studies have associated vitamin D3-upregulated protein 1, the riboregulator H19 and α -2u globulin with cell proliferation and differentiation, suggesting that the different effects that high corn oil and high virgin olive oil diets induce on experimental mammary carcinogenesis can be partly exerted by a differential modulation of the expression of such genes [93].

The effect of LA treatment on the human breast cancer cell line T47D has also been analyzed using microarrays. This treatment induced changes in the expression of estrogen receptor α , G13 α G protein and p38 MAP kinase, and genes with a role in cell cycle regulation and RNA transcription [58]. A high beef fat diet has been also reported to modulate the expression of several genes in the ACI rat model for spontaneous, age-onset prostate cancer. Those genes were related to inflammation, glucose and fatty acid metabolism, androgen metabolism and tumor suppression, in addition to genes coding for proteins with kinase activity, intracellular and extracellular matrix molecules and growth factors, as well as androgen responsive genes [116]. Recently, in PC-3 human prostate cancer cell line it has been found that the ω -6 fatty acid AA induces eleven genes that are regulated by nuclear factor- κ B, including *COX-2*, *I κ B α* , *NF- κ B*, *GM-CSF*, *IL-1 β* , *CXCL-1*, *TNF- α* , *IL-6*, *LTA*, *IL-8*, *PPAR γ* , and *ICAM-1* [117]. Furthermore, microarrays analysis evidenced specific changes in the gene expression profile at various stages of AOM-induced colon carcinogenesis by effect of a high n-3 diet. Such changes were related to the protective effect of this high fish-oil diet on initiation and promotion of the carcinogenesis. In this study n-9 MUFA did not exert a protective effect, probably due to an elevated content of highly fermentable fiber in this diet [106].

2.6 Alteration of the immune system

Fatty acids might be expected to have some impact on immune function because of several reasons. First, changes in dietary lipids can modulate the fatty acid composition of cells of the immune system, specifically their cell membrane phospholipids, thus altering the actions of intracellular second messengers produced. Second, alteration of the fatty acid composition of these phospholipids may influ-

ence eicosanoids synthesis, which are important immunoregulatory molecules. Finally, fatty acids may alter cell function by direct interaction with intracellular targets, including transcription factors, which in turn could alter gene expression.

Dietary lipids have been shown to modulate the immune response and modify inflammatory cytokine production [30]. The suppressive effect of dietary PUFA on lymphocyte proliferation, natural killer cell activity and expression of adhesion molecules has been demonstrated in several studies. Eicosanoids could be involved in this immunosuppressive effect [118–120]. They modulate the inflammatory and immune response, besides playing a critical role in platelet aggregation, and cell growth and differentiation. In general, EPA-derived eicosanoids have antiinflammatory effects, whereas AA-derived eicosanoids have proinflammatory effects (although PGE₂ has been suggested to also have anti-inflammatory properties) [40, 121]. Consequently, diets with a high content of n-6 PUFA in relation with the content of n-3 PUFA would increase synthesis of inflammatory eicosanoids. On the contrary, diets with a low ratio of n-6:n-3 would decrease the production of eicosanoids [86]. It has been reported that PGE₂ inhibits immune responses through the suppression of macrophages, T- and B-lymphocytes, and stimulating immunosuppressor cells. PGE₂ can also inhibit the production of T-helper type 1 cytokines such as interleukin (IL)-2, interferon- γ , and IL-12, whereas it can increase the production of T-helper type 2 cytokines (IL-4, IL-5 and IL-10). *In vitro* and *in vivo* studies have also shown a reduction in the production of IL-1, IL-2 and tumor necrosis factor α by effect of n-3 PUFA [120, 121]. Since n-3 PUFA can suppress the tissue levels of AA and thus the synthesis of PGE₂, increased intake of n-3 PUFA would lead to enhancement instead of suppression of immune responses. This suggests that the antiinflammatory and immunomodulatory actions of n-3 PUFA may be mediated by eicosanoids-independent mechanisms, like inducing changes in antioxidant status, transcription activity and intracellular signaling pathways [120–122]. Some nuclear receptors can be involved in the actions that PUFA have in the immune system. As an example, PPAR activation by fatty acids can suppress the expression of cytokines and other molecules involved in the inflammatory response [121].

Although the effects of olive oil on the immune system are less known and some results are disparate, there is enough evidence that it is capable of modulating functions of cells of the immune system. The effects appear to be similar to, albeit weaker than, those seen following feeding diets containing fish oils. The animal studies have demonstrated that the suppressive effects of olive oil on immune function are due to OA, but they have also contributed with data showing that the polyphenolic components of olive oil have some anti-inflammatory and immunomodulatory properties [123, 124]. In contrast, consumption of a MUFA-

rich diet by humans does not appear to bring about a general suppression of immune cell functions. The lack of a clear effect of MUFA in humans may be attributed to the higher level of these fatty acids in the animal studies. Moreover, it is extremely difficult to determine conclusively whether the effects observed are indeed due to an increased level of OA or to a concomitant decrease in the level of saturated fatty acids. Furthermore, potential effects of non-lipid components of olive oil on immune and inflammatory responses cannot be excluded, particularly since olive oil-derived phenolic compounds are associated with potent antioxidant activity and inhibition of lipoxygenase activity [125].

3 Concluding remarks

Epidemiology and especially experimental research support that there is an influence of dietary lipids on cancer development. Although further studies in humans are needed, the current available data show that distinct dietary lipids may modulate differentially the multistep process of carcinogenesis. Moreover, it has been clearly demonstrated experimentally that the effect of dietary fats depends on the quantity and type of lipid. Olive oil, highly consumed in Mediterranean countries, is the principal source of OA. This MUFA has shown protective effects in the development of several cancers, although some inconsistent results have also been reported. This can be probably related to the great diversity of types and varieties of commercially available olive oil, with a variable relative content of LA and OA and also with different content of its minor bioactive compounds. Different mechanisms for the modulatory actions of olive oil and other dietary lipids on cancer have been proposed. Among them, there is experimental evidence about an influence on the hormonal status, cell membranes structure and function, signal transduction pathways, gene expression and the immune system.

The current knowledge about the link between dietary lipids and cancer allow characterizing dietary lipids as functional foods. Functional foods have a biological activity beyond their nutritional value, and, therefore, have a potential impact on the population health and the risk of disease. Accordingly, from a public health focus, studies supporting a protective role for certain dietary lipids in cancer would be placed in the field of primary and secondary cancer prevention, and should allow us to specify scientifically healthy dietary advices to the population. For instance, the scientific data available regarding the beneficial effects of virgin olive oil intake on health may allow designing future prevention strategies based on the regular intake of this oil in the diet [126]. The protective effect of the intake of virgin olive oil in the development of cancer should be contextualized within the concept of the dietary and lifestyle habits, especially from the early decades of life with a special attention to the adolescence. Moreover, it must be taken

into account that human diet involves the interaction between its multiple components along with other environmental as well as genetic factors.

The works of the authors cited in this review were supported in part by grants from "Comision Interministerial de Ciencia y Tecnología" (CICYT SAF92-0537), "Pla de Recerca de Catalunya, Generalitat de Catalunya" (GRQ93-2094, 1995SGR-495), "Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología" (CICYT OLI96-2114), "Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya i Balears" (ACMCB-2002 163.985), "Plan Nacional de I+D+I 2000-2003" and FEDER (BFI 2003-07341). Nowadays, the research project is supported in part by a grant from "Plan Nacional de I+D+I 2004-2007" and FEDER (AGL2006-07691/ALI). Laura Grau has a Pre-doctorate scholarship from "Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu".

4 References

- [1] Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J. Clin.* 2005, 55, 74–108.
- [2] Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., *et al.*, Cancer statistics 2006. *CA Cancer J. Clin.* 2006, 56, 106–130.
- [3] World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*, American Institute for Cancer Research, Washington DC 1997.
- [4] Colditz, G. A., Samplin-Salgado, M., Ryan, C. T., Dart, H., *et al.*, Harvard report on cancer prevention, volume 5: fulfilling the potential for cancer prevention: policy approaches. *Cancer Causes Control* 2002, 13, 199–212.
- [5] Bartsch, H., Nair, J., Owen, R. W., Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 1999, 20, 2209–218.
- [6] Kolonel, L. N., Nomura, A. M., Cooney, R. V., Dietary fat and prostate cancer: current status. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999, 91, 414–428.
- [7] Kushi, L., Giovannucci, E., Dietary fat and cancer. *Am. J. Med.* 2002, 113, 63S–70S.
- [8] Dennis, L. K., Snetselaar, L. G., Smith, B. J., Stewart, R. E., Robbins, M. E., Problems with the assessment of dietary fat in prostate cancer studies. *Am. J. Epidemiol.* 2004, 160, 436–444.
- [9] Hunter, D. J., Spiegelman, D., Adami, H. O., Beeson, L., *et al.*, Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer – a pooled analysis. *N. Engl. J. Med.* 1996, 334, 356–361.
- [10] Hunter, D. J., Role of dietary fat in the causation of breast cancer: counterpoint. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999, 8, 9–13.
- [11] Lee, M. M., Lin, S. S., Dietary fat and breast cancer. *Annu. Rev. Nutr.* 2000, 20, 221–248.
- [12] Gonzalez, C. A., The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Public Health Nutr.* 2006, 9, 124–126.

- [13] Rose, D. P., Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancers: evidence from in vitro experiments and animal studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997, 66, 1513S–1522S.
- [14] Wynder, E. L., Cohen, L. A., Muscat, J. E., Winters, B., *et al.*, Breast cancer: weighting the evidence for a promoting role of dietary fat. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997, 89, 766–775.
- [15] Carroll, K. K., Khor, H. T., Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Prog. Biochem. Pharmacol.* 1975, 10, 308–353.
- [16] Ip, C., Fat and essential fatty acid in mammary carcinogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* 1987, 45, S218–S224.
- [17] Escrich, E., Muntané, J., Ribalta, T., Colom, J., *et al.*, Efectos de una dieta hiperlipídica sobre la carcinogénesis mamaria experimental: contenido y tipo de tumores. *Neoplasia*. 1992, 9, 54–56.
- [18] Klurfeld, D. M., Bull, A. W., Fatty acids and colon cancer in experimental models. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997, 66, 1530S–1538S.
- [19] Ip, C., Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acid, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997, 66, 1523S–1529S.
- [20] Trichopoulou, A., Lagiou, P., Kuper, H., Trichopoulos, D., Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2000, 9, 869–873.
- [21] Hanf, V., Gonder, U., Nutrition and primary prevention of breast cancer: foods, nutrients and breast cancer risk. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2005, 123, 139–149.
- [22] Kitts, D. D., Bioactive substances in food: identification and potential uses. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1994, 72, 423–434.
- [23] Hashim, Y. Z., Eng, M., Gill, C. I., McGlynn, H., Rowland, I. R., Components of olive oil and chemoprevention of colorectal cancer. *Nutr. Rev.* 2005, 63, 374–386.
- [24] Ramirez-Tortosa, M. C., Grandaos, S., Quiles, J. L., in: Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, C., Yaqoob, P. (Eds.), *Olive Oil and Health*, CABI International, Oxfordshire 2006, pp. 45–62.
- [25] Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., *et al.*, Olive-Oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol.* 2000, 1, 107–112.
- [26] Welsch, C. W., Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: a review and critique. *Cancer Res.* 1992, 52, 2040S–2048S.
- [27] Zusman, I., Gurevich, P., Madar, Z., Nyska, A., *et al.*, Tumor-promoting and tumor-protective effects of high-fat diets on chemically induced mammary cancer in rats. *Anticancer Res.* 1997, 17, 349–356.
- [28] Takeshita, M., Ueda, H., Shirabe, K., Higuchi, Y., Yoshida, S., Lack of promotion of colon carcinogenesis by high-oleic safflower oil. *Cancer* 1997, 79, 1487–1493.
- [29] Bartoli, R., Fernandez-Bañares, F., Navarro, E., Castella, E. *et al.*, Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E(2) synthesis. *Gut* 2000, 46, 191–199.
- [30] Stark, A. H., Madar, Z., Olive oil as a functional food: Epidemiology and nutritional approaches. *Nutr. Rev.* 2002, 60, 170–176.
- [31] Hughes-Fulford, M., Chen, Y., Tjandrawinata, R. R., Fatty acid regulates gene expression and growth of human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis* 2001, 22, 701–707.
- [32] Solanas, M., Hurtado, A., Costa, I., Moral, R., *et al.*, Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA-induced mammary tumors compared with a high corn oil diet. *Int. J. Oncol.* 2002, 21, 745–753.
- [33] Costa, I., Moral, R., Solanas, M., Escrich, E., High-fat corn oil diet promotes the development of high histologic grade rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not. *Breast Cancer Res. Treat.* 2004, 86, 225–235.
- [34] Actis, A. B., Lopez, C. B., Joekes, S., Eynard, A. R., N-3, n-6 and n-9 dietary fatty acids modulate the growth parameters of murine salivary gland tumors induced by dimethylbenzanthracene. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 1999, 61, 259–265.
- [35] Piegari, M., Salvador, A. F., Muñoz, S. E., Valentich, M. A., Eynard, A. R., Delayed-type hypersensitivity and humoral immunity modulation by dietary lipids in a murine model of pulmonary tumorigenesis induced by urethan. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2001, 53, 181–186.
- [36] Foulds, L., The natural history of cancer. *J. Chronic Dis.* 1958, 8, 2–37.
- [37] Hanahan, D., Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100, 57–70.
- [38] Stavric, B., Role of chemopreventers in human diet. *Clin. Biochem.* 1994, 27, 319–332.
- [39] Stoll, B. A., N-3 fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. *Br. J. Nutr.* 2002, 87, 193–198.
- [40] Larsson, S., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., Wolk, A., Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79, 935–945.
- [41] Galli, C., Visioli, F., Antioxidant and other activities of phenolics in olives/olive oil, typical components of the mediterranean diet. *Lipids* 1999, 34, S23–S26.
- [42] Owen, R. W., Haubner, R., Wurtele, G., Hull, E., *et al.*, Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur. J. Cancer Prev.* 2004, 13, 319–326.
- [43] Yu, F. L., Greenlaw, R., Fang, Q., Bender, W., *et al.*, Studies on the chemopreventive potentials of vegetable oils and unsaturated fatty acids against breast cancer carcinogenesis at initiation. *Eur. J. Cancer Prev.* 2004, 13, 239–248.
- [44] Malins, D. C., Polissar, N. L., Gunesman, S. J., Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to hydroxyl radical-induced DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 2557–2563.
- [45] Gill, C. I., Boyd, A., McDermott, E., McCann, M., *et al.*, Potential anti-cancer effects of virgin olive oil phenols on colorectal carcinogenesis models in vitro. *Int. J. Cancer* 2005, 117, 1–7.
- [46] Kritchevski, D., Weber, M. M., Klurfeld, D. M., Dietary fat versus caloric content in initiation and promotion of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* 1984, 44, 3174–3177.
- [47] Kinnunen, P. K., Kõiv, A., Lehtonen, J. Y., Rytömaa, M., Mustonen, P., Lipid dynamics and peripheral interactions of proteins with membrane surfaces. *Chem. Phys. Lipids*. 1994, 73, 181–207.
- [48] Albi, E., Viola Magni, M. P., The role of intranuclear lipids. *Biol. Cell.* 2004, 96, 657–667.
- [49] Woutersen, R. A., Appel, M. J., Garderen-Hoetmer, A., Wijands, M., Dietary fat and carcinogenesis. *Mutation Res.* 1999, 443, 111–127.

- [50] Rao, C. V., Hirose, Y., Indranie, C., Reddy, B. S., Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. *Cancer Res.* 2001, 61, 1927–1933.
- [51] Stoneham, M., Goldacre, M., Seagroatt, V., Gill, L., Olive oil, diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis. *J. Epidemiol. Community Health* 2000, 54, 756–760.
- [52] Rao, C. V., Newmark, H. L., Reddy, B. S., Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis* 1998, 19, 287–290.
- [53] Key, T. J., Appleby, P. N., Reeves, G. K., Roddam, A., *et al.*, Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003, 95, 1218–1226.
- [54] Lahmann, P. H., Hoffmann, K., Allen, N., van Gils, C. H., *et al.*, Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *Int. J. Cancer* 2004, 111, 762–771.
- [55] Deslypere, J. P., Verdonck, L., Vermeulen, A., Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1985, 61, 564–570.
- [56] Martin, M. E., Vranckx, R., Benassayag, C., Nunez, E. A., Modifications of the properties of human sex steroid-binding protein by nonesterified fatty acids. *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 2954–2959.
- [57] Hill, M. J., Goddard, P., Williams, R. E., Gut bacteria and aetiology of cancer of the breast. *Lancet* 1971, 2, 472–473.
- [58] Reyes, N., Reyes, I., Tiwari, R., Geliebter, J., Effect of linoleic acid on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D. *Cancer Lett.* 2004, 209, 25–35.
- [59] Cohen, L. A., Mechanisms by which dietary fat may stimulate mammary carcinogenesis in experimental animals. *Cancer Res.* 1981, 41, 3808–3810.
- [60] Sylvester, P. W., Russell, M., Ip, M., Ip, C., Comparative effects of different animal and vegetable fats fed before and during carcinogen administration on mammary tumorigenesis, sexual maturation, and endocrine function in rats. *Cancer Res.* 1986, 46, 757–762.
- [61] Lomeo, F., Khokher, M. A., Dandona, P., Unsaturated fatty acids potentiate insulin action on adipocytes. *Prog. Lipid Res.* 1986, 25, 511–513.
- [62] Fleshner, N., Bagnell, P. S., Klotz, L., Venkateswaran, V., Dietary fat and prostate cancer. *J. Urol.* 2004, 171, S19–S24.
- [63] Cai, L. Q., Imperato-McGinley, J., Zhu, Y. S., Regulation of prostate 5 α -reductase-2 gene expression and prostate weight by dietary fat and caloric intake in the rat. *Prostate* 2006, 66, 738–748.
- [64] Clinton, S. K., Mulloy, A. L., Li, S. P., Mangian, H. J., Visek, W. J., Dietary fat and protein intake differ in modulation of prostate tumor growth, prolactin secretion and metabolism, and prostate gland prolactin binding capacity in rats. *J. Nutr.* 1997, 127, 225–237.
- [65] Hill, P., Winder, E. L., Garbaczewski, L., Garnes, H., Walker, A. R., Diet and urinary steroids in black and white North American men and black South African men. *Cancer Res.* 1979, 39, 5101–5105.
- [66] Dorgan, J. F., Judd, J. T., Longcope, C., Brown, C., *et al.*, Effects of dietary fat and fiber on plasma and urine androgens and estrogens in men: a controlled feeding study. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996, 64, 850–855.
- [67] Hämäläinen, E., Adlercreutz, H., Puska, P., Pietinen, P., Diet and serum sex hormones in healthy men. *J. Steroid Biochem.* 1984, 20, 459–464.
- [68] Dorgan, J. F., McMahon, R. P., Friedman, L. A., Van Horn, L., *et al.*, Diet and sex hormones in boys: findings from the dietary intervention study in children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006, 91, 3992–3996.
- [69] Liu, Z., Uesaka, T., Watanabe, H., Kato, N., High fat diet enhances colonic cell proliferation and carcinogenesis in rats by elevating serum leptin. *Int. J. Oncol.* 2001, 19, 1009–1014.
- [70] Hu, X., Juneja, S. C., Maihle, N. J., Cleary, M. P., Leptin – a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002, 94, 1704–1711.
- [71] Saglam, K., Aydur, E., Yilmaz, M., Goktas, S., Leptin influences cellular differentiation and progression in prostate cancer. *J. Urol.* 2003, 169, 1308–1311.
- [72] Escrich, E., Solanas, M., Soler, M., Ruiz De Villa, M. C., *et al.*, Dietary polyunsaturated n-6 lipids effects on the growth and fatty acid composition of rat mammary tumors. *J. Nutr. Biochem.* 2001, 12, 536–549.
- [73] Spector, A. A., Burns, C. P., Biological and therapeutic potential of membrane lipid modification in tumors. *Cancer Res.* 1987, 47, 4529–4537.
- [74] Clandinin, M. T., Cheema, S., Field, C. J., Garg, M. L., *et al.*, Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J.* 1991, 5, 2761–2769.
- [75] Hulbert, A. J., Turner, N., Storlien, L. H., Else, P. L., Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2005, 80, 155–169.
- [76] Dowhan, W., Mileykovskaya, E., Bogdanov, M., Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1666, 19–39.
- [77] Simons, K., Ikonen, E., Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997, 387, 569–572.
- [78] Ma, D. W., Seo, J., Davidson, L. A., Callaway, E. S., *et al.*, n-3 PUFA alter caveolae lipid composition and resident protein localization in mouse colon. *FASEB J.* 2004, 18, 1040–1042.
- [79] Escribá, P. V., Ozaita, A., Ribas, C., Miralles, A., *et al.*, Role of lipid polymorphism in G protein-membrane interactions: nonlamellar-prone phospholipids and peripheral protein binding to membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 11375–11380.
- [80] Yang, Q., Alemany, R., Casas, J., Kitajka, K., *et al.*, Influence of the membrane lipid structure on signal processing via G protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* 2005, 68, 210–217.
- [81] Sekimizu, K., Interactions between DNA replication-related proteins and phospholipid vesicles in vitro. *Chem. Phys. Lipids* 1994, 73, 223–230.
- [82] Tomassoni, M. L., Amori, D., Magni, M. V., Changes of nuclear membrane lipid composition affect RNA nucleocytoplasmic transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 258, 476–481.
- [83] Holder, J. W., Elmore, E., Barret, J. C., Gap junction function and cancer. *Cancer Res.* 1993, 53, 3475–3485.
- [84] Jiang, W. G., Bryce, R. P., Mansel, R. E., Gamma linolenic acid regulates gap junction communication in endothelial cells and their interaction with tumour cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 1997, 56, 307–316.
- [85] Sumida, C., Graber, R., Nunez, E., Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 1993, 48, 117–122.

- [86] Jump, D. B., Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2004, *41*, 41–78.
- [87] Banni, S., Angioni, E., Casu, V., Melis, M. P., *et al.*, Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis* 1999, *20*, 1019–1024.
- [88] Yamaki, T., Yano, T., Satoh, H., Endo, T., *et al.*, High oleic acid oil suppresses lung tumorigenesis in mice through the modulation of extracellular signal-regulated kinase cascade. *Lipids* 2002, *37*, 783–788.
- [89] Nishizuka, Y., Protein Kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 1995, *9*, 484–496.
- [90] Palmantier, R., George, M. D., Akiyama, S. K., Wolber, F. M., *et al.*, Cis-polyunsaturated fatty acids stimulate beta1 integrin-mediated adhesion of human breast carcinoma cells to type IV collagen by activating protein kinases C-epsilon and -mu. *Cancer Res.* 2001, *61*, 2445–2452.
- [91] Murray, N. R., Weems, C., Chen, L. A., Leon, J., *et al.*, Protein kinase C betaII and TGFbetaRII in omega-3 fatty acid-mediated inhibition of colon carcinogenesis. *J. Cell Biol.* 2002, *157*, 915–920.
- [92] Vacaresse, N., Lajoie-Mazenc, I., Auge, N., Suc, I., *et al.*, Activation of epithelial growth factor receptor pathway by unsaturated fatty acids. *Circ. Res.* 1999, *85*, 892–899.
- [93] Escrich, E., Solanas, M., Moral, M., in: Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, C., Yaqoob, P. (Eds.), *Olive Oil and Health*, CABI International, Oxfordshire 2006, pp. 317–374.
- [94] Hardy, S., St-Onge, G. G., Joly, E., Langelier, Y., Prentki, M., Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40. *J. Biol. Chem.* 2005, *280*, 13285–13291.
- [95] Singh, J., Hamid, R., Reddy, B. S., Dietary fat and colon cancer: modulation of cyclooxygenase-2 by types and amount of dietary fat during the postinitiation stage of colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 1997, *57*, 3465–3470.
- [96] Davidson, L. A., Lupton, J. R., Jiang, Y., Chapkin, R. S., Carcinogen and dietary lipid regulate ras expression and localization in rat colon without affecting farnesylation kinetics. *Carcinogenesis* 1999, *20*, 785–791.
- [97] Clarke, S. D., Jump, D. B., Regulation of gene transcription by polyunsaturated fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 1993, *32*, 139–149.
- [98] Tiwari, R. K., Mukhopadhyay, B., Telang, N. T., Osborne, M. P., Modulation of gene expression by selected fatty acids in human breast cancer cells. *Anticancer Res.* 1991, *11*, 1383–1388.
- [99] Fernandes, G., Venkatraman, J. T., Modulation of breast cancer growth in nude mice by omega 3 lipids. *World Rev. Nutr. Diet.* 1991, *66*, 488–503.
- [100] Moral, R., Solanas, M., García, G., Colomer, R., Escrich, E., Modulation of EGFR and neu expression by n-6 and n-9 high-fat diets in experimental mammary adenocarcinomas. *Oncol. Rep.* 2003, *10*, 1417–1424.
- [101] Menendez, J. A., Vellon, L., Colomer, R., Lupu, R., Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erbB-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin™) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification. *Ann. Oncol.* 2005, *16*, 359–371.
- [102] Solanas, M., Moral, R., Escrich, E., The stimulating effect of a high-fat n-6 polyunsaturated diet on rat DMBA-induced mammary tumors is not related to changes in c-Ha-ras1 mRNA tumor expression. *Nutr. Res.* 2001, *21*, 1261–1273.
- [103] Solanas, M., Escrich, E., Rouzaut, A., Costa, I., *et al.*, Deregulated expression of the PCPH proto-oncogene in rat mammary tumors induced with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Mol. Carcinog.* 2002, *33*, 219–227.
- [104] Hamid, R., Sing, J., Reddy, B. S., Cohen, L. A., Inhibition by dietary menhaden oil of cyclooxygenase-1 and -2 in N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumor. *Int. J. Oncol.* 1999, *14*, 523–528.
- [105] Narayanan, B. A., Narayanan, N. K., Simi, B., Reddy, B. S., Modulation of inducible nitric oxide synthase and related proinflammatory genes by the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 2003, *63*, 972–979.
- [106] Davidson, L. A., Nguyen, D. V., Hokanson, R. M., Callaway, E. S., *et al.*, Chemopreventive n-3 polyunsaturated fatty acids reprogram genetic signatures during colon cancer initiation and progression in the rat. *Cancer Res.* 2004, *64*, 6797–6804.
- [107] Jurek, D., Udilova, N., Jozkowicz, A., Nohl, H., *et al.*, Dietary lipid hydroperoxides induce expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human colorectal tumor cells. *FASEB J.* 2005, *19*, 97–99.
- [108] Davis, C. D., Snyderwine, E. G., Analysis of EGFR, TGF-alpha, neu and c-myc in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced mammary tumors using RT-PCR. *Carcinogenesis* 1995, *16*, 3087–3092.
- [109] Tillotson, J. K., Darzynkiewicz, Z., Cohen, L. A., Ronai, Z., Effects of linoleic acid on mammary tumor cell proliferation are associated with changes in p53 protein expression. *Int. J. Oncol.* 1993, *3*, 81–87.
- [110] Wu, B., Iwakiri, R., Ootani, A., Tsunada, S. F., *et al.*, Dietary corn oil promotes colon cancer by inhibiting mitochondria-dependent apoptosis in azoxymethane-treated rats. *Exp. Biol. Med.* 2004, *229*, 1017–1025.
- [111] Kachhap, S. K., Dange, P., Ghosh, S. N., Effect of omega-6 polyunsaturated fatty acid (linoleic acid) on BRCA1 gene expression in MCF-7 cell line. *Cancer Lett.* 2000, *154*, 115–120.
- [112] Bernard-Gallon, D. J., Vissac-Sabatier, C., Antoine-Vincent, D., Rio, P. G., *et al.*, Differential effects of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on BRCA1 and BRCA2 gene expression in breast cell lines. *Br. J. Nutr.* 2002, *87*, 281–289.
- [113] Jiang, W. G., Hiscox, S., Hallett, M. B., Horrobin, D. F., *et al.*, Regulation of the expression of E-cadherin on human cancer cells by gamma-linolenic acid (GLA). *Cancer Res.* 1995, *55*, 5043–5048.
- [114] Jiang, W. G., Hiscox, S., Horrobin, D. F., Bryce, R. P., Mansel, R. E., Gamma linolenic acid regulates expression of maspin and the motility of cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, *237*, 639–644.
- [115] Escrich, E., Moral, R., García, G., Costa, I., *et al.*, Identification of novel differentially expressed genes by the effect of a high-fat n-6 diet in experimental breast cancer. *Mol. Carcinog.* 2004, *40*, 73–78.
- [116] Reyes, N., Iatropoulos, M., Mittelman, A., Geliebter, J., Microarray analysis of diet-induced alterations in gene expression in the ACI rat prostate. *Eur. J. Cancer Prev.* 2002, *11*, S37–S42.
- [117] Hughes-Fulford, M., Li, C.-F., Boonyaratankornkit, J., Sayyah, S., Arachidonic acid activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling and induces gene expression in prostate cancer. *Cancer Res.* 2006, *66*, 1427–1433.

- [118] Utermohlen, V., Tucker, M. A. M., Possible effects of dietary n-6 series polyunsaturated fatty acids on the development of immune dysfunction and infection. *Proc. Nutr. Soc.* 1986, 45, 327–331.
- [119] Calder, P. C., Dietary fatty acids and the immune system. *Lipids* 1999, 34, S137–S140.
- [120] Hwang, D., Fatty acids and immune responses – a new perspective in searching for clues to mechanism. *Annu. Rev. Nutr.* 2000, 20, 431–456.
- [121] Stulnig, T. M., Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: mechanisms and effects. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003, 132, 310–321.
- [122] Calder, P. C., Yaqoob, P., Thies, F., Wallace, F. A., Miles, E. A., Fatty acids and lymphocyte functions. *Brit. J. Nutr.* 2002, 87, S31–S48.
- [123] Kossoy, G., Madar, Z., Ben-Hur, H., Gal, R., *et al.*, Transplacental effect of a 15% olive-oil diet on functional activity of immune components in the spleen and colon tumors of rat offspring. *Oncol. Rep.* 2001, 8, 1045–1049.
- [124] Miles, E. A., Zoubouli, P., Calder, P. C., Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition* 2005, 21, 389–394.
- [125] Yaqoob, P., in: Quiles, J. L., Ramírez-Tortosa, C., Yaqoob, P. (Eds.), *Olive Oil and Health*, CABI International, Oxfordshire 2006, pp. 265–283.
- [126] Perez-Jimenez, F., Alvarez de Cienfuegos, G., Badimon, L., Barja, G. *et al.*, International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur. J. Clin. Invest.* 2005, 35, 421–424.

Antecedentes y resumen de los resultados:

Este artículo integra, al igual que en el anterior, los datos experimentales que demuestran la relación entre los lípidos de la dieta y el cáncer, poniendo, específicamente en esta publicación, especial relevancia a los descritos con el aceite de oliva. En concreto, la Tabla 2 del artículo expone de manera muy precisa los mecanismos de acción del aceite de oliva en el cáncer, así como sus componentes involucrados y las referencias bibliográficas más relevantes sobre este tema. En este sentido, deben señalarse los resultados de los estudios realizados por el GMECM en relación al aceite de oliva y que han aportado datos nuevos y muy sugestivos de su efecto modulador negativo en la carcinogénesis mamaria experimental. Este artículo amplía las evidencias descritas en el anterior (Artículo 7) en todos los apartados y, por las mismas razones expuestas en el anterior, se incluye en esta Tesis Doctoral.

Entre los temas que más relevantes que se tratan en este artículo se halla el reconocimiento del papel de los componentes minoritarios del aceite de oliva en el efecto modulador de este aceite en el cáncer de mama, adicional al del ácido oleico. Entre estos se incluyen: los fenoles que, al reducir la biodisponibilidad de los carcinógenos e inhibir su activación metabólica, interfieren con la iniciación de la carcinogénesis o que, al inhibir la producción de eicosanoides inflamatorios y citoquinas, influyen en la respuesta inmune; otros con poder antioxidante, como el hidroxitirosol, la oleuropeína o el ácido cafeico, que reducen la peroxidación lipídica y el daño oxidativo subsecuente en el ADN, así como la peroxidación lipídica de las membranas celulares, o que inhiben la síntesis de leucotrienos, con actividad proliferativa; los lignanos que, al mostrar similitudes estructurales con estradiol y tamoxifen, muestran efectos antiestrogénicos; o el escualeno que, al modular la biosíntesis de los ácidos biliares, regula el efecto proliferativo de éstos o que, al inhibir la actividad de enzimas implicadas en la vía metabólica del colesterol, como la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG CoA) reductasa, disminuye los niveles intermediarios lipídicos requeridos para la prenilación de Ras, necesaria para su activación en la membrana, tal como se explicará en el apartado B de la “Discusión”.

Dadas las características de este artículo, similar al anterior, su contenido se tratará en el apartado D de la “Discusión” de la Tesis Doctoral.

RESULTADOS

Mol Nutr Food Res 2007; 51: 1279-1292

.....

9. ARTÍCULO 9

Differential expression of H19 and vitamin D3 upregulated protein 1 as a mechanism of the modulatory effects of high virgin olive oil and high corn oil diets on experimental mammary tumours.

M. Solanas, R. Moral, G. García, L. Grau, E. Vela, R. Escrich, **I. Costa**, E. Escrich

European Journal of Cancer Prevention 2009; 18:153-161

RESULTADOS

Differential expression of H19 and vitamin D3 upregulated protein 1 as a mechanism of the modulatory effects of high virgin olive oil and high corn oil diets on experimental mammary tumours

Montserrat Solanas^a, Raquel Moral^a, Gemma Garcia^a, Laura Grau^a, Elena Vela^a, Raquel Escrich^a, Irmgard Costa^{a,b} and Eduard Escrich^a

Dietary lipids have a role in the aetiology of breast cancer. We have reported earlier that a high corn oil diet downregulates H19 and vitamin D3 upregulated protein 1 (VDUP1) messenger RNA (mRNA) expression in rat dimethylbenz (α) anthracene-induced mammary adenocarcinomas in comparison with the control low-fat diet, this effect being associated with a higher degree of tumour malignancy. This result was compatible with the stimulating effect of this diet. In this study we have investigated the influence of a high extra virgin olive diet on H19 and VDUP1 mRNA and/or protein expression. We have shown earlier that this high-fat diet confers to the tumours a more benign phenotype in accordance with its potential protective effect on mammary cancer. We have also analysed the effects on the mRNA and protein expression of insulin-like growth factor-2, in close relation with H19, and the expression and activity of the thioredoxin protein, negatively regulated by VDUP1. mRNA and protein expression were analysed by chemiluminescent northern blot and western blot, respectively. Thioredoxin activity was determined by the insulin-reducing assay. The results showed that the high olive oil diet does not change the tumour expression of H19 and VDUP1. Moreover, tumours from the animals fed this diet displayed higher levels of the

insulin-like growth factor-2 mRNAs, which are related to a higher rate of degradation or a lower traducibility. Finally, tumour expression and activity levels of thioredoxin-1 protein did not change irrespective of the diet. These results suggest that the differential effects of high olive oil and high corn oil diets on mammary cancer are exerted by means of a different, specific influence on gene expression. *European Journal of Cancer Prevention* 18:153–161 © 2009 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

European Journal of Cancer Prevention 2009, 18:153–161

Keywords: breast cancer, dietary lipids, gene expression, H19, insulin-like growth factor-2, olive oil, thioredoxin, vitamin D3 upregulated protein 1

^aDepartment of Cell Biology, Physiology and Immunology, Medical Physiology Unit, Medicine School, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra and

^bDepartment of Pathology, Hospital de Sabadell, Corporació Parc Taulí, Sabadell, Barcelona, Spain

Correspondence to Dr Eduard Escrich, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Medical Physiology Unit, Medicine School, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain
Tel: +34 93 581 1423; e-mail: eduard.escrich@uab.es

Received 4 July 2008 Accepted 4 August 2008

Introduction

Breast cancer is the most frequent neoplasia in women worldwide (Jemal *et al.*, 2007). It is widely accepted that, besides genetic and endocrine factors, environmental factors have an important role in the occurrence of this cancer. Among the latter, nutrition has been shown to be significant. In particular, epidemiological and especially experimental studies show dietary lipids to be one of the most remarkable factors (Bartsch *et al.*, 1999; Lee and Lin, 2000; WCRF and AICR, 2007). The main support for a relationship between dietary lipids and breast cancer in human populations comes from ecological studies, including those of international correlations and migrations. In contrast, analytic epidemiology, including case-control and cohort studies, has generated conflicting results, probably because of methodological reasons (Willett, 1999; Lee and Lin, 2000; Kesteloot and Zhang, 2006). In contrast, the influence of dietary lipids on

breast cancer has been clearly shown in animal studies, where it has been demonstrated that their effects depend on the type and quantity of fat consumed, as well as on the particular critical phases of the carcinogenesis in which they act (Welsch, 1992; Wynder *et al.*, 1997; Bartsch *et al.*, 1999). Thus, the n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA), especially linoleic acid (18:2n-6), have a strong tumour-enhancing effect. Saturated fatty acids also enhance tumourigenesis, but more weakly. On the contrary, n-3 PUFA, conjugated linoleic acid and γ -linolenic acid, have shown inhibitory effects on experimental cancer. Oleic acid (18:1n-9), present in high levels in olive oil, has aroused growing interest from the epidemiological studies showing that the Mediterranean diet, whose hallmark is the high intake of olive oil, lowers cancer and cardiovascular risk (Trichopoulou *et al.*, 2000; Gallus *et al.*, 2004). Some inconsistent results, however, have been obtained experimentally, having reported nonpromoting,

weak promoting and even promoting effects on tumour growth (Ip, 1997; Bartsch *et al.*, 1999; Escrich *et al.*, 2006). In any case, when considering the effects of olive oil on cancer it must be taken into account that besides the oleic acid, virgin olive oil contains certain minor compounds in its unsaponifiable fraction, such as phenols, phytosterols, flavonoids, squalene and lignans, which are bioactive and may contribute to the putative protective effects of this oil (Galli and Visioli, 1999; Owen *et al.*, 2004). In fact, the different relative content of these minor compounds in the different types of olive oil could account for the discrepancies among studies.

In the rat 7,12-dimethylbenz (α) anthracene (DMBA)-induced mammary cancer model, we have shown that a high corn oil diet, rich in n-6 PUFA, confers a clinical behaviour of higher malignancy and a lower degree of histopathological differentiation to the tumours, in comparison with a low-fat diet. On the contrary, a high extra virgin olive oil diet would act as a negative modulator of the mammary carcinogenesis, conferring a lower degree of malignancy, both clinically and morphologically, to the DMBA-induced mammary adenocarcinomas compared with the control and high corn oil diets (Solanas *et al.*, 2002a; Costa *et al.*, 2004). These changes are accompanied by modifications in the expression of genes that have been related to proliferation and differentiation. In fact, the modulation of gene expression is one of the postulated mechanisms by which dietary fats exert their effects on experimental breast cancer (Escrich *et al.*, 2007). In this regard, we have previously shown the distinct influence of high n-6 and high n-9 fat diets on the expression of the ErbB family of membrane receptors (Moral *et al.*, 2003; Escrich *et al.*, 2006), the PCPH protooncogene (Solanas *et al.*, 2002b; Escrich *et al.*, 2006), β -actin and several markers of the mammary gland differentiation (Moral *et al.*, 2008). In addition, they do not modify the c-Ha-ras1 messenger RNA (mRNA) levels (Solanas *et al.*, 2001a; Escrich *et al.*, 2006). Interestingly, using complimentary DNA (cDNA) microarrays we have also shown that the high corn oil diet downregulates submaxillary gland α -2u globulin, H19 and vitamin D3 upregulated protein 1 (VDUP1) (Escrich *et al.*, 2004), genes that have also been related to differentiation.

The imprinted H19 gene belongs to the group of genes that act at the RNA level, the so-called 'riboregulators'. In most tissues, H19 is a paternally imprinted, maternally expressed gene. It is abundantly expressed in foetal life and is downregulated postnatally in almost all tissues. Its transcript, however, remains detectable in a few adult organs, in particular the mammary gland (Looijenga *et al.*, 1997; Adriaenssens *et al.*, 1998). H19 activation and deregulation have been reported in various tumours but its biological role in cancer is not well understood (Ariel *et al.*, 2000; Lottin *et al.*, 2005). H19 and insulin-like growth factor-2 (IGF2) genes are reciprocally imprinted

(Pedone *et al.*, 1999). The IGF2 product is involved in the regulation of cell proliferation, growth and differentiation in the embryo and is also expressed in many neoplasms, including breast cancer, where it has been implicated in the autocrine and paracrine regulation of cancer cell growth (Yballe *et al.*, 1996; Matouk *et al.*, 2004).

VDUP1 was reported originally as an upregulated gene by vitamin D3 in an HL-60 model system of cellular differentiation. It has been shown to be upregulated by anticancer agents and downregulated in various tumour cells, suggesting its involvement in the regulation of tumour development, progression and metastasis. Besides, VDUP1 acts in other essential biological functions, such as the fatty acid utilization (Kaimul *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007). It has been suggested that the inhibition of thioredoxin-1 (TRX) reducing activity by VDUP1 is one of the mechanisms involved in the growth inhibitory effect of this protein (Nishiyama *et al.*, 1999). TRX is a small ubiquitous protein having dithiol/disulfide oxidoreductase activity. It acts as an antioxidant by reducing reactive oxygen species, thus defending cells against oxidative stress. TRX has many cellular functions, including the promotion of cell proliferation and tumour angiogenesis, and inhibition of apoptosis (Arnér and Holmgren, 2006).

To elucidate whether the different modulatory effects of high n-6 and high n-9 fat diets, stimulatory and protective, respectively, on the promotion of mammary cancer are accompanied by a distinct influence on the expression of H19 and VDUP1, we examined the expression of these genes in tumours from animals fed these two high-fat diets. In addition, we also investigated the expression of the IGF2, in close relation to H19, and the expression and activity of TRX, in relation to VDUP1.

Methods

Experimental mammary tumours

Experimental mammary adenocarcinomas were obtained in a previous work from 60 female Sprague-Dawley rats induced with a single dose of 5 mg of DMBA (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) by oral gavage and fed different semisynthetic diets, following a promotion design. All of the animals received humane care under an institutionally approved experimental animal protocol, following the legislation applicable in Spain. Rats ($n = 20$ for each group) were given a normolipidic 3% corn oil diet (control low-fat diet group), a high 20% corn oil diet (high corn oil diet group, HFCO) and a high extra virgin olive oil diet containing 3% corn oil and 17% olive oil (high olive oil diet group, HFOO) (Solanas *et al.*, 2002a). The preparation and suitability of the experimental diets have been described earlier (Escrich *et al.*, 1994a,b). Tumours were rapidly removed, measured and rinsed in normal saline. Samples were flash-frozen in liquid nitrogen and

stored at -80°C . Only confirmed mammary adenocarcinomas were included in this study.

Northern blot analysis

Total RNA was extracted from frozen mammary adenocarcinomas by guanidinium isothiocyanate method. mRNA relative abundance was analysed by chemiluminescent Northern blot, as described earlier (Solanas *et al.*, 2001b). Briefly, 20 μg of total RNA was electrophoresed on formaldehyde-agarose gel transferred onto positively charged nylon membranes and hybridized with specific PCR digoxigenin-labelled (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) probes. Probes for H19 and VDUP1 were obtained as cultures of *Escherichia coli* DH10B transformed with the correspondent I.M.A.G.E. Consortium Collection insert and amplified using cDNA Primer GF-200 (ResGen, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA). A 1024-bp mouse IGF2 probe (ATCC, Manassas, Virginia, USA) and a 756-bp rat p0 cDNA (kindly provided by Dr Y.L. Chan (Wool *et al.*, 1991) were amplified using random primers. Detection was performed with an alkaline phosphatase-coupled antidigoxigenin antibody and CSPD as chemiluminescent substrate (Roche Diagnostics GmbH). Blots were exposed to Hyperfilm (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and the densitometry of bands was analysed with the Gel Doc 2000 image system and the Quantity One software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). Ribosomal phosphoprotein P0 mRNA was used as an endogenous control to normalize each sample and the values were represented as mRNA relative abundance.

Western blot analysis

Cell lysates from frozen tumours were prepared with a lysis buffer containing 50 mmol/l Tris-HCl pH 7.2, 250 mmol/l sucrose, 2 mmol/l EDTA, 1 mmol/l EGTA, 5 mmol/l MgCl_2 , 50 $\mu\text{mol/l}$ NaF, 100 $\mu\text{mol/l}$ Na_3VO_4 , 1% Triton, 10 mmol/l β -mercaptoethanol, and protease inhibitors (Sigma-Aldrich). Mouse foetal liver and Raji whole-cell lysates (Anaspec, Inc., San Jose, California, USA) were used as positive controls for IGF2 and VDUP1, respectively. The protein concentration was determined by a Lowry protein assay. Twenty to 200 μg of protein was separated by 12–15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotted onto PVDF membranes (Hybond-P; GE Healthcare). The membrane was blocked and incubated with the specific primary antibody: anti-IGF2 clone S1F2, used at 1:1000 dilution (Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, New York, USA, 05-166); anti-VDUP1/Txnip clone JY2, used at 1:1000 dilution (MBL International, Woburn, Massachusetts, USA, K0205-3); or antithioredoxin, used at 1:8500 dilution (IMCO Corporation, Stockholm, Sweden, ATRX-06). Antibodies were detected on Hyperfilm using the suitable horseradish peroxidase-labelled secondary antibody and the Amersham ECL Western Blotting

Detection system (GE Healthcare). We used three replicates of a control tumour sample, or of the positive control in the case of IGF2, in each western blot to compare the different blots. Densitometric values of bands were analysed using Quantity One software (Bio-Rad Laboratories) and the values were first normalized relative to the mean of the replicates of the control sample and then to micrograms of protein loaded.

Determination of thioredoxin-1 activity

The activity of TRX was determined by an insulin-reducing assay, according to the method described by Holmgren (Holmgren and Björnstedt, 1995), with slight modification. Equal amounts (35 μg) of total cellular protein, prepared with lysis buffer without β -mercaptoethanol, in a volume of 68 μl were preincubated in 2 μl of the dithiothreitol activation buffer (50 mmol/l HEPES pH 7.6, 1 mmol/l EDTA, 1 mg/ml BSA and 2 mmol/l dithiothreitol) at 37°C for 20 min, to reduce and activate TRX, which might contain aggregated material with intermolecular or intramolecular disulfides. The preincubated protein extracts were mixed with 40 μl of the reaction mixture (1 mol/l HEPES pH 7.6, 0.2 mol/l EDTA, 40 mg/ml NADPH and 10 mg/ml insulin) and water to a final volume of 120 μl . The reaction was started by the addition of 0.4 U of rat TRX reductase, or an equal volume of water as a negative control, followed by 20 min of incubation at 37°C . The reaction was stopped by the addition 0.4 mg/ml 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)/6 mol/l guanidine hydrochloride in 0.2 mol/l Tris-HCl, pH 8.0, and then absorbance at 412 nm was measured. From the absorbance of each sample the absorbance of the respective control sample lacking TRX reductase was subtracted. Finally, the calculated values after subtracting the absorbance of a control tube without protein extract were compared with the standard curve for human TRX (0–50 $\mu\text{mol/l}$) to obtain quantitative determinations of the absolute amounts of TRX.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with the SPSS software (version 15, SPSS Inc., Illinois, USA). Quantitative data were analysed with the nonparametric Mann-Whitney *U* test. mRNA expression values were also analysed qualitatively calculating the percentage of tumours in each group with a relative abundance higher than the median of the control group. Qualitative data were analysed through the χ^2 test. The nonparametric correlations were carried out through Kendall's Tau-b and Spearman's Rho tests. The level of significance was $P < 0.05$.

Results and discussion

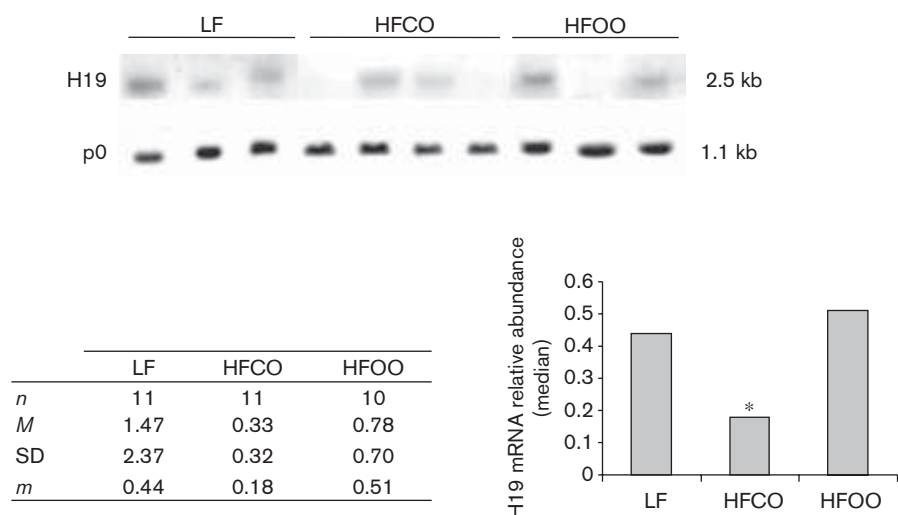
Northern blot analyses in DMBA-induced rat mammary adenocarcinomas using a H19 cDNA probe revealed one

mRNA species of approximately 2.5 kb (Fig. 1). The levels of H19 mRNA expression were variable among the different tumour samples and, in general, they were low. Among adenocarcinomas with detectable expression of H19, the mRNA levels were lower in the HFCO group than in the control, this decrease being close to significance in the quantitative analysis and statistically significant in the qualitative analysis. In contrast, the HFOO group did not show differences in comparison with the control (Fig. 1). As mentioned above, tumours from animals fed the high corn oil diet, rich in n-6 PUFA, have a more malignant phenotype than tumours from the high extra virgin olive oil diet group, according to the promoting effect of the first diet and the negative modulatory effect of the second one (Solanas *et al.*, 2002a; Costa *et al.*, 2004). In this sense, the results obtained in this study are in agreement with those of Ariel *et al.* (2000) in which the fraction of tumour cells expressing H19 is reduced in parallel to loss of tumour differentiation in human bladder carcinoma. The different regulation of the H19 mRNA expression in mammary tumours depending on the type of dietary fat suggests that this ribo-regulator may be involved in the differential effects that these two high-fat diets exert on breast cancer. The function of H19 in the mammary gland is of particular interest as it is one of the few tissues that continue to express detectable amounts of H19 mRNA in adulthood, unlike the most part of adult organs where the gene is strongly repressed after birth and its expression reappears when a malignant process occurs (Ariel *et al.*, 2000). The status of H19 in cancer is still a matter of debate because H19 may have either tumour-promoting or tumour-

suppressing activities, probably depending of the local environment (Lottin *et al.*, 2005).

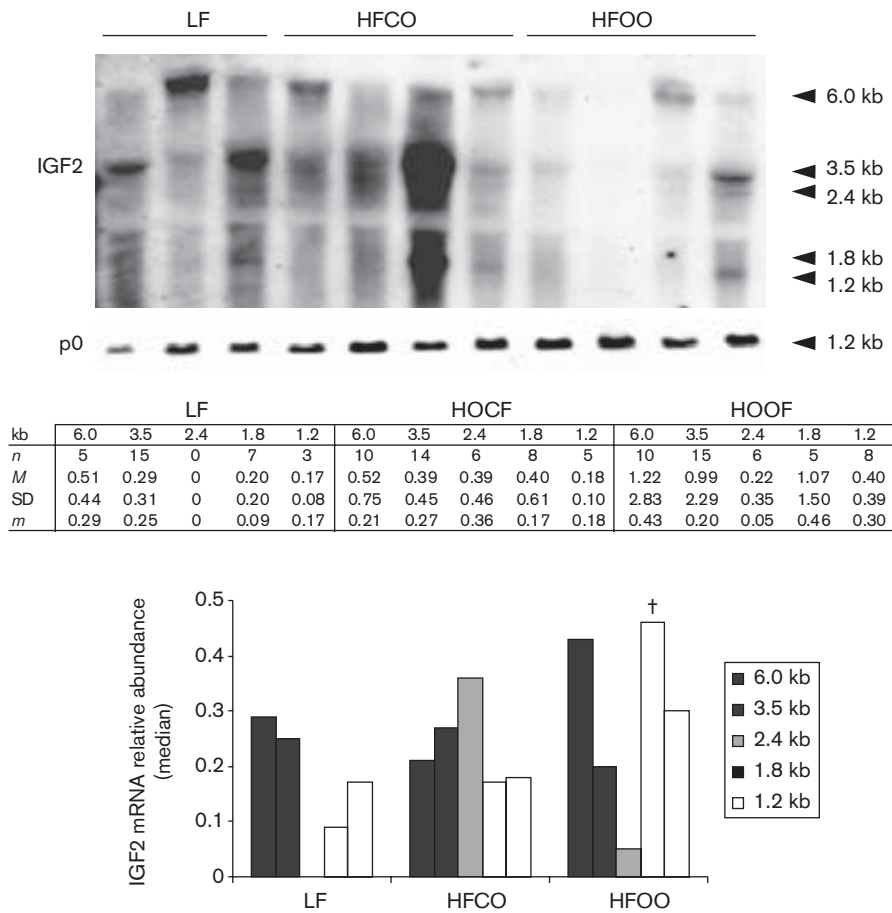
One of the functions of H19 is supposed to be the regulation of the transcription and traducibility of the IGF2 gene. Thus, H19 would regulate the allele-specific expression of IGF2 in *cis* and may also regulate IGF2 expression in *trans*, as the H19 transcript is associated with polysomes in a variety of cell types, in both humans and mice (Nishiyama *et al.*, 1999). In this study, the hybridization of the tumour RNA with the IGF2 cDNA probe rendered mRNAs of 6.0, 3.5, 2.4, 1.8 and 1.2 kb (Fig. 2, Table 1), which correspond to the multiple mRNAs described in the literature that produce the same 67-amino-acid-long peptide (Nielsen and Christiansen, 1992; De Moor *et al.*, 1994). The analysis of the relative abundance of these transcripts revealed that the levels of the 3.5 kb transcript were not different among experimental groups. Higher values of the 6.0, 1.8 and 1.2 kb mRNAs were, however, obtained in the HFOO group, being the increase in the 1.8 kb mRNA in relation to the control close to statistical significance ($P < 0.1$). The levels of the 2.4 kb transcript were higher in the HFCO group than in the others (Fig. 2). The full-length 3.5-kb mRNA is one of the most abundant transcripts in rat cells and tissues and is likely to be the predominant template for preproIGF2 synthesis *in vivo*. The smaller transcripts could arise after endonucleolytic cleavage of the larger mRNAs. Thus, the 1.8 kb transcript is an endonucleolytic product of the 3.5-kb mRNA, which could correspond either to the untranslated tail fragment or to the exonuclease-degraded upstream fragment. The

Fig. 1



H19 messenger RNA (mRNA) expression in mammary adenocarcinomas from animals fed low-fat, high corn oil or high virgin olive oil diets. Representative Northern blot and results of the data analysis using ribosomal phosphoprotein p0 mRNA to normalize. *n*, number of tumours analysed; *M*, mean; *m*, median; *SD*, standard deviation. * $P < 0.05$ compared with the low-fat diet control group. HFCO, high corn oil diet group; HFOO, high olive oil diet group.

Fig. 2



Insulin-like growth factor-2 (IGF2) messenger RNA (mRNA) expression in mammary adenocarcinomas from the different experimental groups. Representative Northern blot and results of the data analysis of the different mRNA species (6.0, 3.5, 2.4, 1.8 and 1.2 kb) using ribosomal phosphoprotein p0 mRNA to normalize. *n*, number of tumours analysed; *M*, mean; *m*, median; *SD*, standard deviation. [†]0.05 < *P* < 0.1 compared with the low-fat diet (LF) control group. HFCO, high corn oil diet group; HFOO, high olive oil diet group.

Table 1 Percentage of rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas expressing each of the IGF2 mRNA species in the different experimental groups

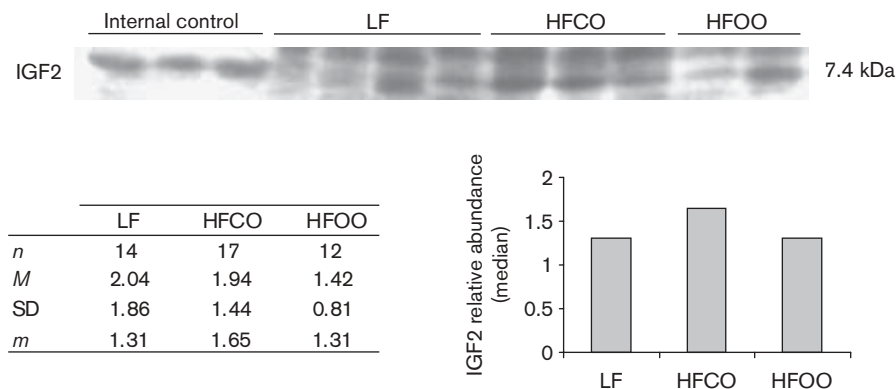
	LF	HFCO	HFOO
6.0 kb	33.3	71.4	66.7
3.5 kb	100.0	100.0	100.0
2.4 kb	0.0	50.0	40.0
1.8 kb	46.7	57.1	33.3
1.2 kb	20.0	35.7	53.3

HFCO, high corn oil diet group; HFOO, high olive oil diet group; LF, control low fat diet group.

upstream nonpolyadenylated 1.2 kb transcript might also originate from an alternative endonucleolytic event and it is much less efficiently translated than the predominant 3.5 kb mRNA (Nielsen and Christiansen, 1992). The 6.0 and 2.4 kb mRNAs have leader sequences that form stable secondary structures reducing their translational efficiency (De Moor *et al.*, 1994).

Our results showed a different profile of tumour IGF2 mRNA expression among the experimental groups. Taking into account the different origin and characteristics of the IGF2 mRNA species, our data suggest that in high virgin olive oil diet tumours the rate of IGF2 mRNA degradation is higher and the mRNA translation is lower than in tumours from the other groups, indicating a different posttranscriptional regulation of the IGF2 production. It has been described that IGF2 mRNA levels are dependent of the growth conditions of the cells. In fact, in Hep3B cells, lower levels of IGF2 mRNA have been observed in cells grown in 10% fetal calf serum compared with starved cells as a consequence of a higher mRNA degradation (Scheper *et al.*, 1996). Despite these results, the observed changes in the levels of the protein were small, with a tendency to be higher (25% of increase) in the HFCO group in comparison with the control and HFOO groups (Fig. 3). This tendency is

Fig. 3



Insulin-like growth factor-2 (IGF2) protein expression in the mammary adenocarcinomas from the different experimental groups. Representative western blot and results of the data analysis. *n*, number of tumours analysed; *M*, mean; *m*, median; *SD*, standard deviation. HFCO, high corn oil diet group; HFOO, high olive oil diet group; LF, control low-fat diet group.

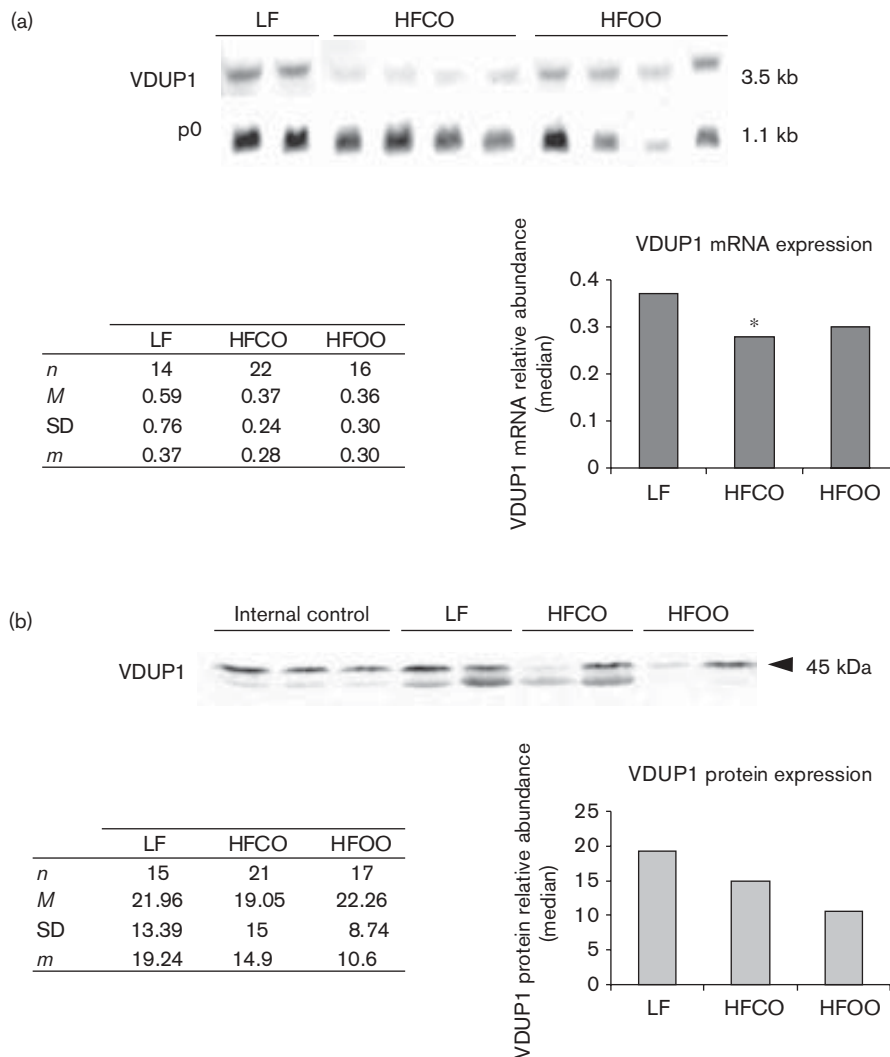
in accordance with the tumour-stimulating effect of the high corn oil diet as IGF2 promotes cellular growth and induces cellular mitosis (Tanos *et al.*, 2004). In addition, mRNA H19 expression levels and those of the 3.5 kb IGF2 mRNA correlated inversely in control tumours ($P < 0.05$), which is compatible with the antagonist activity of H19 on IGF2 expression in *trans* (Li *et al.*, 1998). The fact that this correlation disappeared in high-fat diet groups suggests an effect of high-fat diets on the regulation of the expression of these genes.

We also investigated whether the opposite effect of the high olive oil and high corn oil diets on mammary carcinogenesis also involved a different regulation of the VDUP1 expression. Low and variable levels of the 3.5 kb VDUP1 mRNA were detected among tumours (Fig. 4a). Although the tumours from the HFCO group displayed lower levels of VDUP1 mRNA compared with those from the control, which were statistically significant in the qualitative analysis, the high olive oil diet did not modify these levels. The results of the analysis of the 45-kDa VDUP1 levels showed a nonsignificant decrease in HFCO tumours. Surprisingly, we observed the same tendency in the HFOO group (Fig. 4b). VDUP1 is a multifunctional protein involved in maintaining cellular homeostasis. It is induced by a variety of stresses, including H_2O_2 , irradiation, heat shock, serum starvation and transforming growth factor- β . In addition, anticancer and antiproliferative reagents increase VDUP1 expression in cancer cells; meanwhile, its expression is often reduced in various tumour tissues, including breast, lung and colon cancers. These findings suggest that VDUP1 is a growth suppressor (Kaimul *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007). In this work, the underexpression of VDUP1 in the tumours with

a more malignant phenotype, those from the HFCO group, is in accordance with the mentioned suppressor role. In this sense, the fact that HFOO tumours tended to have lower levels of VDUP1 protein in comparison with control tumours results in a paradox taking into account the more benign biology of olive oil diet tumours.

It has been postulated that the growth suppressive function of VDUP1 may be explained at least partly by its negative regulation of TRX (Kaimul *et al.*, 2007). TRX takes part in the TRX-thioreductase system, one of the most important systems for the maintenance of the reducing thiol-disulfide status of the cytosol. VDUP1 binds to the catalytically active centre of TRX inactivating its reducing activity (Nishiyama *et al.*, 1999; Junn *et al.*, 2000). TRX is a potent antioxidant and acts as a scavenger of reactive oxygen species. Moreover, it can act as a cellular growth factor, stimulating proliferation of cell, and can also alter the DNA binding of several transcription factors, function as an antiapoptosis factor or induce tumour angiogenesis. It has been expressed at relatively high levels in a number of cancers, including that of the breast (Arnér and Holmgren, 2006). We have detected the expression and activity of the 12-kDa thioredoxin protein in all the tumours that have been analysed and in both cases the levels were similar among experimental groups (Fig. 5). Besides, we verified that VDUP1 protein expression did not correlate with thioredoxin activity in any experimental group. These results were unexpected taking into account the underexpression of VDUP1 in tumours from high corn oil diet group and the known negative regulator role of VDUP1 on TRX (Nishiyama *et al.*, 1999). In this regard, it has been suggested that TRX and VDUP1 may have

Fig. 4

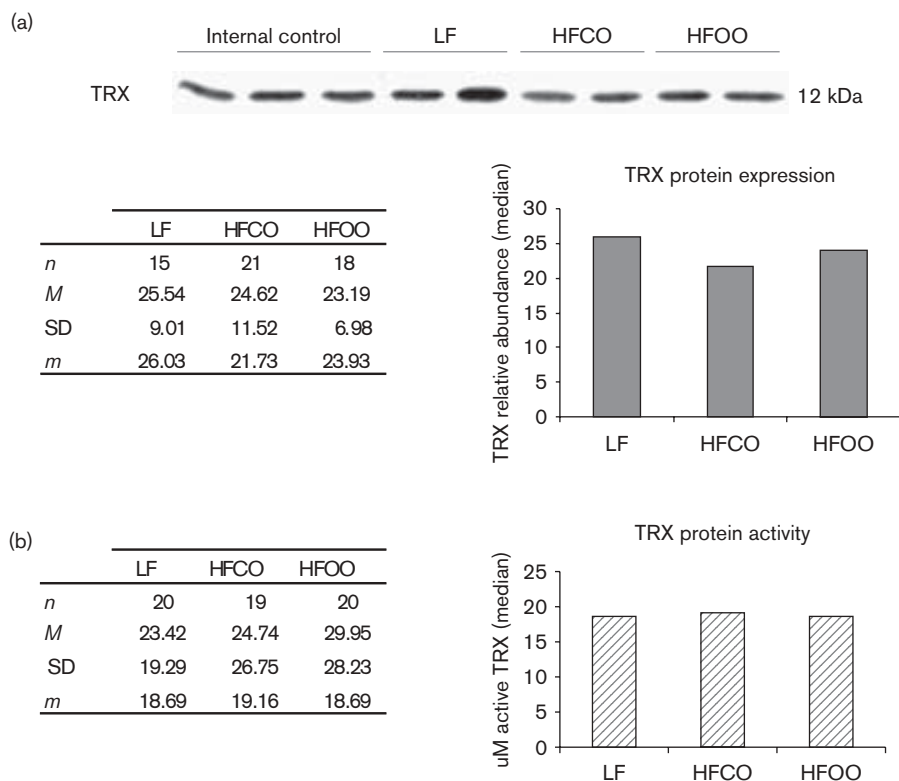


(a) Vitamin D3 upregulated protein 1 (VDUP1) mRNA expression in mammary adenocarcinomas from the different experimental groups. Representative Northern blot and results of the data analysis using ribosomal phosphoprotein p0 mRNA to normalize. * $P < 0.05$ compared with the low-fat diet (LF) control group. (b) VDUP1 protein expression in the mammary adenocarcinomas from the different groups. Representative western blot and results of the data analysis. *n*, number of tumours analysed; *M*, mean; *m*, median; *SD*, standard deviation. HFCO, high corn oil diet group; HFOO, high olive oil diet group.

independent functions in cells. In particular, some functions of VDUP1 may not be explained by the inhibition of TRX and it is possible that VDUP1 has a unique function independent of its role as a negative regulator of TRX (Kaimul *et al.*, 2007). In contrast, it must be pointed out that high extra virgin olive oil, which contains a high level of antioxidants, was not accompanied by changes in the central redox molecule, TRX. The influence of high olive oil diet on the oxidative stress as a mechanism of its modulatory effect on mammary cancer, and specifically the role of the selenoprotein thioredoxin reductase, needs further investigation.

In conclusion, in this study we have demonstrated that the high virgin olive oil and high corn oil diets have different effects on the expression of H19, VDUP1 and IGF2 genes in experimental mammary tumours. This could be one of the mechanisms by which these two high-fat diets exert their protective or promoting action, respectively, on breast carcinogenesis. The fact that modifications in expression are not evident at the protein level and the lack of changes in TRX activity make necessary further studies to understand the putative role of such genes in the modulatory effects that dietary lipids have on this neoplasia.

Fig. 5



(a) Thioredoxin-1 (TRX) protein expression in mammary adenocarcinomas from the different experimental groups. Representative western blot and results of the data analysis. (b) TRX protein activity in the mammary adenocarcinomas performed by the insulin-reducing assay. Results of the data analysis. *n*, number of tumours analysed; *M*, mean; *m*, median; *SD*, standard deviation. HFCO, high corn oil diet group; HFOO, high olive oil diet group; LF, control low-fat diet group.

Acknowledgements

This study was supported by grants from 'Plan Nacional de I + D + I 2000–2003' and FEDER (BFI 2003-07341); 'Plan Nacional de I + D + I 2004–2007' (AGL2006-07691/ALI); and 'Fundación Patrimonio Comunal Olivarero 2008–2012' (FPCO2008-165.396).

References

- Adriaenssens E, Dumont L, Lottin S, Bolle D, Leprêtre A, Delobelle A, *et al.* (1998). H19 overexpression in breast adenocarcinoma stromal cells is associated with tumour values and steroid receptor status but independent of p53 and Ki-67 expression. *Am J Pathol* **153**:1597–1607.
- Ariel I, de Groot N, Hochberg A (2000). Imprinted H19 gene expression in embryogenesis and human cancer: the oncofetal connection. *Am J Med Genet* **91**:46–50.
- Arnér ES, Holmgren A (2006). The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol* **16**:420–426.
- Bartsch H, Nair J, Owen RW (1999). Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* **26**:2209–2218.
- Costa I, Moral R, Solanas M, Escrich E (2004). High-fat corn oil diet promotes the development of high histologic grade rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not. *Breast Cancer Res Treat* **86**:225–235.
- De Moor CH, Jansen M, Sussenbach JS, Van den Brande JL (1994). Differential polysomal localization of human insulin-like-growth-factor-2 mRNAs in cell lines and foetal liver. *Eur J Biochem* **222**:1017–1024.
- Escrich E, Solanas M, Segura R (1994a). Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: I - Diet Definition. *In vivo* **8**:1099–1106.
- Escrich E, Solanas M, Segura R (1994b). Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: II - Suitability of the Diets. *In vivo* **8**:1107–1112.
- Escrich E, Moral R, Garcia G, Costa I, Sánchez JA, 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**:73–78.
- Escrich E, Solanas M, Moral R (2006). Olive oil, and other dietary lipids, in cancer: experimental approaches. In: Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Yaqoob P, editors. *Olive Oil and Health*. Oxford: CABI Publishing. pp. 317–374.
- Escrich E, Moral R, Grau L, Costa I, Solanas M (2007). Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer. *Mol Nut Food Res* **51**:1279–1292.
- Galli C, Visioli F (1999). Antioxidant and other activities of phenolics in olives/olive oil, typical components of the Mediterranean diet. *Lipids* **34** (Suppl): S23–S26.
- Gallus S, Bosetti C, La Vecchia C (2004). Mediterranean diet and cancer risk. *Eur J Cancer Prev* **13**:447–452.
- Holmgren A, Björnstedt M (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* **252**:199–208.
- Ip C (1997). Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acid, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am J Clin Nutr* **66**:S15235–S15295.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ (2007). Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* **57**:43–66.
- Junn E, Han SH, Im JY, Yang Y, Cho EX, Um HD *et al.* (2000). Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *J Immunol* **164**:6287–6295.

- Kaimul AM, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J (2007). Thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cancer and metabolic syndrome. *Free Radic Biol Med* **43**:861–868.
- Kesteloot HE, Zhang J (2006). Differences in breast cancer mortality worldwide: unsolved problems. *Eur J Cancer Prev* **15**:416–423.
- Kim SY, Suh HW, Chung JW, Yoon SR, Choi I (2007). Diverse functions of VDUP1 in cell proliferation, differentiation, and diseases. *Cell Mol Immunol* **4**:345–351.
- Lee MM, Lin SS (2000). Dietary fat and breast cancer. *Annu Rev Nutr* **20**:221–248.
- Li YM, Franklin G, Cui HM, Svensson K, He XB, Adam G *et al.* (1998). The H19 transcript is associated with polysomes and may regulate IGF2 expression in *trans*. *J Biol Chem* **273**:28247–28252.
- Looijenga LH, Verkerk AJ, De Groot N, Hochberg AA, Oosterhuis JW (1997). H19 in normal development and neoplasia. *Mol Reprod Dev* **46**:419–439.
- Lottin S, Adriaenssens E, Berteaux N, Leprêtre A, Vilain MO, Denhez E *et al.* (2005). The human H19 gene is frequently overexpressed in myometrium and stroma during pathological endometrial proliferative events. *Eur J Cancer* **41**:168–177.
- Matouk I, Ayesh B, Schneider T, Ayesh S, Ohana P, de-Groot N *et al.* (2004). Oncofetal splice-pattern of the human H19 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **318**:916–919.
- Moral R, Solanas M, García G, Colomer R, Escrich E (2003). Modulation of EGFR and neu expresión by n-6 and n-9 high fat diets in experimental mammary adenocarcinomas. *Oncol Reports* **10**:1417–1424.
- Moral R, Solanas M, García 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 tumours. *Oncol Rep* **20**:429–435.
- Nielsen FC, Christiansen J (1992). Endonucleolysis in the turnover of insulin-like growth factor II mRNA. *J Biol Chem* **267**:19404–19411.
- Nishiyama A, Matsui M, Iwata S, Hirota K, Masutani H, Nakamura H *et al.* (1999). Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J Biol Chem* **274**:21645–21650.
- Owen RW, Haubner R, Wurtele G, Hull E, Spiegelhalter B, Bartsch H (2004). Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur J Cancer Prev* **13**:319–326.
- Pedone PV, Pikaart MJ, Cerrato F, Vernucci M, Ungaro P, Bruni CB *et al.* (1999). Role of histone acetylation and DNA methylation in the maintenance of the imprinted expression of the H19 and Igf2 genes. *FEBS Lett* **458**:45–50.
- Scheper W, Holthuizen PE, Sussenbach JS (1996). Growth-condition-dependent regulation of insulin-like growth factor II mRNA stability. *Biochem J* **318**:195–201.
- Solanas M, Moral R, Escrich E (2001a). 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. *Nutr Res* **21**:1261–1273.
- Solanas M, Moral R, Escrich E (2001b). Improved non-radioactive Northern blot protocol for detecting low abundance mRNAs from mammalian tissues. *Biotech Lett* **23**:263–266.
- Solanas M, Hurtado A, Costa I, Moral R, Menendez JA, Colomer R, Escrich E (2002a). Effects of high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA-induced mammary tumours compared with a high corn oil diet. *Int J Oncol* **21**:745–753.
- Solanas M, Escrich E, Rouzaut A, Costa I, Martínez A, Notario V (2002b). Deregulated expression of the PCPH proto-oncogene in rat mammary tumors induced with 7,12-dimethylbenz [a] anthracene. *Mol Carcinog* **33**:219–227.
- Tanos V, Ariel I, Prus D, De-Groot N, Hochberg A (2004). H19 and IGF2 gene expression in human normal, hyperplastic, and malignant endometrium. *Int J Gynecol Cancer* **14**:521–525.
- Trichopoulou A, Lagiou P, Kuper H, Trichopoulos D (2000). Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**:869–873.
- WCRF and AICR (2007). *World Cancer Research Foundation and American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective*. Washington, DC: AICR.
- Welsch CW (1992). Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: a review and critique. *Cancer Res* **52 (Suppl)**:2040–2048.
- Willett WC (1999). Dietary fat and breast cancer. *Toxicol Sciences* **52 (Suppl)**:27–146.
- Wool IG, Chan YL, Glück A, Suzuki K (1991). The primary structure of rat ribosomal proteins P0, P1, and P2 and a proposal for a uniform nomenclature for mammalian and yeast ribosomal proteins. *Biochimie* **73**:861–870.
- Wynder EL, Cohen LA, Muscat JE, Winters B, Dwyer JT, Blackburn G (1997). Breast cancer: weighing the evidence for a promoting role of dietary fat. *J Natl Cancer Inst* **89**:766–775.
- Yballe CM, Vu TH, Hoffman AR (1996). Imprinting and expression of insulin-like growth factor-II and H19 in normal breast tissue and breast tumor. *J Clin Endocrinol Metab* **81**:1607–1612.

RESULTADOS

Antecedentes y resumen de los resultados:

Este trabajo se basa en estudios previos sobre la modificación de la expresión de genes relacionados con la diferenciación y la proliferación celular por los lípidos de la dieta en el modelo experimental de cáncer de mama inducido con DMBA en la rata, entre los que se incluye el Artículo 6 que se ha presentado en este compendio de publicaciones. En concreto, se pretende analizar si los efectos moduladores, estimuladores o protectores, de las dietas ricas en grasas n-6 (grupo HFCO) y n-9 (grupo HFOO), en la promoción del cáncer mamario experimental, se acompañan de variaciones en la expresión de los genes *H19* y *VDUP1* (proteína 1 suprarregulada por la vitamina D3), así como de *IGF2* (“insulin-like growth factor-2”), relacionado antagónicamente con H19, y de la expresión y actividad de TRX (tioredoxina-1), relacionada con VDUP1. Los resultados de este estudio se esquematizan en la Tabla A10 (A: adicional al artículo). Este artículo extiende el estudio del Artículo 6 al analizar la expresión de las proteínas codificadas por estos genes y/o su actividad, así como al introducir el grupo dietético rico en aceite de oliva virgen extra. En el apartado de “Material y Métodos” se especifican las técnicas, sondas y anticuerpos utilizados (en concreto, se estudiaron los niveles de ARNm de *H19*, *VDUP1* y *IGF2* y la expresión proteica de VDUP1, IGF2 y TRX), así como el método de determinación de la actividad de la tioredoxina-1. El estudio histopatológico, en este caso, se limitó al diagnóstico, aplicando los criterios definidos en el Artículo 1 para este fin.

Tabla A10: Resultados del estudio de la expresión de H19, IGF2, VDUP1 y TRX

	ARNm	Proteína	Actividad
H19	HFCO* < LF = HFOO		
IGF2	diversos perfiles	HFOO = LF < HFCO	
VDUP1	HFCO* < HFOO ~ LF	HFOO < HFCO < LF	
TRX		LF = HFCO = HFOO	LF = HFCO = HFOO

* $P < 0,05$ respecto LF

En lo que concierne a H19, riborregulador infrarregulado en los tejidos adultos, los análisis de “Northern blot”, utilizando una sonda de ADNc, revelaron una única especie de ARNm de aproximadamente 2,5 kb con niveles de expresión, en general, bajos. Se constató una menor expresión en el grupo HFCO que en el control (LF), cercana a la significación estadística en el análisis cuantitativo y significativa en el cualitativo, mientras que el grupo HFOO no mostró diferencias con el grupo control normolipídico (Figura 1 del artículo). Respecto a IGF2, inductor del crecimiento celular y de la actividad mitótica, se obtuvieron

varios ARNm que mostraron diversos perfiles de expresión en los tumores, entre los grupos experimentales (Figura 2 y Tabla 1 del artículo) pero que, dadas las características de estos transcritos, con diferente eficiencia translacional, los resultados sugerían una mayor degradación del ARNm de IGF2 y una menor traducción en los tumores del grupo rico en aceite de oliva virgen extra que en los otros grupos. En cuanto a la proteína, los cambios observados fueron menores, con una tendencia a ser más altos en el grupo HFCO que en el resto (Figura 3 del artículo). Asimismo, en el grupo control, se constató una correlación inversa entre los niveles de expresión del ARNm de H19 y los del transcrito de 3,5kb de IGF2 ($P<0,05$), que desaparecía en los grupos hiperlipídicos. Referente a VDUP1, considerado un supresor del crecimiento celular, el ARNm mostró niveles inferiores en el grupo HFCO que en el control, de forma significativa en el análisis cualitativo, sin observarse modificaciones en HFOO, mientras que la expresión proteica presentó niveles no significativamente menores en ambos grupos hiperlipídicos respecto al control (Figura 4 del artículo). Finalmente, no se constataron diferencias en la expresión proteica ni en la actividad de la TRX, ni se demostró correlación entre la expresión de la proteína VDUP1 y la actividad tioredoxina (Figura 5 del artículo). Los resultados obtenidos se discuten en el artículo y en el apartado C.2.c de “Discusión”, correlacionándolos con las funciones de estos genes.

.....

10. ARTÍCULO 10

Diets high in corn oil or extra-virgin olive oil provided from weaning advance sexual maturation and differentially modify susceptibility to mammary carcinogenesis in female rats.

R. Moral, R. Escrich, M. Solanas, E. Vela, **I. Costa**, MC. Ruíz de Villa, E. Escrich

Nutrition and Cancer 2011; 63:410-420

RESULTADOS

Diets High in Corn Oil or Extra-Virgin Olive Oil Provided From Weaning Advance Sexual Maturation and Differentially Modify Susceptibility to Mammary Carcinogenesis in Female Rats

Raquel Moral, Raquel Escrich, Montserrat Solanas, and Elena Vela

Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Physiology Unit, Medicine School, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Irmgard Costa

Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Physiology Unit, Medicine School, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, and Department of Pathology, Corporació Parc Taulí-UDIAT, Barcelona, Spain

M. Carme Ruíz de Villa

Department of Statistics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Eduard Escrich

Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Physiology Unit, Medicine School, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Based on the importance of early-life events in breast cancer risk, we have investigated the effects of high-fat diets on maturation, mammary gland development, and its susceptibility to transformation. Female Sprague-Dawley rats were fed a lowfat (LF), high corn oil (HCO), or high extra-virgin olive oil (HOO) diet from weaning and gavaged with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. Body weight and mass increased in the HCO group compared to the LF group. The vaginal opening was advanced in both high-fat groups, especially in the HCO group. This HCO group also had increased body weight around puberty, more corpora lutea at post-puberty, and tended to have higher kisspeptin levels in the hypothalamus. Both high-fat diets induced subtle modifications in the morphology of the mammary gland, with no changes on β -casein or hormone receptors expression in the gland. The HCO diet had a clearly stimulating effect of carcinogenesis, inducing the earliest appearance of tumors and the highest tumor incidence and yield, whereas the HOO diet seemed to have a weak enhancing effect, increasing tumor yield. Our data suggest a strong influence of the HCO diet in

sexual maturation and mammary cancer risk, while rats fed the HOO diet were more similar to the controls.

INTRODUCTION

Breast cancer is the most common type of malignancy in women worldwide, and rates are increasing in most countries (1). Ecological analyses strongly support the influence of environment, and especially dietetic factors, in the development of this neoplasia (1). Whereas animal and case-control studies have shown that high fat intake is an important modulator of breast cancer risk (2–4), cohort studies have generated conflicting results (5). Nevertheless, recent studies from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) project have used new approaches to analyze the association of a food pattern with breast cancer risk, showing that high fat intake (irrespective of the type of fat) is associated with a doubling of such risk (6). Experimental data have provided evidence that the effect of lipids on susceptibility to mammary carcinogenesis is dependent on the type of fat. Thus, whereas the n-6 PUFA, such as linoleic acid (18:2n-6), have strong tumor-enhancing effects, monounsaturated fatty acids such as oleic acid (18:1n-9) seem to be protective, although some inconsistent results have been reported (7). The Mediterranean diet, characterized by the high

Submitted 26 April 2010; accepted in final form 28 September 2010.

Address correspondence to Eduard Escrich, Department of Cell Biology, Physiology, and Immunology, Medicine School, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. Phone: +34 93 581 14 23. Fax: +34 93 581 29 86. E-mail: Eduard.Esrich@uab.cat

consumption of olive oil (rich in oleic acid and antioxidants), has traditionally been linked to a protective effect in cardiovascular disease and cancer (7–10).

The development of the mammary gland begins during the fetal life but, unlike other organs, remains highly undifferentiated until the initiation of puberty. In adolescence, the gland undergoes profound changes as a response to hormonal influences, the sexual hormones playing a key role (11). There is striking evidence showing the importance of early life events, including food and nutrition, as well as factors that affect hormone status, in modifications in the risk of breast cancer (1). Reproductive factors increasing the number of menstrual cycles, such as early menarche, have been associated with increased risk of this neoplasia (1). The onset of menarche has been earlier in Western populations since the beginning of the 20th century, probably due to improved nutrition (12). It has long been known that menarche is dependent on a critical accumulation of adipose tissue, and nutritional factors may, therefore, be determinant at the time of sexual maturity (12). Recently, hypothalamic kisspeptin (KiSS1) has emerged as an essential factor in the activation of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis that occurs in puberty and may represent the link between systemic metabolic signals and central control of reproduction (13). More data regarding sexual maturation are needed based on the studies suggesting that the years between the onset of puberty and the first childbirth are a critical period for establishing the risk of mammary cancer (14).

The aim of this study is to determine the effect of a high corn oil (HCO) diet and a high extra-virgin olive oil (HOO) diet on puberty, mammary gland development, and the risk for experimental mammary carcinogenesis. To this end, our group has analyzed the growth and sexual maturation of female Sprague-Dawley rats (body weight, body mass index, vaginal opening, uterus and ovaries histology, hypothalamic expression of KiSS1), the differentiation of the mammary gland (morphology, β -casein levels, expression of hormone receptors), and the manifestation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced mammary carcinogenesis (latency time, tumor incidence, and tumor yield).

MATERIAL AND METHODS

Diets

Three semisynthetic diets were designed: a lowfat (LF) diet (3% corn oil w/w), a HCO diet (20% corn oil), and a HOO diet (3% corn oil + 17% extra-virgin olive oil) (Table 1). In order to maintain the normal lipidic metabolism, they were supplemented with methionine (0.51% in the LF diet and 0.66% in the two high-fat diets), choline (1800 mg/kg diet), and folic acid (5 mg/kg diet). The definition, preparation, and suitability of the experimental diets were previously described (15–17). Diets were prepared weekly and stored under nitrogen in the dark at 4°C.

TABLE 1
Composition of the experimental diets

Diet Composition (g/kg)	High Corn		High Olive
	Lowfat	Oil	Oil
Proteins (casein)	180	230	230
Carbohydrates (dextrose)	679	459	459
Lipids:			
Corn oil	30	200	30
Extra-virgin olive oil	0	0	170
Fiber (cellulose)	50	50	50
Mineral mix ^a	59	59	59
Vitamin mix ^a	2.4	2.4	2.4
Fatty Acids in the Experimental Fats (%)			Extra-Virgin Olive Oil
C16:0 (palmitic)	11.1		13.2
C16:1 (palmitoleic)	0.2		1.3
C17:0 (margaric)	0.1		0.1
C17:1 (margaroleic)	0.0		0.2
C18:0 (stearic)	2.3		2.5
C18:1 <i>t</i> (elaidic)	0.1		0.0
C18:1 (oleic)	31.7		73.7
C18:2 <i>ct</i> + <i>tc</i> linoleics	1.3		0.0
C18:2 (linoleic)	51.3		7.3
C18:3 <i>tct</i> + <i>cct</i> + <i>ctc</i> + <i>tcc</i> linolenics	0.3		0.0
C18:3 (linolenic)	0.5		0.8
C20:0 (arachidic)	0.5		0.4
C20:1 (eicosenoic)	0.2		0.3
C22:0 (docosanoic)	0.2		0.1
C24:0 (lignoceric)	0.2		0.1
Total saturated	14.4		16.4
Total monounsaturated	32.1		75.5
Total n-6 polyunsaturated	51.3		7.3
Total n-3 polyunsaturated	0.5		0.8
Total trans isomers	1.7		0.0

c = cis-double bound; *t* = trans-double bound.

^aThe composition of mineral and vitamin mixes is given in reference (15).

Animals and Experimental Design

All animals received humane care under an institutionally approved experimental animal protocol, following the legislation applicable in this country. Female Sprague-Dawley rats (strain CrI: OFA(SD), *n* = 167) were purchased from Iffa-Credo–Charles River Lab (L'Arbresle Cedex, France) on post-natal day (PND) 23. Upon arrival, the rats were weighed, randomized, and housed 2–3 per cage in a controlled environment maintained at 22 ± 2°C, 50% relative humidity, and a 12:12-h light to dark cycle. The day after arrival, 6 rats were sacrificed (see below), and the remaining rats were distributed according to the experimental diet administered. Animals were fed the LF

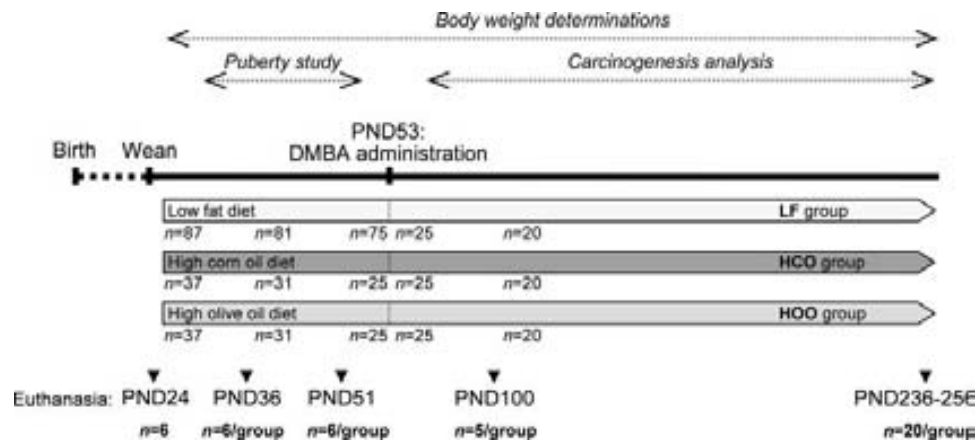


FIG. 1. Experimental design. Female Sprague-Dawley rats were fed a lowfat (LF group), high corn oil (HCO group), or high olive oil (HOO group) diet from postnatal day (PND) 24 and induced with 5 mg of dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) at PND53. Rats fed the experimental diets were euthanized at PND36 ($n = 6/\text{group}$), PND51 ($n = 6/\text{group}$), PND100 ($n = 5/\text{group}$), and PND236-256 ($n = 20/\text{group}$).

diet (Group LF, $n = 87$), the HCO diet (Group HCO, $n = 37$), or the HOO diet (Group HOO, $n = 37$) and water ad libitum. At PND53, mammary gland cancer was induced by oral gavage with one single dose of 5 mg of DMBA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) dissolved in corn oil. After DMBA treatment, 50 rats from the LF group were separated and changed to high-fat diets for a different part of this project aiming to study the promotion of carcinogenesis (results not shown). Animals were examined and weighed weekly throughout the study (Fig. 1).

From PND74 (21 days postinduction) onward, all rats were monitored for mammary tumor appearance weekly. Using these data, the following parameters were calculated: latency (time to first tumor appearance) per rat of the group; tumor incidence, i.e., the percentage of rats of the group bearing at least one palpable mammary tumor; and tumor yield, i.e., the cumulative total number of mammary tumors per group.

At PND24, PND36, PND51, PND100, and PND236–256 (median = PND246, end of the assay), rats were sacrificed by decapitation. The number of euthanized rats per group was as follows: PND24, PND36, and PND51, $n = 6$; PND100, $n = 5$; PND246, $n = 20$ (Fig. 1). At least 2 h before euthanasia, rats were examined and weighed, and body length (nose–anus) was measured. From PND51, the phase of the estrous cycle was also determined by vaginal cytology before euthanasia. At the end of the assay, animals at the diestrus phase were chosen. After sacrifice, left abdominal mammary glands and brains were collected and flash frozen for molecular analyses. Blood was obtained and centrifuged, and the serum was stored at -20°C . Uteri and ovaries were excised, weighed, and fixed in 4% buffered formalin for histological analyses. Right mammary glands were fixed in 10% buffered formalin for morphological analyses. At PND246, tumors were excised and a portion fixed in 4% formalin for histopathological diagnosis. The remainder of each tumor was flash frozen. Tumor histopathology classification was performed as previously described (18). Only confirmed mammary adenocarcinomas were included in this study.

Growth and Puberty Onset

Growth study was performed from weekly body weight measurements throughout the assay. At days of sacrifice, body mass index (g/cm^2) was also determined.

Sexual maturation was studied from PND30 to PND52 by exploring the rats to determine the vaginal status. The morphological changes observed were classified as 0 (vagina totally closed and smooth perivaginal zone), 1 (vagina closed, appearance of folds), 2 (marked folds around a little orifice), and 3 (vagina totally opened and lips clearly separated), this last one corresponding to the fully mature status. The determinations of maturation state were made blindly by two independent investigators. On the day of debut in each stage (1 to 3), weight and body length were recorded. From the first day of State 3 to PND52, the estrous phase was determined daily by vaginal cytology.

Histological Analysis of Ovaries and Uteri

Ovaries and uteri fixed in 4% buffered formalin were embedded in paraffin using conventional automated systems. The blocks were cut to $5\text{-}\mu\text{m}$ -thick sections and stained with haematoxylin-eosin. The number of the following follicles and corpora was determined in the ovaries under the microscope: secondary follicles (maturing), tertiary follicles (mature), atretic follicles (degenerated before arriving to fully maturation), corpora lutea (body formed after the releasing of the ovule), and corpora albicans (formed after the degeneration of the corpus luteum). The endometrium was classified as inactive or functional.

Morphological Characterization of the Mammary Gland

For morphological analysis of the whole-mounted mammary glands, tissues were fixed in 10% neutral-buffered formalin for 24–48 h, defatted in acetone, rehydrated, and stained in alum carmine. After dehydration in graded alcohols, glands were cleared in HistoChoice (Sigma-Aldrich) and cover-slipped with

mounting media. The number of epithelial structures was determined in the outer 5-mm margin of the whole mounts using the criteria previously established (19): the undifferentiated terminal end buds (TEB) and terminal ducts (TD), and the increasingly differentiated alveolar buds (AB), lobules type 1 (Lob1), type 2 (Lob2), and type 3 (Lob3). Analyses were performed in 10 to 15 fields (400 \times magnification) per gland using a light microscope (Nikon Eclipse E800) and the image software ACT-1 for DXM 1200F version 2.51 (Nikon Instruments Europe B.V., Badhoevedorp, the Netherlands). The number of epithelial structures was related to the number of fields examined. Moreover, development of the glands was qualitatively scored by two independent researchers using a 4-point scale (1 = poor; 2 = moderate; 3 = high; 4 = very high). The scored characteristics were relative to density of epithelial ducts and lobule-alveolar units.

Gene Expression

Total RNA from mammary glands and hypothalamus homogenates was extracted using the Lipid Tissue RNeasy Extraction Kit (QiaGen, Hilden, Germany). RNA samples were evaluated by capillary electrophoresis with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Two μ g of RNA were reverse-transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems; Foster City, CA), following the manufacturer's recommendations. Gene expression analyses were performed by real-time PCR in the iCycler MyiQ Real-Time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Hypothalamic expression of KiSS1 at PND24, PND36, PND51, and PND100 was assessed as previously described (20). Briefly, 25 ng of cDNA were amplified using SYBR green I and 1 \times iQ Supermix (Bio-Rad Laboratories) in a final volume of 25 μ L. The primers used were KiSS1 sense (5'-TGG CAC CTG TGG TGA ACC CTG AAC-3'), KiSS1 antisense (5'-ATC AGG CGA CTG CGG GTG GCA CAC-3'), S11 sense (5'-CAT TCA GAC GGA GCG TGC TTA C-3'), and S11 antisense (5'-TGC ATC TTC ATC TTC GTC AC-3') (20). The PCR cycling conditions were 95 $^{\circ}$ C for 5 min followed by 40 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 15 s, 62.5 $^{\circ}$ C for 15 s, and 72 $^{\circ}$ C for 1 min. KiSS1 expression was normalized relative to the ribosomal protein S11 using Δ Ct methodology.

Gene expression of β -casein, estrogen receptor α (ER α), estrogen receptor β 1 (ER β 1), estrogen receptor β 2 (ER β 2), and progesterone receptor (PR) was determined in the mammary glands using the TaqMan methodology (Applied Biosystems). Reactions were prepared with the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the suitable TaqMan assay (β -casein: Rn01524626.m1; ER α : Rn00664737.m1; ER β 1: Rn00688792.m1; ER β 2: Rn01468728.m1; PR: Rn0057662.m1; Hprt: Rn01527840.m1) in a final volume of 25 μ L. cDNA was denatured for 10 min at 95 $^{\circ}$ C and amplified during 40 cycles of 15 s at 95 $^{\circ}$ C and 60 s at

60 $^{\circ}$ C. Gene expression was normalized using Hprt as a control transcript.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with SPSS software (version 15.0). We used parametric or nonparametric statistics depending on the distribution of each variable studied, determined by the Kolmogorov-Smirnov test, and the equality of variances among groups, determined by Levene's test. Body weight throughout the assay was analyzed using nonlinear mixed models. Daily body weight from PND30 to PND52 was estimated by regression analysis. Parametric quantitative data were analyzed with analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Analysis of nonparametric quantitative data was performed with Friedman and Mann-Whitney's U tests. Qualitative data were analyzed with Pearson's chi-squared test. Correlations were carried out through Kendall's Tau-b and Spearman's Rho tests. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Body Weight and Mass Index

The analysis of body weight throughout the study showed an increased weight in the rats fed the HCO diet in comparison with the ones fed the control LF diet ($P = 0.04$), whereas the HOO diet did not change body weight compared to the control diet (Fig. 2A). At the end of the study, the weights obtained were as follows (g, mean \pm SE): LF = 341.0 \pm 8.40, HCO = 382.3 \pm 12.5, HOO = 342.9 \pm 10.6). Body mass index did not differ among groups at PND36, PND51, and PND100, while at the end of the assay (PND246, median day), it was significantly higher in the HCO group, as compared to the LF group ($P = 0.045$) (Fig. 2B).

Sexual Maturation

From PND30 to PND52, rats were inspected daily in order to determine vaginal changes accompanying sexual maturation, scoring them from State 0 to State 3. The evolution through the maturation states was significantly different between the LF and the high-fat diet groups, which displayed different distribution of the data (Pearson's chi-squared test, $P < 0.0001$, Fig. 3). Rats fed both high-fat diets arrived at States 1 and 2 at a younger age in comparison to the control group, while only the HCO group arrived at State 3 earlier than the control group (Fig. 4). When comparing the days spanning between states (1 to 2, 2 to 3, and 1 to 3), no differences were found among groups. For a specific state, there were no differences in the body weight among groups (no differences in the weight at the day the rats arrived to each state). On the other hand, from the data obtained in the weekly determinations, the daily weight of each rat was estimated. For a specific day, the HCO group had higher body weight than the LF group (significantly increased on PND32, PND34, and PND36; see Table 2).

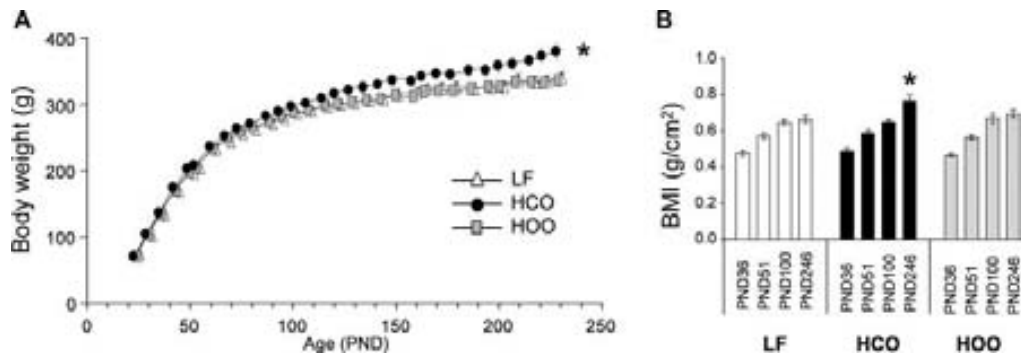


FIG. 2. Effect of high-fat diets on body weight and mass. A: Body-weight evolution. Rats fed the HCO diet had a significantly higher body weight compared to the rats fed the LF diet (nonlinear mixed models test, $P = 0.04$). B: Body mass index (BMI) was significantly higher in the HCO group than in the LF group by the end of the assay (Tukey's test, $P < 0.05$, $n = 5-20$ /group). LF = lowfat group; HCO = high corn oil group; HOO = high extra-virgin olive oil group; PND = postnatal day. Values are means \pm SE. * $P < 0.05$ compared to the LF group.

From the first day of Stage 3, and until PND52, the estral phase was determined daily by cytology. No differences were found due to the effect of the experimental conditions in the time between the onset of puberty and the first estrus or in the cycle of the rats. Uterus and ovary weights at each sacrifice (row values or relative to body weight) showed no differences among groups (data not shown).

Histological analysis of ovaries indicated that at PND36, the LF group had a higher number of secondary follicles (maturing follicles) than the HOO group and more atretic follicles (degen-

erated follicles) than the HCO group (Table 3). At PND51, the HCO group had a higher number of corpora lutea (indicative of ovules released) than the LF group ($P = 0.012$). Moreover, endometria were inactive at PND24. At PND36, 50% of rats (3/6) in the LF group showed an inactive endometrium and no signs of ovulation (no corpora lutea), while 33% (2/6) of the HCO group and 0% (0/6) of the HOO group had an inactive endometrium. From PND51 on, all rats displayed a functional endometrium.

Hypothalamic kisspeptin expression was analyzed by real-time PCR from PND24 to PND100 (Table 3). At PND36, the HCO group tended to have higher levels of KiSS1 ($P = 0.063$) than the LF group. No differences were found at other ages tested.

TABLE 2

Effect of experimental diets on maturation of female rats^a

Maturation Parameters	LF	HCO	HOO
Time between maturation states (days)			
1 to 2	3.4 \pm 0.24	4.4 \pm 0.45	3.8 \pm 0.41
2 to 3	6.0 \pm 0.32	5.8 \pm 0.49	6.5 \pm 0.51
1 to 3	9.5 \pm 0.40	10.0 \pm 0.54	10.0 \pm 0.59
Body weight (g) at day of:			
State 1	137.3 \pm 1.10	136.4 \pm 1.83	136.5 \pm 1.76
State 2	145.8 \pm 1.11	147.0 \pm 2.13	146.1 \pm 1.78
State 3	160.7 \pm 1.60	160.5 \pm 2.07	161.4 \pm 2.71
Body weight (g) at:			
PND32	130.9 \pm 0.99	136.5 \pm 1.58*	133.4 \pm 1.33
PND34	135.3 \pm 1.02	141.4 \pm 1.64*	138.8 \pm 1.47
PND36	140.0 \pm 1.07	146.3 \pm 1.70*	143.7 \pm 1.53
PND38	144.9 \pm 1.10	151.1 \pm 1.77	148.6 \pm 1.60
PND42	154.7 \pm 1.18	160.9 \pm 1.92	158.3 \pm 1.77
PND43	157.1 \pm 1.20	163.3 \pm 1.96	160.7 \pm 1.81
PND44	159.6 \pm 1.22	165.8 \pm 2.00	163.1 \pm 1.86

^aValues are mean \pm SE of 81 animals (group LF) or 31 animals (groups HCO and HOO). LF = lowfat group; HCO = high corn oil group; HOO = high extra-virgin olive oil group; PND = postnatal day. * $P < 0.05$ compared to the control LF group (Tukey's test).

Morphological Differentiation of the Mammary Gland

Terminal epithelial structures were identified in the whole-mounted abdominal glands at each age studied. The evolution of the gland was similar in all the groups (Fig. 5). On PND24, we only found undifferentiated TEB and TD. The number of TEB decreased over time, while the number of TD decreased from PND24 to PND51 and increased at postinduction ages. The more differentiated alveolar and lobular structures appeared by PND36, and the number of AB increased from this age to PND100. The number of Lob1 was high by PND51 and PND100, decreasing by the end of the assay. Lob2 appeared at PND36 and their quantity increased up to PND100 in all groups. We only found Lob3 at PND100 (in groups HCO and HOO) and at PND246 (Fig. 5).

The density of TEB was numerically higher in the high-fat groups, as related to the LF group, but differences were not statistically significant (total number of TEB counted per group: PND36: LF = 74, HCO = 95, HOO = 97; PND51: LF = 13, HCO = 17, HOO = 14; PND100: LF = 1, HCO = 3, HOO = 2; $n = 3$).

On PND51, the number of undifferentiated TD tended to be higher in the HCO group than in the LF group ($P = 0.064$), while the number of Lob2 was higher in both high-fat groups in

TABLE 3
Ovaries function and kisspeptin mRNA levels: Histological analysis of the ovaries and kisspeptin (KiSS1) mRNA expression levels in the hypothalamus of rats fed the experimental diets^a

Age Group	Ovaries Activity (Number of follicles or corpora)							Hypothalamus KiSS1 Expression mRNA Relative Levels
	Secondary Follicles	Tertiary Follicles	Corpora Lutea	Corpora Albicans	Atretic Follicles			
PND24	16.33 ± 1.82	0.17 ± 0.17	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	25.00 ± 3.44	0.28 ± 0.22		
PND36								
LF	19.17 ± 1.49	0.67 ± 0.33	7.67 ± 3.73	0.17 ± 0.17	25.17 ± 2.48	0.72 ± 0.32		
HCO	14.17 ± 1.42	0.50 ± 0.34	6.17 ± 1.97	0.00 ± 0.00	17.17 ± 1.62*	1.24 ± 0.22		
HOO	13.17 ± 1.49*	1.00 ± 0.45	10.00 ± 2.18	0.00 ± 0.00	20.83 ± 1.64	0.82 ± 0.34		
PND51								
LF	8.33 ± 0.80	0.50 ± 0.22	13.33 ± 1.98	0.67 ± 0.42	11.83 ± 2.06	3.85 ± 1.17		
HCO	10.17 ± 2.83	0.50 ± 0.34	23.17 ± 2.21*	0.67 ± 0.67	13.33 ± 1.74	2.50 ± 1.10		
HOO	9.67 ± 2.01	0.00 ± 0.00	20.67 ± 2.11	2.17 ± 1.80	11.67 ± 2.76	8.40 ± 1.68		
PND100								
LF	8.60 ± 1.33	0.80 ± 0.37	18.60 ± 2.04	1.20 ± 0.37	13.00 ± 1.95	5.56 ± 1.50		
HCO	9.60 ± 1.44	0.00 ± 0.00	20.40 ± 4.31	0.80 ± 0.58	13.40 ± 1.72	1.93 ± 0.98		
HOO	10.40 ± 1.85	0.80 ± 0.58	27.60 ± 2.09	2.40 ± 1.47	16.80 ± 1.93	2.73 ± 0.88		

^aValues are mean ± SE of 5–6 animals per group at each time point. PND = postnatal day; LF = lowfat group; HCO = high corn oil group; HOO = high extra-virgin olive oil group. * $P < 0.05$ compared to the control LF group (Tukey's test).

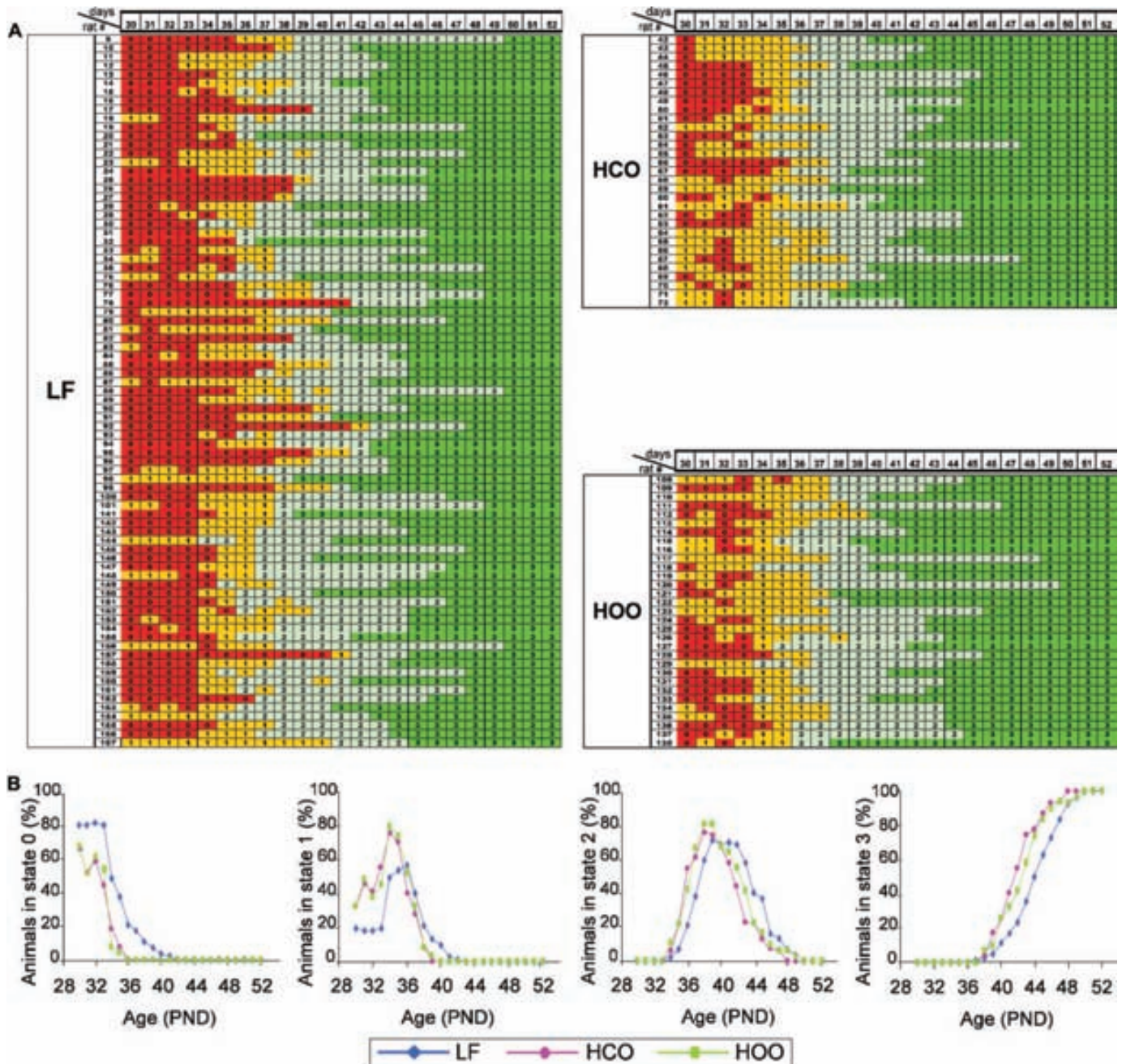


FIG. 3. Maturation state determination. A: Morphological changes in the perivaginal zone were scored in 0 (vagina totally closed, in red), 1 (appearance of folds, in orange), 2 (marked folds around a little orifice, in light green), and 3 (vagina totally opened and lips clearly separated, in dark green). B: Distribution of the rats (%) in relation to the maturation state. $n = 81$ [low-fat (LF) group], $n = 31$ [high corn oil (HCO) and high olive oil (HOO) groups]. PND = postnatal day.

relation to the LF group ($P = 0.01$). At the end of the assay, the number of AB was higher in the HOO group than in the HCO group ($P < 0.01$), and we found a lower number of lobular structures in the high-fat groups than in the LF group (Fig. 5).

The density scores showed a higher percentage of dense glands (in which the epithelial structures occupied a large proportion of the mammary area) at PND246 in the HCO group

(58.3%), followed by the LF (45.5%) and the HOO groups (18.2%), but differences were not significant.

Expression of β -casein and of Hormone Receptors in the Mammary Gland

The relative mRNA expression of β -casein was studied in the abdominal mammary glands by real-time PCR, showing a

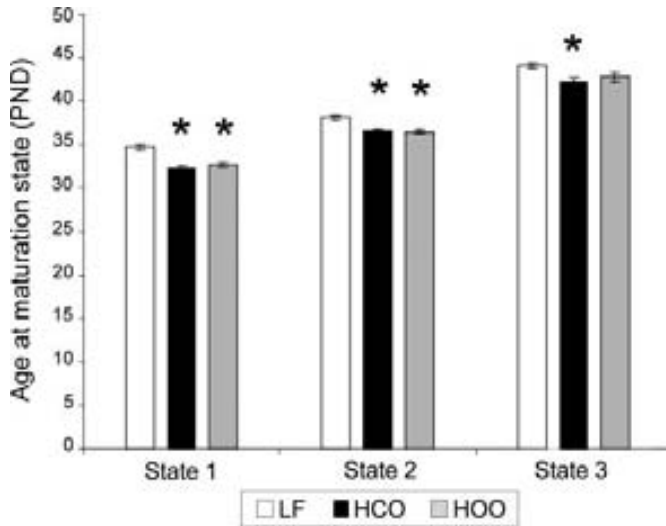


FIG. 4. Age at sexual maturation. Days of arrival at different maturation states. LF = lowfat group; HCO = high corn oil group; HOO = high extra-virgin olive oil group; PND = postnatal day. Values are means \pm SE. $n = 81$ (LF group), $n = 31$ (HCO and HOO groups). * $P < 0.05$ compared to the LF group (Tukey's test).

great variability of data, an increase in the expression levels over the time, and no differences among groups (data not shown). At PND246, we found a significant inverse correlation between β -casein mRNA levels and the number of TD (Kendall's Tau-b $r = -0.363$, $P = 0.024$; Spearman's Rho $r = -0.509$, $P = 0.018$).

In relation to the hormone receptors expression, no differences were found in mRNA levels of ER α or ER β 1 due to the effect of the diet. ER β 2 levels were higher in the HCO group than in the HOO group ($P = 0.028$) by the end of the assay. Finally, PR expression was significantly higher in the HOO group in relation to the LF group ($P = 0.001$) and the HCO group ($P = 0.01$) at PND36 (data not shown).

Mammary Gland Carcinogenesis

The manifestation of carcinogenesis was studied by the analysis of three parameters. The latency time was as follows: LF = 97.0 (55.0–193.0), HCO = 71.5 (32.3–194.0), HOO = 89.0 (41.4–139.8) [days, median (5th percentile–95th percentile)]. The differences among groups were not statistically significant. The percentage of tumor-bearing rats (incidence) and the number of tumors per group (tumor yield) was determined in the 26 weekly explorations, and the evolution of the parameter was compared among groups. The incidence was significantly higher in the HCO group in relation to the LF ($P < 0.001$) and HOO groups ($P < 0.001$), while there were no differences between the HOO and LF groups (Fig. 6A). Both high-fat diets increased tumor yield, with a significantly stronger effect of the HCO diet in relation to the HOO diet. Thus, the HCO group had the highest number of tumors per group (HCO vs. LF, $P < 0.001$; HCO vs. HOO, $P < 0.001$), followed by the HOO group and the LF group (HOO vs. LF, $P = 0.039$) (Fig. 6B).

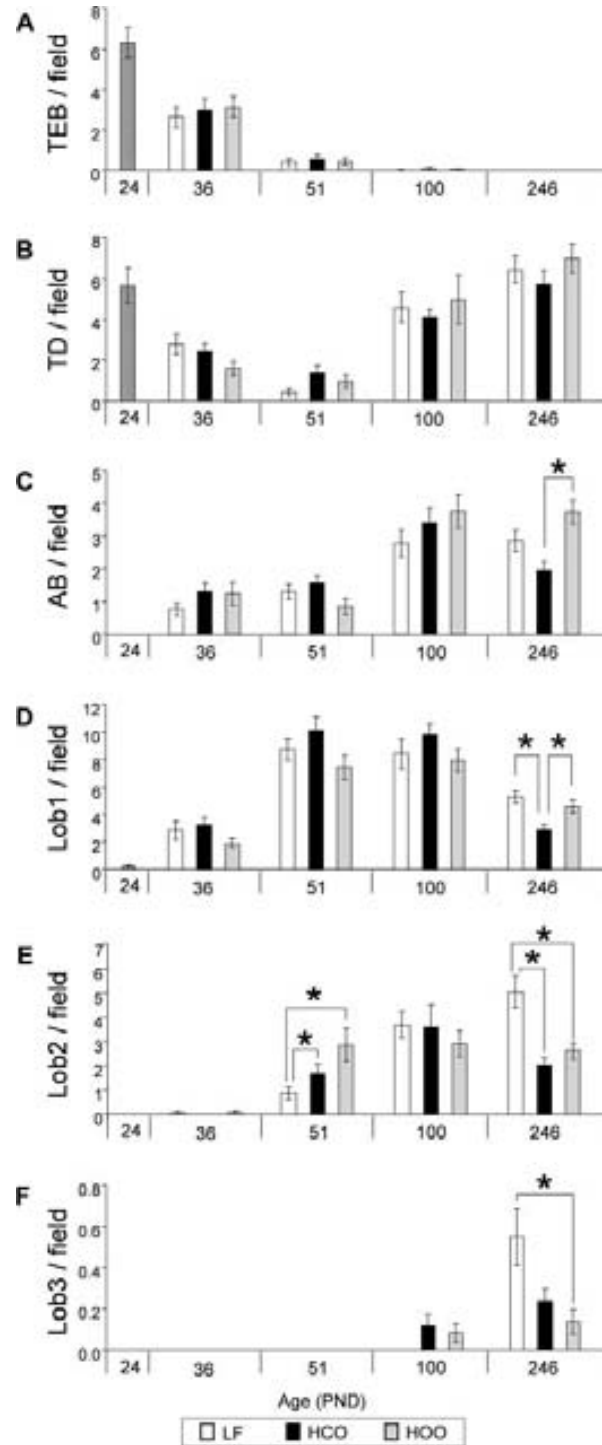


FIG. 5. Morphological analysis of the mammary gland. The number of epithelial structures per field was determined in the outer 5-mm margin of the mammary gland. A: Terminal end buds (TEB). B: Terminal ducts (TD). C: Alveolar buds (AB). D: Lobules type 1 (Lob1). E: Lobules type 2 (Lob2). F: Lobules type 3 (Lob3). LF = lowfat group; HCO = high corn oil group; HOO = high extra-virgin olive oil group; PND = postnatal day. Post-weaning rats (PND24) were not fed any experimental diet and represent the starting point for all the groups. Values are means \pm SE, $n = 5$ –8/group. * $P < 0.05$ between groups (Tukey's test).

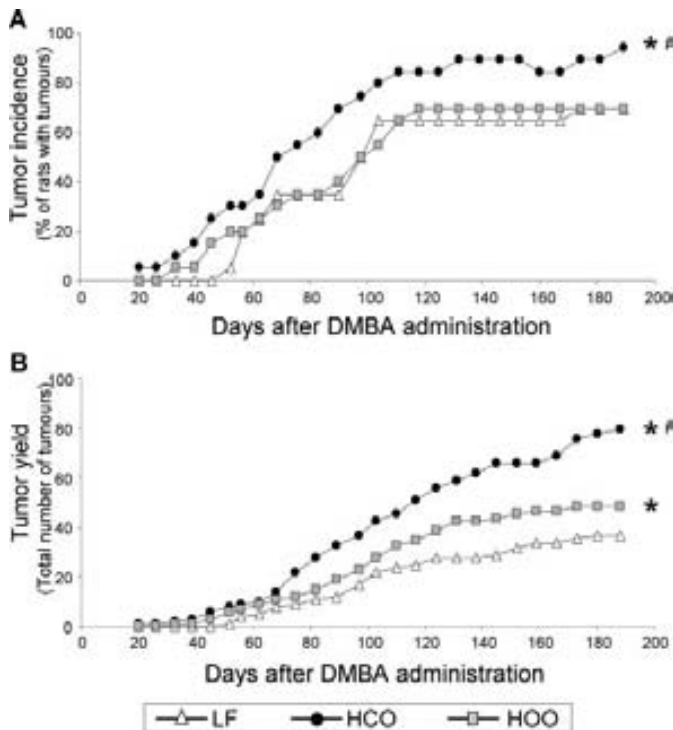


FIG. 6. Effect of high-fat diets on DMBA-induced mammary carcinogenesis. A: Tumor incidence. B: Tumor yield. Values are medians, $n = 20/\text{group}$. * $P < 0.05$ compared to the LF group. # $P < 0.05$ compared to the HOO group (Friedman test, $P < 0.05$).

DISCUSSION

Experimental data and some human studies have provided evidence of an influence of high-fat diets on mammary cancer (1–10). To give insight into the influence of an HCO and an HOO diet on experimental carcinogenesis, the present study was designed to determine whether changes in the onset of puberty is one of the mechanisms linking diet and breast cancer risk. The results indicated an advance in maturation due to the effect of the high-fat diets, such an effect being stronger in the case of the HCO diet group (sexual maturation at the youngest age, higher body weight and mass, higher number of corpora lutea at PND51, and a tendency to have higher levels of kisspeptin expression in the hypothalamus at puberty). The HCO diet had a clear carcinogenesis-enhancing effect, while the HOO diet seemed to have a weak stimulating influence.

The HCO diet increased the body weight of the rats and body mass index by the end of the assay. In contrast, the HOO diet, with the same percentage of fat as the HCO diet, did not modify body weight or mass in relation to the LF diet. Other experimental models have also found an increase in body weight because of the effect of a high n-6 PUFA diet, but there are few data regarding HOO diets. The administration of a 30% extra-virgin olive oil diet for a shorter period (28 days) has also been described to produce less body-weight gain compared to a 30% corn oil diet in rats (21). These results give further

support to the fact that there is a qualitative aspect linking diet and body weight, as the effects on body weight and mass are not only dependent on the quantity of fat consumed but also on the dietary fat type. Although caution must be applied when comparing animal models with epidemiological studies, our data are in concordance with the observation that the Mediterranean diet, whose main source of fat is olive oil, may have a protective effect on obesity (22).

Puberty onset was significantly advanced in the high-fat groups, especially in the HCO group. There were no differences either in body weight or mass when arriving at each stage, thus suggesting that the reproductive morphological changes are related to the acquisition of a threshold level of body mass, as has been already reported in the literature (23). This threshold weight would appear earlier in the HCO group, followed by the HOO group and the LF group. The number of corpora lutea was increased in the HCO group at PND51, which could indicate higher ovulation in this group. Such a parameter has also been previously influenced by high-fat diets, as a 21% fish oil diet retarded the vaginal opening and decreased the quantity of corpora lutea in rats in comparison to a 21% corn oil diet (24). We also observed some changes in the number of secondary and atretic follicles, but the explanation of such results is unclear. In relation to the increased corpora lutea by PND51 and the higher activity of the endometrium in the high-fat groups, one hypothesis is that they are related to higher fertility of these animals before the carcinogenic insult occurs. On the other hand, no differences were found among groups as regards uterine weight, time span among stages, time from vaginal opening to first estrus, or cycle. Such data support that the high-fat diets advanced the process of maturation but did not change its evolution. Studies in humans have also suggested that as soon as a weight threshold is passed, the maturation process can be less influenced (25).

Hypothalamic kisspeptin neurons have emerged as fundamental regulators of the gonadotropic axis and may represent the link between systemic metabolic signals and central control of reproduction (13). In the rat, KiSS1 mRNA levels increase in the hypothalamus, coinciding with the onset of puberty (20). Our results suggested higher levels of KiSS1 mRNA levels on PND36 in the rats fed the HCO diet, in accordance with the advanced puberty onset of this group. On the other hand, the changes we observed in the KiSS1 expression at post-puberty (PND51) are probably related to differences in the cycling phase of the rats, since KiSS1 is highly dependent on the estral phase (20).

The mammary gland is another target of sexual maturity. With the initiation of puberty, critical molecular and morphological changes in the female mammary tissue occur (11). Several studies highlight the importance of the degree of differentiation of this tissue at the time of a carcinogenic insult (26), and it has been described an influence of dietary n-6 PUFA in the morphology of the gland in rats (27,28). In this work, the high-fat diets had little effect on the mammary gland architecture, inducing some modifications at post-puberty (a higher number of

differentiated Lob2) without decreasing the number of undifferentiated structures, which are the target of malignant transformation (29). At older ages, we observed fewer Lob3 (the most differentiated structure) in the margin of the glands from the high-fat groups, in addition to dense glands in the HCO group. This apparent discrepancy could indicate that the periphery of the gland is mostly representative of undifferentiated structures, what could become more evident with the growing of the gland and thus be manifested at older ages.

To further characterize the differentiation degree of the mammary gland, mRNA expression of β -casein, classically considered a molecular differentiation marker of this gland, was analyzed (30,31). β -casein expression increased in the mammary tissue over time, but no significant differences were found by effect of dietary lipids. Although β -casein mRNA levels inversely correlated with the number of undifferentiated TD, we did not find a correlation with TEB, the main target of carcinogens (29), nor, therefore, with the susceptibility of the mammary gland to transformation. To better understand the effects of dietary lipids on the molecular differentiation of the mammary gland, we also analyzed the expression levels of hormone receptors. Few changes were observed in the estrogen receptors (ER α , ER β 1, and ER β 2) or PR mRNA expression, and the relevance of such modifications is unclear. In any case, these results suggest that the modulation of the expression levels of hormone receptors would not be a major mechanism by which these high-fat diets may influence mammary gland biology, although we cannot rule out the possibility that dietary lipids may induce differences in these receptors at the protein level.

The study of carcinogenesis indicated that administration of the high n-6 PUFA diet clearly increased the risk of developing DMBA-induced mammary tumors, in accordance with our previous findings (7,17,32). Such an effect was manifested in a higher percentage of tumor-bearing rats and tumor yield, as compared to the LF and HOO groups. In addition, tumors from the HCO group appeared earlier (lower latency time), although this result was not statistically significant. On the other hand, the HOO diet may have a weak enhancing influence on carcinogenesis. In the HOO group, the incidence of tumor-bearing rats was unaffected, while tumor yield was higher than in the LF group, although significantly lower than in the HCO group. These results showed some differences with our previous assays, in which we studied the influence on the carcinogenesis of high-fat diets when administered from the induction, observing a negative modulatory effect of the HOO diet. This influence resulted in a lower histopathological degree of tumor malignancy than in rats fed the HCO diet, and lower tumor yield and volume, even lower than that of the LF group (7,17,32). The differences observed in the assays can be related to the different timing of the dietary intervention, as well as to distinct varieties of oil used, since it has been reported that the influence of olive oil on carcinogenesis depends on the proportions of oleic acid and minor components of the oil (33). Our findings are of interest considering the high percentage of olive oil used in the

diet, as it should be taken into consideration that all high-fat diets may have an unspecific stimulatory effect of carcinogenesis (34). There are few works published that have investigated the effect of an HOO diet on the susceptibility to mammary carcinogenesis. It has been reported that prenatal exposure to a 7% or a 15% olive oil diet significantly increased the number of tumor-free rats, perhaps due to an influence of the diet on the immune system and in the promotion of apoptosis (35).

In summary, the results obtained in this work show that administration of the HCO diet from prepuberty clearly advanced the growth and sexual maturation of rats and increased the susceptibility to mammary carcinogenesis, while the HOO diet had a weaker effect. The few modifications observed in the morphology of the glands at the time of the highest susceptibility to transformation suggest that the dietary lipids may modify the mammary cancer risk inducing other changes at a molecular level. In this respect, we have recently described that both high-fat diets exert different effects on mammary cancer through a different combination of Ras signaling pathways, a different proliferation/apoptosis balance, and probably distinct levels of DNA damage (36). The few data published using diets with lower percentages of olive oil (35), together with our previous results showing a potentially protective effect of the HOO diet when administered from postpuberty (7,17,32), suggest that extra-virgin olive oil may have a beneficial effect if its consumption is moderate. New experiments are being designed to explore this hypothesis. In addition with the growing evidence regarding the benefits of olive oil in other chronic diseases (10,37), our results also suggest that the use of this oil as a source of fat can be a healthy choice. In any case, experimental research highlights the transcendence that dietetic factors may have on health and the importance of dietetic habits from childhood.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr. X. Cañas for his technical advice and Dr. J. Ruberte for the use of his laboratory. This work was supported by grants from the Plan Nacional de I + D + I 2004-2007 (AGL2006-07691/ALI); Fundación Patrimonio Comunal Olivarero 2008–2012 (FPCO2008-165.396); Agencia para el Aceite de Oliva del Ministerio de Medio Ambiente y de Medio Rural y Marino 2008–2012 (AAO2008-165.471); Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español 2009–2013 (OIP2009-165.646); and Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria 2008. The sponsors had no role in the study design, data collection and analysis, interpretation of results, the preparation of the manuscript, the decision to submit the manuscript for publication, and the writing of the manuscript.

REFERENCES

1. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research: *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. American Institute for Cancer Research, Washington, DC, 2007.

2. Bartsch H, Nair J, and Owen RW: Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* **20**, 2209–2218, 1999.
3. Fay MP, Freedman LS, Clifford CK, and Midthune DN: Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res* **57**, 3979–3988, 1997.
4. Howe GR, Hirohata T, Hislop TG, Iscovich JM, Yuan JM, et al.: Dietary factors and risk of breast cancer: combined analysis of 12 case-control studies. *J Natl Cancer Inst* **82**, 561–569, 1990.
5. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Adami HO, Beeson WL, Van Den Brandt PA, et al.: Types of dietary fat and breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Int J Cancer* **92**, 767–774, 2001.
6. Schulz M, Hoffmann K, Weikert C, Nöthlings U, Schulze MB, et al.: 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**, 942–946, 2008.
7. Escrich E, Solanas M and Moral R: Olive oil, and other dietary lipids, in cancer: experimental approaches. In *Olive Oil and Health*, Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, and Yaqoob P (eds.). CABI Publishing, Oxford, UK, 2006, pp. 317–374.
8. La Vecchia C: Association between Mediterranean dietary patterns and cancer risk. *Nutr Rev* **67**, S126–S129, 2009.
9. Bosetti C, Pelucchi C, and La Vecchia C: Diet and cancer in Mediterranean countries: carbohydrates and fats. *Public Health Nutr* **12**, 1595–1600, 2009.
10. Ordovas JM, Kaput J, and Corella D: Nutrition in the genomics era: cardiovascular disease risk and the Mediterranean diet. *Mol Nutr Food Res* **51**, 1293–1299, 2007.
11. Howlin J, McBryan J, and Martin F: Pubertal mammary gland development: insights from mouse models. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **11**, 283–297, 2006.
12. Ong KK, Ahmed ML, and Dunger DB: Lessons from large population studies on timing and tempo of puberty (secular trends and relation to body size): the European trend. *Mol Cell Endocrinol* **254–255**, 8–12, 2006.
13. Castellano JM, Roa J, Luque RM, Dieguez C, Aguilar E, et al.: KiSS-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: physiologic roles and putative pathophysiological implications. *Peptides* **30**, 139–145, 2009.
14. Rosner B, Colditz GA, and Willett WC: Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* **139**, 819–835, 1994.
15. Escrich E, Solanas M, and Segura R: Experimental diets for the study of lipid influence on induced mammary carcinoma in rats: I—diet definition. *In Vivo* **8**, 1099–1106, 1994.
16. Escrich E, Solanas M, Ruiz de Villa MC, Ribalta T, Muntane J, et al.: Experimental diets for the study of lipid influence on induced mammary carcinoma in rats: II—suitability of the diets. *In Vivo* **8**, 1107–1112, 1994.
17. Solanas M, Hurtado A, Costa I, Moral R, Menéndez JA, et al.: Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA-induced mammary tumors compared with a high corn oil diet. *Int J Oncol* **21**, 745–753, 2002.
18. Costa I, Solanas M, and Escrich E: Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz(alpha)anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumors. *Arch Pathol Lab Med* **126**, 915–927, 2002.
19. Russo J and Russo IH: DNA labeling index and structure of the rat mammary gland as determinants of its susceptibility to carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* **61**, 1451–1459, 1978.
20. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Barreiro ML, Roa J, et al.: Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* **145**, 4565–4574, 2004.
21. Oi-Kano Y, Kawada T, Watanabe T, Koyama F, Watanabe K, et al.: 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**, 685–692, 2007.
22. Buckland G, Bach A, and Serra-Majem L: Obesity and the Mediterranean diet: a systematic review of observational and intervention studies. *Obes Rev* **9**, 582–593, 2008.
23. Vizmanos B and Martí-Henneberg C: Puberty begins with a characteristic subcutaneous body fat mass in each sex. *Eur J Clin Nutr* **54**, 203–208, 2000.
24. Zhang Z, Benson B, and Logan JL: Dietary fish oil delays puberty in female rats. *Biol Reprod* **47**, 998–1003, 1992.
25. Heger S, Körner A, Meigen C, Gausche R, Keller A, et al.: Impact of weight status on the onset and parameters of puberty: analysis of three representative cohorts from central Europe. *J Pediatr Endocrinol Metab* **21**, 865–877, 2008.
26. Russo IH and Russo J: Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect* **104**, 938–967, 1996.
27. Hilakivi-Clarke L, Clarke R, Onojafe I, Raygada M, Cho E, et al.: A maternal diet high in n-6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 9372–9377, 1997.
28. Snyderwine EG, Davis CD, Schut HA, and Roberts-Thomson SJ: 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**, 1209–1215, 1998.
29. Russo J, Tait L, and Russo IH: Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. III. The cell of origin of rat mammary carcinoma. *Am J Pathol* **113**, 50–66, 1983.
30. Supowit SC and Rosen JM: Hormonal induction of casein gene expression limited to a small subpopulation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor cells. *Cancer Res* **42**, 1355–1360, 1982.
31. Moral R, Solanas M, Garcia G, Grau L, Vela E, et al.: 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**, 429–435, 2008.
32. Moral R, Solanas M, García G, Colomer R, and Escrich E: Modulation of EGFR and neu expression by n-6 and n-9 high-fat diets in experimental mammary adenocarcinomas. *Oncol Rep* **10**, 1417–1424, 2003.
33. Cohen LA, Epstein M, Pittman B, and Rivenson A: The influence of different varieties of olive oil on N-methylnitrosourea (NMU)-induced mammary tumorigenesis. *Anticancer Res* **20**, 2307–2312, 2000.
34. Guthrie N and Carroll KK: Specific versus nonspecific effects of dietary fat on carcinogenesis. *Prog Lipid Res* **38**, 261–271, 1999.
35. Kossoy G, Stark A, Tendler Y, Ben-Hur H, Beniashvili D, et al.: Transplacental effects of high fat diets on functional activity of the spleen and lymph nodes, cell kinetics and apoptosis in mammary gland tumors in female rat offspring. *Int J Mol Med* **10**, 773–778, 2002.
36. Solanas M, Grau L, Moral R, Vela E, Escrich R, et al.: Dietary olive oil and corn oil differentially affect experimental breast cancer through distinct modulation of the p21ras signaling and the proliferation–apoptosis balance. *Carcinogenesis* **31**, 871–879, 2010.
37. Martínez-González MS, Bes-Rastrollo M, Serra-Majem L, Lairon D, Estruch R, et al.: Mediterranean food pattern and the primary prevention of chronic disease: recent developments. *Nutr Rev* **67**, S111–S116, 2009.

RESULTADOS

Antecedentes, resumen de los resultados y datos adicionales:

Estudios experimentales y epidemiológicos, expuestos en los apartados B.3 y C.2.c de la *Introducción* de este trabajo, señalan que el grado de diferenciación que exhibe la glándula mamaria, en el momento en el que un agente etiológico actúa, es de extrema importancia en el inicio de la carcinogénesis mamaria. Determinados factores externos, como la alimentación y la nutrición y, entre ellas, los lípidos de la dieta, pueden modificar este estado de diferenciación glandular, tal como se ha indicado en los apartados B.1.c y D de la *Introducción*. Desde hace tiempo, se reconoce que los factores reproductivos que aumentan el número de ciclos menstruales, como una menarquia precoz, se asocian con un riesgo aumentado de esta neoplasia. El hecho de que el inicio de la menarquia se haya adelantado en los países occidentales, desde principios del siglo XX, se ha relacionado con la mejora de la nutrición. En este sentido, se sabe que la menarquia depende de la acumulación de tejido adiposo y, por lo tanto, los factores nutricionales pueden ser determinantes en definir el tiempo de maduración sexual. Recientemente, se ha demostrado que la kisspeptina hipotalámica (KiSS1) es un factor esencial en la activación del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal que acontece en la pubertad y puede representar un enlace entre las señales metabólicas sistémicas y el control de la reproducción central, tal como se detalla en el apartado correspondiente de la *Discusión*. El objetivo del estudio que configura este artículo fue determinar el efecto de una dieta rica en aceite de maíz (HCO) y otra rica en aceite de oliva virgen extra (HOO) sobre la pubertad, el desarrollo mamario y el riesgo de carcinogénesis mamaria experimental. Con esta finalidad, se estudió el crecimiento y la maduración sexual de ratas Sprague-Dawley hembras (peso corporal, índice de masa corporal, apertura vaginal, histología ovárica y vaginal, expresión hipotalámica de KiSS1), la diferenciación glandular de la mama (morfología, niveles de β -caseína, expresión de receptores hormonales) y parámetros de la carcinogénesis mamaria inducida con DMBA en la rata (tiempo de latencia, incidencia y multiplicidad tumoral), que se detallan y se detallan en el apartado de *Material y Métodos* del artículo. En resumen, en la serie experimental que se diseñó, se sacrificaron 6 ratas al inicio del estudio (24 PND ó día posnatal-) y el resto se distribuyeron en los tres grupos de dieta (LF o control, HCO y HOO), tal como se definen en el artículo. El día 53 posnatal se administró DMBA a los animales, tal como se realizó en las anteriores series experimentales y se describe en el presente artículo. Se sacrificaron ratas de cada grupo experimental en los días 36 PND, 51 PND, 100 PND y al final del experimento (mediana de 246 PND). De los parámetros estudiados, cabe señalar que la caracterización

morfológica de la glándula mamaria se realizó en tejido mamario montado en freso (õwhole mountsõ), valorándose las estructuras ductales y lobulillares, y que la expresión génica de KiSS1, β -caseína, receptor de estrógenos (ER), β 1 (ER β 1), β 2 (ER β 2) y de progesterona (PR) se determinó a partir de ARN total procedente de homogeneizados de glándula mamaria e hipotálamo, tal como se especifica en el subapartado correspondiente de õMaterial y Métodosõ del artículo. En esta publicación, el estudio aportado por la doctoranda incluye, además del diagnóstico de los carcinomas mamarios con los criterios histológicos definidos previamente, en una nueva serie experimental, el análisis morfológico de los ovarios y del endometrio. Los resultados del estudio clínico y morfológico de la glándula mamaria se esquematizan en la Tabla A11 (A: adicional al artículo). En resumen, se observó un aumento del peso corporal de las ratas a lo largo del estudio ($P=0,04$) y en el momento del sacrificio, en el grupo HCO respecto a LF, sin observarse diferencias entre LF y HOO, y un aumento significativo del índice de masa corporal en HCO comparado al de LF, al final del experimento (Figura 2 del artículo).

Tabla A11: Resultados del estudio clínico y morfológico de la glándula mamaria

	LF	HCO	HOO
Peso corporal	LF=HOO	HCO>LF*	HOO=LF
Índice masa corporal	LF=HOO	HCO>LF* (246 PND)	HOO=LF
Maduración sexual	LF la + lenta	HCO>rápida que LF*	HOO>rápida que LF, especialmente en etapas iniciales*
Diferenciación morfológica de la glándula mamaria	lobulillos LF>HOO y HCO (246 PND)*	Menor diferenciación glandular al final del experimento	ABs y lobulillo 1 HOO>HCO* (246 PND)
ER y PR		ER β 2 HCO>HOO*	PR HOO>LF* y HCO*
Tiempo latencia días, mediana (percentil 5-95)	97 (55,0-193,0)	71,5 (32,3-194,0)	89,0 (41,4-139,8)
Incidencia tumoral	LF=HOO	HCO>LF* y HOO*	HOO=LF
Multiplicidad tumoral	LF<HOO*<HCO*	HCO>LF* HCO>HOO*	HOO>LF*

*Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo señalado $P<0,05$

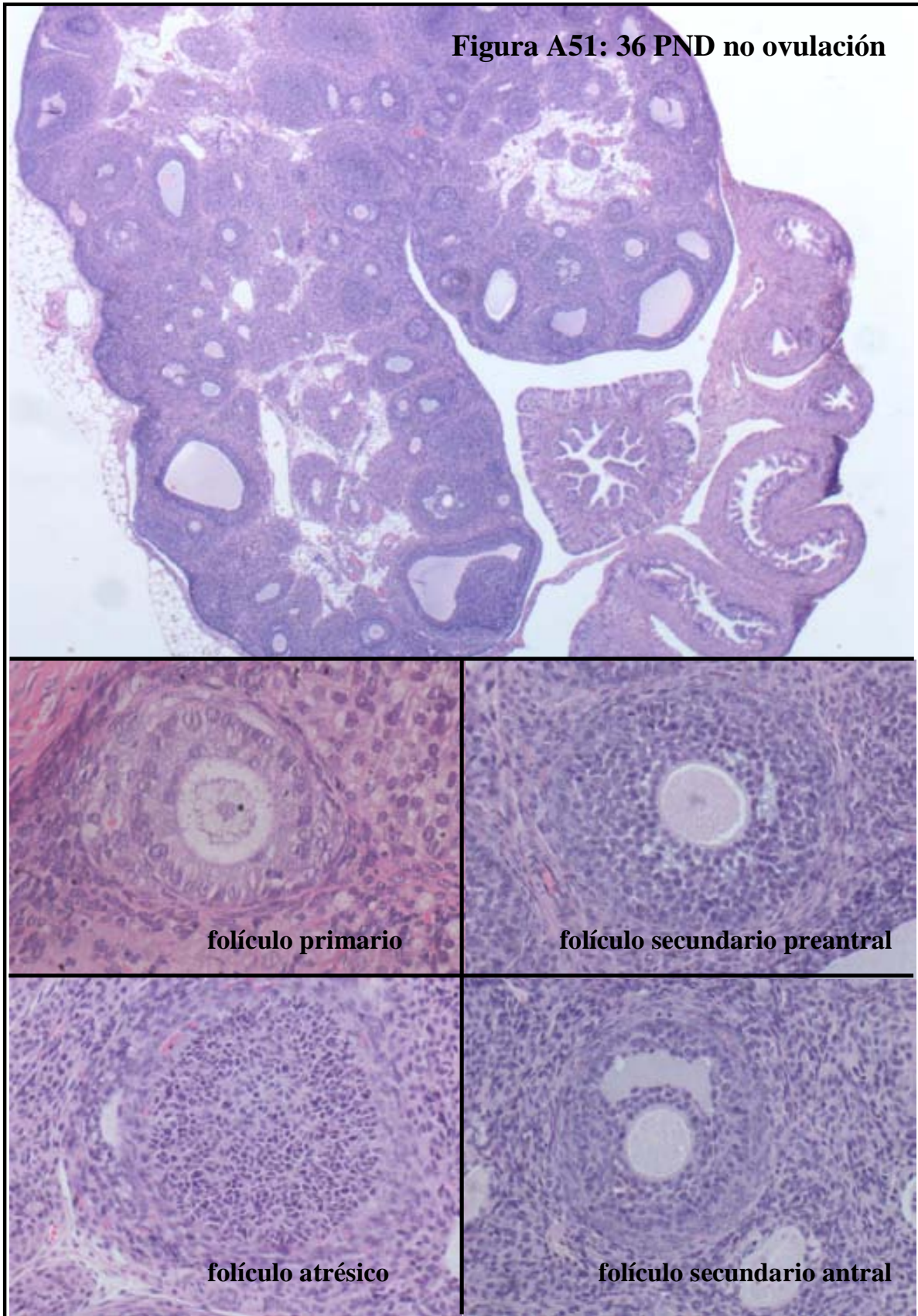
La maduración sexual se valoró con los cambios vaginales, desde un estadio 0 a uno 3 (apertura total de la vagina con labios completamente separados), entre los días 30 PND y 52 PND. Las ratas alimentadas con las dietas hiperlipídicas conseguían el estadio 1 y 2 en edades

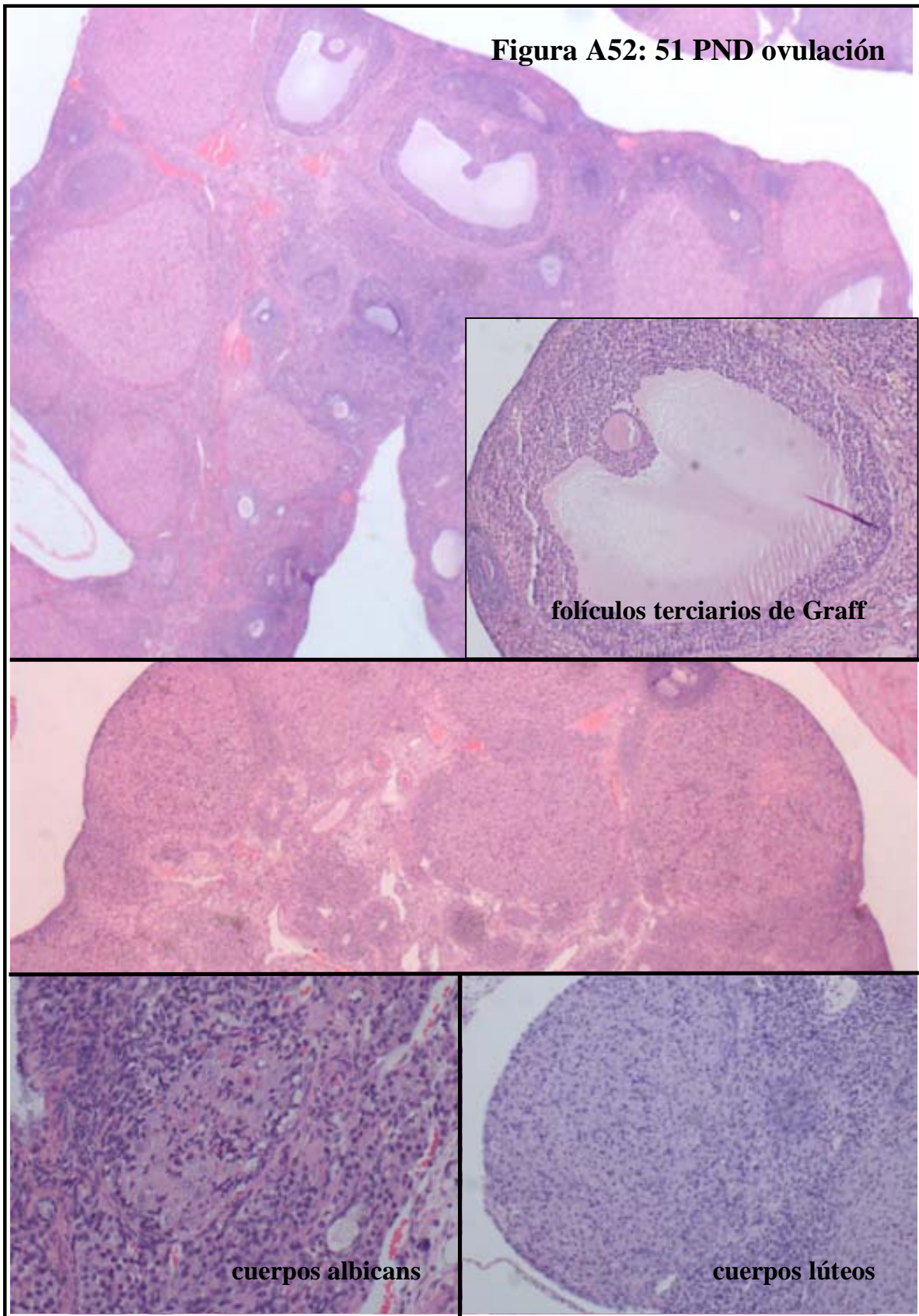
menores que las del grupo control, mientras que sólo el grupo HCO mostró una edad de apertura vaginal estadio 3 claramente menor a LF (Figuras 3 y 4 del artículo), sin relacionarse con cambios en el peso corporal (Tabla 2 del artículo). No se observaron diferencias en el tiempo entre el inicio de la pubertad y el primer ciclo estral, valorado por citología, entre las diferentes condiciones experimentales. En cuanto a la histología ovárica (se analizaron el número de folículos secundarios, terciarios y atréticos, cuerpos lúteos y albicans) y endometrial (inactivo versus funcional), se constató una mayor cantidad de folículos secundarios y atréticos en LF que en HCO y HOO, respectivamente, y un mayor porcentaje de ratas sin cuerpos lúteos y con endometrio inactivo en el grupo LF que en HCO y HOO, en el día 36 PND, mientras que en el día 51 PND, el grupo HCO mostró un número significativamente mayor de cuerpos lúteos que LF (Tabla 3 del artículo). En la Figura A51 (A: adicional al artículo) se muestra una imagen de uno de los ovarios a los 36 PND, en ausencia de ovulación, con representación de las estructuras foliculares más primitivas, y en la Figura A52, a los 51 PND, cuando todas las ratas habían iniciado el ciclo estral y mostraban folículos maduros y estigmas de ovulación. Finalmente, los niveles de expresión de KiSS1 hipotalámica, analizados por PCR en tiempo real (RT-PCR), tendieron a ser mayores en HCO que en LF, en el día 36 PND.

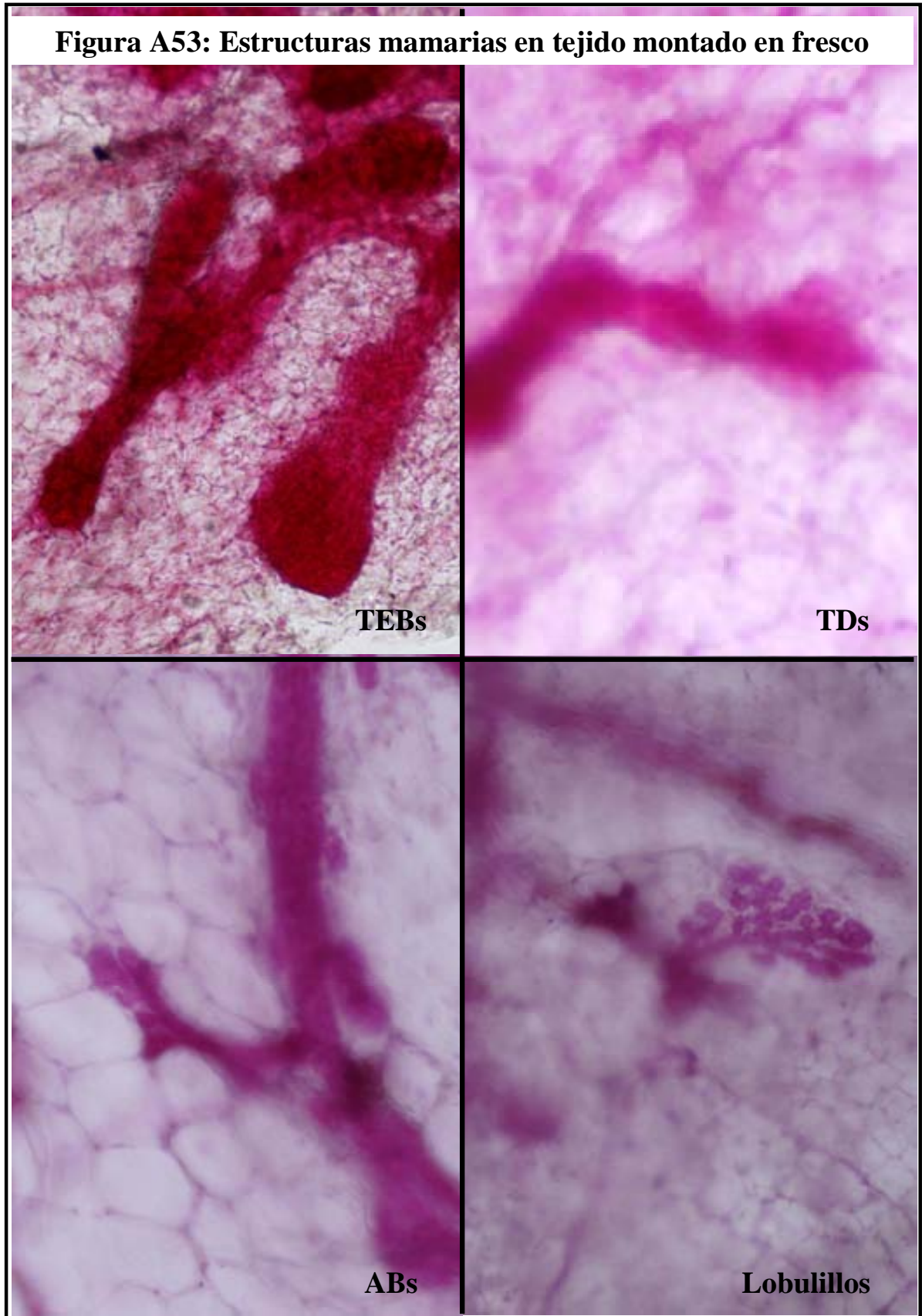
La diferenciación de la glándula mamaria siguió un patrón similar a lo descrito en el apartado C.2.c de la *Introducción* de esta Tesis Doctoral, en relación a los cambios observados en la glándula mamaria de una rata nulípara, En la Figura A53 se muestran las imágenes de las diferentes estructuras mamarias en el tejido montado en fresco y que se evaluaron, en cada sacrificio, en 10 a 15 campos de gran aumento y se cuantificaron con un sistema de análisis de imagen, detallado en el subapartado correspondiente de *Material y Métodos* del artículo. Así, se observó un aumento de los TDs postinducción en los tres grupos experimentales y presencia de lobulillos más maduros (de tipo 3), únicamente en los días 100 PND y 246 PND (Figura 5 del artículo). La densidad de TEBs fue mayor en los grupos de dieta hiperlipídica que en LF, aunque no de forma significativa, y el número de TDs tendió a ser mayor en el grupo HCO que en LF en el día 51 PND, cuando el número de lobulillos tipo 2 en HOO y HCO era significativamente mayor que en LF. Esta situación fue revirtiendo al final del experimento, observándose mayor número de estructuras lobulillares en LF que en los grupos de dieta hiperlipídica. No se observaron diferencias en los niveles de expresión de β -caseína en función de la dieta y sólo se destacó una correlación inversa, al final del experimento, entre los niveles de ARNm y el número de TDs. En cuanto a los niveles

de ARNm de receptores de estrógenos, sólo los de ER β 2 fueron significativamente mayores en HCO que en HOO, en el día 246 PND, mientras que la expresión de PR fue significativamente más elevada en el grupo HOO que en los grupos LF y HCO, en el día 36 PND.

En cuanto a los parámetros clínicos de la carcinogénesis mamaria, no se observaron diferencias significativas respecto al tiempo de latencia. La incidencia tumoral fue significativamente mayor en HCO que en HOO y LF, mientras que HOO y LF no mostraron diferencias. La multiplicidad tumoral por grupo o número de tumores por grupo se incrementó en los grupos de dieta hiperlipídica, especialmente en HCO, con diferencias significativas entre HCO y LF, HCO y HOO y HOO y LF. Estos resultados se expresan en la Figura 6 del artículo.







.....

IV – DISCUSIÓN



Como se ha comentado en el apartado de “Objetivos”, los trabajos que constituyen este compendio de publicaciones se enmarcan dentro del proyecto de investigación sobre el tema de “Lípidos de la Dieta y Cáncer de Mama” que desarrolla el “Grup Multidisciplinari per a l’Estudi del Càncer de Mama” (GMECM) del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona. Esta línea de investigación, que abarca estudios celulares y moleculares, se ha realizado, principalmente, utilizando como soporte experimental el modelo de los tumores mamarios inducidos en ratas hembras Sprague-Dawley con el carcinógeno dimetilbenz(α)antraceno (DMBA). Tal como se ha tratado en el apartado C de la “Introducción”, este modelo experimental presenta unas características biológicas y patogénicas conocidas y similares a las del cáncer de mama humano y unas condiciones experimentales establecidas y aceptadas. Estos factores explican su uso universal en el estudio de la carcinogénesis mamaria para responder cuestiones específicas de la biología neoplásica y aportar información que no podría obtenerse en la población humana.

La discusión se estructurará de acuerdo a los objetivos de este trabajo y a los contenidos de los artículos que lo configuran. En este sentido, los artículos incluidos dentro del grupo de los “específicos del estudio morfológico” se centran, en primer lugar, en las características histológicas del cáncer de mama experimental, tanto en las propias del modelo experimental (objetivo “a”) como en las observadas en diferentes situaciones de dieta, concretamente en cuanto a aporte de grasas (objetivo “b”), y, en segundo lugar, en el análisis de la expresión morfológica, por técnicas de inmunohistoquímica, de la proteína p21Ha-Ras como estudio complementario a los realizados sobre los mecanismos moleculares de los efectos de los lípidos de la dieta en el cáncer de mama (objetivo “c”). Estos temas se discutirán en dos apartados diferentes que se refieren, el primero, al primer y segundo objetivos, y el segundo, al tercero. El resto de las publicaciones, dentro del grupo de “artículos de aplicación e integración de los resultados del estudio morfológico”, integran estos datos histopatológicos en diversos trabajos de investigación, clínicos, moleculares y biológicos, llevados a cabo por el GMECM (objetivo “d”), y aportan una visión global de los efectos de los lípidos de la dieta en el cáncer de mama (objetivo “e”), y constituirán la discusión del tercer y cuarto apartado, respectivamente.

A. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE LAS LESIONES MAMARIAS EXPERIMENTALES Y DEL EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LOS CARCINOMAS DE MAMA EN EL MODELO EXPERIMENTAL INDUCIDO CON DMBA EN LA RATA

Desde la introducción del modelo experimental inducido con DMBA en la rata, en el estudio de la carcinogénesis mamaria, se han intentado caracterizar morfológicamente las lesiones desarrolladas en la glándula mamaria de estos animales. Tal como se ha detallado en el apartado E.2 de la “Introducción”, los trabajos realizados hasta el momento han permitido constatar, en primer lugar, que la mayoría de las lesiones observadas en la mama humana se encuentran en la rata, a excepción de algunas formas específicas de carcinoma (como el carcinoma lobulillar) o de algunos procesos no neoplásicos (como algunos tipos de adenosis), y, en segundo lugar, que existen diferencias histológicas entre los carcinomas de mama desarrollados en la rata y los más frecuentes de la mama humana. En concreto, los carcinomas de mama experimentales muestran predominantemente márgenes redondeados que los hacen, macroscópicamente, bien delimitados, patrones arquitecturales cribiformes y/o papilares y un aspecto generalizado de baja agresividad histológica que dificulta su diferenciación de los tumores benignos ([447], [1141], [3503], [3934], [4322]). Este hecho ha conllevado la necesidad de establecer unos criterios que permitan un correcto diagnóstico diferencial entre las lesiones benignas y malignas. En este sentido, los criterios descritos por S. Young y R.C. Hallowes ([1141]) -macroscópicos, citológicos, histológicos y biológicos-, y ampliados, posteriormente, por Russo y cols. ([3503], [3963]) se han demostrado útiles para esta finalidad. Por otro lado, en un intento de correlacionar la patología mamaria de la rata y la humana, se han propuesto diferentes clasificaciones de las lesiones de la glándula mamaria de la rata, detalladas en el apartado E.2 de la “Introducción”, siendo la más aceptada la descrita por el grupo de J. Russo, del “Breast Cancer Research Laboratory” del “Fox Chase Cancer Center”, de Filadelfia ([3963]). Estas tentativas de ordenar las lesiones mamarias de la rata han facilitado la comprensión y han optimizado la aplicación de los modelos experimentales de cáncer de mama inducidos en este animal. Sin embargo, su uso no ha sido universalmente aceptado y, además, se han mostrado poco reproducibles y con poca correlación clínico-patológica con lesiones de igual denominación en la mama humana, lo que significa una limitación de este modelo experimental en el estudio de la carcinogénesis mamaria, que ha ocasionado críticas y dudas sobre su relevancia. Por este motivo, el trabajo que configura el Artículo 1 (objetivo “a”) pretende, en primer lugar, describir las características histopatológicas de las lesiones mamarias desarrolladas en tres series

experimentales diferentes y, en el caso de los carcinomas, realizar un estudio morfológico similar al que se utiliza en el estudio del cáncer de mama humano y, así, poder compararlas con las entidades descritas en la patología mamaria humana. En segundo lugar, proponer una clasificación de las lesiones mamarias experimentales fácilmente extrapolable a lo que ocurre en la mama humana. La aproximación morfológica expuesta en esta publicación resulta original, ya que no existe un trabajo similar en la literatura, y útil para optimizar el uso de estos modelos experimentales en el estudio de la carcinogénesis mamaria humana.

El estudio histopatológico se extendió, posteriormente, y de acuerdo con el proyecto “Lípidos de la Dieta y Cáncer de Mama” del GMECM, a valorar los efectos que dos dietas hiperlipídicas (una rica en aceite de maíz y otra rica en aceite de oliva virgen extra) podrían ejercer sobre las características morfológicas de los carcinomas de mama experimentales, en especial, sobre aquellas indicativas de la agresividad de los tumores. Para este fin, se diseñó un método de gradación histológica para los adenocarcinomas de mama de la rata, basado en el sistema de gradación de Scarff, Bloom y Richardson ([3703]), usado en patología humana. Este sistema de gradación, aunque se presenta en el Artículo 2, forma parte del primer objetivo de caracterización morfológica de los tumores de mama experimentales, ya que puede aplicarse en todos los adenocarcinomas de mama de la rata, en diferentes situaciones experimentales, para subclasificar estos tumores en grupos histológicos con valor pronóstico y predictivo. Por este motivo, se discutirá en el primer subapartado de esta “Discusión”. Referente a la relación entre los lípidos de la dieta y el cáncer de mama, demostrada en varios estudios epidemiológicos y, sobretodo, experimentales, se ha comprobado que ésta depende del tipo y de la cantidad de grasa ingerida, así como de su presencia en ciertas fases de la carcinogénesis ([2289], [3421], [3568], [3615], [4350]). Asimismo, se han establecido muchas de las bases moleculares que explican esta asociación, tal como se ha comentado en el apartado D de la “Introducción”, y que se discutirán en el tercer y cuarto apartado de la “Discusión”. En cambio, los estudios que incluyen un análisis morfológico de los efectos de estas dietas en el cáncer de mama son escasos y restringidos a la evaluación de parámetros aislados ([1105], [4262]). En concreto, el objetivo del estudio morfológico que constituye la integridad del Artículo 2, y parte del Artículo 5, (objetivo “b”) fue el de analizar si los cambios moleculares y biológicos inducidos por las diferentes grasas de la dieta sobre el cáncer de mama experimental podían reflejarse en la morfología de éste y, en concreto, en el grado de agresividad histológica. Para ello, se aplicó, en primer lugar, el mismo patrón de caracterización de las lesiones mamarias y la clasificación propuesta para las lesiones de mama experimentales, descritos en el trabajo precedente, y, en segundo lugar, el sistema de

gradación histopatológico diseñado para estos carcinomas. Esto permitió, por un lado, un correcto y fácil reconocimiento de los tipos de tumores y lesiones desarrolladas y, por otro lado, evaluar una serie de parámetros morfológicos que podrían aportar valor pronóstico y biológico en los carcinomas de mama experimentales.

1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL MODELO EXPERIMENTAL (Objetivo “a”)

El estudio histológico de las lesiones de mama desarrolladas en las ratas inducidas con DMBA, en tres series experimentales, (37 en A, 62 en B y 101 en C; 200 en total), presentado en el Artículo 1, muestra que la patología más frecuente es el carcinoma (hasta el 75% de las lesiones tumorales). Entre los tumores benignos, el fibroadenoma es el más común, adoptando predominantemente un patrón pericanalicular. Estos primeros resultados son concordantes con lo que se conoce en este modelo experimental ([1438], [3122]). El hallazgo de lesiones proliferativas benignas fue escaso, destacando la hiperplasia lobulillar. Este hecho puede explicarse por la selección, para el estudio histológico, de áreas macroscópicamente anómalas de la glándula mamaria, de aspecto tumoral o pseudotumoral, lo que condiciona el tipo de patología recibida, que no incluye lesiones no reconocidas macroscópicamente. La ausencia de lesiones similares a las lesiones precursoras del carcinoma de mama humano, como la atipia del epitelio plano o la hiperplasia ductal atípica, en las muestras estudiadas de las tres series, puede deberse, también, a este motivo, así como al momento en que se realizó la disección de los tumores. En este sentido, el estudio del tejido mamario en las fases finales del experimento, cuando el proceso tumorigénico se halla avanzado, dificulta el hallazgo de las lesiones previas a la neoplasia infiltrante. Tal como se ha detallado en el apartado B.3.b de la “Introducción”, los tumores mamarios experimentales se inician en las yemas terminales (TEBs), tras la administración del carcinógeno, y progresan desde unas proliferaciones intraductales a carcinomas intraductales. Algunos estudios sugieren que la confluencia estos carcinomas intraductales constituirían microtumores, antes de desarrollar carcinomas invasivos ([3503], [3963], [3966]). Este proceso avanza con el tiempo, de tal forma que los carcinomas intraductales empiezan a observarse a partir del día 20 postadministración del carcinógeno, de acuerdo con la experiencia del grupo investigador. En este sentido, Crist y cols., en otro modelo experimental de cáncer de mama inducido químicamente con N-nitroso-N-metilurea, demostraron que se obtiene un incidencia del 86% de carcinoma intraductal y del 0% de carcinoma invasivo en ratas Sprague-Dawley, entre los días 22 y 45 postinducción. La incidencia de carcinoma invasivo pasa a ser del 50% entre los días 55 y 60 y se incrementa

hasta el 90% entre los 75 y 106 días postinducción ([3623]). Por lo tanto, parece probable que la ausencia de lesiones proliferativas intraductales, en el presente estudio, pueda deberse a que los animales se sacrificaron tarde en el tiempo (media de 201, 225 y 208 días postinducción en las series A, B y C, respectivamente). J. Russo e I.H. Russo describen atipia citológica en hiperplasias ductales en la mama de estos animales, que ellos denominan proliferaciones intraductales, y que consideran que son las lesiones precancerosas previas al carcinoma ductal “in situ” ([3963]). Asimismo, en la clasificación internacional de los tumores de los roedores, de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (“International Agency for Research in Cancer” –IARC-) ([7332]) se reconoce la hiperplasia focal con atipia citológica. Probablemente, el hallazgo de lesiones proliferativas premalignas requiere de un estudio progresivo y temporal tras la inducción con el carcinógeno y un mayor muestreo del parénquima mamario. Recientemente, en un estudio realizado por Al-Dhaheri y cols. se demostró la presencia de lesiones preneoplásicas en el modelo experimental inducido con DMBA en la rata, observándose desde ectasias ductales a hiperplasias, displasias y carcinomas “in situ”, lo que sugiere que este modelo sería útil para diseccionar los cambios tempranos que ocurren durante el proceso de la carcinogénesis mamaria [6109].

La aproximación histopatológica realizada en los carcinomas de mama desarrollados en las ratas de este modelo experimental, que se detalla en el apartado de “Material y Métodos” del Artículo 1, ha permitido un mayor conocimiento de las características histológicas de estos tumores. Asimismo, ha sido el eje en el que se han sustentado los estudios morfológicos posteriores que se han llevado a cabo, y que forman parte de las publicaciones de este trabajo, así como la referencia para otros autores que han aplicado esta aportación en diversos proyectos experimentales, entre los que destacan: [5100], [5137], [6716], [7977], [7978], [7979], [7981]. A diferencia de lo realizado hasta el momento, en que el estudio histopatológico de los carcinomas de mama experimentales se hallaba restringido, en la mayoría de las veces, al diagnóstico de benignidad o malignidad de los tumores y al estudio de parámetros aislados, como la infiltración mastocitaria o linfoplasmocitaria asociada ([3122], [3993]) o el contenido de ADN nuclear ([3624]), el análisis morfológico presentado en este trabajo es detallado y similar a lo que se realiza en patología humana. En concreto, se valoraron en cada uno de los carcinomas diversos parámetros, algunos relacionados con la agresividad del tumor, como el grado arquitectural, el grado nuclear y la actividad mitótica, que configuran el sistema de gradación de Scarff, Bloom y Richardson ([3703]) y de Elston y Ellis o de NGS ([7256]). En este sentido, y tal como se detalla en el Artículo 1, el grado arquitectural, que corresponde a la evaluación de la formación tubular/acinar en el

mencionado sistema de gradación en humanos (ver Tabla 2 de la “Introducción”), se subclasificó siguiendo criterios similares a los sistemas de gradación humanos, pero en relación a las áreas sólidas, dado el predominio de patrón cribiforme y/o papilar en los carcinomas experimentales (grado I, menos del 25% de áreas sólidas; grado II entre 25% y 75% de áreas sólidas y grado III, más del 75% de áreas sólidas). Por otro lado, las escasas figuras de mitosis observadas en los carcinomas de mama experimentales y el pequeño tamaño de alguno de estos tumores aconsejó subclasificar el primer nivel del sistema de gradación humano (menos de 10 mitosis/10 campos de gran aumento) en tres subniveles (≤ 3 , 4-6 y 7-9) para obtener una mayor distribución de los carcinomas, de acuerdo a este parámetro. Otros parámetros, como la presencia de necrosis tumoral o la intensidad del infiltrado inflamatorio asociado, se analizaron por considerarse, también, probables marcadores de agresividad, ya que parecen mostrar valor pronóstico en el diagnóstico histopatológico del cáncer de mama humano, tal como se ha recogido en el apartado E.1.a de la “Introducción”; o, como la presencia o ausencia de microcalcificaciones, como hallazgo morfológico. Finalmente, se evaluaron otros parámetros más propios de las características de los carcinomas de mama de la rata, como el patrón arquitectural –cribiforme y/o papilar-, la reacción estromal –dado el carácter nodular de estos tumores-, la infiltración mastocitaria -frecuente en el parénquima mamario de la rata-, el cambio secretor y el patrón microcribiforme. Los resultados de dicho estudio (plasmados en el Artículo 1 y en el resumen del apartado correspondiente de los “Resultados”), que incluye además una correlación del grado arquitectural y el grado nuclear, como exponentes más evidentes de la agresividad tumoral, con el resto de los parámetros, han permitido obtener una visión más clara y comprensible de estos carcinomas experimentales y una mejor aplicabilidad de los datos morfológicos en los estudios de la carcinogénesis mamaria. En resumen, aunque muchos de los carcinomas presentaron grados nucleares y arquitecturales bajos o moderados y escasa actividad mitótica, se reconocieron carcinomas de diversa agresividad morfológica. Asimismo, a pesar de que la mayoría de los carcinomas eran redondeados y bien delimitados en el estudio microscópico a pequeño aumento, se observaron imágenes de invasión de tejidos vecinos, principalmente de forma expansiva, y algunos, también, con infiltración destructiva del estroma, a mayor aumento. En este estudio se analizó el carcinoma de mama prescindiendo del término “in situ”, invasivo o infiltrante, dado el carácter nodular de estos tumores experimentales, analizando y valorando la reacción del estroma vecino a la neoplasia. En este sentido, los pocos tumores bien delimitados del tejido estromal adyacente y que no mostraron reacción fibroblástica ni desestructuración de la colágena podrían corresponder a

verdaderos carcinomas no invasivos, probablemente resultado de la confluencia de carcinomas intraductales, previo al desarrollo de la invasión. La rareza de imágenes sugestivas de carcinoma propiamente intraductal, como la que se muestra en la Figura A16 de los “Resultados”, podría explicarse por el momento avanzado de la carcinogénesis en que se realizó el sacrificio, tal como se ha comentado con las lesiones proliferativas premalignas. Por otro lado, en algún caso, la infiltración era muy parecida a la que se muestra en el carcinoma ductal infiltrante de la mama humana, con presencia de desmoplasia y nidos tumorales invasivos, como se observa en la Figura A13 de los “Resultados”. Por lo tanto, el resultado de este análisis permite reconocer, en este modelo experimental, formas intraductales, “in situ” o no invasivas, y formas invasivas o infiltrantes de carcinoma de mama. El patrón arquitectural fue predominantemente cribiforme o glandular, asociado a una mayor o menor proporción de patrón papilar y, en algunos casos, adoptando un patrón más tubular o ductal. Los carcinomas con mayor proporción de patrón papilar asociado correspondían a tumores bien diferenciados, tal como se observa en la patología humana ([7276]). Algunos parámetros como las microcalcificaciones, el patrón microcribiforme, el cambio secretor o la necrosis tumoral fueron hallazgos poco frecuentes. La selección para el estudio histológico de las áreas tumorales periféricas más preservadas podría explicar la baja incidencia de necrosis tumoral observada en este estudio, por lo que cabría suponer que ésta debería ser una situación más frecuente. La necrosis tumoral se observó preferentemente en los carcinomas de alto grado arquitectural y nuclear, como ocurre en el carcinoma ductal infiltrante ([4049], [4051], [4225]), mientras que el cambio secretor se evidenció en los tumores bien diferenciados, correlacionando, probablemente, diferenciación morfológica y funcional. Otros parámetros, como el infiltrado linfoplasmocitario, en la mayoría de los tumores ausente o leve, se observó más pronunciado en los carcinomas más agresivos, como parece ser en el cáncer de mama humano, donde algunos estudios lo consideran parámetro pronóstico ([4051], [4053], [4054]), mientras que el infiltrado mastocitario, menor que en el parénquima no tumoral adyacente, fue más prominente en los carcinomas de bajo grado, resultado similar a otros estudios ([3997]), y que podría explicar, por un lado, un papel de los mastocitos en el proceso de la carcinogénesis mamaria y, por otro lado, una relación entre infiltración mastocitaria y diferenciación tumoral ([3122], [3990]), tal como se detalla en la discusión del Artículo 1.

Por lo tanto, aunque el aspecto morfológico de estos carcinomas de mama experimentales exhibe algunas diferencias con los de la mama humana, como la nodularidad tumoral y el patrón predominantemente cribiforme y/o papilar, algunas características observadas, como los diversos grados de diferenciación morfológica y de actividad mitótica,

la variabilidad en la necrosis tumoral o el infiltrado inflamatorio, o la presencia de imágenes de desmoplasia, que pueden indicar diferente agresividad biológica, permiten aceptar este modelo como una herramienta útil en el estudio de la carcinogénesis mamaria, desde un punto de vista histopatológico. En concreto, en el Artículo 1 se propone nombrar a estos carcinomas experimentales, adenocarcinomas, por el patrón cribiforme o glandular predominante que presentan, añadiendo las características morfológicas más relevantes, en concreto: el patrón arquitectural predominante, el grado nuclear y el grado arquitectural, la actividad mitótica, la intensidad de la reacción estromal, del infiltrado inflamatorio y mastocitario y de la necrosis tumoral, y la presencia o ausencia de secreción. Dados los resultados en el estudio de las microcalcificaciones y del patrón microcribiforme, estos parámetros no se consideran relevantes en la tipificación de los carcinomas de mama experimentales. Además, se aconseja evitar clasificar estos carcinomas en subtipos histológicos como el tubular, cribiforme, anaplásico, papilar, etc., como se incluye en algunas de las clasificaciones propuestas por otros autores (ver apartado E.2 de la “Introducción”), dada su escasa correlación con la terminología similar utilizada en patología mamaria humana. La más reciente clasificación publicada por la OMS para las lesiones mamarias humanas ([7603]), en la que se integran las recientes y aceptadas evidencias moleculares en el cáncer de mama humano, resumidas en el apartado E.1.b de la “Introducción”, aconseja renombrar al carcinoma ductal infiltrante como carcinoma invasivo de “tipo no especial” para separarlo de los subtipos especiales, menos frecuentes, que se diagnostican por cumplir unos criterios morfológicos estrictos. Además, y tal como se señala en esta última edición, el término “ductal” puede perpetuar el concepto erróneo de que estos tumores derivan del epitelio ductal mamario, olvidando que, como se ha comentado en el apartado B.3.a de la “Introducción”, el lobulillo tipo 1 o TDLU es el lugar de inicio de la mayoría de los carcinomas de mama. El carcinoma invasivo de “tipo no especial” constituye hasta el 80% de los carcinomas de mama y representa un grupo muy heterogéneo de tumores que requiere un análisis morfológico y molecular complementario para delimitar grupos con valor pronóstico y predictivo, tal como se ha tratado en el apartado E.1 de la “Introducción” ([7276], [7594], [7603]). Finalmente, la última edición de la OMS sustituye términos como carcinoma apocrino o carcinoma medular por una nomenclatura más descriptiva, como carcinomas con diferenciación apocrina o con características medulares, que reconoce la importancia de las características morfológicas asociadas a un tumor, evitando establecer entidades muy cerradas y, a veces, poco reproducibles en la práctica clínica.

En el Artículo 2, que se discutirá más detalladamente en el subapartado siguiente, se realizó un estudio morfológico de los tumores de mama experimentales desarrollados en animales alimentados con diferentes dietas, en cuanto a aporte de grasas. Una de las aportaciones más significativas de este trabajo fue la de crear un sistema de gradación específico para los carcinomas de mama de la rata, adaptado del método de gradación histopatológico utilizado en el carcinoma de mama humano, descrito por Scarff, Bloom y Richardson ([3703]) y actualizado posteriormente por Elston y Ellis, como el Sistema de Gradación de Nottingham o NGS ([7256]). Como se explica en el artículo, el método que se propone incluye tres niveles de puntuación para el análisis del grado nuclear y para el grado arquitectural y cinco para el índice mitótico, tal como se ha descrito y comentado anteriormente. Así, el sistema de gradación histológica integrado final permitió incluir tres calificaciones por grado (grado histológico –GH- I: 3-5 puntos, GH II: 6-8 puntos y GH III: 9-11 puntos), difiriendo respecto a lo realizado en la patología humana (GH I: 3-5 puntos, GH II 6-7 puntos y GH III: 8-9 puntos). La subgradación del primer nivel de la actividad mitótica y la posterior adaptación del grado histológico final permitió una mayor distribución de los carcinomas de mama experimentales entre los grupos de diferenciación histológica. Esta adaptación debería permitir poder evaluar con mayor precisión los efectos que un determinado factor externo puede inducir sobre el grado de diferenciación de estos tumores, relacionado a su vez con el grado de agresividad. Asimismo, los datos morfológicos obtenidos podrían correlacionarse con estudios moleculares concomitantes de diferenciación y proliferación celular, tal como se realizó posteriormente en algunos de los trabajos incluidos en este compendio de publicaciones, como en el estudio de la expresión de *PCPH* (Artículo 4) o los que se recogen en los artículos de integración Artículo 7 y 8. En este sentido, por un lado, se intentó mimetizar lo que se realiza en patología mamaria humana, en la que el grado histológico, que representa la representación morfológica de las características biológicas del tumor, se considera uno de los parámetros pronósticos y predictivos más robustos para el correcto manejo clínico y terapéutico de las pacientes con cáncer de mama ([7603]). La relevancia pronóstica del Sistema de Gradación de Nottingham, inicialmente demostrado en 1991 ([7256]), ha sido validada en subsecuentes múltiples estudios independientes, tal como ya se ha detallado en el apartado E.1.a de la “Introducción”. Asimismo, ha adquirido valor en índices pronóstico, como el de Nottingham ([7611]), combinado con el tamaño tumoral y el estado ganglionar, y forma parte de algoritmos y guías de tratamiento, como la de St. Gallen ([7612]). Por otro lado, los más recientes y aceptados estudios moleculares, entre los que destacan los estudios de expresión

génica, han caracterizado fenotípica y genótipicamente el cáncer de mama humano y han permitido clasificar los tumores de mama en subgrupos moleculares y reconocer, al menos, dos vías patogénicas diferentes para los tumores de bajo y de alto grado histológico ([7260], [7423]), tal como se ha detallado en el apartado B.3.a de la “Introducción”. Estos subgrupos moleculares, descritos en el apartado E.1.b de la “Introducción”, muestran una traducción morfológica que se correlaciona más con el grado histológico y no con otros parámetros, como el tipo histológico ([7270], [7271], [7275], [7602]). En este sentido, Sotiriou y cols. ([7613]) han categorizado un grupo de 97 genes que permite identificar adecuadamente los casos diagnosticados como de grado histológico I o III y que, además, se asocia con la evolución clínica de los pacientes. Este ensayo, comercializado como MapQuant Dx muestra un valor pronóstico similar al obtenido con los MammaPrint o Oncotype DX, descritos en el apartado E.1.b de la “Introducción”. Otros estudios, en la misma línea, han mostrado que el grado histológico dibuja grupos moleculares más perfilados que el estado ganglionar o el tamaño tumoral ([7913], [7914]). Por lo tanto, el grado histológico, en concreto cuando se aplica correctamente el Sistema de Gradación de Nottingham, proporciona un método simple, objetivo, económico y muy preciso para evaluar las características biológicas y el pronóstico de los pacientes con cáncer de mama y debería ser incluido en los algoritmos terapéuticos de esta neoplasia. Por otro lado, su valor no compite sino que complementa la información aportada por los ensayos moleculares que, indudablemente, resultan más costosos. La aplicación de un método de gradación similar en los carcinomas de mama experimentales debería aportar datos biológicos adicionales parecidos y una mejor caracterización morfológica de estos tumores.

La clasificación de las lesiones mamarias de la rata que se presenta al final del Artículo 1, basada en la experiencia del grupo investigador y en algunos datos recogidos de la literatura, reconoce una forma histológica de carcinoma invasivo de mama, el adenocarcinoma, a excepción de los de tipo glándula salival que también se han descrito en este modelo experimental y que por su diferente histogénesis se separan de los derivados de los TEBs. Por los motivos expuestos, y dada la variabilidad de fenotipos morfológicos que estos carcinomas pueden presentar, en el artículo se propone que el adenocarcinoma de mama del modelo experimental inducido con DMBA en la mama se podría equiparar al carcinoma invasivo de “tipo no especial” de mama humano. No se reconocieron carcinomas con características morfológicas propias de los subtipos especiales clásicos (lobulillar, medular, coloide o apocrino). En un caso, se observó un patrón de dediferenciación del carcinoma que podría corresponder a un carcinoma metaplásico o carcinosarcoma (Figura A14). Por otro

lado, y aunque la mayoría de los trabajos previos sobre los tumores mamarios desarrollados en la rata no reconocen la presencia de tumores “phyllodes”, en una de las series del estudio que constituye el Artículo 1, la serie C, se observó un tumor con características arquitecturales que remedaban un fibroadenoma, con un estroma muy celular que mostraba moderada atipia citológica, actividad mitótica y hendiduras foliáceas, que se interpretó como un sarcoma de bajo grado y que podría corresponder a un tumor “phyllodes” (Figuras A28, A29 y A30). La clasificación de las lesiones mamarias propuesta en este trabajo pretende ser innovadora y actual, y fácilmente adaptable a la evolución que sufre el sistema de clasificación de la patología mamaria humana. Asimismo, permite un reconocimiento fácil de las lesiones y, en especial, una sencilla y objetiva identificación de los carcinomas de mama experimentales, que se definen como adenocarcinomas, añadiendo las características citológicas, arquitecturales y morfológicas complementarias, y, en concreto, el grado histológico adaptado a estos tumores experimentales, propuesto en el Artículo 2.

2. EFECTO DE LAS DIETAS RICAS EN PUFA n-6 (ACEITE DE MAÍZ) Y EN ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DEL CÁNCER DE MAMA EXPERIMENTAL (Objetivo ” b”)

Existen numerosos estudios epidemiológicos y experimentales que han puesto de manifiesto la relación entre los lípidos de la dieta y el cáncer de mama, tal como se ha revisado en los apartados B.1.c y D de la “Introducción”, y que ha sido objeto de estudio por parte del grupo investigador ([2567], [2568], [2642], [3672], [3947], [3975], [4393], [4737], [5321], [5965], [6879], [7109]). Como ya se ha comentado, entre los factores más determinantes de dicha relación están el tipo y la cantidad de grasa ingerida, así como el momento de la carcinogénesis en el que las grasas están presentes. Asimismo, los mecanismos moleculares a través de los cuáles estos lípidos ejercen sus efectos en el cáncer de mama son diversos y complejos, y algunos de ellos han sido descritos por el grupo investigador y se recogen en los Artículos 7 y 8. En relación a los lípidos que han sido objeto de estudio del GMECM, se reconoce que los ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-6 u omega-6, fundamentalmente el ácido linoleico (18:2n-6), presentes en aceites vegetales como los de maíz y girasol, son los promotores más efectivos de la carcinogénesis mamaria, mientras que el aceite de oliva, en el que se hallan, además del ácido oleico (18:1n-9), numerosos compuestos bioactivos, parece ser protector, aunque con resultados más controvertidos.

La mayoría de los lípidos se encuentran en alimentos que forman parte de nuestra dieta y, en función de las propiedades expuestas, se les puede clasificar en saludables o protectores y perjudiciales o promotores para la salud en relación con el cáncer y, en concreto, con el de mama. Estos términos, utilizados muchas veces sin base científica o sin consenso entre diversos laboratorios, pueden generar confusión en la población. El hecho de que queden aún muchos aspectos por discernir sobre la relación de los lípidos de la dieta y el cáncer de mama, por un lado, y, por otro lado, las discrepancias existentes entre algunos estudios genera la necesidad de aportar nuevos datos a la caracterización de la actividad biológica de estos nutrientes en la alimentación humana. Por este motivo, el objetivo principal del Artículo 2 fue el de ampliar estos conocimientos y, en concreto, estudiar si los efectos biológicos que los lípidos de la dieta ejercen sobre el cáncer de mama experimental pueden reflejarse en la morfología de éste. Tal como se ha discutido en el subapartado anterior, el grado histológico y algunas características morfológicas poseen un valor pronóstico y predictivo que se ha demostrado útil en el manejo del cáncer de mama humano. En este trabajo, se estudiaron estos parámetros morfológicos, algunos relacionados con la agresividad biológica y otros con la diferenciación celular, en los carcinomas de mama obtenidos de diferentes situaciones experimentales, en cuanto a aporte de grasas. Para ello, se escogieron tres series experimentales, A, B y C, constituidas por diferentes grupos de dieta. Dichas series disponían de un grupo control de animales inducidos con el mismo carcinógeno mamario, pero alimentados con una dieta normolipídica. En el caso de la serie C, el objetivo fue el de estudiar el fenotipo morfológico de los carcinomas de mama inducidos químicamente en ratas alimentadas con dos tipos de dieta hiperlipídica (una rica en aceite de maíz - HFCO_p- y otra rica en aceite de oliva virgen extra - HFOO_p-) y compararlos entre ellos y con el del grupo control, mientras que el diseño experimental desarrollado en las series A y B permitió evaluar los efectos que una dieta hiperlipídica rica en aceite de maíz podía ejercer sobre las características morfológicas de los tumores de mama cuando se administraba durante las etapas de iniciación (grupo HFCO_i) o de promoción (grupo HFCO_p) de la carcinogénesis. En este sentido, y aunque la mayoría de los trabajos experimentales señalan que las grasas actúan fundamentalmente como promotores del cáncer de mama, también existen evidencias de su posible papel durante la iniciación, tal como se ha detallado en el apartado D.1 de la “Introducción”.

La aproximación morfológica que se planteó, y que se detalla en el apartado de “Material y Métodos” del Artículo 2, se consideró original y novedosa dado que este tipo de análisis en tumores experimentales desarrollados en diferentes situaciones de dieta, recogidos

hasta el momento en la literatura, había sido tratado de forma parcial, limitado al diagnóstico y a la valoración de parámetros histopatológicos aislados, como la actividad proliferativa, la infiltración o la necrosis tumoral ([1105], [4261], [4262], [4263]). En este trabajo, se aplicaron los parámetros histopatológicos descritos en el trabajo de caracterización de estos carcinomas de mama experimentales (Artículo 1) y el grado el histológico, tanto el Sistema de Scarff, Bloom y Richardson ([3703]) como el diseñado por el grupo investigador, adaptado del primero a los tumores de la rata, y descrito en el subapartado anterior.

Los resultados mostraron un efecto modulador de los lípidos de la dieta sobre las características histopatológicas, según el tipo de grasa y el momento de administración de éstas. En el Artículo 2 se detallan los resultados del estudio morfológico de cada parámetro, por serie y por grupo experimental, y el análisis estadístico. En resumen, las dietas hiperlipídicas de aceite de maíz, sobre todo cuando actuaron durante la promoción de la carcinogénesis, se asociaron con adenocarcinomas de mayor grado arquitectural y nuclear, con mayor número de mitosis, con reacción estromal y necrosis tumoral más prominentes y con patrón cribiforme prevalente, en comparación con los tumores de los grupos de las dietas control y rica en aceite de oliva virgen extra. Los adenocarcinomas de este último grupo exhibieron, con mayor frecuencia, un grado arquitectural y nuclear bajo, con pocas áreas claramente invasivas y necróticas, similar a la situación control, y presentaron el mayor porcentaje de áreas papilares. Por lo tanto, los tumores de los grupos de aceite de maíz, especialmente el grupo HFCO_p, mostraron un fenotipo morfológico de mayor agresividad que los tumores de los grupos control y de aceite de oliva, lo que es compatible con la mayor malignidad clínica de los primeros, y concordante con el efecto protector o levemente promotor propuesto para el aceite de oliva, demostrado en los estudios de carcinogénesis y que se tratará en el apartado C.1 de la “Discusión”. Algunos de estos resultados están en línea con algunos trabajos previos, en concreto, en relación a los efectos del ácido linoleico. Así, Rogers y cols. ([1105]) y, posteriormente, Snyderwine y cols. ([4262]) observaron una mayor incidencia de carcinomas invasivos en ratas alimentadas con una dieta rica en ácido linoleico que con dieta normolipídica, lo que se corresponde con la mayor reacción estromal y, en concreto, de tipo desmoplásico, observada en los tumores del grupo HFCO_p de las series experimentales de este estudio. Esta mayor capacidad invasiva podría explicar, asimismo, la mayor incidencia de metástasis observada, por Rose y cols. ([2289]), en ratones atímicos alimentados con una dieta con alto porcentaje de ácido linoleico. Por otro lado, existen varios artículos en la literatura que señalan un efecto proliferativo del ácido linoleico y de las dietas ricas en aceite de maíz en líneas celulares de cáncer de mama ([891], [1449], [4263]). En el

modelo experimental inducido con 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol(4,5-b)piridina (PhIP) ([4262]), también se ha descrito un mayor índice proliferativo en los carcinomas de mama de las ratas alimentadas con una dieta rica en aceite de maíz que en los animales con dieta baja en grasas.

En cuanto al aceite de oliva, no se han encontrado estudios en la literatura que analicen las características histopatológicas de los carcinomas de mama experimentales desarrollados en situaciones de alto aporte de dichos lípidos. En el presente estudio, las características morfológicas de los carcinomas de mama desarrollados en el grupo HFOO_P sugieren que estos tumores son menos agresivos, desde un punto de vista histológico, que los obtenidos del grupo HFCO_P, y muy parecidos a los del grupo control (LFCO). En este sentido, destaca la mayor proporción de áreas papilares en los carcinomas de este grupo, en comparación con el resto, que podría expresar una mayor diferenciación estructural ([7276]), como ya se ha comentado en la sección anterior. El único parámetro que mostró valores más elevados respecto al control fueron las mitosis, que podría explicarse por un efecto estimulador inespecífico del aporte calórico asociado a las dietas ricas en grasas ([868], [3673]).

El estudio del resto de los parámetros evidenció un mayor infiltrado inflamatorio, tanto linfoplasmocitario como de mastocitos, en los grupos alimentados con una dieta rica en aceite de maíz, especialmente durante la promoción de la carcinogénesis, aunque las diferencias no fueron significativas. Tal como se detalla en la discusión del Artículo 2, esto podría deberse, por un lado, a un efecto directo de los lípidos de la dieta o, por otro lado, a cambios asociados al proceso de tumorigénesis y a la agresividad tumoral. Respecto a la mayor secreción observada en los carcinomas de los grupos de las dietas hiperlipídicas, especialmente en las series A y C (ésta última con diferencias estadísticamente significativas entre LFCO y HFCO_P), ésta podría atribuirse al almacenaje de grasa citoplasmática en las células tumorales, en respuesta al excesivo aporte lipídico. En cambio, en la serie B estos resultados no se repitieron, observándose una mayor secreción en los tumores del grupo control (LFCO). Aunque las diferencias entre los grupos experimentales no fueron estadísticamente significativas, la mayor secreción observada en los tumores del grupo control podría atribuirse a la mayor diferenciación morfológica, correlación descrita en el Artículo 1. Probablemente, estudios adicionales de este parámetro permitirán clarificar si existe una variación real de la secreción tumoral en relación a los lípidos de la dieta y su significado.

Finalmente, se analizó el grado histológico de los carcinomas aplicando los dos sistemas de gradación histológica en los carcinomas de mama desarrollados, el Sistema de Scarff, Bloom y Richardson ([3703]) y el adaptado a la rata, descrito y explicado en la sección anterior. Al utilizar el Sistema de Scarff, Bloom y Richardson, se constató que en los grupos con dieta rica en aceite de maíz se observaba una menor proporción de carcinomas de bajo grado (grado I) que en los grupos control, especialmente cuando éstos actuaban durante la fase de la promoción de la carcinogénesis, siendo las diferencias significativas en la serie A, y casi significativas en la serie B entre HFCO_P y LFCO. El grupo HFCO_P mostró una distribución similar a LFCO, en la serie C. Al aplicar el sistema modificado y adaptado a los tumores de ratas, las diferencias entre HFCO_P y LFCO se hicieron más evidentes, adquiriendo valor de significación estadística en las series A y B y con una tendencia en C, probablemente debido a una mejor y mayor distribución de los carcinomas entre los tres grados histológicos. En cuanto a HFCO_I, las diferencias con LFCO no fueron tan claras y evidentes como entre LFCO y HFCO_P, con una distribución menos definitiva y descriptiva. En cambio, el grupo HFCO_P mostró, igualmente, una distribución muy similar a la del grupo control, en la serie C. Por lo tanto, el método de gradación histológica propuesto en el Artículo 2 parece permitir una caracterización más precisa de los carcinomas experimentales y, en consecuencia, una mejor tipificación de los efectos de un factor ambiental, como los lípidos de la dieta, sobre el cáncer de mama, desde un punto de vista histopatológico.

La mayor agresividad observada en los carcinomas del grupo HFCO_P, cuando la dieta rica en aceite de maíz se administró durante la fase de promoción de la carcinogénesis, que en los carcinomas del grupo HFCO_I, donde la dieta se administró previamente a la inducción con el carcinógeno, podría deberse a una modificación de los parámetros reproductivos del animal por parte de los lípidos de la dieta. En este sentido, los resultados obtenidos en el trabajo que configura el Artículo 10 indican que las dietas hiperlipídicas, especialmente las ricas en aceite de maíz, aceleran la aparición de la pubertad, tema que se tratará en el apartado C.2.d, de la "Discusión". Así, la dieta rica en aceite de maíz administrada desde el destete y previa a la inducción, que define al grupo HFCO_I, afectaría al grado de maduración y diferenciación de la glándula mamaria en el momento de la exposición al carcinógeno. Esto modularía la respuesta al desarrollo neoplásico y la dependencia a factores promotores. En cambio, en el grupo HFCO_P, el carcinógeno actuaría en el momento de máxima susceptibilidad del tejido mamario, tal como se ha descrito detalladamente en el apartado C.2.c de la "Introducción", con mayor efecto de los factores promotores.

Según los datos disponibles, no existe en la literatura un estudio morfológico integrado, similar al realizado en el trabajo que configura el Artículo 2, sobre los efectos que diferentes lípidos de la dieta pueden ejercer sobre las características histopatológicas de los carcinomas de mama experimentales y, en concreto, sobre la agresividad morfológica de los mismos. En este sentido, la aplicación de la caracterización de los carcinomas de mama experimentales, tal como se describe en el Artículo 1, permitió, por un lado, una identificación correcta de los tumores malignos, al reconocer la variabilidad morfológica de los mismos, y, por otro lado, el uso de una nomenclatura objetiva y fácilmente manejable. Además, el sistema de gradación adaptado a los adenocarcinomas de mama de la rata, descrito en el Artículo 2 y expuesto en el apartado anterior de caracterización morfológica de estos tumores experimentales, se ha mostrado útil para reconocer los diversos grados de agresividad morfológica en estos tumores. En este sentido, otros autores han utilizado la caracterización histológica y el método para graduar los carcinomas de mama experimentales, propuestos en estas dos primeras publicaciones, en sus trabajos de investigación para obtener un dato morfológico adicional, lo que apoya su utilidad práctica. Entre ellos, se incluyen los principales trabajos que utilizan modelos experimentales de mama inducidos químicamente para el estudio de la carcinogénesis mamaria ([5100], [5137], [5265], [6716], [7051], [7977], [7978], [7979], [7981]). Asimismo, y tal como se ha añadido en el subapartado correspondiente del Artículo 2, en el apartado de “Resultados”, la aplicación de este estudio morfológico en los tumores de mama de la rata ha resultado muy útil en series experimentales posteriores con diseños semejantes, llevadas a cabo por el grupo investigador. En estos trabajos, los resultados han sido muy similares a los de esta primera aproximación. La reproductibilidad de los mismos validaría el sistema de caracterización histológica de los carcinomas mamarios experimentales propuesto por el grupo investigador.

B. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS DIETAS HIPERLIPÍDICAS SOBRE LA EXPRESIÓN DE p21Ha-Ras EN LOS ADENOCARCINOMAS DE MAMA EXPERIMENTALES (Objetivo “c”)

Después de caracterizar morfológicamente los carcinomas de mama experimentales y de analizar las diferencias histopatológicas observadas en estos tumores, por efecto de la cantidad y del tipo de ácidos grasos de la dieta, los datos obtenidos se correlacionaron con los resultados de estudios clínicos, moleculares y biológicos realizados en similares condiciones experimentales, llevados a cabo por el grupo investigador. Algunos de estos trabajos

constituyen los artículos del apartado de “Artículos de aplicación e integración de los resultados del estudio morfológico” de este trabajo y su discusión será desarrollada en los apartados C y D de esta “Discusión”. El Artículo 3 se centra en el papel de p21Ha-Ras, como componente de una de las vías de señalización intracelular más importantes, la vía ErbB-Ras-MAPK, en la relación “Lípidos de la Dieta y Cáncer de Mama”. Tal como se ha detallado en el apartado F de la “Introducción”, p21Ha-Ras actúa como mediador en la transducción de señales, a través de la membrana plasmática, en procesos de proliferación celular, parada del crecimiento, senescencia, diferenciación, apoptosis y supervivencia ([2389], [2390], [2963], [4374]). La evidencia, hacia finales de la década de los años setenta, de que Ras presentaba propiedades transformantes que se adquirían por mutaciones de ganancia de función marcó la evolución de la biología molecular del cáncer y encabezó el descubrimiento de muchos más genes, cuya función se hallaba alterada en los tumores. Estos hallazgos acuñaron el concepto de que la transformación progresiva de una célula normal a una de fenotipo maligno refleja la acumulación sucesiva de alteraciones genéticas que confiere a la célula las capacidades necesarias para evadir las barreras homeostáticas, descritas por Hanahan y Weinberg ([3973], [7349]). Actualmente, se reconocen varias propiedades transformantes de Ras, entre las que destacan: capacidad de autosuficiencia en el crecimiento o promoción de la proliferación celular a través de múltiples vías (como transductor de la señalización de los factores de crecimiento, inductor de la transcripción de alguno de estos factores o alterando la expresión de sus receptores); supresión de la apoptosis; estimulación de la glicólisis y otras modificaciones metabólicas que estimulan y facilitan el crecimiento tumoral; remodelación del microambiente celular a través de la sobrerregulación de factores, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs); o evasión a la respuesta inmune a través de diversos mecanismos como la reducción de los complejos mayores de histocompatibilidad presentadores de antígenos en las células tumorales; etc. ([7596]). En el caso del cáncer de mama humano y experimental inducido con DMBA, la incidencia de mutaciones puntuales en *ras* es poco frecuente, tal como se ha comentado en el apartado F de la “Introducción”, mientras que las alteraciones del ARNm y de la proteína de p21Ha-Ras y, probablemente, de su estado de activación parece que intervienen en el proceso de la carcinogénesis mamaria ([2390], ([4198], [4307], [4554]), [4610]).

El posible papel que *c-Ha-ras* podría jugar en los efectos de los lípidos de la dieta en el cáncer de mama ya se ha tratado en los apartados D.4 y D.5 de la “Introducción”. Diversos estudios parecen demostrar que las dietas ricas en aceite de maíz (n-6 PUFA) no alteran la

expresión del ARNm del gen *c-Ha-Ras*, en relación a dietas normolipídicas ([3297], [3975]), ni que sus efectos sobre el cáncer de mama experimental se asocien a mutaciones activadoras de *c-Ha-ras* ([2835], [3297], [3975], [6879]). En cambio, parece más probable que los lípidos de la dieta puedan actuar sobre el nivel de activación funcional de la proteína p21Ha-Ras. Tal como ya se ha señalado en el apartado F de la “Introducción”, p21Ha-Ras necesita, para ser biológicamente activa, una serie de eventos postraduccionales que permitan, por un lado, el tráfico de la proteína recién sintetizada y procesada desde la superficie citosólica del retículo endoplásmico a la superficie interna de la membrana plasmática y, por otro lado, hacerla más hidrofóbica para el posterior anclaje en ésta ([4198], [4610]). Estas modificaciones comprenden, en primer lugar, una farnesilación de una cisteína del extremo C-terminal de la proteína, por acción de la enzima farnesil transferasa y, en segundo lugar, una palmitoilación de los residuos cisteína 181 y 184 ([4135], [4136], [4610]). Todas estas modificaciones lipídicas son esenciales para la asociación a la membrana y la correcta localización subcelular de la mayoría de los miembros de la superfamilia Ras. En concreto, estas modificaciones en p21Ha-Ras permiten su conducción hacia los “lipid rafts” o balsas lipídicas de la membrana plasmática y sus caveolas, descritos en el apartado D.3 de la “Introducción” ([4307]). Diversos trabajos, algunos recogidos en los apartados D.3, D.4 y D.5 de la “Introducción”, demuestran que los procesos postraduccionales que experimenta Ras y su posterior anclaje en la membrana plasmática pueden alterarse por los lípidos de la dieta. En este sentido, en modelos experimentales y en líneas celulares de cáncer de colon, se ha observado una disminución de la localización en la membrana de la proteína p21Ha-Ras, situación necesaria para su activación, por efecto de los lípidos n-3 de la dieta, en comparación con los lípidos n-6 ([2955], [3355], [3920]). Algunas evidencias indican que los cambios en la composición lipídica, especialmente en las balsas lipídicas y las caveolas de éstas, podrían alterar la función y la estructura de la membrana citoplasmática y, por esta vía, influir en el tráfico intracelular y la subsecuente localización subcelular de proteínas lipificadas como Ras ([3587]). Por otro lado, en relación al aceite de oliva, se ha sugerido que el posible mecanismo protector de este aceite, en cáncer, se realizaría a través de sus componentes minoritarios, en concreto el escualeno, mediante la inhibición de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzimaA (HMG CoA) reductasa lo que reduciría, a su vez, los sustratos necesarios para la farnesilación de la proteína Ras, disminuyendo su localización en membrana ([3619], [3620], [3862]). Con estas premisas, en un estudio reciente, el grupo investigador analizó el posible papel de la vía de señalización ErbB/Ras y de sus tres principales efectores, concretamente Raf-1/ERK, PI3K/AKT y RaLGDS/Ra1A/B, en los mecanismos que intervienen en los

efectos de los diferentes lípidos de la dieta en el cáncer de mama experimental, y los resultados fueron el objeto de una publicación ([6879]). Los resultados confirmaron, por un lado, que no existían diferencias en los niveles del ARNm de *c-Ha-ras1* ni en el estado mutacional del gen por efecto de los lípidos de la dieta. En este sentido, este estudio constituyó el primero que analizaba “in vivo” el efecto del aceite de oliva sobre el estado de Ras en cáncer, según la información disponible. Además, se objetivó que los tumores que contenían mutaciones de este gen eran de mayor edad que los que exhibían la forma no mutada, lo que es compatible con una ventaja de crecimiento selectiva conferida por la mutación de *ras* en los tumores mamarios. Por otro lado, se evidenció que la dieta rica en aceite de oliva virgen extra se asociaba con niveles de proteína Ras total (membrana y citosol) y de membrana superiores a los de los grupos de dieta normolipídica e hiperlipídica de aceite de maíz y a una disminución de los niveles de Ras unido a GTP total y de membrana, mientras que la dieta rica en aceite de maíz no modificaba los niveles ni la actividad de esta proteína. Siguiendo esta línea de investigación, el objetivo del Artículo 3 fue el de analizar el efecto de los lípidos de la dieta en la expresión de la proteína p21Ha-Ras en los adenocarcinomas de mama experimentales, desde un punto de vista morfológico, con la técnica de inmunohistoquímica. Para ello, se utilizó una de las series experimentales anteriormente descritas, la serie C, con los tres diseños de dieta: LFCO (control), HFCO_p (dieta rica en aceite de maíz) y HFOO_p (dieta rica en aceite de oliva virgen extra), y los resultados obtenidos se correlacionaron con datos clínicos y patológicos, entre ellos el grado histológico de los adenocarcinomas. Para evaluar la expresión de la proteína, la técnica de inmunohistoquímica, a diferencia del “Western blot”, permite seleccionar y analizar únicamente el tejido tumoral y las áreas adecuadas para un estudio cuantitativo. Asimismo, se consideró la posibilidad de poder localizar a la proteína en la célula, con una disposición predominantemente citoplasmática y/o de membrana, relacionado con su estado de actividad, ya que Ras sólo puede acoplarse a GTP una vez localizada en la membrana ([3920], [6879]). Se utilizó un anticuerpo monoclonal que reconoce únicamente Ha-Ras, y no el resto de las isoformas Ras, y que no discrimina entre Ras mutado y la forma “wild-type”. De todas formas, dado que, tal como se ha comentado en el apartado F de la “Introducción”, la incidencia de mutaciones de *ras* en cáncer de mama humano es menor al 5%, y al 20% en tumores experimentales, la proteína p21Ha-Ras visualizada por este anticuerpo correspondía principalmente a la forma “wild-type”. La cuantificación de p21Ha-Ras se realizó con un sistema de análisis de imagen, descrito en el apartado de “Resultados” correspondiente al Artículo 3, que permite una valoración más objetiva de la cantidad de proteína exhibida en el

tumor que los diferentes métodos semicuantitativos clásicos. Para ello, se utilizó en cada tanda de inmunohistoquímica un control negativo que desechaba la tinción de fondo de los carcinomas en el programa de análisis y, siempre, el mismo control positivo que se analizaba previamente a la evaluación de los tumores de cada tanda y del que se requería siempre unos valores similares de positividad para validar la técnica, tal como se ha detallado en el apartado correspondiente de “Resultados”. Por otro lado, se escogió la serie C, entre las series experimentales anteriormente expuestas, porque había sido objeto de un estudio clínico (Artículo 5; ver apartado C.1 de la “Discusión”) y patológico, (Artículos 2 y 5). Los datos clínicos que se recogieron fueron aquellos obtenidos en el sacrificio de los animales, ya que el análisis histopatológico se realizó en los tumores obtenidos en aquel momento. Según la información disponible, un estudio similar que analizara los efectos de los lípidos de la dieta sobre la expresión de p21Ha-Ras en el cáncer de mama experimental, por inmunohistoquímica, no se había realizado hasta el momento. Los resultados obtenidos se integraron con los descritos en los estudios previos sobre Ras en la relación “Lípidos de la Dieta y Cáncer de Mama” desarrollados por el grupo investigador, y que se discutirán a continuación.

El estudio inmunohistoquímico de la expresión de p21Ha-Ras en los adenocarcinomas de mama experimentales obtenidos de los diferentes grupos de dieta, en cuanto a aporte de grasas, no mostró diferencias estadísticamente significativas. En primer lugar, y como era de esperar, todos los tejidos no tumorales y las lesiones benignas mostraron diversa intensidad de expresión de la proteína, que se identificó como granular y citoplasmática, tal como se había descrito anteriormente ([966], [3246], [7893], [7894]). Garin Chesa y cols., en un estudio de inmunohistoquímica con p21Ha-Ras ([3246]), describieron expresión de esta proteína en la mayoría de los tejidos humanos normales, especialmente en el componente más diferenciado de estos, como en las células parietales gástricas, en el epitelio acinar y ductal mamario, en las células de Leydig testiculares, y menor en el componente más proliferativo (como las células de las criptas gástrica o las células germinales testiculares). En segundo lugar, y referente a los adenocarcinomas, aunque se observó heterogeneidad en la tinción entre los tumores, ésta no se relacionaba con la dieta recibida por los animales. En este sentido, y de acuerdo a lo expuesto sobre el papel de Ras en el efecto estimulador de las dietas ricas en aceite de maíz, estos resultados son concordantes con los estudios en los que se analiza la expresión de la proteína por “Western blot” o del ARNm de *c-Ha-ras* ([3297], [3975], [6879]) y que sugieren que los cambios en la expresión de Ha-Ras no forman parte de los mecanismos de actuación de estos lípidos de la dieta. En relación al grupo HFOO_P, alimentado con una dieta rica en aceite de oliva virgen extra, no se corroboraron los

resultados observados en el trabajo previo referido realizado por el grupo investigador ([6879]), en el que se constataron unos niveles significativamente más elevados de Ras en los extractos totales y de membrana de los tumores de mama de este grupo, comparados con los del grupo control y HFCO_p. Debe tenerse en cuenta, no obstante, que en el estudio de dicho trabajo se analizaron las tres isoformas de Ras en su conjunto, mientras que en el trabajo que configura el Artículo 3 se valoró únicamente p21Ha-Ras, lo que no permite una comparación estricta de los resultados. Tampoco se observaron diferencias en la localización de la tinción, ya que ésta fue siempre predominantemente citoplasmática y granular, sin poderse observar tinción de membrana prevalente en ningún caso. Por otro lado, el patrón citoplasmático es el descrito en los trabajos en los que se ha estudiado dicha proteína con esta técnica ([3246], [7893], [7894]).

La correlación de los resultados del estudio clínico, morfológico y/o inmunohistoquímico permitió constatar algunas evidencias. En primer lugar, que la agresividad clínica observada en el grupo de ratas alimentado con una dieta rica en aceite de maíz, respecto al grupo control, era concordante con la agresividad morfológica de los adenocarcinomas desarrollados en aquel grupo. En este sentido, en el grupo HFCO_p, los tumores aparecieron antes, y el porcentaje de animales afectados y el número de tumores, total y por rata, fue mayor. Además, los adenocarcinomas presentaron grados arquitectural y nuclear más elevados, mayor índice mitótico y mayor grado histológico. Estos resultados son compatibles con el efecto estimulador de la carcinogénesis mamaria atribuido a los ácidos grasos poliinsaturados n-6, descrito en el apartado D de la “Introducción”. Por otro lado, el grupo HFOO_p, alimentado con una dieta rica en aceite de oliva virgen extra, mostró un efecto en la carcinogénesis mamaria que indicaba igual o menor malignidad que el grupo LFCO (similar latencia tumoral y afectación de animales, pero con una menor carga tumoral total y por rata), así como unas características histopatológicas similares a las del grupo control y menos agresivas que las del grupo HFCO_p (menor grado arquitectural y nuclear, e histológico final, mayor nodularidad, con escasa o nula reacción estromal, y patrón papilar más prevalente). Los resultados clínicos están en concordancia con estudios previos desarrollados por el grupo investigador y en otros similares publicados en la literatura y serán discutidos en el apartado C.1 de la “Discusión”. En el presente trabajo clínico, sólo las diferencias en el tiempo de latencia entre el grupo HFCO_p y los grupos LFCO y HFOO_p mostraron una tendencia a la significación estadística, mientras que los otros dos parámetros clínicos exhibieron resultados diferentes, entre los grupos experimentales, pero no fueron estadísticamente evidentes. Esto puede deberse al hecho de que los valores de los parámetros

que se analizaron fueron los que se tomaron en un único punto, al final del ensayo y no a lo largo del tiempo, tal como se evaluó en el estudio clínico que constituye el Artículo 5 y en donde estas diferencias, tal como se comentará, fueron más claras y estadísticamente significativas. La estimulación no específica por parte de las calorías aportadas por el aceite de oliva virgen extra podría explicar la mayor actividad mitótica y la mayor incidencia tumoral observada en el grupo HFOO_P, respecto al grupo control ([868], [3673]). En este trabajo, se compararon las características morfológicas y el grado histológico de los adenocarcinomas de mama desarrollados en cada rata, confirmándose una distribución homogénea y uniforme de estos tumores por animal, que fue más evidente en los grupos LFCO y HFOO_P que en el HFCO_P.

En segundo lugar, al comparar la expresión de p21Ha-Ras con el parámetro morfológico más significativo de la agresividad tumoral, el grado histológico, se pudo observar una relación inversa entre la expresión de la proteína y el grado histológico de los carcinomas (Figura 4 del artículo). En este sentido, en la literatura, se recogen algunos estudios que han evaluado la asociación entre expresión de p21Ha-Ras por inmunohistoquímica y algunos parámetros clínicos e histopatológicos en el cáncer de mama humano. Así, se han descrito correlaciones con el tamaño tumoral, los márgenes del tumor, las metástasis ganglionares y a distancia, el tipo histológico, el grado histológico y otros parámetros morfológicos, como el infiltrado linfocitario, e incluso la expresión de dicha proteína se ha estudiado como factor pronóstico, pero los resultados han sido variados y contradictorios. Algunos autores describen un efecto protector de p21Ha-Ras en las pacientes con cáncer de mama al inducir diferenciación y regular el crecimiento de las células tumorales y la apoptosis, a pesar de correlacionarse con parámetros de proliferación, incidiendo probablemente sobre el potencial de invasión y metástasis ([7894], [7895]). Otros autores coinciden en reconocer un papel de p21Ha-Ras en la diferenciación tisular, al observar mayor inmunorreactividad en los fenotipos más maduros ([3246]). Estos resultados, no obstante, no se repiten en otros estudios, donde se describe mayor expresión de p21Ha-Ras en carcinomas invasivos y mal diferenciados, asociados a embolización tumoral linfática ([1467], [7896]) y a enfermedad axilar y a peor pronóstico ([7893], [7897], [7898], [7899]). Somlo y cols. proponen un modelo pronóstico basado en la expresión de algunas proteínas y genes, como p21Ha-Ras, EGFR, y afectación ganglionar axilar ([7903]). Finalmente, otros autores no demuestran correlación con estos parámetros ([7900], [7901], [7902]). Estas discrepancias se pueden explicar por la diferente metodología utilizada, especialmente por el método de evaluación de los resultados (“scoring”), así como por el número de pacientes

incluidos en los estudios. Estudios que utilizan “Western blot” para analizar la expresión de p21Ha-Ras tampoco han ayudado a clarificar el valor clínico de la expresión de p21Ha-Ras en los tumores de mama ([7899], [7904]). Los resultados del estudio que configura el Artículo 3 evidencian una disminución significativa de la expresión de la proteína al aumentar el grado histológico de los adenocarcinomas. Este hallazgo puede considerarse paradójico, considerando el papel de p21Ha-Ras en la proliferación. No obstante, si estos resultados se correlacionan con datos obtenidos en trabajos paralelos realizados por el grupo investigador, éstos pueden ser explicados. Como ya se ha comentado, en un estudio previo llevado a cabo por el GMECM ([6879]), se objetivaron unos niveles significativamente más altos de proteína Ras y unos niveles significativamente disminuidos de la proteína activa, unida a GTP, total y de membrana, en los extractos de los tumores del grupo HFOO_p, en comparación con los del grupo control y HFCO_p. Una hipótesis sugerida es que uno de los mecanismos a través de los cuáles la dieta rica en aceite de oliva virgen extra modularía negativamente la carcinogénesis mamaria experimental sería disminuyendo la actividad de Ras lo que generaría un escenario de señalización celular que resultaría en un balance proliferación-apoptosis, a favor de esta última, tal como se detalla en el artículo referido ([6879]). En cambio, la dieta rica en aceite de maíz estimularía la carcinogénesis mamaria, entre otras, a través de una combinación de vías de señalización independientes de Ras que decantan este balance a favor de la supervivencia de las células mamarias transformadas. Probablemente, el aceite de oliva virgen extra interfiere en la activación de Ras, mediante modificaciones postraduccionales de la proteína o de la composición lipídica de la membrana celular, lo que afectaría secundariamente el nivel de activación de la proteína, aunque estos efectos aún no han sido demostrados. Ello resultaría en un aumento de los niveles relativos la proteína no activada y de la proteína total. Aplicando esta misma hipótesis, la mayor expresión de p21Ha-Ras observada en los carcinomas de mama experimentales de grado histológico I podría correlacionarse con una disminución de la proteína activada, mientras que la menor inmunoreactividad de los tumores de mayor grado podría ser consecuencia de un aumento de la actividad de la proteína que resultaría en una disminución, por un efecto de “feed-back” negativo, de la forma no activada y total. Este patrón de expresión de p21Ha-Ras se constata al evaluar todos los carcinomas de los tres grupos de dieta y los de los grupos control y HFCO_p, por separado. En cambio, no se cumple cuando se analizan los carcinomas de mama del grupo HFOO_p, en el que no se observan estas diferencias entre los grados histológicos. Es de destacar la mayor expresión de p21Ha-Ras en los carcinomas de mama de grado III de este grupo, en comparación con los carcinomas de grado III de los otros dos

grupos experimentales. Este hallazgo apoyaría un efecto de la dieta rica en aceite de oliva virgen extra sobre Ras, probablemente sobre su actividad, tal como sugieren los trabajos previos ([6879]), repercutiendo sobre los niveles totales de la proteína. Además, permite constatar que carcinomas morfológicamente similares pueden tener un contexto molecular diferente debido a la influencia de un factor ambiental, como los lípidos de la dieta, con posibles consecuencias biológicas y clínicas.

Se obtuvieron similares resultados en el análisis de los carcinomas de las series A y B que incluyen un grupo HFCO_P y un grupo HFCO_I, en el que el aceite de maíz actúa en la iniciación, lo que confirma que los cambios en la expresión de p21Ha-Ras no parecen jugar un papel importante en el efecto estimulador de la dieta rica en aceite de maíz en la carcinogénesis mamaria experimental. Las diferencias respecto al porcentaje de células positivas entre la serie experimental C y las otras dos se atribuye, en primer lugar, a que, en las primeras, los tumores presentaron tiempos de fijación en formol largos, lo que dificultó el desenmascaramiento antigénico y, en segundo lugar, a que en la realización de la técnica de inmunohistoquímica se utilizó, en las series A y B, un sistema de detección de biotina-estreptavidina marcada con peroxidasa, mientras que, en la serie C, el proceso se realizó en un autostainer DAKO, con el método de EnVision+ Dual Link, tal como se especifica en el apartado de “Material y Métodos” del Artículo 3, que aumenta la intensidad de la tinción. En cuanto al estudio de la relación expresión p21Ha-Ras y el grado histológico se repitieron los mismos resultados en la serie A que los discutidos en la serie C, mientras que, en la serie B, un análisis similar, desgranando el grado arquitectural, el grado nuclear y el número de mitosis, también demostró una menor expresión de la proteína en los carcinomas con características más agresivas.

C. APLICACIÓN DEL ESTUDIO MORFOLÓGICO PROPUESTO PARA EL ADENOCARCINOMA DE MAMA DE LA RATA INDUCIDO CON DMBA EN DIFERENTES TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS CON DICHO MODELO EXPERIMENTAL (Objetivo “d”)

1. ESTUDIOS CLÍNICOS

El Artículo 5 analiza la influencia que diferentes dietas hiperlipídicas pueden tener en la evolución clínica del cáncer de mama experimental, integrando los resultados obtenidos con un estudio histopatológico paralelo. Para este fin, como se ha comentado en el apartado correspondiente de los “Resultados”, la serie experimental utilizada (serie C) incluye en este

estudio cuatro grupos de animales inducidos con DMBA y alimentados con diferentes dietas: un grupo control (C), alimentado con una dieta normolipídica, un grupo con dieta rica en aceite de maíz (M), un grupo con dieta rica en aceite de oliva virgen extra (O) y un grupo MO que combina ambas dietas hiperlipídicas. Este último grupo pretende evaluar el efecto del aceite de oliva sobre el desarrollo tumoral después de un periodo con una dieta rica en aceite de maíz. Se analizaron diversos parámetros relacionados con la agresividad clínica de los tumores (latencia, incidencia, multiplicidad y volumen tumoral), así como la regresión tumoral, y algunos relacionados con la agresividad morfológica (grado nuclear y arquitectural, actividad mitótica y reacción estromal asociada al tumor).

Los resultados de este estudio pusieron en evidencia una correlación entre los datos clínicos y morfológicos obtenidos en los diferentes grupos de dieta hiperlipídica, y, por lo tanto, permiten suponer que los efectos biológicos que las diferentes dietas pueden ejercer en las neoplasias desarrolladas se reflejan en la morfología de éstas. Así, los tumores disecados al final del experimento del grupo M fueron los que mostraron menor diferenciación morfológica y mayor proliferación, características que se correspondían con los datos de agresividad clínica. En efecto, la dieta rica en aceite de maíz estimulaba claramente la promoción de los tumores mamarios inducidos con DMBA: éstos aparecían antes, con un mayor número de animales afectados, y el contenido tumoral (total y por animal) y el volumen tumoral (total y medio) fueron mayores. En cuanto a los tumores de los grupos con aceite de oliva en la dieta, los grupos MO y O, el patrón morfológico mostraba, en líneas generales, similitud con el de los tumores del grupo control, con mayor diferenciación que los del grupo M (mayor porcentaje de carcinomas de grado arquitectural y nuclear I que II o III, especialmente en el grupo MO) y menor reacción estromal, compatible con el efecto clínico no promotor e incluso protector de la dieta rica en aceite de oliva. Así, en este estudio, la dieta rica en aceite de oliva virgen extra (grupo O) se asoció con una mayor latencia, una menor incidencia y contenido, así como con tumores más pequeños, que la dieta rica en aceite de maíz. Además, el contenido y el volumen total y medio tumorales fueron, incluso, menores que los del grupo control. En cambio, la incidencia tumoral y la actividad mitótica de los carcinomas fueron mayores al grupo control y la latencia similar a éste. Los resultados del grupo O sugieren un efecto dual en la carcinogénesis mamaria experimental, débilmente promotor y negativo. Respecto al grupo MO, los resultados obtenidos en el estudio clínico parecen confirmar los efectos atribuidos a ambas dietas. Por un lado, la latencia tumoral fue similar a la del grupo M y la incidencia tumoral ocupó un lugar intermedio entre el grupo M y O. Por otro lado, el contenido y el volumen tumoral total evolucionaron desde unas cifras

similares a las del grupo M, al inicio del estudio, hasta similares o, incluso, menores a las del grupo O, al final del mismo. Estos resultados sugieren, en primer lugar, que la dieta rica en aceite de maíz, administrada en las primeras fases de la carcinogénesis, fue esencial para determinar el tiempo de latencia tumoral y el número de animales afectados, y, en segundo lugar, que la dieta rica en aceite de oliva fue capaz de disminuir o revertir el efecto promotor de la dieta rica en aceite de maíz, enlenteciendo la progresión de los tumores mamarios inducidos con DMBA. Por otro lado, el grupo MO fue el que exhibió los tumores con las características más indolentes (mayor porcentaje de grados nuclear y arquitectural I, menor actividad mitótica y menor invasión estromal). La aparente mayor benignidad de los carcinomas desarrollados en MO, más incluso que los del grupo control y O, resulta sorprendente. Probablemente, un estudio futuro que incluya un análisis histopatológico a lo largo del experimento podrá aportar mayor información sobre este hecho. En definitiva, los efectos de la dieta rica en aceite de oliva virgen extra sugieren un mecanismo predominantemente modulador negativo sobre la carcinogénesis mamaria experimental, lo que resultaría en un comportamiento clínico más benigno de la enfermedad cancerosa en comparación con los efectos de la dieta rica en aceite de maíz o, incluso, normolipídica, que se reflejaría en su apariencia morfológica. El predominio de tumores con nula o escasa reacción estromal en todos los grupos experimentales es consistente con la baja capacidad invasiva que caracteriza a estos tumores experimentales ([3503]) y que ya se ha comentado en el primer apartado de la “Discusión”. Las dietas ricas en grasas no modifican esta situación, lo que sugiere que, en el caso del grupo M, aunque la dieta rica en aceite de maíz estimula el crecimiento tumoral probablemente no aumenta la capacidad invasiva y/o metastásica de estos tumores.

Estos resultados están en concordancia con estudios previos desarrollados por el grupo investigador. Así, en las 18 series experimentales desarrolladas hasta el momento actual por el GMECM, los resultados de los estudios de carcinogénesis han sido siempre reproducibles y muy concluyentes en el caso del aceite de maíz. Las dietas con elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados n-6, suministrados a través de dicho aceite en cantidades del 20% en peso, ejercen un claro efecto estimulador de la carcinogénesis mamaria experimental ([2642], [3672], [3947], [3975], [4393], [7109]). Otros estudios experimentales confirman el papel promotor de los ácidos poliinsaturados (PUFA) n-6, tanto en cáncer de mama ([868], [1106]) como en otras neoplasias, como colon y próstata ([3114], [3568]). Hilakivi-Clarke y cols., en sus estudios sobre la relación entre los niveles de estrógenos circulantes en sangre y el riesgo de cáncer de mama, demostraron una mayor

incidencia de adenocarcinomas de mama en ratas gestantes, inducidas con DMBA y alimentadas con una dieta rica en aceite de maíz, respecto a un grupo control de ratas gestantes e inducidas, pero alimentadas con una dieta baja en grasas ([3420]). Estos mismos autores también evidenciaron que los tumores de mama inducidos en ratas nacidas de animales que habían sido expuestos durante la gestación a una dieta rica en aceite de maíz presentaban mayor incidencia tumoral, con un menor tiempo de latencia, que aquellas cuyas madres habían recibido una dieta baja en grasas ([3341], [3588], [5099], [5132]).

En cuanto al aceite de oliva, los estudios son escasos y los resultados han sido más discordantes, tal como se ha comentado en el apartado D de la “Introducción”, mostrando desde un papel modulador negativo, probablemente protector, de la carcinogénesis mamaria experimental a un efecto débilmente promotor, muy inferior al obtenido con el aceite de maíz ([1943], [3205], [3568]). No obstante, actualmente, se reconoce un papel principalmente protector de la carcinogénesis mamaria, tal como ha constatado el presente estudio, y que también se ha observado en otros cánceres, como los de colon y de próstata ([3619], [4634], [4994], [5321]). El análisis de la regresión tumoral, evaluada como uno de los posibles efectos inhibidores de esta dieta, demostró que los efectos protectores del aceite de oliva sobre los tumores mamarios experimentales no eran suficientemente potentes para producir regresión de los tumores, ya sea total o parcialmente. Así, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, ni al evaluar el porcentaje de los tumores que regresaron ni el porcentaje de tumor regresado. Este hecho indicaría que el efecto protector de las dietas ricas en aceite de oliva se efectuaría enlenteciendo la progresión tumoral más que provocando la regresión de los tumores ya establecidos. Los resultados integrados del estudio de la progresión y regresión tumoral sugieren que las dietas de aceite de oliva, si bien no constituirían “per se” una opción terapéutica para el tratamiento del cáncer de mama, sí podrían frenar la evolución de esta enfermedad, si son consumidas moderadamente y de forma habitual. En este sentido, estudios “in vitro”, realizados por el grupo investigador, han demostrado que la combinación de ácido oleico con algún fármaco quimioterápico es capaz de aumentar la citotoxicidad de estos agentes en células de cáncer de mama humano ([3897], [4207]). Por otro lado, los mecanismos a través de los cuáles las dietas con aceite de oliva ejercen estos efectos no están aún del todo claros, y algunos ya han sido comentados en el apartado D la “Introducción”. Entre ellos, cabe destacar la relación entre el contenido de ácido oleico y ácido linoleico y la posible inhibición competitiva de la $\Delta 6$ -desaturasa por el ácido oleico que contrarrestaría el efecto promotor del ácido linoleico, a través de la vía del ácido araquidónico ([3205], [3421]). En este sentido, la gran diversidad de tipos y variedades

de aceite de oliva comercialmente disponibles, con un contenido relativo variable de ácido linoleico y oleico, pueden explicar los resultados contradictorios publicados sobre sus efectos en carcinogénesis. Así, en el modelo experimental de cáncer de mama inducido con nitrosometilurea (NMU) en ratas, Cohen y cols. ([3852]) evidenciaron que diferentes variedades de aceite de oliva inducían diferentes efectos en el desarrollo tumoral, siendo el grupo de animales alimentado con la variedad que contenía mayor relación de ácido oleico “versus” linoleico (80%/5%) el que desarrollaba menor número de adenocarcinomas. Estos tumores eran, además, los que exhibían algunas características morfológicas atribuibles a menor agresividad. En el presente estudio, el aceite de oliva que se utilizó fue virgen extra, con una proporción de 79,03% de ácido oleico y 8,24% de ácido linoleico (ratio 0,10), y de una variedad que contiene, además, menor cantidad de ácidos grasos saturados. Como se ha comentado en el apartado D la “Introducción”, estas grasas son estimuladoras de la carcinogénesis mamaria ([1486], [3205]). Finalmente, otros componentes del aceite de oliva, como escualeno, fenoles, β -sitosterol y flavonoides, deben considerarse por sus propiedades antioxidantes ([3854], [3861], [3862], [4399], [4403], [4404]).

En resumen, los resultados de este estudio sugieren que el aceite de oliva virgen extra podría actuar como un modulador negativo de la carcinogénesis mamaria inducida por agentes genotóxicos, confiriendo a los tumores un comportamiento clínico más indolente y un patrón morfológico de menor agresividad, en comparación con las dietas ricas en aceite de maíz, que actuarían claramente como promotores tumorales. Además, se podrían revertir los efectos promotores de dietas ricas en aceite de maíz, administradas previamente. El conjunto de estos resultados pone de manifiesto la importancia de los hábitos dietéticos, en concreto en lo referente a aporte de grasas, a los que estamos sujetos lo largo de nuestra vida, en relación al desarrollo del cáncer de mama.

2. ESTUDIOS MOLECULARES Y BIOLÓGICOS

a. ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PCPH EN LA GLÁNDULA MAMARIA VIRGEN Y LACTANTE DE LA RATA Y EN LOS TUMORES MAMARIOS INDUCIDOS CON DMBA

PCPH es un gen ampliamente conservado entre los organismos eucariotas que fue definido como un protooncogén en base a su activación oncogénica en fibroblastos embrionarios de hamster Sirio explantados y bajo exposición a una única dosis de 3-metilcolantreno ([7598]). La proteína codificada por el gen normal posee actividad fosfohidrolasa intrínseca, que no se pierde en la forma mutada. La secuenciación del gen, la

determinación de las proteínas codificadas, así como el estudio de las propiedades biológicas de éstas, han sido llevadas a cabo por el equipo del Dr. Vicente Notario, de la Universidad de Georgetown, Washington, y sus trabajos están plasmados en diversas publicaciones, recogidas en la Bibliografía del Artículo 4. Se reconocen dos formas principales del polipéptido PCPH en los tejidos, tanto de rata, humanos como murinos: la forma 47 kDa, que concuerda con el producto de translación obtenido de las secuencias de lectura de ADNc murinos y humanos, y la forma 27 kDa que predomina en la glándula mamaria y en la piel de la rata, de acuerdo al mismo origen embrionario. El objetivo del trabajo que configura el Artículo 4 fue determinar la expresión de las diferentes proteínas codificadas por *PCPH* en el modelo de la carcinogénesis mamaria inducida con DMBA en la rata. En concreto, se obtuvieron muestras de los diferentes órganos de la rata, incluyendo la glándula mamaria lactante, y de los tumores mamaros desarrollados, con el objetivo de conocer los cambios observados en la expresión de este gen. Además, tal como se exhibe en el apartado correspondiente de “Resultados”, se han añadido los resultados de un estudio realizado, posteriormente, en los carcinomas de mama de los grupos experimentales de la serie A, con el objetivo de evaluar el efecto de los lípidos de la dieta, en concreto del aceite de maíz, actuando en la iniciación o la promoción de la carcinogénesis mamaria, en la regulación de la expresión de este gen. Los resultados del primer estudio señalan, en primer lugar, un posible papel de PCPH en la diferenciación tisular. En este sentido, en la glándula mamaria lactante se observa un aumento marcado y diferencial de la expresión de la forma de PCPH de 27 kDa que se localiza, preferentemente, en el citoplasma de las células secretoras. En segundo lugar, se constata la existencia de mecanismos de regulación tejido-específicos muy precisos de la expresión de PCPH, probablemente a nivel del procesamiento del ARNm del gen, dando lugar a ARNm alternativos, tal como estudios previos, llevados a cabo por el equipo de V. Notario sugieren ([7597]), que se acumulan diferencialmente en las células y cuya translación origina las diferentes especies de la proteína. La posibilidad de que los diferentes polipéptidos de PCPH sean el resultado de procesos de la proteína postranslacionales no puede ser, sin embargo, descartada. En tercer lugar, en cuanto a los tumores mamaros experimentalmente inducidos se evidencia una remarcable heterogeneidad en el patrón de expresión de PCPH, tanto en los tumores benignos como malignos. Estas alteraciones de la expresión se caracterizan, por un lado, por un aumento de la complejidad cualitativa, reflejada por la presencia de múltiples formas del polipéptido y, por otro lado, por la presencia de la forma 47 kDa en hasta el 88,5% de los tumores malignos, acompañado de una infrarregulación, o incluso pérdida, de la expresión de la forma 27 kDa, característica de la glándula mamaria

normal. Este hecho se asocia con la ausencia de tinción inmunohistoquímica en las muestras histológicas de los tumores, dado que el anticuerpo monoclonal utilizado reconoce el epítotope de 27 kDa. Estos primeros resultados sugieren, por un lado, que la desregulación de PCPH es un evento temprano en la carcinogénesis mamaria y, en segundo lugar, el papel de algunas formas de la proteína como marcadores de diferenciación tisular. Además, señalan que la activación oncogénica por mutación del gen no parece ser el único mecanismo por el cuál PCPH contribuye al desarrollo neoplásico, sino que las aberraciones en el procesamiento del transcrito o postranslacionales de la proteína resultarían en pérdidas de la proteína normal y en presencia de formas aberrantes. Estudios posteriores que han analizado la expresión de PCPH en otros procesos neoplásicos han abocado similares conclusiones, indicando una expresión diferenciada de las distintas formas de la proteína entre el tejido normal y tumoral que sugieren que PCPH es un participante activo tanto en la iniciación como en la progresión cancerígena ([7792], [7793], [7794], [7795]). Estos estudios proponen, al igual que en el artículo que se presenta, que la inmunodetección de PCPH podría ser aplicada en la identificación temprana de células neoplásicas en los tejidos normales. Además, reconocen a PCPH como probable diana terapéutica, ya que su bloqueo podría prevenir la invasión tumoral, así como inducir cambios en la susceptibilidad de los tumores a los tratamientos complementarios.

Respecto al estudio de la expresión de PCPH en los tumores de mama obtenidos de los animales alimentados con diferente dieta, en cuanto a aporte de grasas, los resultados obtenidos fueron concordantes con el grado de agresividad característico de los diferentes grupos experimentales. Así, tal como se ha detallado en el estudio de los efectos de los lípidos de la dieta sobre las características histopatológicas de los carcinomas de mama, en el Artículo 2, los tumores de los grupos de dietas hiperlipídicas (HFCO_p y HFCO_i) de la serie A fueron los que mostraron un fenotipo morfológico significativamente más maligno (mayor grado arquitectural y nuclear y mayor actividad mitótica, concordante con el mayor grado histológico) que el de los del grupo control, así como parámetros relacionados con una mayor agresividad tumoral (mayor reacción estromal e infiltrado linfoplasmocitario, y elevada proporción de patrón cribiforme). Estos mismos grupos (HFCO_p y HFCO_i) fueron los que mostraron una disminución de la expresión del transcrito de *PCPH* en los tumores de los grupos de animales alimentados con una dieta rica en aceite de maíz, en relación con el grupo control, en el estudio de la abundancia relativa de ARNm de PCPH. Dado el papel atribuible a PCPH en la diferenciación tisular, la menor diferenciación morfológica de los carcinomas de mama desarrollados en los grupos de dieta hiperlipídica concuerda con la menor expresión de esta proteína. Por otro lado, los resultados fueron más evidentes y significativos cuando se

analizaba el efecto de estas grasas durante la iniciación de la carcinogénesis mamaria, lo que puede atribuirse a la participación de PCPH en esta fase del proceso cancerígeno. No existen, según la información disponible, estudios similares en la literatura que hayan analizado el papel de dicho protooncogén en la carcinogénesis modulada por los lípidos de la dieta, por lo que estos resultados deben ser considerados, aún, provisionales.

b. IDENTIFICACIÓN DE GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE POR EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA EN EL CÁNCER DE MAMA EXPERIMENTAL

En base a lo ya comentado y discutido sobre el efecto promotor de las dietas ricas en PUFA n-6 en el cáncer de mama inducido con DMBA en la rata, así como sobre el fenotipo morfológico más agresivo observado en los carcinomas de mama de los animales alimentados con esta dieta, el siguiente estudio fue evaluar los genes que podrían expresarse de forma diferencial en estos tumores mamarios experimentales por efecto de una dieta rica en estas grasas, comparado con una dieta normolipídica. Este trabajo incluye un estudio morfológico paralelo orientado a analizar parámetros de diferenciación y proliferación tumoral (grado histológico y actividad mitótica). Del cribaje realizado con el análisis de un “microarray” de 5184 ADN complementarios (ADNc) de rata que se hibridó con el ARNm de un tumor de cada grupo experimental, se reconocieron seis genes suprarregulados y nueve infrarregulados, especificados en el Artículo 6 y en apartado correspondiente de los “Resultados”, en el grupo de tumores de mama alimentados con una dieta rica en PUFA n-6 (HCO) respecto al control (C). En la validación de estos resultados por “Northern blot” y/o RT-PCR, se normalizaron los niveles de ARNm de los genes diferenciados hallados en HCO respecto a los del grupo C (HCO/C), reportándose una suprarregulación de tres genes y una infrarregulación de cuatro, siendo estos últimos (globulina α -2u de la glándula submaxilar, *VDUPI*-proteína 1 suprarregulada por la vitamina D3-, *H19* y EST-Rn.32385) los que mostraron niveles de ARNm significativamente diferentes entre los grupos HCO y control. Dado el papel de estos genes, tal como se detalla en la Discusión del Artículo 6, algunos asociados a diferenciación tisular (como la globulina α -2u de la glándula submaxilar y *H19*) y otros involucrados en la proliferación celular (*VDUPI*, cuyo producto, al unirse a tioredoxina-1, bloquea su actividad proliferativa y de inhibición de la apoptosis), su infrarregulación en los carcinomas del grupo HCO es compatible con una mayor agresividad de éstos. En este sentido, el fenotipo morfológico tumoral de mayor malignidad en el grupo de dieta hiperlipídica (mayor grado histológico y mayor índice mitótico), respecto al control, es compatible con estos hallazgos moleculares. Este estudio aportó información innovadora, y hasta este momento desconocida, sobre el posible papel de la expresión alterada de estos genes en los mecanismos a través de los cuáles los

lípidos de la dieta influirían en la carcinogénesis mamaria experimental. El trabajo que se comenta a continuación (Artículo 9) fue diseñado con el objetivo de estudiar los mecanismos implicados en estos cambios y ampliar el estudio al aceite de oliva.

c. EFEECTO DIFERENCIAL DE LAS DIETAS HIPERLIPÍDICAS RICAS EN ACEITE DE OLIVA Y EN ACEITE DE MAÍZ SOBRE LA EXPRESIÓN DE H19 Y VDUP1

Los resultados obtenidos en el estudio que configura el Artículo 6 muestran que las dietas ricas en aceite de maíz infrarregulan, entre otros, los genes *H19* y *VDUP1*, tal como se ha comentado en el subapartado anterior. En el Artículo 9 se amplía el estudio a una dieta rica en aceite de oliva virgen extra, para elucidar si los diferentes efectos moduladores clínicos y morfológicos descritos previamente por las dietas ricas en grasas n-6 (grupo HFCO) y n-9 (grupo HFOO), en la promoción de la carcinogénesis mamaria, se acompaña de una expresión diferencial del ARNm y de las proteínas codificadas por estos genes. Además, se analiza la expresión de IGF2 y tioredoxina-1 (TRX) y la actividad de ésta última, en estos dos grupos de dietas hiperlipídicas. En este sentido, una de las funciones de H19 sería la regulación de la transcripción y traducción de IGF2 ([4458]) y, en consecuencia, de su función sobre el crecimiento y la proliferación celular ([4589]); mientras que VDUP-1 actuaría, entre otras vías, reduciendo la actividad de TRX sobre la proliferación celular, angiogénesis e inhibición de la apoptosis ([5804], [5805]). Los resultados obtenidos confirman una reducción de la transcripción de *H19* en el grupo HFCO, significativa respecto a LFCO; una mayor degradación del ARNm de IGF2 y una menor traducción de éste en los tumores del grupo rico en aceite de oliva virgen extra que en los otros grupos, con una tendencia a niveles más altos de la proteína en el grupo HFCO, y una correlación inversa entre la expresión de H19 y de IGF2 en el grupo control, que desaparece en los grupos de dieta hiperlipídica. Dado el papel de H19, atribuido en algunos estudios ([3951], [4812]), en la diferenciación celular, la disminución de su expresión en el grupo HFCO, respecto al grupo control, está de acorde con el mayor grado histológico, y por lo tanto menor diferenciación morfológica, evidenciado en los carcinomas de los animales alimentados con una dieta rica en aceite de maíz que en los tumores de los grupos HFOO y control (ver Artículo 2). En relación a IGF2, la mayor abundancia de los diferentes transcritos del ARNm en el grupo HFOO podría indicar una mayor degradación, así como una menor eficiencia translacional de los transcritos y, por lo tanto, una regulación postranscripcional diferente de IGF2 entre los grupos experimentales. Además, y aunque los resultados no fueron significativos, se observó una tendencia a niveles más elevados de la proteína en el grupo HFCO que en los grupos HFOO y control. Estos resultados son compatibles, por un lado, con el fenotipo más benigno de los carcinomas de

mama experimentales del grupo HFOO y, por otro lado, con la mayor agresividad histológica descrita en los tumores desarrollados en los grupos que reciben una dieta rica en aceite de maíz (ver Artículo 2). Finalmente, la significativa correlación inversa observada, en el grupo control, entre los niveles del transcrito de 3,5 kb IGF2 y el ARNm de *H19* se explicaría por la actividad antagonista de *H19* sobre la expresión de *IGF2*. La desaparición de esta correlación en los grupos ricos en grasas sugiere un efecto de los lípidos en la regulación de la expresión de estos genes. En cuanto a los resultados obtenidos en el estudio de la expresión de *VUDPI*, los niveles significativamente más bajos del transcrito de 3,5 kb en el grupo HFCO son compatibles con el papel supresor tumoral atribuido a este gen ([5803]), así como con el fenotipo morfológico más maligno de los carcinomas de este grupo experimental. En cambio, los niveles más bajos de la proteína, observados en HFOO, resultan paradójicos y difíciles de correlacionar con la biología y la morfología más benigna de los tumores inducidos en este grupo. Finalmente, la expresión proteica y la actividad de TRX que, además de ser un potente antioxidante, puede actuar como un factor de crecimiento celular, apoptótico o proangiogénico, no mostró diferencias entre los grupos dietéticos. La ausencia de correlación inversa entre los niveles de TRX y de *VDUP1* fue inesperada, dado el papel regulador negativo conocido de éste sobre TRX ([4161]). Una posible explicación sería que no todas las funciones de *VDUP1* dependerían de la inhibición de TRX.

En resumen, parece ser que las dietas ricas en aceite de maíz y en aceite de oliva virgen extra ejercen efectos diferentes en la expresión de *H19*, *VDUP1* y *IGF2* en los tumores mamarios experimentales, que se correlacionan con el efecto promotor o protector de la carcinogénesis mamaria, así como con las características morfológicas de los carcinomas, descrito en cada una de ellas, respectivamente. Ello permite corroborar que la desregulación de la expresión de estos genes formaría parte de los mecanismos de acción de las grasas en el cáncer de mama experimental, más evidente a nivel de transcripción que de traducción. Este último hecho, así como la ausencia de cambios en la actividad de TRX, hace necesario estudios complementarios que permitan definir mejor el papel de estos genes en los efectos moduladores de los lípidos de la dieta en el cáncer de mama.

d. MODULACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LA GLÁNDULA MAMARIA A LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA SECUNDARIA A LOS CAMBIOS EN LA MADURACIÓN SEXUAL INDUCIDOS POR LOS LÍPIDOS DE LA DIETA

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

mama. La nuliparidad o que el primer embarazo se produzca en edad avanzada, una menarquia precoz o/y una menopausia tardía constituirían alguno de estos factores. Tal como se ha comentado en el apartado B.3.a de la “Introducción”, estas circunstancias comportarían que la glándula mamaria no alcanzase su máxima diferenciación o bien la alcanzase muy tarde, ampliando el período de máxima susceptibilidad para el inicio del cáncer de mama. Durante este período, el estado de indiferenciación tisular y la exposición a elevados niveles hormonales, así como el aumento del número de ciclos menstruales en los que la glándula mamaria sufre un proceso de crecimiento e involución, influirían en la susceptibilidad de la glándula mamaria a la carcinogénesis, al aumentar la probabilidad de la aparición y acúmulo de mutaciones espontáneas ([5975], [6093], [6828], [7616], [7627]).

El inicio de la pubertad está determinado por las hormonas, los factores nutricionales y el balance energético, cuyas alteraciones pueden alterar su progresión ([7620]). En ratas, el desarrollo puberal empieza poco después del destete y, en hembras, se considera la apertura vaginal el indicador clínico de su inicio ([7628]). Los cambios hormonales que controlan la función reproductora están muy determinados e interregulados de forma muy precisa, siendo la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) la responsable, a nivel hipotalámico ([7629], [7630], [7631], [7632], [7633], [7634], [7637], [7653]). A su vez, el principal regulador de la secreción de GnRH es la kisspeptina hipotalámica ([5830], [6242], [7635], [7636]). La kisspeptina y su receptor son claves en diversos aspectos de la maduración y funcionamiento de la reproducción, desde la diferenciación sexual del cerebro y el inicio de la pubertad hasta la regulación, ya en edad adulta, de la secreción de gonadotropinas y el control metabólico de la fertilidad ([7619]). Su función, mecanismos de acción y regulación están, en la actualidad, bien establecidos y reconocidos ([5828], [7619], [7639], [7648]). Por otro lado, la reproducción es una función altamente sensible al estado de las reservas energéticas y al estado metabólico del organismo. Así, las alteraciones en la homeostasis metabólica afectan al eje gonadotrópico y a la expresión de kisspeptina en el hipotálamo ([5869], [6840]). Además, se ha descrito que es necesario llegar a un determinado peso y a un cierto grado de tejido adiposo para que se inicie la pubertad, por lo que los factores nutricionales pueden influir en el momento de su inicio ([5423], [6826]). De hecho, el tejido adiposo es dinámico y está en constante comunicación con otros tejidos relevantes, como el hígado, el músculo y los centros reguladores de la ingesta en el cerebro ([7624]). Es, además, el principal lugar de producción periférica de estrógenos y de secreción de una serie de péptidos, las adipoquinas, con funciones relacionadas con el metabolismo y la reproducción, entre las que se encuentran la leptina, la adiponectina y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) ([7656]). En

cuanto a los factores nutricionales, estos son esenciales para un adecuado crecimiento y maduración sexual. En roedores, se ha descrito que un déficit nutricional en edades perinatales puede retrasar el desarrollo de las gónadas, la apertura vaginal y el primer estro, y, por lo tanto, el inicio de la pubertad ([7620], [7621]). La nutrición posnatal es igual de importante ya que una dieta desequilibrada durante la edad peripuberal puede afectar el grado de adiposidad. El hecho de que el inicio de la menarquia se haya adelantado en los países occidentales, desde principios del siglo XX, se ha relacionado con la mejora de la nutrición [6829]. En este sentido, una dieta con una elevada cantidad de grasas puede producir el adelantamiento de la pubertad ([6093], [6828], [7616], [7618]). Este efecto, no obstante, parece depender del tipo de grasa consumida y, en concreto, de las características de los ácidos grasos, como son el tipo de estructura, la longitud de la cadena o el grado de insaturación ([5426], [5428], [6599], [7475]). La obesidad, además de su influencia sobre el crecimiento y la maduración sexual, tiene otras importantes consecuencias sobre la salud y se ha asociado con algunos tipos de cáncer, como el de páncreas, colorrectal, endometrio y riñón, así como con el cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas, tal como se ha comentado en el apartado B.1.c de la “Introducción” ([6093]).

El estudio que configura el Artículo 10 pretende determinar el efecto de una dieta rica en aceite de maíz (grupo HCO) y de otra rica en aceite de oliva virgen extra (grupo HOO) en la pubertad, en el desarrollo mamario y en la carcinogénesis mamaria experimental. Para este fin, se diseñó una nueva serie experimental, diferente a las utilizadas en los trabajos que configuran los Artículos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9, y que se describe en el apartado de “Material y Métodos” del artículo y en el correspondiente del apartado de “Resultados” de este trabajo. En concreto, las diferentes dietas (normolipídica, rica en aceite de maíz y rica en aceite de oliva virgen extra) se administraron desde el destete, previo a la inducción con el carcinógeno. En primer lugar, se analizaron diferentes parámetros relacionados con la maduración sexual, en diversos puntos del experimento. Los resultados indican una anticipación de la maduración por las dietas ricas en grasas, más evidente en el grupo HCO (apertura vaginal en edades más tempranas, mayor número de cuerpos lúteos en el día PND51 y una tendencia a niveles más altos de la expresión de kisspeptina hipotalámica en la pubertad). En cuanto al peso e índice de masa corporal, los resultados son concordantes con lo descrito en la literatura. Así, se observó que la dieta HCO aumentaba ambos parámetros, especialmente al final del experimento, mientras que la dieta rica en aceite de oliva virgen extra, con igual porcentaje de grasas que en el grupo HCO, no modificaba estos parámetros, en relación a una dieta control. Estas evidencias estarían de acuerdo con estudios epidemiológicos que han asociado

diferentes patrones dietéticos con el riesgo de desarrollar obesidad. Así, por ejemplo, la dieta mediterránea, cuya principal fuente de grasa es el aceite de oliva, ha sido inversamente asociada con la obesidad, a pesar del contenido de grasa relativamente elevado de dicha dieta ([7102], [7625]). Uno de los mecanismos por los cuales una dieta basada en aceite de oliva podría tener efectos beneficiosos sobre el peso corporal, sería a través de la aportación exógena de oleiletanolamida (OEA) ([7168], [7178], [7206], [7210], [7218]). Esta etalonamida juega un papel importante en el control central y periférico de la ingesta y de la saciedad, contribuyendo a la disminución del peso corporal, y en el control del gasto y acúmulo de energía ([7206], [7212], [7495]).

Cuando se evaluó el inicio de la pubertad en relación al peso y masa corporal, se constató que no existían diferencias en éstos al llegar a dicho estadio, entre los grupos experimentales, lo que confirma la necesidad de una determinada masa corporal para observar los cambios reproductivos ([6826]), que se consigue antes con una dieta rica en aceite de maíz que con una rica en aceite de oliva virgen extra o normolipídica. La ausencia de diferencias, entre los grupos de dieta, en el tiempo desde la apertura vaginal y el primer ciclo estral o en el ciclo de las ratas, ni en la evolución del peso uterino u ovárico, indicaría que las dietas ricas en grasas no cambiarían la evolución del proceso de maduración sexual, una vez iniciado, a pesar de avanzar. Esta observación concuerda con las evidencias en estudios humanos que sugieren que cuando se alcanza el nivel de peso y masa corporal necesaria para el inicio de la pubertad, el proceso de maduración es menos influenciado por estos factores ([6830]).

En segundo lugar, se estudió el efecto de los lípidos de la dieta sobre el desarrollo de la glándula mamaria, con el objetivo de valorar los cambios que las diferentes grasas podrían ejercer sobre la diferenciación glandular. Tal como se ha comentado en el apartado B.3 y C.2.c de la “Introducción”, el grado de diferenciación de este órgano determina la susceptibilidad a la transformación maligna, en el momento del insulto carcinogénico. En este sentido, se ha descrito la influencia de los PUFA n-6 en la morfología de la glándula mamaria de la rata, alterando la densidad y la proliferación de los TEBs, así como de la cantidad de receptores de estrógenos y de la actividad de PKC ([3341], [3581], [3588], [4915], [5816]). En el estudio que configura el presente trabajo, sólo se hallaron algunos cambios en el compartimento lobulillar. Así, las dietas ricas en grasa se asociaron con un mayor número de lobulillos tipo 2, en el momento de la inducción con el carcinógeno, sin alterar significativamente el número de las estructuras más indiferenciadas (dianas del carcinógeno, tal como se ha comentado en el apartado B.3.b de la “Introducción”). En edades más avanzadas de los animales, se constató un menor número de lobulillos tipo 2 y 3 (estructuras

más diferenciadas, tal como se detalla en el apartado A.2 de la “Introducción) en las glándulas mamarias de los grupos de dieta hiperlipídica, probablemente debido a la acción conjunta del carcinógeno y de las dietas. Para caracterizar mejor el grado de diferenciación de la glándula mamaria, se analizó la expresión de β -caseína, considerada como el marcador molecular de diferenciación de este órgano, y de los receptores de estrógenos y progesterona. Se constató un aumento de los niveles de ARNm de β -caseína mamaria, en todos los grupos dietéticos, a lo largo del experimento, sin observarse diferencias significativas entre ellos; y una correlación inversa con el número de TDs, al final del experimento, no observada en relación con los TEBs. Los resultados que conciernen al estudio de los niveles de receptores hormonales no mostraron cambios evidentes entre los grupos experimentales que permitan suponer una modulación de la expresión de estos receptores por parte de los lípidos de la dieta.

Finalmente, los resultados del estudio del efecto de los lípidos de la dieta en la carcinogénesis mamaria experimental fueron similares a los reportados en las series experimentales anteriores y que se han discutido, principalmente, en los Artículos 2, 3 y 5. En concreto, en esta serie experimental se observó un significativo mayor porcentaje de ratas portadoras de neoplasia y un mayor contenido tumoral total en el grupo HCO que en los grupos HOO y control, así como una menor latencia tumoral. En cambio, el grupo HOO mostró un leve efecto estimulador de la carcinogénesis ya que, a pesar de presentar una incidencia tumoral parecida a la del grupo control, se constató un mayor contenido tumoral total respecto a éste, aunque menor que en HCO. Este resultado difiere ligeramente de lo recogido en la serie C, en la que la dieta rica en aceite de oliva virgen extra se administró después de la inducción, donde se constató un efecto modulador negativo de esta dieta, tanto en el estudio clínico como morfológico (ver Artículo 5). Las diferencias observadas entre los ensayos podrían explicarse, por un lado, por el momento de administración de la dieta y por las distintas variedades de aceite de oliva utilizadas y, por otro lado, por la inevitable deriva genética de la especie utilizada. En este sentido, se ha reportado que la influencia del aceite de oliva en la carcinogénesis depende muy directamente de la proporción de ácido oleico y de los componentes minoritarios que contiene ([3852]). Asimismo, tampoco puede subestimarse el papel estimulador inespecífico que las calorías, asociadas a una alimentación elevada en grasas, pueden jugar en la carcinogénesis. Los aislados trabajos que analizan el efecto de la dieta rica en aceite de oliva en la susceptibilidad a la carcinogénesis mamaria, sugieren un posible efecto protector ([5127]), por lo que se requieren estudios adicionales para clarificar la modulación y los mecanismos de acción del aceite de oliva sobre el desarrollo de la glándula mamaria y su relación con la transformación maligna.

En resumen, el efecto estimulador de la carcinogénesis mamaria, por una dieta rica en PUFA n-6, observado en este estudio, puede correlacionarse con la aceleración de la maduración sexual, que amplía la ventana de susceptibilidad a la transformación neoplásica. Esta misma aceleración de la pubertad, aunque no tan evidente, observada en el grupo de animales alimentados con una dieta rica en aceite de oliva virgen extra, puede asociarse con el efecto levemente promotor observado en esta situación. Por otro lado, aunque el estudio de la diferenciación glandular no muestra diferencias significativas entre los grupos experimentales, la evidencia de algunos cambios en el compartimento lobulillar apoya una posible modificación diferencial, especialmente a largo plazo, por efecto de los lípidos de la dieta. Estudios adicionales permitirán complementar los hallazgos expuestos.

D. INTEGRACIÓN DE LOS RESULTADOS MORFOLÓGICOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LÍPIDOS DE LA DIETA Y CÁNCER DE MAMA (Objetivo “e”)

Los Artículos 7 y 8 recogen los resultados y las conclusiones más aceptadas sobre la relación “Lípidos de la Dieta y Cáncer de Mama”, en especial los efectos clínicos y los mecanismos moleculares a través de los cuáles las diferentes grasas actúan, en base a lo publicado en la literatura, tanto por el grupo investigador como por otros autores. Además, integran los cambios morfológicos consecuentes a estos efectos, reportados en los Artículos 2, 3, 5 y 6. Estos dos artículos remarcan la importancia que las evidencias experimentales han aportado y se extienden a las recogidas en otros cánceres, en particular los de colon, recto y próstata. El contenido de dichas publicaciones detalla y expande lo referido en el apartado D de la “Introducción”, ya que incluye las aportaciones de los Artículos 2, 3, 5, 6 y 9, así como datos adicionales tanto de la carcinogénesis mamaria, como de la colorectal y prostática, en relación con los lípidos de la dieta.

En resumen, se señala que los estudios experimentales han permitido establecer una relación clara entre los lípidos de la dieta y el cáncer, siendo el de mama el que se ha estudiado más exhaustivamente. Entre otras evidencias, se ha podido demostrar que esta relación depende del tipo y de la cantidad de grasa consumida, así como de las fases de la carcinogénesis en las que actúan. En este sentido, se recuerda el papel promotor de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n-6, principalmente el ácido linoleico, y se recogen los diferentes trabajos realizados por el grupo investigador con el aceite de maíz ([2642], [3672], [3947], [3975], [4393], [4737], [5965], [6879]), a los que se añaden los Artículos 2, 3, 5, 6, 9 y 10, que demuestran este efecto estimulador de la carcinogénesis mamaria, tanto desde un punto de vista clínico y molecular,

como morfológico. Por otra parte, y en relación al aceite de oliva, se constata que hay pocos trabajos en la literatura que analicen los mecanismos de acción de estas grasas en el cáncer. Por este motivo, los Artículos 7 y 8 constituyen una importante aportación en este campo, ya que ofrecen una visión actualizada e integradora de los efectos y de la modulación de estas grasas en la carcinogénesis mamaria, y complementan otras revisiones realizadas por el grupo investigador sobre este tema ([4393], [5321], [5965], [6879], [7109]). En este sentido, los estudios realizados con aceite de oliva virgen extra han mostrado desde un efecto modulador negativo (Artículo 5), posiblemente protector de la carcinogénesis mamaria, hasta un efecto muy débilmente promotor (Artículo 10). Asimismo, el análisis de la regresión tumoral (Artículo 5) parece indicar que estas grasas no son suficientemente potentes para que regresen los tumores. Estos resultados concuerdan con la apariencia morfológica más diferenciada de estos adenocarcinomas, similar a la observada en los carcinomas desarrollados en los grupos de animales alimentados con una dieta normolipídica (Artículos 2, 3 y 5 del compendio de publicaciones). En el caso del aceite de oliva, aparte del posible papel que puede jugar el ácido oleico –MUFA n-9-, hay que considerar los componentes minoritarios, como los compuestos fenólicos, escualeno o lignanos, que pueden intervenir en las acciones sobre la neoplasia. En la Tabla 2 del Artículo 8, se detallan los principales mecanismos de acción, conocidos hasta el momento, de este aceite en el cáncer, especificando los componentes involucrados que se conocen.

La integración de los estudios sobre los efectos de los lípidos de la dieta en el cáncer de mama, en estos dos artículos, permite suponer que la modulación de la carcinogénesis mamaria por las diferentes grasas de la dieta se ejerce a través de mecanismos diversos que se interrelacionan entre sí y que, en el caso del aceite de maíz y de oliva virgen extra, comportan una expresión morfológica diferente de los carcinomas. Algunos de estos mecanismos afectan a varios, y en muchos casos no compartidos, genes, proteínas, enzimas, estructuras celulares o vías moleculares que regulan diversas funciones biológicas. En lo que se refiere a las dietas ricas en aceite de maíz y de aceite de oliva se destaca la repercusión antagónica sobre la peroxidación lipídica, el estado de estrogenicidad tisular, la biosíntesis de eicosanoides o la expresión de algunos genes involucrados en proliferación y diferenciación. En este sentido, se remarca, en primer lugar, el papel selectivo del aceite de maíz sobre la infrarregulación de algunos genes, potencialmente supresores del crecimiento celular (*globulina α -2u de la glándula submaxilar*, *VDUPI*, *H19* y *EST-Rn.32385*), descrito en los Artículos 6 y 9, que no se observa con la dieta rica en aceite de oliva virgen extra. Asimismo, la expresión de *PCPH*, que se asocia a diferenciación tisular (Artículo 4), muestra una disminución en el cáncer de mama experimental, secundaria a una dieta rica en aceite de maíz, resultados que se recogen

en los Artículos 7 y 8 y en los datos adicionales al Artículo 4, mientras que en el grupo rico en aceite de oliva los niveles no son significativamente diferentes al grupo control (resultados no reportados). En esta misma línea de investigación, se ha observado una modulación diferencial de la expresión de transferrina y ZBP1 por dietas ricas en aceite de maíz o de aceite de oliva. En cambio, se han constatado niveles elevados de ARNm de β -actina, considerada un marcador de dediferenciación, por efecto de las dietas hiperlipídicas, independientemente del tipo, y ausencia de cambios en la expresión de caseínas por efecto de las grasas ([5965]). En segundo lugar, otros estudios han demostrado un efecto diferencial de los lípidos de la dieta sobre la expresión de genes involucrados en vías de señalización celular. Así, la dieta rica en aceite de maíz se asocia con un incremento del transcrito 9,5 kb de *c-erbB1*, que es traducido a la forma funcional del receptor EGFR, mientras que la dieta rica en aceite de oliva virgen extra disminuye la ratio entre este transcrito y el truncado de 2,7 kb (sin actividad). Además, la dieta rica en aceite de oliva tiende a disminuir los niveles de ARNm de *c-erbB2/neu* y de su proteína, mientras que la dieta rica en aceite de maíz no modifica la expresión de este receptor ([4393], [5321]). En relación a las vías de transducción de señales, se ha demostrado una regulación de la actividad de Ras por el aceite de oliva, que no se repite con el aceite de maíz, tal como se ha discutido previamente en el apartado B de la “Discusión”, lo que sugiere que los efectos moduladores negativos del aceite de oliva sobre el cáncer de mama son mediados, entre otros, por una disminución de la actividad de Ras, mientras que la dieta rica en aceite de maíz estimula la carcinogénesis mamaria a través de una combinación de vías de señalización celular independientes de Ras, como la vía Raf/Erk ([6879]). Finalmente, entre los mecanismos diferenciales de los lípidos de la dieta en el cáncer, hay que resaltar los efectos en la composición tumoral en ácidos grasos, diferentes entre la dieta rica en aceite de maíz y la dieta rica en aceite de oliva, lo que sugiere una posible modulación en el grado de insaturación y fluidez de las membranas celulares y, en consecuencia, de su función, de la señalización celular y del suministro de sustratos energéticos, así como un efecto proinflamatorio de los PUFA n-6 y antiinflamatorio del aceite de oliva virgen extra.

Una de las aportaciones más importantes de estos artículos es la correlación de los datos clínicos, moleculares y morfológicos de la relación “Lípidos de la Dieta y Cáncer de Mama”. En resumen, en primer lugar, se recoge que los mecanismos a través de los cuáles las distintas dietas, en cuanto a aporte de grasas, modulan la carcinogénesis mamaria parece que implican vías de proliferación y diferenciación distintas. En segundo lugar, que los efectos moleculares observados en los diferentes grupos de dieta hiperlipídica coinciden con los

efectos clínicos y morfológicos respectivos. En este sentido, las dietas ricas en aceite de maíz, a través de mecanismos moleculares que derivan en señales de proliferación y supervivencia celular, muestran efectos estimuladores de la carcinogénesis mamaria experimental: los tumores aparecen antes, se observa un mayor número de animales afectados, y el contenido y el volumen tumoral es mayor; lo que es compatible con la mayor agresividad histológica de los carcinomas desarrollados (mayor grado histológico y mayor actividad mitótica) y con un fenotipo que se caracteriza por una reacción estromal más prominente, con áreas de necrosis tumoral e inflamación linfoplasmocitaria más frecuentes, y con un patrón predominantemente cribiforme, respecto a una situación de dieta normolipídica. En cambio, las dietas ricas en aceite de oliva virgen extra, probablemente modificando el balance de proliferación/apoptosis a favor de esta última, ejercen un efecto protector o levemente promotor de la carcinogénesis mamaria experimental. Así, se recoge una latencia tumoral parecida a la situación control, pero con algunos parámetros más agresivos (incidencia o contenido tumoral, según el estudio realizado –Artículos 5 y 10), que se corresponde con el aspecto morfológico más indolente respecto a los tumores desarrollados en una situación de dieta rica en aceite de maíz y parecido a los de una situación normolipídica: mayor porcentaje de carcinomas bien diferenciados, nodulares y con presencia de patrón papilar, aunque con mayor actividad mitótica.

En conclusión, los resultados expuestos en todos los trabajos que constituyen esta Tesis Doctoral indican que el efecto estimulador de las dietas hiperlipídicas de aceite de maíz en el cáncer de mama experimental se realiza, fundamentalmente, sobre la promoción de la carcinogénesis y se efectúa, al menos en parte, disminuyendo la diferenciación tumoral y aumentando el estado de proliferación. Estos efectos se observan tanto en los estudios clínicos, como en los morfológicos y moleculares que se presentan. En cambio, las dietas hiperlipídicas de aceite de oliva ejercerían un papel más parecido a la de la dieta control normolipídica en la carcinogénesis experimental y en el estudio morfológico, modulando procesos celulares que conducirían a un control de la promoción tumoral. Estos comportamientos clínicos y morfológicos son compatibles con la influencia que ejercen los lípidos de la dieta en la maduración sexual.

DISCUSIÓN

V – CONCLUSIONES



De acuerdo a los objetivos marcados, las conclusiones de los resultados obtenidos en este trabajo son las siguientes:

a) La caracterización morfológica de las lesiones de mama del modelo experimental inducido con DMBA en la rata ha demostrado la validez de este modelo para el estudio de la carcinogénesis mamaria, desde un punto de vista histopatológico:

- a.1. La aproximación morfológica llevada a cabo en los carcinomas mamarios de la rata ha permitido realizar un análisis comparativo con los tumores de mama humanos. Esta aproximación ha constatado:
 - i- la posibilidad de graduar parámetros relacionados con la diferenciación y agresividad tumoral en los carcinomas de mama experimentales (patrón y grado arquitectural, grado nuclear e histológico total, actividad mitótica, necrosis tumoral, reacción estromal e infiltrado inflamatorio), lo que permite analizar los efectos de un factor externo sobre el fenotipo morfológico de esta neoplasia;
 - ii- la asociación de algunos parámetros (secreción e infiltrado mastocitario) con la diferenciación histológica de los carcinomas de mama experimentales;
 - iii- la existencia de algunas diferencias morfológicas entre ambos sistemas, especialmente arquitecturales (tumores nodulares, con patrón cribiforme y papilar prevalentes, en los adenocarcinomas de mama experimentales).
- a.2. La clasificación propuesta para las lesiones y los tumores mamarios experimentales permite una buena extrapolación y adaptabilidad al sistema humano, con las siguientes apreciaciones:
 - i- se reconocen, en la rata, la mayoría de las patologías observadas en la glándula mamaria humana;
 - ii- se propone el uso genérico del término de adenocarcinoma, para el carcinoma de mama experimental derivado de los TDLUs, añadiendo las características citológicas, arquitecturales y morfológicas complementarias, lo que permite un adecuado diagnóstico descriptivo de estos tumores y evita confusiones con los subtipos histológicos específicos definidos en la patología mamaria humana;
 - iii- los adenocarcinomas de mama experimentales pueden equipararse con el carcinoma invasivo de “tipo no especial” de mama humano.
- a.3. El grado histológico descrito en este trabajo para los adenocarcinomas de mama experimentales, y basado en el Sistema de Scarff-Bloom-Richardson (SBR), se ha demostrado útil para determinar la agresividad morfológica de estos tumores. Las modificaciones introducidas respecto el sistema de SBR –en concreto, en el análisis

del grado arquitectural y en la actividad mitótica, así como en la clasificación del grado histológico total- permiten una mejor distribución de los adenocarcinomas experimentales, en relación al grado histológico, y un estudio similar a lo realizado en patología humana, lo que facilita el análisis comparativo entre ambos sistemas.

b) El estudio del efecto de las dietas ricas en PUFA n-6 (aceite de maíz) y en aceite de oliva virgen extra sobre las características histopatológicas de los carcinomas de mama inducidos con DMBA en la rata ha demostrado que la modulación diferencial de estos lípidos sobre la carcinogénesis mamaria experimental se refleja en la morfología de estos tumores:

b.1. Los adenocarcinomas de mama desarrollados en animales alimentados con una dieta rica en aceite de maíz muestran mayor grado arquitectural, nuclear e histológico total y mayor actividad mitótica, respecto al grupo control alimentado con una dieta normolipídica, así como mayor frecuencia de infiltrado linfoplasmocitario, necrosis tumoral e invasión de tejidos adyacentes y patrón arquitectural cribiforme prevalente, compatible con una mayor agresividad morfológica, más evidente cuando aquella dieta se administra a partir de la inducción de la carcinogénesis.

b.2. Los adenocarcinomas de mama experimentales desarrollados en los grupos de dieta rica en aceite de oliva virgen extra muestran una apariencia histológica más diferenciada, similar a la del grupo control, en la evaluación de algunos parámetros (grado arquitectural, nuclear e histológico total, y el infiltrado linfocitario) y, en la de otros, incluso sugestiva de menor agresividad (patrón arquitectural papilar más prominente y menor reacción desmoplásica y necrosis tumoral). El aumento, no significativo, de la actividad mitótica observada en los carcinomas de mama de este grupo experimental es compatible con un efecto inespecífico atribuible al contenido hipercalórico asociado a una dieta rica en ácidos grasos.

b.3. Los resultados obtenidos en el estudio de algunos parámetros (infiltrado mastocitario y secreción celular) indican un posible efecto de los lípidos de la dieta sobre éstos.

c) El análisis de la influencia de las dietas hiperlipídicas sobre la expresión de p21Ha-Ras, por inmunohistoquímica, en los carcinomas de mama experimentales, no muestra diferencias atribuibles a los lípidos de la dieta:

c.1. No se observan diferencias significativas en la expresión de p21Ha-ras entre los grupos experimentales, lo que sugiere que los lípidos de la dieta modulan la carcinogénesis mamaria sin alterar los niveles de expresión de esta proteína.

- c.2. La expresión de p21Ha-Ras está relacionada con el grado histológico de los adenocarcinomas mamarios experimentales (mayor expresión de la proteína en los carcinomas de bajo grado histológico, tanto en el análisis global de los tumores como en el análisis de los de los animales alimentados con una dieta rica en aceite de maíz). La pérdida de esta relación, por efecto de una dieta rica en aceite de oliva virgen extra, es compatible con el papel atribuible al aceite de oliva sobre la actividad de p21Ha-Ras.
- d) **La aplicación del análisis morfológico propuesto para los tumores experimentales de mama en diversos estudios realizados por el grupo investigador ha permitido constatar que el fenotipo histológico de los carcinomas de mama experimentales traduce los efectos diferenciales de la modulación de los lípidos de la dieta sobre las características clínicas y moleculares de esta neoplasia:**
- d.1. El efecto modulador negativo de la carcinogénesis mamaria observado con la dieta rica en aceite de oliva virgen extra, que confiere un comportamiento clínico más indolente, se asocia a una menor agresividad morfológica en los tumores desarrollados, en comparación con una dieta rica en aceite de maíz que actúa como un promotor tumoral y cuyos carcinomas exhiben mayor malignidad histológica. Además, esta modulación negativa puede revertir el efecto promotor de una dieta rica en aceite de maíz, administrada previamente a la dieta rica en aceite de oliva.
- d.2. La expresión diferencial de genes relacionados con diferenciación y proliferación celular en los carcinomas de mama experimentales, por efecto de los lípidos de la dieta, se correlaciona con el grado de diferenciación y agresividad morfológica de estos tumores. En este sentido, se constata:
- i- una expresión disminuida de PCPH y una infrarregulación de los genes de *globulina α -2u de la glándula submaxilar*, *VDUP1*, *H19* y *EST-Rn.32385* en los tumores mamarios de animales alimentados con una dieta rica en aceite de maíz, en relación al grupo control y al rico en aceite de oliva, lo que se correlaciona con el fenotipo morfológico más maligno de los primeros;
 - ii- una menor traducción de IGF2, por efecto de una dieta rica en aceite de oliva, compatible con la morfología menos agresiva de los carcinomas de este grupo experimental;
 - iii- una alteración de la expresión correlativa inversa entre *H19* y *IGF2* por las dietas hiperlipídicas, sin afectar la expresión ni la actividad de la TRX, en el cáncer de mama experimental.

- d.3. El estudio de los cambios en la maduración sexual de las ratas inducidos por los lípidos de la dieta muestra una aceleración de la maduración sexual por efecto de una dieta rica en aceite de maíz (apertura vaginal en edades más tempranas, mayor número de cuerpos lúteos ováricos y menor porcentaje de muestras de endometrio inactivo, y expresión más elevada de KiSS1), lo que se correlaciona con su efecto promotor de la carcinogénesis mamaria. La anticipación de la pubertad, menos evidente y probablemente a través de vías diferentes, observada en los animales alimentados con una dieta rica en aceite de oliva se correlaciona con el efecto levemente promotor evidenciado. La mayor actividad mitótica en los tumores mamarios y los mayores niveles de ER β 2 en la glándula mamaria descritos en el grupo experimental de dieta rica en aceite de maíz son compatibles con el papel de esta dieta en la proliferación celular. Finalmente, la dieta rica en aceite de maíz induce una menor diferenciación de la glándula mamaria, especialmente en edades avanzadas.
- e) **La integración de los resultados del análisis morfológico de los tumores mamarios experimentales en el estudio de los mecanismos de los efectos de los lípidos de la dieta en el cáncer de mama se correlaciona adecuadamente con los resultados clínicos, moleculares y biológicos.** En este sentido, se reconoce un efecto promotor de las dietas ricas en aceite de maíz y un efecto modulador negativo o muy levemente promotor del aceite de oliva virgen extra a través de múltiples y complejos mecanismos que afectan, entre otros y principalmente, a la expresión génica, la vía de transducción de señales y la estructura y la función de las membranas celulares, lo que se traduce en una mayor agresividad y menor diferenciación morfológica en los tumores del primer grupo, respecto al segundo.

VI – BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

NOTA:

El número de las referencias se corresponde con el que posee cada una de ellas en la base de datos del “Grup Multidisciplinari per a l’Estudi del Càncer de Mama”, donde se encuentran informatizadas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- [113] ESCRICH E, PRATS M, FERRER M, CASAMITJANA R, GAYA JM and RIVERA F. Determinación de receptores estrogénicos en patología mamaria humana: aspectos técnicos y su significado clínico. *Pharmatherapeutica* 1980, 2:S102-S107.
- [439] HUGGINS C, GRAND LC, BRILLANTES FP. Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons, and its suppression. *Nature* 1961, 189:204-207.
- [443] HUGGINS C, MORII S, GRAND LC. Mammary cancer induced by a single dose of polynuclear hydrocarbons: routes of administration. *Ann. Surg.* 1961, 154:315-318.
- [446] PECKHAM JC. Experimental oncology. En "The Laboratory Rat. Vol. II, Research Applications", HJ BAKER, JR LINDSEY, SH WEISBROTH, Academic Press, New York 1980, 119-147.
- [447] ALTMAN NH and GOODMAN DG. Neoplastic diseases. En "The Laboratory Rat. Vol. I. Biology and Diseases", HJ BAKER, JR LINDSEY, SH WEISBROTH, Academic Press, New York 1979, 333-376.
- [453] ROSEN JM, RICHARDS DA, GUYETTE W and MATUSIK RJ. Steroid-hormone modulation of prolactin action in the rat mammary gland. En "Gene Regulation by Steroid Hormones", AK ROY, JH CLARK, Springer-Verlag, New York Inc, 1980, 58-77.
- [460] HILF R. Relaciones dosis-tiempo en el efecto de los estrógenos sobre el cáncer mamario. En "Revisiónes Cáncer Endocrino-Dependiente", BA STOLL, 1979, 11-16.
- [467] VIGNON F and ROCHEFORT H. Régulation des "récepteurs" des oestrogenes dans les tumeurs mammaires: effet de la prolactine "in vivo". *C. R. Acad. Sci. Paris* 1974, 278:103-106.
- [468] VIGNON F and ROCHEFORT H. Regulation of estrogen receptors in ovarian-dependent rat mammary tumors. I. Effects of castration and prolactin. *Endocrinology* 1976, 98:722-729.
- [470] SASAKI GH and LEUNG BS. On the mechanism of hormone action in 7,12 dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor. *Cancer* 1975, 35:645- 651.
- [472] NAGASAWA H, YANAI R, TANIGUCHI H. Importance of mammary gland DNA synthesis on carcinogen-induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Res.* 1976, 36:2223-2226.
- [475] SMITH RD, HILF R, SENIOR AE. Prolactin binding to mammary gland, 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene-induced mammary tumors, and liver in rats. *Cancer Res.* 1976, 36:3726-3731.
- [490] HSUEH AJ, PECK EJ JR, CLARK JH. Control of uterine estrogen receptor levels by progesterone. *Endocrinology* 1976, 98:438-444.
- [493] TSENG L, GURPIDE E. Effects of progestins on estradiol receptor levels in human endometrium. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 1975, 41:402-404.
- [494] MILGROM E, THI L, ATGER M and BAULIEU EE. Mechanisms regulating the concentration and the conformation of progesterone receptor(s) in the uterus. *J. Biol. Chem.* 1973, 248:6366-6374.
- [571] SUKUMAR S, NOTARIO C, MARTIN-ZANCA D, BARBACID M. Induction of mammary carcinomas in rat by nitroso-methylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. *Nature* 1983, 306:658-661.
- [583] DELOUIS C. Histopathologie du sein: rôle des hormones dans l'élaboration de la maturation du tissu mammaire. En "Récepteurs hormonaux et pathologie mammaire", PM MARTIN, Medsi, Paris, 1980, 11-12.
- [585] SADLER WT. Sistema tegumentario: glándulas mamarias. En "Embriología médica", J LANGMAN, Editorial Médica Panamericana, México, 1987, 332-334.
- [586] NETTER FH. Anatomía y patología de la glándula mamaria. En "Sistema reproductor", tomo II, Colección Ciba de ilustraciones médicas, Salvat, 1982, 243-263.
- [603] McMAHON B, COLE P and BROWN J. Etiology of human breast cancer: a review. *J Nat Cancer Inst.* 1973, 50:21-42.
- [683] MEITES J. Relation of prolactin and estrogen to mammary tumorigenesis in the rat. *J. Nat. Cancer Inst.* 1972, 48:1217-1224.
- [798] ESCRICH E. Efecto de un derivado androgénico sobre la inducción y el crecimiento de tumores mamaros experimentales. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA, 1985.
- [807] WETSEL W C, RUTLEDGE A, ROGERS AE. Dietary corn oil does not alter plasma prolactin in rats. *Federation Proc.* 1983, 42:526.
- [824] DESLYPERE JP, VERDONCK MA, VERMEULEN A. Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism. *J. Clin. Endocr. Metab.* 1985, 61:564-570.
- [860] ARMSTRONG BK, McMICHAEL AJ, MacLENNAN R. Diet. En "Cancer Epidemiology and Prevention", D SCHOTTENFELD, JF FRAUMENI Jr, WB Saunders Company, Philadelphia, 1982, 419-432.

BIBLIOGRAFÍA

- [861] PETRAKIS NL, ERNSTER VL, KING MC. Breast. En "Cancer Epidemiology and Prevention", D SCHOTTENFELD, JF FRAUMENI Jr, WB Saunders Company, Philadelphia, 1982, 855-870.
- [868] CARROLL KK and KHOR HT. Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Prog. Biochem. Pharmacol.* 1975, 10: 308-353.
- [884] LONDON RS, MURPHY L, KITLOWSKI KE. Hypothesis: breast cancer prevention by supplemental vitamin E. *J. Am. Coll. Nutr.* 1985, 4:559-564.
- [891] WELSCH CW, DEHOOG JV, O'CONNOR DH, SHEFFIELD LG. Influence of dietary fat levels on development and hormone responsiveness of the mouse mammary gland. *Cancer Res.* 1985, 45:6147.
- [905] SUBCOMMITTEE ON LABORATORY ANIMAL NUTRITION, COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION, BOARD ON AGRICULTURE AND RENEWABLE RESOURCES, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of laboratory animals. En "Nutrient Requirements of Domestic Animals", NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, Washington, DC, 1978, 6-35.
- [906] HATHWAY DE. Mechanisms of chemical carcinogenesis. BUTTERWORTHS, University Press, Cambridge, 1986.
- [918] WELSCH CW and AYLSWORTH CF. Enhancement of murine mammary tumorigenesis by feeding high levels of dietary fat: a hormonal mechanism? *J. Natl. Cancer Inst.* 1983, 70:215-221.
- [920] KRITCHEVSKI D, WEBER MM, KLURFELD DM. Dietary fat versus caloric content in initiation and promotion of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* 1984, 44:3174-3177.
- [921] HILLYARD LA and ABRAHAM S. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on growth of mammary adenocarcinomas in mice and rats. *Cancer Res.* 1979, 39:4430-4437.
- [922] CARROLL KK. Neutral fats and cancer. *Cancer Res.* 1981, 41:3695-3699.
- [934] SYLVESTER PW, RUSELL M, IP M, IP C. Comparative effects of different animal and vegetable fats fed before and during carcinogen administration on mammary tumorigenesis, sexual maturation, and endocrine function in rats. *Cancer Res.* 1986, 46:757-762.
- [943] KING MM, McCAY PB, RUSSO IH. Dietary fat may influence DMBA-initiated mammary gland carcinogenesis by modification of mammary gland development. En "Diet, Nutrition, and Cancer: From Basic Research to Policy Implications", ALAN R LISS Inc, New York, 1983, 61-90.
- [966] GHOSH AK, MOORE M, HARRIS M. Immunohistochemical detection of ras oncogene p21 product in benign and malignant tissue in man. *J. Clin. Pathol.* 1986, 39:428-434.
- [976] MARTIN ME, VRANCKX R, BENASSAYAG C, NUNEZ EA. Modifications of the properties of human sex steroid-binding protein by nonesterified fatty acids. *J. Biol. Chem.* 1986, 261:2954-2959.
- [995] RUSSO J, SABY J, ISENBERG WM, RUSSO IH. Pathogenesis of mammary carcinomas induced in rats by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *J. Natl. Cancer Inst.* 1977, 59:435-445.
- [1029] NEMOTO N. Marked activation of benzo(a)pyrene to protein-binding forms in the presence of unsaturated fatty acids and heme-compounds. *Carcinogenesis* 1986, 7:267-271.
- [1030] HOUDEBINE LM. Contrôle hormonal du développement et de l'activité de la glande mammaire. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 1986, 26:523-541.
- [1046] IP C and IP MM. Serum estrogens and estrogen responsiveness in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors as influenced by dietary fat. *J. Natl. Cancer Inst.* 1981, 66:291-295.
- [1047] CAVE WT Jr and JURKOWSKI JJ. Dietary lipid effects on the growth membrane composition, and prolactin-binding capacity of rat mammary tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 1984, 73:185-191.
- [1077] COHEN LA. Mechanisms by which dietary fat may stimulate mammary carcinogenesis in experimental animals. *Cancer Res.* 1981, 41:3808-3810.
- [1093] COHEN LA, CHOI K, NUMOTO S, REDDY S, BERKE B, WEISBURGER JH. Inhibition of chemically induced mammary carcinogenesis in rats by long-term exposure to butylated hydroxytoluene (BHT): interrelations among BHT concentration, carcinogen dose and diet. *J. Natl. Cancer Inst.* 1986, 76:721-729.
- [1105] ROGERS AE, CONNER B, BOULANGER C, LEE S. Mammary tumorigenesis in rats fed diets high in lard. *Lipids* 21:86.
- [1106] COHEN LA, THOMPSON DO, MAEURA Y, CHOI K, BLANK ME, ROSE DP. Dietary fat and mammary cancer. I- Promoting effects of different dietary fats on N-Nitrosomethylurea- induced rat mammary tumorigenesis. *J.N.C.I.* 1986, 1:33-42.
- [1107] COHEN LA, THOMPSON DO, CHOI K, KARMALI RA, ROSE DP. Dietary fat and mammary cancer: II- Modulation of serum and tumor lipid composition and tumor prostaglandins by different dietary fats: association with tumor incidence patterns. *J. Natl. Cancer Inst.* 1986, 77:43-51.

BIBLIOGRAFÍA

- [1110] MAUVAIS-JARVIS P, KUTTENN F, GOMPEL A, MALET C and FOURNIER S. Interaction estradiol-progestérone au niveau des cellules mammaires humaines normales et pathologiques. *Ann. Endocrinol.-Paris* 1986, 47:179-187.
- [1141] YOUNG S and HALLOWES RC. Tumours of the mammary gland. En "Pathology of Tumour in Laboratory Animals", Vol. I, Tumours of the rat. Part 1, 1973. TUROSOV, Lyon IARC, 31-74.
- [1299] ESCRICH E. Mammary cancer model induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene: a good experimental tool for the study of tumour markers. *Int. J. Biol. Markers*, 1987, 2:109-119.
- [1347] GIDWITZ S, PESSIN JE, WEBER MJ, GLASER M, STORM DR. Effect of membrane phospholipid composition changes on adenylate cyclase activity in normal and rous-sarcoma-transformed chicken embryo fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1980, 628:263-276.
- [1355] WELSCH CW. Enhancement of mammary tumorigenesis by dietary fat: review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 1987, 45:192-202.
- [1358] IP C. Fat and essential fatty acid in mammary carcinogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* 1987, 45:S218-S224.
- [1383] SOLOMONSON LP, LIEPKALNS VA, SPECTOR AA. Changes in (Na+K+)-ATPase activity of Ehrlich Ascites tumor cells produced by alteration of membrane fatty acid composition. *Biochemistry* 1976, 15:892-897.
- [1387] Pathology of Laboratory Animals. Vol. I. K BENIRSCHKE, FM GARNER, TC JONES, Springer-Verlag, 1978.
- [1390] Pathology of Laboratory Animals. Vol. II. K BENIRSCHKE, FM GARNER, TC JONES, Springer-Verlag, 1978.
- [1425] DIPPLE A, MICHEJDA CJ, WEISBURGER EK. Metabolism of chemical carcinogens. En "Mechanism of Cellular Transformation by Carcinogenic Agents", D GRUNBERGER, S GOFF, Pergamon Press 1987, 1-32.
- [1438] ESCRICH E. Validity of the DMBA-induced mammary cancer model for the study of human breast cancer. *Int. J. Biol. Markers* 1987, 2:197-206.
- [1442] WYNDER EL and HILL P. Prolactin, oestrogen, and lipids in breast fluid. *Lancet* 1977, 2:840-842.
- [1449] ZHANG L, BIRD RP, BRUCE WR. Proliferative activity of murine mammary epithelium as affected by dietary fat and calcium. *Cancer Res.* 1987, 47:4905-4908.
- [1467] FROMOWITZ FB, VIOLA MV, CHAO S, ORAVEZ S, MISHRIKI Y, FINKEL G, GRIMSON R, LUNDY J. ras p21 expression in the progression of breast cancer. *Hum. Pathol.* 1987, 18:1268:1275.
- [1486] IP C, IP M, SYLVESTER PW. Relevance of trans fatty acids and fish oil in animal tumorigenesis studies. En "Dietary Fat and Cancer", ALAN R LISS Inc, New York 1986, 283-294.
- [1489] AYLSWORTH CF, WELSCH CW, KABARA JJ, TROSKO JE. Effects of fatty acids on gap junctional communication: possible role in tumor promotion by dietary fat. *Lipids* 1987, 22:445-454.
- [1518] SPECTOR AA and BURNS CP. Biological and therapeutic potential of membrane lipid modification in tumors. *Cancer Res.* 1987, 47:4529-4537.
- [1520] RUSSO J and RUSSO IH. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab. Invest.* 1987, 57:112-137.
- [1524] RUSSO J, TAY LK, CIOCCA DR, RUSSO IH. Molecular and cellular basis of the mammary gland susceptibility to carcinogenesis. *Environ. Health Persp.* 1983, 49:185-199.
- [1560] LOMEIO F, KHOKHER MA, DANDONA P. Unsaturated fatty acids potentiate insulin action on adipocytes. *Prog. Lipid Res.* 1986, 25:511-513.
- [1572] SAINSBURY JRC, FARNDON JR, SHERBET GV and HARRIS AL. Epidermal-growth-factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. *Lancet* 1985, 1:364-366.
- [1576] GELMANN P and LIPPMAN ME. Understanding the role of oncogenes in human breast cancer. En "Growth factors and oncogenes in breast cancer", M SLUYSER, Weinheim-New York, Ellis Horwood series in biomedicine, 1987, 29-43.
- [1585] SPORN MB and TODARO GJ. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N. Engl. J. Med.*, 1980, 303:878-880.
- [1659] SCHOTTENFELD D and FRAUMENI JF. *Cancer Epidemiology and Prevention*, W B Saunders Company, Philadelphia, 1982.
- [1660] ARMSTRONG B and DOLL R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries with special reference to dietary practices. *Int. J. Cancer* 1975, 15:617-631.
- [1663] TANNENBAUM A. The genesis and growth of tumors. III Effects of a high fat diet. *Cancer Res.* 1942, 2:468-475.

BIBLIOGRAFÍA

- [1666] HILL MJ, GODDARD P, WILLIAMS REO. Gut bacteria and aetiology of cancer of the breast. *Lancet* 1971, 2:472-473.
- [1669] CORMIER EM, WOLF MF and JORDAN VC. Decrease in estradiol-stimulated progesterone receptor production in MCF-7 cells by epidermal growth factor and possible clinical implication for paracrine-regulated breast cancer growth. *Cancer Res.*, 1989, 49:576-589.
- [1678] ESCRICH E. Lípidos de la dieta y cáncer de mama. Tesis doctoral, Barcelona, 1990.
- [1700] ROGERS AE and LONGNECKER MP. Biology of disease. Dietary and nutritional influences on cancer: a review of epidemiologic and environmental data. *Lab. Invest.* 1988, 59:729-759.
- [1718] RUSSO IH, KOSZALKA M and RUSSO J. Human chorionic gonadotropin and rat mammary cancer prevention. *J. Natl. Cancer I.*, 1990, 82: 1286-1289.
- [1781] SUKUMAR S. An experimental analysis of cancer: role of ras oncogenes in multistep carcinogenesis. *Cancer Cells* 1990, 2:199-204.
- [1808] KUMAR R, MEDINA D, SUKUMAR S. Activation of H-ras oncogenes in preneoplastic mouse mammary tissues. *Oncogene*, 1990, 5:1271-1277.
- [1809] ZARLB H, SUKUMAR S, ARTHUR AV, MARTIN-ZANCA D, BARBACID M. Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. *Nature* 1985, 315:382-385.
- [1829] ESCRICH E and SEGURA R. Factores de la dieta y cáncer de mama. *Rev. Senología y Patol. Mam.* 1991, 4:86-96.
- [1854] FERNANDES G and VENKATRAMAN JT. Modulation of breast cancer growth in nude mice by n-3 lipids. *World Rev. Nutr. Diet.* 1991, 66:488-503.
- [1870] SUNDERLAND MC and McGUIRE WL. Hormones and breast cancer. *Trends Endocrin. Met.* 1991, 2:72-76.
- [1881] CANTLEY LC, AUGER KR, CARPENTER C, DUCKWORTH B, GRAZIANI A, KAPPELLER R, SOLTOFF S. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991, 64:281-302.
- [1905] O'BRIEN SJ, NASH WG, GOODWIN JL, LOWY DR, CHANG EH. Disprison of the ras family of transforming genes to four different chromosomes in man. *Nature* 1983, 302:839-842.
- [1918] DISTEL RJ, ROBINSON GS, SPIEGELMAN BM. Fatty acid regulation of gene expression. *J. Biol. Chem.* 1992, 267:5937-5941.
- [1919] TIWARI RK, MUKHOPADHYAYB, TELANG NT, OSBORNE MP. Modulation of gene expression by selected fatty acids in human breast cancer cells. *Anticancer Res.* 1991, 11:1383-1388.
- [1937] RONAI Z, LAU Y, COHEN LA. Dietary n-3 fatty acids do not affect induction of Ha-ras mutations in mammary glands of NMU-treated rats. *Mol. Carcinogen.* 1991, 4:120-128.
- [1940] LESTER DS. In vitro linoleic acid activation of protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta* 1990, 1054: 297-303.
- [1942] BIRT DF, KRIS ES, CHOE M, PELLING JC. Dietary energy and fat effects on tumor promotion. *Cancer Res.* 1992, 52:2035s-2039s.
- [1943] WELSCH CW. Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: a review and critique. *Cancer Res.* 1992, 52:2040s-2048s.
- [1948] VAN DE VIJVER MJ and NUSSE R. The molecular biology of breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1991, 1072:33-50.
- [1955] LOWY DR, ZHANG KE, DECLUE JE, WILLUMSEN BM. Regulation of p21ras activity. *Trends Genet.* 1991, 7:346-351.
- [1959] CAVE WT. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid effects on animal tumorigenesis. *FASEB J.* 1991, 5:2160-2166.
- [1962] FREEDMAN LS, CLIFFORD C, MESSINA M. Analysis of dietary fat, calories, body weight, and the development of mammary tumors in rats and mice: a review. *Cancer Res.* 1990, 50:5710-5719.
- [1973] BOTWELL RK. Opportunities for nutritional scientists in cancer prevention. En "Mutagens and carcinogens in the diet". Wiley-Liss, Inc., 1990, 269-284.
- [1975] HUNTER T. Cooperation between oncogenes. *Cell* 1991, 64:249-270.
- [2009] STUBBS CD and SMITH AD. Essential fatty acids in membrane: physical properties and function. *Biochem. Soc. Trans.* 1990, 18:779-781.
- [2027] ELLIS RW, DEFEO F, FURTH ME, SCOLNICK EM. Mouse cells contain two distinct ras gene mRNA species that can be translated into a p21 onc protein. *Mol. Cell. Biol.* 1982, 2:1339-1345.

BIBLIOGRAFÍA

- [2045] CARROLL KK. Dietary fat and breast cancer. *Lipids* 1992, 27:793-797.
- [2050] WEBER PC. n-3 fatty acids and human disease. *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* 1990, 50:14-19.
- [2054] CHOE M, KRIS ES, LUTHRA R, COPENHAVER J, PELLING JC, DONNELLY TE, BIRT DF. Protein kinase C is activated and diacylglycerol is elevated in epidermal cells from Sencar mice fed high fat diets. *J Nutr.* 1992, 122:2322-2329.
- [2085] DEVRIES CEE and VANNOORDEN CJF. Effects of dietary fatty acid composition on tumor growth and metastasis. *Anticancer Res.* 1992, 12:1513-1522.
- [2137] SUMIDA C, GRABER R, NUNEZ E. Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostag. Leukotr. Ess.* 1993, 48:117-122.
- [2206] PANSINI F, BONACCORSI G, GENOVESI F, FOLEGATTI MR, BAGNI B, BERGAMINI CM, MOLLICA G. Influence of estrogens on serum free fatty acid levels in women. *J. Clin. Endocr. Metab.* 1990, 71:1387-1389.
- [2226] HSIEH C, GOLDMAN M, PAVIA M, EKBOM A, PETRIDOU E, ADAMI H, TRICHOPOULOUS D. Breast cancer risk in mothers of multiple births. *Int. J. Cancer* 1993, 54:81-84.
- [2227] HIMENO Y, ENGELMAN RW, GOOD RA. Influence of calorie restriction on oncogene expression and DNA synthesis during liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89:5497-5501.
- [2242] WHITTEMORE AS, HENDERSON BE. Dietary fat and breast cancer: where are we. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1993, 85:762-763.
- [2245] NAKAYAMA M, RAN JU H, SUGANO M, HIROSE N, UEKI T, DOI F, EYNARD AR. Effect of dietary fat and cholesterol on dimethylbenz(α)-anthracene-induced mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats. *Anticancer Res.* 1993, 13:691-698.
- [2260] HAEFFNER EW. Diacylglycerol: formation and function in phospholipid-mediated signal transduction. *Comp. Biochem. Physiol.* 1993, 105C:337-345.
- [2264] CLANDININ MT, CHEEMA S, FIELD CJ, GARG ML, VENKATRAMAN J, CLANDININ TR. Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J.* 1991, 5:2761-2768.
- [2265] MIZUKAMI Y, NONOMURA A, NOGUCHI M, TANIYA T, THOMAS MA, NAKAMURA S, MIYAZAKI I. Effects of high and low dietary fat and indomethacin on tumour growth, hormone receptor status and growth factor expression in DMBA-induced rat breast cancer. *Int. J. Tissue React.* 1992, 14:269-276.
- [2272] TILLOTSON JK, DARZYNKIEWICZ Z, COHEN LA, RONAI Z. Effects of linoleic acid on mammary tumor cell proliferation are associated with changes in p53 protein expression. *Int. J. Oncol.* 1993, 3:81-87.
- [2276] MERRILL AH and SCHROEDER JJ. Lipid modulation of cell function. *Annu. Rev. Nutr.* 1993, 13:539-559.
- [2289] ROSE DP, HATALA MA, CONNOLLY JM, RAYBURN J. Effect of diets containing different levels of linoleic acid on human breast cancer growth and lung metastasis in nude mice. *Cancer Res.* 1993, 53:4686-4690.
- [2349] SCHUCHARD M, LANDERS JP, PUNKAY SANDHU N, SPELSBERG TC. Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocr. Rev.* 1993, 14:659-669.
- [2363] HOWELL A, De FRIEND D, ANDERSON E. Mecanismos de respuesta y resistencia a la terapia endocrina en el cáncer de mama y desarrollo de nuevos tratamientos. En "Revisiones: Cáncer Endocrino-Dependiente", VHT JAMES, The Journal of Endocrinology Ltd, 1993, 43:7-26.
- [2388] SINGER B and KUSMIEREK JT. Chemical mutagenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 1982, 52:655-693.
- [2389] LOWY DR. Function and regulation of Ras. *Annu. Rev. Biochem.* 1993, 62:851-891.
- [2390] BARBACID M. Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* 1987, 56:779-827.
- [2393] RUSSO J, CALAF G, SOHI N, TAHIN Q, ZHANG PL, ALVARADO ME, ESTRADA S and RUSSO IH. Critical steps in breast carcinogenesis. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1993, 698:1-20.
- [2394] COHEN JB and LEVINSON AD. A point mutation in the last intron responsible for increased expression and transforming activity of the c-Ha-ras oncogene. *Nature* 1988, 334:119-124.
- [2397] FUJITA J, SRIVASTAVA SK, KRAUS MH, RHIM JS, TRONICK SR, AARONSON SA. Frequency of molecular alterations affecting ras protooncogenes in human urinary tract tumors. *PNAS* 1985, 82:3849-3853.
- [2398] YOKOTA J, TSUNETSUGU-YOKOTA Y, BATTIFORA H, LE FEVRE C, CLINE MJ. Alterations of myc, myb and rasHa proto-oncogenes in cancers are frequent and show clinical correlation. *Science* 1986, 231:261-265.
- [2399] BOS JL, VERLAAN-DE VRIES M, MARSHALL CJ, VEENEMAN GH, VAN BOOM JH, VAN DER EB AJ. A human gastric carcinoma contains a single mutated and a amplified normal allele of the ki-ras oncogene. *Nucl. and Res.* 1986, 14:1209-1217.

BIBLIOGRAFÍA

- [2400] WITTINGHOFFER A, FRANKEN SM, SCHEIDIG AJ, LAUTWEIN A, PAI EF, GOODY RS. Three-dimensional structure and properties of wild-type and mutant H-ras-encoded p21. In "the GTPase superfamily". Ciba Foundation Symposium 176, John Wiley & Sons, 1993, 6-27.
- [2402] KHOSRAVI-FAR R and DER CJ. The Ras signal transduction pathway. *Cancer Metast. Rev.* 1994, 13:67-89.
- [2406] RUSSO IH and RUSSO J. Role of hCG and inhibin in breast cancer. *Int. J. Oncol.* 1994, 4:297-306.
- [2415] CLARKE SD and JUMP DB. Regulation of gene transcription by polyunsaturated fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 1993, 32:139-149.
- [2419] HOWE GR, HIROMATA T, HISLOP TG *et al.* Dietary factors and risk of breast cancer: combined analysis of 12 case-control studies. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990, 82:561-569.
- [2421] ZEILLINGER E, KURY F, SPEISER P, SLIUTZ G, CZERWENKA K and KUBISTA E. EGF-R and steroid receptors in breast cancer: a comparison with tumor grading, tumor size, lymph node involvement, and age. *Clin. Biochem.* 1993, 26:221-227.
- [2422] CLARKE SD. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu. Rev. Nutr.* 1994, 14:83-98.
- [2427] HONKAWA H, MASAHASHI W, HASHIMOTO S, HASHIMOTO-GOTOH T. Identification of the principal promoter sequence of the c-Ha-ras transforming oncogene: deletion analysis of the 5'-flanking region by focus formation assay. *Mol. Cell. Biol.* 1987, 7:2933-2940.
- [2428] KLIJN JGM, BERNIS PMJJ, BONTENBAL M and FOEKENS JA. Growth factors. Clinical implications in breast cancer. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1993, 698:85-101.
- [2430] GRABER R, SUMIDA CH, NUNEZ EA. Fatty acids and cell signal transduction. *J. Lipid Med. Cell Sign.* 1994, 9:91-116.
- [2439] GONOS ES and SPANDIDOS DA. Oncogenes in cellular immortalisation and differentiation. *Anticancer Res.* 1993, 13:1117-1122.
- [2444] BIÈCHE I, CHAMPÈME MH, LIDEREAU R. A tumor suppressor gene on chromosome 1p32-pter controls the amplification of MYC family genes in breast cancer. *Cancer Res.* 1994, 54:4274-4276.
- [2475] THEILLET C, LIDERAU R, ESCOT C, HUTZELL P, BRUNET M, GEST J, SCHLOM J, CALLAHAN R. Loss of a c-Ha-ras-1 allele and aggressive human primary breast carcinomas. *Cancer Res.* 1986, 46:4776-4781.
- [2493] HARTWELL L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 1992, 71:543-546.
- [2494] BAIK M, CHOI CB, KELLER WL, PARK CS. Development stages and energy restriction affect cellular oncogene expression in tissues of female rats. *J. Nutr.* 1992, 122:1614-1620.
- [2501] MUELLER H, LOOP P, LIU R, WOSIKOWSKI K, KUENG W and EPPENBERGER U. Differential signal transduction of epidermal-growth-factor receptors in hormone-dependent and hormone-independent human breast cancer cells. *Eur. J. Biochem.* 1994, 221:631-637.
- [2522] MIKI Y, SWENSEN J, SHATTUCK-EIDENS D, HARSHMAN K, TAVTIGIAN S, LIU Q, COCHRAN C, BENNETT LM, DING W *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994, 266:66-71.
- [2541] JUMP DB, VEIT A, SANTIAGO V, LEPAR G, HERBERHOLZ L. Transcriptional activation of the rat liver S14 gene during postnatal development. *J. Biol. Chem.* 1988, 263:7254-7260.
- [2542] CLARKE SD and ABRAHAM S. Gene expression: nutrient control of pre- and post-transcriptional events. *FASEB J.* 1992, 6:3146-3152.
- [2543] CLARKE SD, ARMSTRONG MK, JUMP DB. Nutritional control of rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA abundance. *J. Nutr.* 1990, 120:218-224.
- [2545] BLAKE WL and CLARKE SD. Suppression of rat hepatic fatty acid synthase and S14 gene transcription by dietary polyunsaturated fat. *J. Nutr.* 1990, 12:1727-1729.
- [2546] ARMSTRONG MK, BLAKE WL, CLARKE SD. Arachidonic acid suppression of fatty acid synthase gene expression in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, 177:1056-1061.
- [2547] JUMP DB, CLARKE SD, MacDOUGALD O, THELEN A. Polyunsaturated fatty acids inhibit S14 gene transcription in rat liver and cultured hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90:8454-8458.
- [2548] RICKETTS J and BRANNON PM. Amount and type of dietary fat regulate pancreatic lipase gene expression in rats. *J. Nutr.* 1994, 124:1166-1171.
- [2549] KIM KH and TAE HJ. Pattern and regulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression. *J. Nutr.* 1994, 124:1273S-1283S.

BIBLIOGRAFÍA

- [2551] KAHN BB. Dietary regulation of glucose transporter gene expression: tissue specific effects in adipose cells and muscle. *J. Nutr.* 1994, 124:1289S-1295S.
- [2556] DIVECHA N and IRVINE RF. Phospholipid signaling. *Cell* 1995, 80:269-278.
- [2567] ESCRICH E, SOLANAS M and SEGURA R. Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: I-diet definition. *Int. J. in vivo Res.* 1994, 8:1099-1106.
- [2568] ESCRICH E, SOLANAS M, RUIZ DE VILLA M, RIBALTA T, MUNTANE J and SEGURA R. Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: II-suitability of the diets. *Int. J. in vivo Res.* 1994, 8:1107-1112.
- [2571] SEKIMIZU K. Interactions between DNA replication-related proteins and phospholipid vesicles in vitro. *Chem. Phys. Lipids* 1994, 73:223-230.
- [2572] KINNUNEN PKJ, JUKKA AK, LEHTONEN JYA, RYTOMAA MA, MUSTONEN P. Lipid dynamics and peripheral interactions of proteins with membrane surface. *Chem. Phys. Lipids* 1994, 73:181-207.
- [2586] WOOSTER R, STRATTON MR. Breast cancer susceptibility: a complex disease unravels. *Trends Genet.* 1995, 11:3-5.
- [2602] PERONA R. Regulación de la apoptosis y su papel en la terapia antitumoral. *Oncología* 1995, 18:47-52.
- [2606] SAGER R. Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science* 1989, 246(4936):1406-1412.
- [2608] HUNTER DJ, WILLET WC. Diet, body build, and breast cancer. *Annu. Rev. Nutr.* 1994, 14:393-418.
- [2612] BURN P. Amphitropic proteins: a new class of membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* 1988, 13:79-83.
- [2613] NIGGLI V and BURGER MM. Interaction of the cytoskeleton with the plasma membrane. *J. Membrane Biol.* 1987, 100:97-121.
- [2614] GRIMARD R, TANCREDE P, GICQUARD C. Interaction of actin with positively charged phospholipids: a monolayer study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, 190:1017-1022.
- [2617] LANDSCHULTZ KT, KAESTNER KH, LANE MD. Regulation of mouse liver stearyl-CoA desaturase gene expression by dietary carbohydrate and fat. *FASEB J.* 1991, 5:A1649.
- [2618] KARMALI RA, CHAO CC, BSAU A, MODAK M. Effect of n-3 and n-6 fatty acids on mammary H-ras expression and PGE2 levels in DMBA-treated rats. *Anticancer Res.* 1989, 9:1169-1174.
- [2626] CHIEN CH and CHOW SN. Point mutation of the ras oncogene in human ovarian cancer. *DNA Cell Biol.* 1993, 12:623-627.
- [2627] CICHUTEK K and DUESBERG PH. Harvey ras genes transform without mutant codons, apparently activated by truncation of a 5' exon (exon -1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986, 83:2340-2344
- [2630] HASLAM SZ, COUNTERMAN LJ and NUMMY KA. Effects of epidermal growth factor, estrogen and progesterin on DNA synthesis in mammary cells in vivo are determined by the development state of the gland. *J. Cell Physiol.* 1993, 155:72-78.
- [2631] BIRKENFELD A and KASE NG. Functional anatomy and physiology of the female breast. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* 1994, 21:433-44.
- [2632] KELLER-WOOD M and BLAND KI. Breast physiology in normal, lactating and diseased states. En "The Breast. Comprehensive Managements of Benign and Malignant Diseases". BLAND KI and COPELAND EM 1991, 36-40.
- [2633] IMAGAWA W, YANG J, GUZMAN R and NANDI S. Control of mammary gland development. En "The Physiology of Reproduction", E KNOBIL, JD NEIL, Raven Press, Ltd., New York, 1994, 1033-1063.
- [2634] TUCKER HA. Lactation and its hormonal control. En "The Physiology of Reproduction", E KNOBIL, JD NEIL, Raven Press, Ltd., New York, 1994, 1065-1098.
- [2636] YEN SSC. Prolactina en la reproducción humana. En "Endocrinología de la Reproducción". YEN SCC and JAFFE RB, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1993, 382-413.
- [2637] CATT KJ and DUFAU ML. Hormonas gonadotróficas: biosíntesis, secreción, receptores y acciones. En "Endocrinología de la Reproducción". YEN SCC and JAFFE RB, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1993, 126-77.
- [2638] YEN SCC. Ciclo menstrual humano: regulación neuroendocrina. En "Endocrinología de la Reproducción". YEN SCC and JAFFE RB, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1993, 296-332.
- [2639] SANTEN RJ. Hipogonadismo humano. En "Endocrinología de la Reproducción". YEN SCC and JAFFE RB, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1993, 765-820.

BIBLIOGRAFÍA

- [2642] ESCRICH E, MUNTANE J, RIBALTA T, COLOM J, SOLANAS M, SEGURA R. Efectos de una dieta hiperlipídica sobre la carcinogénesis mamaria experimental: contenido y tipo de tumores. *Neoplasia* 1992, 9:54-56.
- [2643] APARICIO CANO J, CENDEJAS MM and LARRODERA LOPEZ L. Determinación de receptores de estrógenos y progesterona en 504 muestras de carcinoma mamario. *Quím. Clin.* 1995, 14:63-68.
- [2645] WEISZ A and BRESCIANI F. Estrogen regulation of proto-oncogenes coding for nuclear proteins. *Critical Rev. Oncogenesis* 1993, 4:361-388.
- [2646] CLARKE SD and JUMP DB. Regulation of hepatic gene expression by dietary fats: a unique role for polyunsaturated fatty acids. En "Nutrition and Gene Expression", CD BERDANIER, JL HARGROVE, CRC Press, Inc., 1993, 227-245.
- [2647] GLAVERT HP. Dietary fat, gene expression, and carcinogenesis. En "Nutrition and Gene Expression", CD BERDANIER, JL HARGROVE, CRC Press, Inc., 1993, 248-268.
- [2705] DEGENHARDT K, HONG J, GALE N, BAR-SAGI D. Regulation of Ras by receptor tyrosine kinases. *GTPase-controlled Molec.* 1994, 6:247-257.
- [2789] EXTON JH. Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. *Annu Rev Physiol.* 1994, 56:349-369.
- [2834] CLINTON SK, LI PS, MULLOY AL, IMREY PB, NANDKUMAR S, VISEK WJ. The combined effects of dietary fat and estrogen on survival, 7,12- dimethylbenz(α)anthracene-induced breast cancer and prolactin metabolism in rats. *J. Nutr.* 1995, 125:1192-1204.
- [2835] LU J, JIANG C, FONTAINE S, THOMPSON HJ. Ras may mediate mammary cancer promotion by high fat. *Nutr. Cancer* 1995, 23:283-290.
- [2844] FEUNTEUN J, LENOIR GM. BRCA1, a gene involved in inherited predisposition to breast and ovarian cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1996, 1242:177-180.
- [2845] GAYTHER SA, WARREN W, MAZOYER S, RUSSELL PA, HARRINGTON PA, CHIANO M, SEAL S, HAMOUDI R, VAN RENSBURG EJ, DUNNING AM, LOVE R, EVANS G, EASTON D, CLAYTON D, STRATTON MR, PONDER BA. Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation. *Nat. Genet.* 1995, 11:428-433.
- [2846] COX LA, CHEN G and LEE EY-HP. Tumor suppressor genes and their roles in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1994, 32:19-38.
- [2858] DeBORTOLI ME, ABOU-ISSA H, HALEY BE, CHO-CHUNG YS. Amplified expression of p21 ras proein in hormone-dependent mammary carcinomas of humans and rodents. *Biochem. Bioph. Res. Commun.* 1985, 127:699-706.
- [2859] NIETO A, QASBA PK, NAKHASI HL, DHAR R. Differential regulation of c-Ha-ras and c-Ki-ras gene expression in rat mammary gland. *Carcinogenesis* 1987, 8:1955-1958.
- [2875] HAECKER G and VAUX DL. Viral, worm and radical implications for apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* 1994, 19:99-100.
- [2892] ALTMANN DW and GRIBSON DW. Fatty acid synthesis during early linoleic acid deficiency in the mouse. *J. Lipid Res.* 1969, 6:51-62.
- [2949] IP C, BRIGGS SP, HAEGELE AD, THOMPSON HJ, STORKSON J, SCIMECA JA. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis* 1996, 17:1045-1050.
- [2952] RUSSO J and RUSSO IH. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res. Treat.* 1996, 39:7-20.
- [2955] SINGH J, HAMID R, REDDY BS. Dietary fat and colon cancer: modulating effect of types and amount of dietary fat on ras-p21 function during promotion and progression stages of colon cancer. *Cancer Res.* 1997, 57:253-258.
- [2963] SOLANAS M and ESCRICH E. Ha-ras in normal and tumoral tissues: structure, function and regulation. *J. Physiol. Biochem.* 1996, 52:173-192.
- [2984] DAVIS CD and SNYDERWINE EG. Analysis of EGFR, TGF- α , neu and c-myc in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced mammary tumors using RT-PCR. *Carcinogenesis* 1995, 16:3087-3092.
- [3012] RONAI Z, TILLOTSON J, COHEN L. Effect of dietary fatty acids on gene expression in breast cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995, 3758:85-95.
- [3013] CAVE WT. Dietary ω -3 polyunsaturated fats and breast cancer. *Nutrition* 1996, 12:S39-S42.
- [3018] GERBER M. Olive oil, monounsaturated fatty acids and cancer. *Cancer Let.* 1997, 114:91-92.

BIBLIOGRAFÍA

- [3022] ZUSMAN I, GUREVICH P, MADAR Z, NYSKA A, KOROL D, TIMAR B, ZUCKERMAN A. Tumor-promoting and tumor-protective effects of high-fat diets on chemically induced mammary cancer in rats. *Anticancer Res.* 1997, 17:349-356.
- [3060] SUNDRAM K, KHOR HT, ONG A, PATHMANATHAN R. Effect of dietary palm oils on mammary carcinogenesis in female rats induced by 7,12-Dimethylbenz(α)anthracene. *Cancer Res.* 1989, 49:1447-1451.
- [3104] FURTH PA, BAR-PELED U, LI M. Apoptosis and mammary gland involution: reviewing the process. *Apoptosis* 1997, 2:19-24.
- [3105] LI M, LIU X, ROBINSON G, BAR-PELED U, WAGNER KU, YOUNG WS, HENNIGHAUSEN L, FURTH PA. Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1997, 94:3425-3430.
- [3114] ROSE DP. Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancers: evidence from in vitro experiments and animal studies. *Am. J. Nutr.* 1997, 66:1513S-1522S.
- [3122] RUSSO IH and RUSSO J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *J. Natl. Inst. Env. Health Sci.* 1996, 9:938-967.
- [3123] REID SE, MURTHY MS, KAUFMAN M, SCANLON EF. Endocrine and paracrine hormones in the promotion, progression and recurrence of breast cancer. *Br. J. Surg.* 1996, 83:1037-1046.
- [3127] AGNARSSON BA, JONASSON JG, BJÖRNSDOTTIR IB, BARKARDOTTIR RB, EGILSSON V, SIGURDSSON H. Inherited BRCA2 mutation associated with high grade breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1988, 47:121-127.
- [3144] HARRIS, CC. p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and cancer risk assessment. *Environ Health Prospect.* 1996, 104:435-9.
- [3164] KLEINBERG DL. Role of IGF-I in normal mammary development. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998, 47:201-208.
- [3165] RUSSO J and RUSSO IH. Differentiation and breast cancer. *Medicina (B Aires)* 1997, 57:S81-S91.
- [3185] CAVE WT Jr. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in rodent models of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treatm.* 1997, 46:239-246.
- [3195] THOMPSON H, ZHU Z, BANNI S, DARCY K, LOFTUS T, IP C. Morphological and biochemical status of the mammary gland as influenced by conjugated linoleic acid: implications for a reduction in mammary cancer risk. *Cancer Res.* 1997, 57:5067-5072.
- [3198] BRENNER RR. Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 1981, 20:41-47.
- [3205] IP C. Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acid, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997, 66:S15235-S15295.
- [3229] VISIOLI F and GALLI C. Olive oil phenols and their potential effects on human health. *J. Agricult. Food Chem.* 1998, 10:4292-4296.
- [3234] BOS JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989, 49:4682-4689.
- [3246] GARIN CHIESA P, RETTIG WJ, MELAMED MR, OLD LLL, NIMAN H. Expression of p21ras in normal and malignant human tissues: Lack of association with proliferation and malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84:3234-3238.
- [3297] ROBERTS-THOMSON SJ and SNYDERWINE EG. Effect of dietary fat on codon 12 and 13 H-ras gene mutations in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol-[4,5]pyridine-induced rat mammary gland tumors. *Mol. Carcinogenesis* 1997, 20:348-354.
- [3302] UVNAS-MOBERG K and ERIKSSON M. Breastfeeding: physiological, endocrine and behavioural adaptations caused by oxytocin and local neurogenic activity in the nipple and mammary gland. *Acta Paediatr.* 1996, 85:525-530.
- [3303] ELLIS H, COLBORN GL, SKANDALAKIS JE. Surgical embryology and anatomy of the breast and its related anatomic structures. *Surg. Clin. North Am.* 1993, 73:611-632.
- [3321] WREN BG. Do progestagens reduce the risk of breast cancer? A review of the evidence. *Menopause* 1996, 3:4-12.
- [3326] IBRAHIM NK and HORTOBAGYI GN. New antiestrogens in breast cancer: a review. *Breast J.* 1998, 4:213-229.
- [3332] GRAHAM JD and CLARKE CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* 1997, 18:502-519.
- [3334] ROSEN JM, HUMPHREYS R, KRNICIK S, JUO P, RAUGHT B. The regulation of mammary gland development by hormones, growth factors, and oncogenes. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1994, 387:95-111.

BIBLIOGRAFÍA

- [3335] EVANS JJ. Oxytocin in the human – Regulation of derivations and destinations. *Eur. J. Endocrinol.* 1997, 137:559-571.
- [3338] FAY MP, FREEDMAN LS, CLIFFORD CK, MIDTHUNE DN. Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res.* 1997, 57:3979-3988.
- [3341] HILAKIVI-CLARKE L, CLARKE R, ONOJAFE I, RAYGADA M, CHO E, LIPPMAN M. A maternal diet high in n - 6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997, 94:9372-9377.
- [3355] DAVIDSON LA, LUPTON JR, JIANG J-H, CHAPKINS RS. Carcinogen and dietary lipid regulate ras expression and localization in rat colon without affecting farnesylation kinetics. *Carcinogenesis* 1999, 5:785-791.
- [3370] SRIVASTAVA P, RUSSO J, MGBONYEBI OP, RUSSO IH. Growth inhibition and activation of apoptotic gene expression by human chorionic gonadotropin in human breast epithelial cells. *Anticancer Res.* 1998, 18:4003-4010.
- [3371] SPENCER SJ, CATALDO NA, JAFFE RB. Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstet. Gynecol. Surv.* 1996, 51:314-323.
- [3372] BENAUD C, DICKSON RB, THOMPSON EW. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998, 50:97-116.
- [3400] SRIVASTAVA P, SILVA ID, RUSSO J, MGBONYEBI OP, RUSSO IH. Identification of new genes differentially expressed in breast carcinoma cells treated with human chorionic gonadotropin. *Int. J. Oncol.* 1998, 13:465-469.
- [3403] GRANDIEN K, BERKENSTAM A, GUSTAFSSON JA. The estrogen receptor gene: promoter organization and expression. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1997, 29:1343-1369.
- [3404] ROBERTSON JFR. Oestrogen receptor: a stable phenotype in breast cancer. *British Journal of Cancer* 1996, 73:5-12.
- [3405] IWASE H, OMOTO Y, IWATA H, HARA Y, ANDO Y, KOBAYASHI S. Genetic and epigenetic alterations of the estrogen receptor gene and hormone independence in human breast cancer. *Oncology* 1998, 55:S11-S16.
- [3408] GULLICK WJ and SRINIVASAN R. The type 1 growth factor receptor family: new ligands and receptors and their role in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998, 52:43-53.
- [3412] BORRÁS JM, BORRÁS J, VILADIU P, BOSCH FX. Epidemiologia i prevenció del càncer a Catalunya (1975-1992). Institut Català d'oncologia, 1ª edició, 1997.
- [3420] HILAKIVI-CLARKE L, ONOJAFE I, RAYGADA M, CHO E, CLARKE R, LIPPMAN ME. Breast cancer risk in rats fed a diet high in n-6 polyunsaturated fatty acids during pregnancy. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996, 88:1821-1827.
- [3421] WYNDER EL, COHEN LA, MUSCAT JE, WINTERS B, DWYER JT, BLACKBURN G. Breast cancer: weighting the evidence for a promoting role of dietary fat. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997, 89:766-775.
- [3439] MALUMBRES M and PELLICER A. Ras signalling in cell cycle regulation in its role in tumor development. *Rev. Oncología* 1999, 1:66-76.
- [3445] DAVIS LA, McNEILL GP, CASWELL DC. Analysis of conjugated linoleic acid isomers by ¹³C NMR spectroscopy. *Chemist. and Phys. of Lipids* 1999, 97:155-165.
- [3503] RUSSO H, GUSTERSON BA, ROGERS AE, RUSSO IH, WELLINGS SR, ZWIETEN J. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab. Invest.* 1990, 3:244-278.
- [3504] CAKDER PC. Dietary fatty acids and the immune system. *Lipids* 1999, 34:S137-S140.
- [3535] VACARESSE N, LAJOIE-MAZENC I, AUGÉ N, SUC I, FRISACH MF, SALVAYRE R, NEGRE-SALVAYRE A. Activation of epithelial growth factor receptor pathway by unsaturated fatty acids. *Circ. Res.* 1999, 85:892-899.
- [3557] REBBECK TR. Inherited Genetic Predisposition in Breast Cancer. A population-based perspective. *Cancer* 1999, 86:2493-2501.
- [3558] JUMP DB and CLARKE SD. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu. Rev. Nutr.* 1999, 19:63-90
- [3564] BARTOLÍ R, FERNÁNDEZ-BAÑARES F, NAVARRO E, CASTELLÀ E, MANÉ J, ALVÁREZ M, PASTOR C, CABRÉ E, GASSULL MA. Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E2 synthesis. *Gut* 2000, 46:191-199.
- [3567] BANNI S, ANGIONI E, CASU V, MELIS MP, CARTA G, CORONGIU FP, THOMPSON H, IP C. Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis*, 1999, 6:1019-1024.

BIBLIOGRAFÍA

- [3568] BARTSCH H, NAIR J, OWEN RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 1999, 20:2209-2218.
- [3569] ROSE DP and CONNOLLY JM. Effects of fatty acids and inhibitors of eicosanoid synthesis on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Res.* 1990, 50:7139-7144.
- [3572] PEÑA L, FLORES JM, GONZÁLEZ M, PIZARRO M, GÓMEZ M. Flow cytometric analysis of oestrogen receptors in relation to histopathologic characteristics of DMBA-induced mammary tumours in rats. *Exp. Pathol.* 1991, 43:221-228.
- [3573] WEISBURGER JH. Dietary fat and risk of chronic disease: mechanistic insights from experimental studies. *J. Am. Diet. Assoc.* 1997, 97:S16-S23.
- [3581] SNYDERWINE EG and DAVIS CD. Proliferation, development and DNA adduct levels in the mammary gland of rats given 2-amino-1-methyl-phenylimidazo [4,5-b] pyridine and a high fat diet. *Carcinogenesis* 1998, 19:1209-1215.
- [3587] WANG Z, PEI H, KAECK M, LU J. Mammary cancer promotion and MAPK activation associated with consumption of a corn oil-based high-fat diet. *Nutr. Cancer* 1999, 34: 140-146.
- [3588] HILAKIVI-CLARKE L, STOICA A, RAYGADA M, MARTIN MB. Consumption of a high-fat diet alters estrogen receptor content, protein kinase C activity, and mammary gland morphology in virgin and pregnant mice and female offspring. *Cancer Res.* 1998, 58:654-660.
- [3615] WOUTERSEN RA, APPEL MJ, GARDEREN-HOETMER A, VW WIJNANDS M. Dietary fat and carcinogenesis. *Mut. Res.* 1999, 443:111-127.
- [3616] HAMID R and SING J. Inhibition by dietary menhaden oil of cyclooxygenase-1 and 2 in NMU-induced rat mammary tumors. *Intl. J. Oncol.* 1999, 14:523-528.
- [3619] RAO C, NEWMARK H, REDDY B. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis* 1998, 2:287-290.
- [3620] TJ SMITH, GY YANG, DN SERIL, J LIAO, S KIM. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis* 1998, 19:703-706.
- [3621] GIOVANNINI C, STRAFACE E, MODESTI D, CONI E, CANTAFORA A, DE VINCENZI M, MALORNI W, MASELLA R. Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells. *J. Nutr.* 1999, 129:1269-1277.
- [3623] CRIST KA, CHAUDHURI B, SHIVARAM S, CHAUDHURI PK. Ductal carcinoma in situ in rat mammary gland. *J. Surg. Res.* 1992, 52:205-208.
- [3624] GIJBELS MJ, VISSER JW, SOLLEVELD HA, BROERSE JJ, ZURCHER C. Flow cytometric DNA measurements and cytomorphometric analysis of formalin fixed rat mammary tumours. *Br. J. Cancer* 1991, 64:523-527.
- [3672] SOLANAS M, MORAL R, COLOMER R, ESCRICH E. Effects of dietary (n-6) polyunsaturated lipids on experimental mammary carcinogenesis. *J. Women's Cancer* 2000, 2:67-72.
- [3673] KRITCHEVSKY D. Caloric restriction and experimental carcinogenesis. *Toxicol. Sciences* 1999,52:13-16.
- [3695] DANIEL LW, SCIORRA VA, GHOSH S. Phospholipase D, tumor promoters, proliferation and prostaglandins. *Bioch. Biophys. Acta* 1999, 1439:265-276.
- [3701] UCHIDA N, OKAMURA S-I, NAGAMAGHI Y, YAMASHITA S. Increased phospholipase D activity in human breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1997, 123:280-285.
- [3703] DALTON LW, PAGE DL, DUPONT WD. Histologic grading of breast carcinoma. A reproducibility study. *Cancer* 1994, 73:2765-2770.
- [3771] NEWMARK HL. Squalene, olive oil, and cancer risk. Review and hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999, 889:193-203.
- [3824] GLASGOW WC, HUI R, EVERHART AL, JAYAWICKREME SP, ANGERMAN-STEWART J, HAN BB, ELING TE. The linoleic acid metabolite, (13S)-hydroperoxyoctadecadienoic acid, augments the epidermal growth factor receptor signalling pathway by attenuation of receptor dephosphorylation. Differential response in Syrian hamster embryo tumor suppressor phenotypes. *J. Biol. Chem.* 1997, 272:19269-19276.
- [3839] WILLETT WC. Dietary fat and breast cancer. *Toxicol. Sci.* 1999, 52:S127-S146.
- [3840] LEE MM, LIN SS. Dietary fat and breast cancer. *Annu. Rev. Nutr.* 2000, 20:221-248.
- [3844] CLARKE SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br. J. Nutr.* 2000, 83:S59-S66.
- [3852] COHEN LA, EPSTEIN M, PITTMAN B, RIVENSON A. The influence of different varieties of olive oil on N-methylnitrosourea(NMU)-induced mammary tumorigenesis. *Anticancer Res.* 2000, 20:2307-2312.

BIBLIOGRAFÍA

- [3853] LIPWORTH L, MARTÍNEZ ME, ANGELL J, HSIEH C-C, TRICHOPOULOS D. Olive oil and human cancer: an assessment of the evidence. *Prev. Med.* 1997, 26:181-190.
- [3854] OWEN RW, MIER W, GIACOSA A, HULL WE, SPIEGELHALDER B, BARTSCH H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem. Toxicol.* 2000, 38:647-659.
- [3857] KACHHAP SK, DANGE P, NATH GHOSH S. Effect of ω -6 polyunsaturated fatty acid (linoleic acid) on BRCA1 gene expression in MCF-7 cell line. *Cancer Let.* 2000, 154:115-120.
- [3860] ASSMANN G, DE BACKER G, BAGNARA S, BETTERIDGE J, CREPALDI G, FERNANDEZ-CRUZ A, GODTFREDSSEN J, JACOTOT B, PAOLETTI R, RENAUD S, RICCI G, ROCHA E, TRAUTWEIN E, URBINATI GC, VARELA G, WILLIAMS C. Olive oil and the Mediterranean diet: implications for health in Europe. *Br. J. Nurs.* 1997, 6:675-677.
- [3861] LA VECCHIA C, NEGRI E, FRANCESCHI S, DECARLI A, GIACOSA A and LIPWORTH L. Olive oil, other dietary fats, and the risk of breast cancer (Italy). *Cancer Causes Control* 1995, 6:545-550.
- [3862] NEWMARK HL. Squalene, olive oil and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidem. Biomarkers Prev.* 1997, 6:1101-1103.
- [3864] MARTIN-MORENO JM. The role of olive oil in lowering cancer risk: Is this real gold or simply pinchbeck? *J. Epidemiol. Commun. Health* 2000, 54:726-727.
- [3874] McPHERSON K, STEEL CM, DIXON JM. Breast cancer - epidemiology, risk factors and genetics. *BMJ* 2000, 321:624-628.
- [3897] MENÉNDEZ JA, BARBACID MM, MONTERO S, SEVILLA E, ESCRICH E, SOLANAS M, CORTÉS-FUNES H, COLOMER R. Effects of gamma-linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells. *Eur. J. Cancer* 2001, 37:402-413.
- [3908] AREA DE EPIDEMIOLOGÍA AMBIENTAL Y CÁNCER. Mortalidad por cáncer en España, 1998. Centro Nacional de Epidemiología. <http://193.146.50.130/cancer/mort98.txt>.
- [3920] COLLETT ED, DAVIDSON LA, FAN YY, LUPTON JR, CHAPKIN RS. n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulate oncogenic Ras activation in colonocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001, 280:C1066-C1075.
- [3923] WEISS L and GREEP RD. La glándula mamaria. En "Histología". Ed. "El Ateneo", Barcelona, 1982, 4ª ed., 822-45.
- [3924] ROSEN PP and OBERMAN HA. Anatomy. En "Tumors of the mammary gland". ROSAI J and SOBIN LH, AFIP, Washington DC, 1992, 11-13.
- [3929] CLARKE SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J. Nutr.* 2001, 131:1129-1132.
- [3934] RUSSO J, RUSSO IH et al. Classification of neoplastic and non-neoplastic lesions of the rat mammary gland. Integument and mammary gland of laboratory animals. Edited by Jones TC, Mohr U, Hunt RD. Berlin, Springer-Verlag, 1989, pp:275-304.
- [3944] AALTOOMAA S, LIPPONEN P, PAPIHAHO S, KOSMA VM. Mast cells in breast cancer. *Anticancer Research* 1993, 13:785-788.
- [3947] ESCRICH E, SOLANAS M, SOLER M, RUIZ DE VILLA MC, SÁNCHEZ JA, SEGURA R. Dietary polyunsaturated n-6 lipids effects on the growth and fatty acid composition of rat mammary tumors. *J. Nutr. Biochem.* 2001, 12:536-549.
- [3950] ESCRICH E. Endocrine aspects of breast cancer. En "Senology", Cardoso J Ed. Monduzzi Editore. Págs. 599-603. Bologna (Italy), 1998.
- [3951] LOOIJENGA LH, VERKERK AJ, DE GROOT N, HOCHBERG AA, OOSTERHUIS JW. H19 in normal development and neoplasia. *Mol. Reprod. Dev.*, 1997, 46:419-439.
- [3957] SCHORR K, LI M, KRAJEWSKI S, REED JC, FURTH PA. Bcl-2 gene family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1999, 4:153-164.
- [3963] RUSSO J and RUSSO IH. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2000, 5:187-200.
- [3964] TÓTH J, HULLÁN L, GAÁL D, HOLCZINGER L. Relationship between histological structure and lactate dehydrogenase isoenzyme pattern of rat mammary tumors induced by dimethylbenz(a)anthracene. *J. Exp. Pathol.* 1985, 2:41-46.

BIBLIOGRAFÍA

- [3965] RUSSO J, AO X, GRILL C, RUSSO IH. Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor alpha and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res Treat.* 1999, 53:217-227.
- [3966] RUSSO IH and RUSSO J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1998, 3:49-61.
- [3971] HUNTER T. Oncoprotein networks. *Cell* 1997, 88:333-346.
- [3972] HUNTER T. Signalling – 2000 and beyond. *Cell* 2000, 100:113-127.
- [3973] HANAHAN D and WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100:57-70.
- [3975] SOLANAS M, MORAL R, ESCRICH E. The stimulating effect of a high-fat n-6 polyunsaturated diet on rat DMBA-induced mammary tumors is not related to changes in c-Ha-ras1 mRNA tumor expression. *Nutr. Res.* 2001, 21:1261-1273.
- [3977] KARMALI RA, DONNER A, GOBEL S, SHIMAMURA T. Effect of n-3 and n-6 fatty acids on 7,12 dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary tumorigenesis. *Anticancer Res.* 1989, 9:1161-1167.
- [3980] BÉGIN ME, ELLS G, HORROBIN DF. Polyunsaturated fatty acid-induced cytotoxicity against tumor cells and its relationship to lipid peroxidation. *J. Natl. Cancer Inst.* 1988, 80:188-194.
- [3982] KENNY FS, GEE JM, NICHOLSON RI, ELLIS IO, MORRIS TM, WATSON SA, BRYCE RP, ROBERTSON JF. Effect of dietary GLA+/-tamoxifen on the growth, ER expression and fatty acid profile of ER positive human breast cancer xenografts. *Int J. Cancer* 2001, 92:342-347.
- [3990] STREL'TSOVA VN and PAVLENKO-MIKHAILOV IuN. Relationship between the number of mast cells and neoplastic proliferation of the mammary gland epithelium. *Vopr. Onkol.* 1977, 23:53-57.
- [3991] FISHER ER, SASS R, WATKINS G, JOHAL J, FISHER B: Tissue mast cells in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1985, 5:285-291.
- [3993] DE CIDRE LL, EIJAN AM, BERTOLESI G, ISTURIZ M, SACERDOTE DE LUSTIG E. Influence of mast cells on two murine mammary adenocarcinomas. *Tumour Biol.* 1996, 17:345-353.
- [3997] TOMITA M, MATSUZAKI Y, ONITSUKA T. Correlation between mast cells and survival rates in patients with pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer* 1999, 26:103-108.
- [4047] IZZOTTI A, CAMOIRANO A, CARTIGLIA C, GRUBBS CJ, LUBET RA, KELLOFF GJ, De FLORA S. 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.* 1999, 59:4285-4290.
- [4048] TANG MS, VULIMIRI SV, VIAJE A, CHEN JX, BILOLIKAR DS, MORRIS RJ, HARVEY RG, SLAGA T, DiGIOVANNI J. Both (+/-)syn- and (+/-)anti-7,12-dimethylbenz[a]anthracene-3,4-diol-1,2-epoxides initiate tumors in mouse skin that possess -CAA- to -CTA- mutations at codon 61 of c-H-ras. *Cancer Res.* 2000, 60:5688-5695.
- [4049] CARLOMAGNO C, PERRONE, LAURIA R, DE LAURENTIIS M, GALLO C, MORABITO A *et al.* Prognostic significance of necrosis, elastosis, fibrosis and inflammatory cell reaction in operable breast cancer. *Oncology* 1995, 52:272-277.
- [4050] SCHOLL SM, PALLUD C, BEUVON F, HACENE K, STANLEY ER, POHRSCHEIDER L, TANG R, POUILLART P, LIDEREAU R. Anti-colony stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *J. Natl. Cancer Inst.* 1994, 86:120-126.
- [4051] AALTOMAA S, LIPPONEN P, ESKELINEN M, KOSMA VM, MARI S, ALHAVA E, SYRJÄNEN K. Histological assessment of the prognostic factors in female breast cancer. *Oncology* 1992, 49:1-8.
- [4052] TOIKKANEN SP, KUJARI HP, JOENSUU H. Factors predicting late mortality from breast cancer. *Eur. J. Cancer* 1991, 27:586-591.
- [4053] NAUKKAUNEN A, SYRJANEN KJ. Quantitative immunohistochemical analysis of mononuclear infiltrates in breast carcinomas- correlation with tumour differentiation. *J. Pathol.* 1990, 160:217-222.
- [4054] LEE AH, HAPPERFIELD LC, BOBROW LG, MILLIS R. Angiogenesis and inflammation in invasive carcinoma of the breast. *J. Clin. Pathol.* 1997, 50:669-673.
- [4055] NOEL A, FOIDART JM. The role of stroma in breast carcinoma growth in vivo. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1998, 3:215-225.
- [4061] EVAN GI and VOUSDEN KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001,411:342-348.
- [4080] CHAKRAVARTI D, PELLING JC, CAVALIERI EL, ROGAN EG. Relating aromatic hydrocarbon-induced DNA adducts and c-H-ras mutations in mouse skin papillomas: the role of apurinic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92:10422-10426.

BIBLIOGRAFÍA

- [4081] HOLLANDER MC, KOVALSKY O, SALVADOR JM, KIM KE, PATTERSON AD, HAINES DC, FORNACE AJ. Dimethylbenzanthracene carcinogenesis in Gadd45a-null mice is associated with decreased DNA repair and increased mutation frequency. *Cancer Res.* 2001, 61:2487-2491.
- [4088] MALANEY S and DALY RJ. The ras signaling pathway in mammary tumorigenesis and metastasis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2001, 6:101-113.
- [4093] KUMAR R, VADLAMUDI RK and ADAM L. Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocrine-rel. Cancer* 2000, 7:257-269.
- [4135] HANCOCK JF, PATERSON H, MARSHALL CJ. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* 1990, 63:133-139.
- [4136] HANCOCK JF, MAGEE AI, CHILDS JE, MARSHALL CJ. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 1989, 57:1167-1177.
- [4138] CHOY E, CHIU VK, SILLETTI J, FEOKTISTOV M, MORIMOTO T, MICHAELSON D, IVANOV IE, PHILIPS MR. Endomembrane trafficking of Ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell*, 1999, 98:69-80.
- [4146] CAMPBELL SL, KHOSRAVI-FAR R, ROSSMAN KL, CLARK GJ, DER CJ. Increasing complexity of Ras signalling. *Oncogene* 1998, 17:1395-1413.
- [4155] HWANG D. Fatty acids and immune responses - A new perspective in searching for clues to mechanism. *Annu. Rev. Nutr.* 2000, 20:431-456.
- [4156] KITAJKA K, PUSKÁS LG, ZVARA A, HACKLER L, BARCELÓ-COBLIJN G, YEO YK, FARKAS T. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99:2619-26124.
- [4161] NISHIYAMA A, MATSUI M, IWATA S, HIROTA K, MASUTANI H, NAKAMURA H, TAKAGI Y, SONO H, GON Y, YODOI J. Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D3 up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274:21645-21650.
- [4175] DEVANESAN PD, RAMAKRISHNA NV, PADMAVATHI NS, HIGGINBOTHAM S, ROGAN EG, CAVALIERI EL, MARSCH GA, JANKOWIAK R, SMALL GJ. Identification and quantitation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adducts formed in mouse skin. *Chem. Res. Toxicol.* 1993, 6:364-371.
- [4176] RAMAKRISHNA NV, DEVANESAN PD, ROGAN EG, CAVALIERI EL, JEONG H, JANKOWIAK R, SMALL GJ. Mechanism of metabolic activation of the potent carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Chem. Res. Toxicol.* 1992, 5:220-226.
- [4177] CAVALIERI EL and ROGAN EG. Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica*, 1995, 25:677-688.
- [4198] PRIOR IA and HANCOCK JF. Compartmentalization of Ras proteins. *J. Cell Sci.* 2001, 114:1603-1608.
- [4202] SOLANAS M, MORAL R, ESCRICH E. Mecanismos de activación de proto-oncogenes. Papel de la sobreexpresión génica en cáncer de mama. *Oncología* 2002, 25:243-257.
- [4207] MENÉNDEZ JA, ROPERO S, DEL BARBACID MM, MONTERO S, SOLANAS M, ESCRICH E, CORTÉS-FUNES H, COLOMER R. Synergistic interaction between vinorelbine and gamma-linolenic acid in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 2002, 72:203-219.
- [4216] SIMONS K and IKONEN E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997, 387:569-572.
- [4219] RAABE NK, SCHISTAD O, SAUER T, BOFIN A, KAARESEN R, FOSSAA SD. Prognosis of radically operated breast carcinoma patients. A retrospective study of 167 consecutive patients with emphasis on histopathological grading, reproducibility and mean nuclear area. *APMIS* 1997, 105:363-370.
- [4220] HASEBE T, TSUDA H, TSUBONO Y, IMOTO S, MUKAI K. Fibrotic focus in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a significant histopathological prognostic parameter for predicting the long-term survival of the patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998, 49:195-208.
- [4221] ROSEN PP. *Breast Pathology. Invasive duct carcinoma and morphological prognostic markers.* Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia-New York 1997, 275-293.
- [4225] KATO T, KAMEOKA S, KIMURA T, TANAKA S, NISHIKAWA T, KOBAYASHI M. p53, mitosis, apoptosis and necrosis as prognostic indicators of long-term survival in breast cancer. *Anticancer Res.* 2002, 22:1105-1112.
- [4227] SAIMURA M, FUKUTOMI T, TSUDA H, SATO H, MIYAMOTO K, AKASHI-TANAKA S, NANASAWA T. Prognosis of a series of 763 consecutive node-negative invasive breast cancer patients without adjuvant therapy: analysis of clinicopathological prognostic factors. *J. Surg. Pathol.* 1999, 71:101-105.

BIBLIOGRAFÍA

- [4228] ROSEN PP, GROSHEN S, SAIGO PE, KINNE DW, HELLMAN S. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J. Clin. Oncol.* 1989, 7:1235-1239.
- [4229] O'BYRNE KJ, DALGLEISH AG, BROWNING MJ, STEWARD WP, HARRIS AL. The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *Eur. J. Cancer* 2000, 36:151-169.
- [4231] KATZ A, STROM EA, BUCHHOLZ TA, THERIAULT R, SINGLETARY SE, MCNEESE MD. The influence of pathologic tumor characteristics on locoregional recurrence rates following mastectomy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001, 50:735-742.
- [4233] HANNA WM, KAHN HJ, CHAPMAN JA, FISH EB, LICKLEY HL, MCCREADY DR. Pathologic characteristics of breast cancer that predict for local recurrence after lumpectomy alone. *Breast J.* 1999, 5:105-111.
- [4235] MIRZA AN, MIRZA NQ. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann. Surg.* 2002, 235:10-26.
- [4236] SILVERSTEIN MJ, SKINNER KA, LOMIS TJ. Predicting axillary nodal positivity in 2981 patients with breast carcinoma. *World J. Surg.* 2001, 25:767-772.
- [4237] ARISIO R, SAPINO A, CASSONI P, ACCINELLI G, CUCCORESE MC, MANO MP, BUSSOLATI G. What modifies the relation between tumour size and lymph node metastases in T1 breast carcinomas. *J. Clin. Pathol.* 2000, 53:846-850.
- [4239] LEEK RD. The prognostic role of angiogenesis in breast cancer. *Anticancer Res.* 2001, 21:4325-4331.
- [4240] CROMBIE N, RAMPAUL RS, PINDER SE, ELSTON CW, ROBERTSON JF, ELLIS IO. Extent of ductal carcinoma in situ within and surrounding invasive primary breast carcinoma. *Br. J. Surg.* 2001, 88:1324-1329.
- [4241] DUROUX Y and MARNAY J. Evaluation of predictive factors, particularly the Van Nuys index, of local recurrence in ductal carcinoma "in situ" of the breast: study of 166 cases with conservative treatment and review of the literature. *Bull. Cancer* 2001, 88:419-425.
- [4244] SANTEN RJ, SONG RX, MCPHERSON R, KUMAR R, ADAM L, JENG M-H, YUE W. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2002, 80:239-256.
- [4261] FISCHER SM, CONTI CJ, LOCNISKAR M, BELURY MA, MALDVE RE, LEE ML, LEYTON J, SLAGA TJ, BECHTEL DH. The effect of dietary fat on the rapid development of mammary tumors induced by 7,12 dimethylbenz(a)anthracene in SENCAR mice. *Cancer Res.* 1992, 52:662-666.
- [4262] SNYDERWINE EG, THORGEIRSSON UP, VENUGOPAL M, ROBERTS-THOMSON SJ. Mammary gland carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimisazol[4,5-b]pyridine in Sprague-Dawley rats on high and low-fat diets. *Nutr. Cancer* 1998, 31:160-167.
- [4263] CUNNINGHAM DC, HARRISON LY, SCHULTZ TD. Proliferative responses of normal human mammary gland and MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid, conjugated linoleic acid and eicosanoid synthesis inhibition in culture. *Anticancer Res.* 1997, 17:197-203.
- [4300] STARK AH and MADAR Z. Olive oil as a functional food: Epidemiology and nutritional approaches. *Nutr. Reviews* 2002, 60:170-176.
- [4304] APOLLONI A, PRIOR IA, LINDSAY M, PARTON RG, HANCOCK F. H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol. Cell. Biol.* 2000, 20:2475-2487.
- [4307] PRIOR IA, HARDING A, YAN J, SLUIMER J, PARTON RG, HANCOCK JF. GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat. Cell Biol.* 2001, 3:368-375.
- [4322] VAN ZWIETEN MJ, SHELLABARGER CJ, HOLLANDER CF, CRAMER DV, STONE JP, HOLTZMAN S, BROERSE JJ. Differences in DMBA-induced mammary neoplastic responses in two lines of Sprague-Dawley rats. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1984, 20:1119-1204.
- [4324] STOLL BA. N-3 fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. *British J. Nutr.* 2002, 87:193-198.
- [4325] BERNARD-GALLON DJ, VISSAC-SABATIER C, ANTOINE-VINCENT D, RIO PG, MAURIZIS JC, FSTIER P, BIGNON YJ. Differential effects of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on BRCA1 and BRCA2 gene expression in breast cell lines. *Br. J. Nut.* 2002, 87:281-289.
- [4333] MORENO V, GONZÁLEZ JR, SOLER M, BOSCH FX, KOGEVINAS M and BORRÀS JM. Estimación de la incidencia de cáncer en España: período 1993-1996. *Gaceta Sanitaria*, 2001, 15:380-388.
- [4349] WILLET WC. Diet and cancer: One view at the start of the millennium. *Cancer Epidem. Biomarkers Prev.* 2001, 10: 3-8.
- [4350] WILLET WC. Diet and breast cancer. *J. Internal Med.* 2001, 249: 395-411.
- [4351] KUSHI L and GIOVANNUCCI E. Dietary fat and cancer. *Am. J. Med.* 2002, 113:63-70S.

BIBLIOGRAFÍA

- [4353] TAVANI A, PELUCCHI C, PARPINEL M, NEGRI E, FRANCESCHI S, LEVI F, LA VECCHIA C. n-3 polyunsaturated fatty acid intake and cancer risk in Italy and Switzerland. *Int. J. Cancer* 2003, 105:113-116.
- [4359] DALHIER-TRAN R and MERMILLOD P. Use of heterologous complementary DNA array screening to analyze bovine oocyte transcriptome and its evolution during in vitro maturation. *Biology of Reproduction* 2003, 68:252-261.
- [4374] MALUMBRES M and BARBACID M. Ras oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3:459-465.
- [4393] MORAL R, SOLANAS M, GARCÍA G, COLOMER R, ESCRICH E. Modulation of EGFR and neu expression by n-6 and n-9 high-fat diets in experimental mammary adenocarcinomas. *Oncol. Rep.* 2003, 10:1417-1424.
- [4399] OWEN RW, GIACOSA A, HULL WE, HAUBNER R, SPIEGELHALDER B, BARTSCH H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur. J. Cancer* 2000, 36:1235-47.
- [4403] BIRT DF, HENDRICH S, WANG W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.* 2001, 90:157-177.
- [4404] YANG CS, LANDAU JM, HUANG MT, NEWMARK HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* 2001, 21:381-406.
- [4410] BOECKER W, MOLL R, DERVAN P, BUERGER H *et al* (10 autores). Usual ductal hyperplasia of the breast is a committed stem (progenitor) cell lesion distinct from atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ. *J. Pathol.* 2002, 198:458-467.
- [4458] PEDONE PV, PIKAART MJ, CERRATO F, VERNUCCI M, UNGARO P, BRUNI CB, RICCIO A. Role of histone acetylation and DNA methylation in the maintenance of the imprinted expression of the H19 and IGF2 genes. *FEBS Lett.* 1999, 458:45-50.
- [4472] BOTHA JL, BRAY F, SANKILA R, PARKIN DM. Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur. J. Cancer* 2003, 39:1718-1729.
- [4473] SANT M, ALLEMANI C, BERRINO F, COLEMAN MP, AARELEID T, CHAPLAIN G, COEBERGH JW, COLONNA M, CROSIGNANI P, DANZON A, FEDERICO M, GAFÀ L, GROSCLAUDE P, HÉDELIN G, MACÈ-LESECH J, MARTÍNEZ C, MOLLER J, PACI E, RAVERDY N, TRETARRE B and WILLIAMS EMI. Breast carcinoma survival in Europe and the United States. A population-based study. *Cancer* 2004, 100:715-722.
- [4505] POWER KA and THOMPSON LU. Ligand-induced regulation of ER α and ER β is indicative of human breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res. Treat.* 2003, 81: 209-221.
- [4506] MAGEE PJ and ROWLAND IR. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *British J. Nut.* 2004, 91:513-531.
- [4534] NATHANSON KN, WOOSTER R, WEBER BL. Breast Cancer genetics: What we know and what we need. *Nature Med.* 2001, 7:552-556.
- [4537] THOMPSON HJ and SINGH M. Rat models of premalignant breast disease. *J. Mamm. Gland Neopl.* 2000, 5:409-420.
- [4538] IP MM, MASSO-WELCH PA, IP C. Prevention of mammary cancer with conjugated linoleic acid: Role of the stroma and the epithelium. *J. Mamm. Gland Neopl.* 2003, 8:103-118.
- [4539] ROCK CL. Diet and breast cancer: Can dietary factors influence survival? *J. Mamm. Gland Biol. Neopl.* 2003, 8:119-132.
- [4540] KAPUT J and RODRÍGUEZ RL. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol. Genomics* 2004, 16:166-177.
- [4541] JUMP DB. Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sciences* 2004, 41:41-78.
- [4542] REYES N, REYES I, TIWARI R, GELIEBTER J. Effect on linoleic acid on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D. *Cancer Lett.* 2004, 209:25-35.
- [4543] KHAN SA and HEUVEL JPV. Current topics role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids. *J. Nut. Biochem.* 2003, 14:554-567.
- [4544] MANDARD S, MÜLLER M, KERSTEN S. Peroxisome proliferator-activated receptor target genes. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004, 61:393-416.
- [4546] LARSSON S, KUMLIN M, INGELMAN-SUNDBERG M, WOLK A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79:935-945.
- [4547] STULNIG TM. Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: mechanisms and effects. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003, 132:310-321.
- [4551] DOWNWARD J. Targeting ras signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3:11-22.

BIBLIOGRAFÍA

- [4554] HAMAGUCHI T, MATSUOKA J, KAWAGUCHI H, FUKAMACHI K *et al.* (12 autores). Terminal endbuds and acini as the respective major targets for chemical and sporadic carcinogenesis in the mammary glands of human c-Ha-ras protooncogene transgenic rats. *Breast Cancer Res. Treat.* 2004, 83:43-56.
- [4577] ANDERSON E and CLARKE RB. Steroid receptors and cell cycle in normal mammary epithelium. *J. Mamm. Gland Neopl.* 2004, 9:3-13.
- [4589] YBALLE CM, VU TH, HOFFMAN AR. Imprinting and expresión of insulin-like growth factor II and H19 in normal breast tissue and breast tumor. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 1996, 81:1607-1612.
- [4593] PEROU CM, SORLIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, REES CA, POLLACK JR, ROSS DT, JOHNSEN H, AKSLEN LA, FLUGE O, PERGAMENSCHIKOV A, WILLIAMS C, ZHU SX, LONNING PE, BORRESEN-DALE A-L, BROWN PO, BOTSTEIN D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000, 406:747-752.
- [4594] SORLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R, AAS T, GEISLER S, JOHNSEN H, HASTIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY S, THORSEN T, QUIST H, MATESE JC, BROWN PO, BOTSTEIN D, LONNING PE, BORRESEN-DALE A-L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS* 2001, 98:10869-10874.
- [4595] KEEN JC and DAVIDSON NE. The biology of breast carcinoma. *Cancer* 2003, 97:825-833.
- [4610] HANCOCK JF. Ras proteins: different signals from different locations. *Mol. Cell. Biol.* 2003, 4:373-384.
- [4614] MA DWL, SEO J, DAVIDSON LA, CALLAWAY ES, FAN YY, LUPTON JR, CHAPKIN RS. n-3 PUFA alter caveolae lipid composition and resident protein localization in mouse colon. *FASEB J.* 2004, 18:1040-4042.
- [4615] BROWN DA and LONDON E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 2000, 275:17221-17224.
- [4623] NAROD SA and FOULKES WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews* 2004, 4:665-676.
- [4624] MICHALIK L, DESVERGNE B, WAHLI W. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nature Reviews* 2004, 4:61-70.
- [4634] LLOR X, PONS E, ROCA A, ALVAREZ M, MAÑÉ J, FERNÁNDEZ-BAÑARES F, GASSULL MA. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Clin Nutr.* 2003, 22:71-79.
- [4647] BRAY F, McCARRON P, PARKIN DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res.* 2004, 6:229-239.
- [4651] MILLER WR and SHARPE RM. Environmental oestrogens and human reproductive cancer. *Endocrine-Rel. Cancer* 1998, 5:69-96.
- [4653] HARVEY PW and DARBRE P. Endocrine disrupters and human health: could oestrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women? A review of evidence and call for further research. *J. Appl. Toxicol.* 2004, 24:167-176.
- [4662] ADLERCREUTZ H. Phytoestrogens and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2003, 83:113-118.
- [4680] CAVALIERI E, FRENKEL K, LIEHR JG, ROGAN E and ROY D. Estrogens as endogenous genotoxic agents-DNA adducts and mutations. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 2000, 27:75-93.
- [4713] MITRA AK, FARUQUE FS and AVIS AL. Breast cancer and environmental risks: Where is the link? *J. Environm. Health* 2004, 66:24-32.
- [4716] WATSON CS, GAMETCHU B, NORFLEET AM, CAMPBELL CH and THOMAS ML. Rapid, nongenomic actions of estrogens. *Women Cancer* 1998, 1:21-28.
- [4718] WATSON CS, CAMPBELL CH and GAMETCHU B. The dynamic and elusive membrane estrogen receptor. *Steroids* 2002, 67:429-437.
- [4719] BULAYEVA NN and WATSON CS. Xenostrogen-induced ERK-1 and ERK-2 activation via multiple membrane-initiated signalling pathways. *Environm. Health Perspect.* 2004, 112:1481-1487.
- [4722] PARKER BS, ARGANI P, COOK BP, LIANGFENG H, CHARTRAND SD, ZHANG M, SAHA S, BARDELLI A, JIANG Y, MARTIN TBS, NACHT M, TEICHER BA, KLINGER KW, SUKUMAR S, MADDEN SL. Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 2004, 64:7857-7866.
- [4723] GUO W, GIANCOTTI FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004, 5:816-826.
- [4737] MORAL R, SOLANAS M, MANZANARES E, HARO D, ESCRICH E. Influence of DMBA-induced mammary cancer on the liver CPT-I, mit HMGCoA synthase and PPAR α mRNA expression in rats fed a low or high corn oil diet. *Int. J. Mol. Med.* 2004, 14:283-287.

BIBLIOGRAFÍA

- [4743] OWEN RW, GIACOSA A, HULL WE, HAUBNER R, WÜRTELE G, SPIEGELHALDER B, BARTSCH H. Olive-Oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet* 2000, 1:107-112.
- [4744] MA DWL, SEO J, SWITZER KC, FAN YY, McMURRAY DN, LUPTON JR, CHAPKIN RS. n-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. *J. Nutr. Biochem.* 2004, 15:700-706.
- [4765] MORENO JJ. Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radic Biol Med.* 2003, 35:1073-1081.
- [4802] OWEN RH, HAUBNER R, WÜRTELE G, HULL WE, SPIEGELHALDER B, BARTSCH H. Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur. J. Cancer Prev.* 2004, 13:319-326.
- [4804] DOWHAN W, MILEYKOVSKAYA E, BOGDANOV M. Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1666: 19-39.
- [4812] ARIEL I, de GROOT N, HOCHBERG E. Imprinted H19 gene expression embryogenesis and human breast cancer: the oncofetal connection. *Am. J. Med. Genet.* 2000, 91:46-50.
- [4818] HULBERT AJ, TURNER N, STORLIEN LH, ELSE PL. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 2005, 80:155-169.
- [4822] HULBERG AJ and ELSE PL. Mechanisms underlying the cost of living in animals. *Ann. Rev. Physiol.* 2000, 62: 207-235.
- [4824] HOLDER JW, ELMORE E, BARRET JC. Gap junction function and cancer. *Cancer Res.* 1993, 53: 3475-3485.
- [4837] KOSOY G, MADAR Z, BEN-HUR H, GAL R, STARK A, COHEN O, ZUSMAN I. Transplacental effect of a 15% olive-oil diet on functional activity of immune components in the spleen and colon tumors of rat offspring. *Oncol. Rep.* 2001, 8:1045-1049.
- [4861] ALBI E and VIOLA MAGNI MP. The role of intranuclear lipids. *Biol. Cell* 2004, 96: 657-667.
- [4883] VISIOLI F, GRANDE S, BOGANI P, GALLI C. The role of antioxidants in the mediterranean diets: focus on cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* 2004, 13: 337-343.
- [4888] VENKATESWARAN V, FLESHNER NE, SUGAR LM, KLOTZ LH. Antioxidants block prostate cancer in Lady transgenic mice. *Cancer Research* 2004, 64: 5891-5896.
- [4900] JUREK D, UDILOVA N, JOZKOWICZ A, NOHL H, MARIAN B, SCHULTE-HERMANN R. Dietary lipid hydroperoxides induce expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human colorectal tumor cells. *FASEB J.* 2005, 19:97-99.
- [4902] WU B, IWAKIRI R, OOTANI A, TSUNADA S, FUJISE T, SAKATA Y, SAKATA H, TODA S, FUJIMOTO K. Dietary corn oil promotes colon cancer by inhibiting mitochondria-dependent apoptosis in azoxymethane-treated rats. *Exp. Biol. Med.* 2004, 229:1017-1025.
- [4913] RODRÍGUEZ-VICIANA P, SABATIER C, McCORMICK F. Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol. Cell. Biol.* 2004, 24:4943-4954.
- [4914] FREEMAN MR and SOLOMON KR. Cholesterol and prostate cancer. *J. Cell. Biochem.* 2004, 91:54-69.
- [4915] HILAKIVI-CLARKE L, CLARKE R. Timing of dietary fat exposure and mammary tumorigenesis: role of estrogen receptor and protein kinase C activity. *Mol. Cell Biochem.* 1998, 188:5-12.
- [4972] MILES EA, ZOUBOULI P, CALDER PC. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition* 2005, 21:389-394.
- [4992] CALDER PC, YAQOOB P, THIES F, WALLACE FA, MILES EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br J Nutr.* 2002, 87 Suppl 1:S31-48.
- [4994] YAQOOB P, KNAPPER JA, WEBB DH, WILLIAMS CM, NEWSHOLME EA, CALDER PC. Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998, 67:129-135.
- [5051] YANG Q, ALEMANY R, CASAS J, KITAJKA K, LANIER SN, ESCRIBÀ PV. Influence of the membrane lipid structure on signal processing via G protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* 2005, 68:210-217.
- [5099] HILAKIVI-CLARKE L, CHO E, DEASSIS S, OLIVO S, EALLEY E, BOUKER KB, WELCH JN, KHAN G, CLARKE R, CABANES A. Maternal and prepubertal diet, mammary development and breast cancer risk. *J. Nutr.* 2001, 131:154S-157S.
- [5100] SHAN L, YU M, SNYDERWINE EG. Gene expression profiling of chemically induced rat mammary gland cancer. *Carcinogenesis* 2005, 26:503-509.
- [5127] STARK AH, KOSOY G, ZUSMAN I, YARDEN G, MADAR Z. Olive oil consumption during pregnancy and lactation in rats influences mammary cancer development in female offspring. *Nutr. Cancer.* 2003, 46:59-65.

BIBLIOGRAFÍA

- [5132] HILAKIVI-CLARKE L, CHO E, CABANES A, DEASSIS S, OLIVO S, HELFERICH W, LIPPMAN ME, CLARKE R. Dietary modulation of pregnancy estrogen levels and breast cancer risk among female rat offspring. *Clin. Cancer Res.* 2002, 8:3601-3610.
- [5137] SHAN L, YU M, SNYDERWINE EG. Global gene expression profiling of chemically induced rat mammary gland carcinomas and adenomas. *Toxicol. Pathol.* 2005, 33:768-775.
- [5149] MENENDEZ JA, VELLON L, COLOMER R, LUPU R. Effect of δ -linolenic acid on the transcriptional activity of the Her-2/neu (erbB-2) oncogene. *J. Natl. Cancer Inst.* 2005, 97:1611-1615.
- [5265] QIU C, SHAN L, YU M, SNYDERWINE EG. Steroid hormone receptor expression and proliferation in rat mammary gland carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Carcinogenesis* 2005, 26:763-769.
- [5321] ESCRICH E, SOLANAS M, MORAL R. Olive oil, and other dietary lipids, in cancer: experimental approaches. In Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Yaqoob P. (eds.) *Olive Oil and Health*. CAB International, Oxfordshire, UK 2006, 317-374.
- [5367] KEY TJ, APPLEBY PN, REEVES GK *et al.* (49 authors). Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003, 95:1218-1226.
- [5368] LAHMANN PH, HOFFMANN K, ALLEN N *et al.* (41 authors). Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int. J. Cancer* 2004, 111:762-771.
- [5423] FRISCH RE, HEGSTED DM, YOSHINAGA K. Body weight and food intake at early estrus of rats on a high-fat diet. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1975, 72:4172-4176.
- [5426] ZHANG Z, BENSON B, LOGAN JL. Dietary fish oil delays puberty in female rats. *Biol. Reprod.* 1992, 47:998-1003.
- [5428] KIRTLEY D and MAHER R. Effect of an isocaloric high fat diet on initiation of puberty in Osborne-Mendel rats. *Biol. Reprod.* 1979, 21:331-338.
- [5439] HANCOCK JF and PARTON RG. Ras plasma membrane signalling platforms. *Biochem. J.* 2005, 389:1-11.
- [5444] ROTBLAT B, PRIOR IA, MUNCKE C, PARTON RG, KLOOG Y, HENIS YI, HANCOCK JF. Three separable domains regulate GTP-dependent association of H-ras with the plasma membrane. *Mol. Cell Biol.* 2004, 24:6799-6810.
- [5449] RAJENDRAN L and SIMONS K. Lipid rafts and membrane dynamics. *J. Cell Sci.* 2005, 118:1099-10102.
- [5451] SIMONS K and VAZ WLC. Model systems, lipid rafts and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2004, 33:269-295.
- [5465] MINEO C, JAMES GL, SMART EJ, ANDERSON RGW. Localization of Epidermal Growth Factor-stimulated Ras/Ras-1 interaction to caveolae membrane. *J. Biol. Chem.* 1996, 271:11930-11935.
- [5481] ZHUANG L, LIN J, LU ML, SOLOMON KR, FREEMAN MR. Cholesterol-rich lipid rafts mediate Akt-regulated survival in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002, 62:2227-2231.
- [5484] WALKER SA and LOCKYER PJ. Visualizing Ras signalling in real-time. *J. Cell Sci.* 2004, 117:2879-2886.
- [5489] WENNERBERG K, ROSSMAN KL, DER CS. The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* 2005, 118:843-846.
- [5519] MIYAKIS S, SOURVINOS G, SPANDIDOS DA. Differential expression and mutation of the ras family genes in human breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 251:609-612.
- [5576] GREEN DR and EVAN GI. A matter of life and death. *Cancer Cell* 2002, 1:19-30.
- [5612] SCHLEY PD, BRINDLEY DN, FIELD CJ. (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J. Nutr.* 2007, 137:548-553.
- [5655] BENAKANAKERE I, BESCH-WILLIFORD C, SCHNELL J, BRANDT S, ELLERSIECK MR, MOLINOLO A and HYDER SM. Natural and synthetic progestins accelerate 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated mammary tumors and increase angiogenesis in Sprague-Dawley rats. *Clin. Cancer Res.* 2006, 12:4062-4071.
- [5659] HAYASHI SI, EGUCHI H, TANIMOTO K, YOSHIDA T, OMOTO Y, INOUE A, YOSHIDA N and YAMAGUCHI Y. The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocr Relat Cancer* 2003, 10:193-202.
- [5660] CLARKE RB, ANDERSON E, HOWELL A. Steroid receptors in human breast cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 2004, 15:316-323.
- [5672] CUI X, SCHIFF R, ARPINO G, OSBORNE CK, LEE AV. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23:7721-7735.
- [5673] SINGH RR and KUMAR R. Steroid hormone receptor signaling in tumorigenesis. *J Cell Biochem.* 2005, 96:490-505.

BIBLIOGRAFÍA

- [5685] EDWARDS DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol.* 2005, 67:335-376.
- [5690] WANG X, MARTINDALE JL, HOLBROOK NJ. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2000, 275:39435-39443.
- [5760] BASSO AD, KIRSCHMEIER P, BISHOP RW. Farnesyl transferase inhibitors. *J.Lipid Res.* 2006, 47:15-31.
- [5767] KRIS-ETHERTON PM, PEARSON TA, WAN Y, HARGROVE RL, MORIARTY K, FISHELL V, ETHERTON TD. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999, 70:1009-1015.
- [5782] MATTHEWS J and GUSTAFSSON JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol. Interv.* 2003, 3:281-92.
- [5803] KIM SY, SUH HW, CHUNG JW, YOON SR, CHOIN I. Diverse functions of VDUP1 in cell proliferation, differentiation and diseases. *Cell. Mol. Immunol.* 2007, 4:345-351.
- [5804] KAIMUL AM, NAKAMURA H, MASUTANI H, JODOI J. Thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cancer and metabolic syndrome. *Free Radic. Biol. Med.* 2007, 43:861-868.
- [5805] ARNÉR ESJ and HOLMGREN A. The thioredoxin system in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 2006, 16:420-426.
- [5816] HILAKIVI-CLARKE L. Nutritional modulation of terminal end buds: its relevance to breast cancer prevention. *Curr. Cancer Drug Targets* 2007, 7:465-474.
- [5817] KUIPER GG, CARLSSON B, GRANDIEN K, ENMARK E, HÄGGBLAD J, NILSSON S and GUSTAFSSON JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997, 138:863-870.
- [5828] NAVARRO VM, CASTELLANO JM, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ R, BARREIRO ML, ROA J, SANCHEZ-CRIADO JE, AGUILAR E, DIEGUEZ C, PINILLA L, TENA-SEMPERE M. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of kiss-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of kiss-1 peptide. *Endocrinology* 2004, 145:4565-4274.
- [5830] HAN SK, GOTTSCH ML, LEE KJ, POPA SM, SMITH JT, JAKAWICH SK, CLIFTON DK, STEINER RA, HERBISON AE. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptina as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J. Neurosci.* 2005, 25:11349-11356.
- [5869] ROA J, AGUILAR E, DIEGUEZ C, PINILLA L, TENA-SEMPERE M. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front. Neuroendocrinol.* 2008, 29:48-69.
- [5889] JACOB J, SEBASTIAN KS, DEVASSY S, PRIYADARSINI L, FAROOK MF, SHAMEEM A, MATHEW D, SREEJA S, THAMPAN RV. Membrane estrogen receptors: genomic actions and post transcriptional regulation. *Mol. Cell Endocrinol.* 2006, 246:34-41.
- [5892] LEVIN ER. Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J. Appl. Physiol.* 2001, 91:1860-1867.
- [5895] ZHAO C, DAHLMAN-WRIGHT K and GUSTAFSSON JA. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl. Recept. Signal* 2008, 6:e003.
- [5965] MORAL R, SOLANAS M, GARCIA G, GRAU L, VELA E, ESCRICH R, ESCRICH E. High corn oil and high extra virgin olive oil diets have different effects on the expression of differentiation-related genes in experimental mammary tumors. *Oncol. Rep.* 2008, 20:429-435.
- [5975] DE WAARD F and THIJSEN JHH. Hormonal aspects in the causation of human breast cancer: epidemiological hypotheses reviewed, with special reference to nutritional status and first pregnancy. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2005, 97:451-458.
- [6051] GALLUS S, BOSETTI C, LA VECCHIA C. Mediterranean diet and cancer risk. *Eur. J. Cancer Prev.* 2004, 13:447-452.
- [6093] World Cancer Research Foundation and American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. WCRF and AICR. AICR, Washington DC. 2007. 517 pages.
- [6109] AL-DHAHERI WS, HASSOUNA I, AL-SALAM S, KARAM SM. Characterization of breast cancer progression in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008, 1138:121-131.
- [6198] GAGO-DOMINGUEZ M, CASTELAO JE, PIKE MC, SEVANIAN A, HAILE RW. Role of lipid peroxidation in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005, 14:2829-2839.
- [6242] OHTAKI T, SHINTANI Y, HONDA S *et al.* (21 authors). Metastasis suppressor gene *kiss-1* encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001, 411:613-617.
- [6290] MICHEL V and BAKOVIC M. Lipid rafts in health and disease. *Biol. Cell* 2007, 99:129-140.

BIBLIOGRAFÍA

- [6321] SCHULZ M, HOFFMANN K, WEIKERT C, NÖTHLINGS U, SCHULZE MB, BOEING H. Identification of a dietary pattern characterized by high-fat food choices associated with increased risk of breast cancer: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) - Postdam study. *Br. J. Nutr.* 2008, 100:942-946.
- [6338] SCHMITZ G and ECKER J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 2008, 47:147-155.
- [6336] YAQOUB P. The nutritional significance of lipid rafts. *Annu. Rev. Nutr.* 2009, 29:3.1-3.26.
- [6339] CHAPKIN RS, McMURRAY DN, DAVIDSON LA, PATIL BS, FAN YY, LUPTON JR. Bioactive dietary long-chain fatty acids: emerging mechanisms of action. *Br. J. Nutr.* 2008, 100:1152-1157.
- [6363] ZHANG L, ZHANG Z, GWO H and WANG Y. Na⁺/K⁺-ATPase-mediated signal transduction and Na⁺/K⁺-ATPase regulation. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 2008, 22:615-621.
- [6390] SAXEN N, LAHIRI SS, HAMBARDE S, TRIPATHI RP. Ras: Target for Cancer Therapy. *Cancer Invest.* 2008, 26:948-955.
- [6526] VISIOLI F, COLOMBO C, GALLI C. Oxidation of individual fatty acids yields different profiles of oxidation markers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 245:487-489.
- [6599] FERNÁNDEZ-QUINTELA A, CHURRUCA I, PORTILLO MP. The role of dietary fat in adipose tissue metabolism. *Public Health Nutr.* 2007, 10:1126-1131.
- [6609] WIDSCHWENDTER M and JONES PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene* 2002, 21:5462-5482.
- [6691] PARKIN, D.M., WHELAN, S.L., FERLAY, J., TEPPA, L. and THOMAS, D.B. (eds), *Cancer Incidence in Five Continents Vol. VIII*, IARC Scientific Publications No. 155, IARC, Lyon, 2002.
- [6716] SAMY RP, GOPALAKRISHNAKONE P, IGNACIMUTHU S. Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in rats. *Chem. Biol. Interact.* 2006, 164:1-14.
- [6769] XUE W and WARSHAWSKY D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005, 206:73-93.
- [6793] RAO CV, HIROSE Y, INDRANIE C, REDDY BS. Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. *Cancer Res.* 2001, 61:1927-1933.
- [6794] SAJI S, OMOTO Y, SHIMIZU C, WARNER M, HAYASHI Y, HORIGUCHI S, WATANABE T, HAYASHI S, GUSTAFSSON JA, TOI M. Expression of estrogen receptor (ER) (beta)cx protein in ER(alpha)-positive breast cancer: specific correlation with progesterone receptor. *Cancer Res.* 2002, 62:4849-4853.
- [6797] WIESEN JF, YOUNG P, WERB Z, CUNHA GR. Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Development.* 1999, 126:335-344.
- [6801] SHUPNIK MA. Oestrogen receptors, receptor variants and oestrogen actions in the hypothalamic-pituitary axis. *J Neuroendocrinol.* 2002, 14:85-94.
- [6806] PENG B, LU B, LEYGUE E, MURPHY LC. Putative functional characteristics of human estrogen receptor-beta isoforms. *J Mol Endocrinol.* 2003, 30:13-29.
- [6812] MOTE PA, BARTOW S, TRAN N, CLARKE CL. Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2002, 72:163-172.
- [6813] MITCHNER NA, GARLICK C, BEN-JONATHAN N. Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 1998, 139:3976-3983.
- [6818] FENDRICK JL, RAAFAT AM, HASLAM SZ. Mammary gland growth and development from the postnatal period to postmenopause: ovarian steroid receptor ontogeny and regulation in the mouse. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1998, 3:7-22.
- [6826] VIZMANOS B and MARTÍ-HENNEBERG C. Puberty begins with a characteristic subcutaneous body fat mass in each sex. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2000, 54:203-208.
- [6828] ROSNER B, COLDITZ GA, WILLETT WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses Health Study. *Am. J. Epidemiol.* 1994, 139:819-835.
- [6829] ONG KK, AHMED ML, DUNGER DB. Lessons from large population studies on timing and tempo of puberty (secular trends in relation to body size): The European trend. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2006, 254-255:8-12.
- [6830] HEGER S, KÖMER A, MEIGEN C, GAUSCHE R, KELLER A, KELLER E, KIESS W. Impact of weight status on the onset and parameters of puberty: analysis of three representative cohorts from central Europe. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2008, 21:865-877.

BIBLIOGRAFÍA

- [6840] CASTELLANO JM, ROA J, LUQUE RM, DIEGUEZ C, AGUILAR E, PINILLA L, TENA-SEMPERE M. Kiss-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: physiologic roles and putative pathophysiological implications. *Peptides* 2009, 30:139-145.
- [6845] CLARKE R, SKAAR T, BAUMANN K, LEONESSA F, JAMES M, LIPPMAN J, THOMPSON EW, FRETER C, BRUNNER N. Hormonal carcinogenesis in breast cancer: cellular and molecular studies of malignant progression. *Breast Cancer Res. Treat.* 1994, 31:237-48.
- [6862] WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC: AICR, 2007.
- [6879] SOLANAS M, GRAU L, MORAL R, VELA E, ESCRICH R, ESCRICH E. Dietary olive oil and corn oil differentially affect experimental breast cancer through distinct modulation of the p21ras signaling and the proliferation-apoptosis balance. *Carcinogenesis* 2010, 31:871-879.
- [6897] BOSCH A, EROLES P, ZARAGOZA R, VIÑA JR, LLUCH A. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev.* 2010 36:206-215.
- [7022] ESTELLER M. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* 2008, 358:1148-1159.
- [7051] GRANADOS-PRINCIPAL S, QUILES JL, RAMIREZ-TORTOSA CL, SANCHEZ-ROVIRA P, RAMIREZ-TORTOSA MC. Hydroxytyrosol from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr. Rev.* 2010, 68:191-206.
- [7062] MUSGROVE EA and SUTHERLAND RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2009, 9:631-643.
- [7086] MANTOVANI A, ALLAVENA P, SICA A, BALKWILL F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008, 454:436-444.
- [7102] ROMAGUERA D, NORAT T, VERGNAUD AC *et al.* (51 authors). Mediterranean dietary patterns and prospective weight change in participants of the EPIC-PANACEA project. *Am. J. Clin. Nutr.* 2010, 92:912-921.
- [7108] FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C, PARKIN DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 2010, 127:2893-2917.
- [7109] ESCRICH E, SOLANAS M, MORAL R, COSTA I. Lípidos de la dieta y cáncer de mama: evidencias científicas, clínicas, anatomopatológicas y moleculares. *Revista Española de Obesidad* 2008, 6:129-138.
- [7144] SOTO-GUZMÁN A, NAVARRO-TITO N, CASTRO-SANCHEZ L, MARTINEZ-OROZCO R, SALAZAR EP. Oleic acid promotes MMP-9 secretion and invasion in breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* 2010, 27:505-515.
- [7145] MacLENNAN M and MA DWL. Role of dietary fatty acids in mammary gland development and breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010, 12:211.
- [7158] DICKSON RB, THOMPSON EW, LIPPMAN ME. Regulation of proliferation, invasion and growth factor synthesis in breast cancer by steroids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1990, 37:305-316.
- [7168] BORRELLI F and IZZO AA. Role of acylethanolamides in the gastrointestinal tract with special reference to food intake and energy balance. *Best Prac. Res. Clin. Endocrinol.* 2009, 23:33-49.
- [7178] RODRÍGUEZ DE FONSECA F, NAVARRO M, GÓMEZ R, ESCUREDO L, NAVA F, FU J, MURILLO-RODRÍGUEZ E, GIUFFRIDA A, LO VERME J, GAETANI S, KATHURLA S, GALL C, PIOMELLI D. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* 2001, 414:209-212.
- [7206] THABUIS C, TISSOT-FAVRE D, BEZELGUES JB, MARTIN JC, CRUZ-HERNANDEZ C, DIONISI F, DESTAILLATS F. Biological functions and metabolism of oleylethanolamide. *Lipids* 2008, 43:887-894.
- [7210] LO VERME J, GAETANI S, FU J, OVEISI F, BURTON K, PIOMELLI D. Regulation of food intake by oleylethanolamide. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 2005, 62:708-716.
- [7212] GONZÁLEZ-YANES C, SERRANO A, BERMÚDEZ-SILVA FJ, HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ M, PÁEZ-OCHOA MA, RODRÍGUEZ DE FONSECA F, SÁNCHEZ-MARGALET V. Oleylethanolamide impairs glucose tolerance and inhibits insulin-stimulated glucose uptake in rat adipocytes through p38 and JNK MAPK pathways. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005, 289:E923-E929.
- [7218] SERRANO A, PAVÓN FJ, TOVAR S, CASANUEVA F, SEÑARÍS R, DIEGUEZ C, RODRÍGUEZ DE FONSECA F. Oleylethanolamide: effects on hypothalamic transmitters and gut peptides regulating food intake. *Neuropharmacology* 2011, 60:593-601.
- [7249] MANTOVANI A. Cancer-related inflammation: the seventh hallmark of cancer. En "American Society of Clinical Oncology", ASCO Educational Book, 2009, 723-726.
- [7256] ELSTON CW and ELLIS IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I: The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long term follow-up. *Histopathology* 1991, 19:403-410.
- [7257] BOECKER W. Preneoplasia of the breast. A new conceptual approach to proliferative breast disease. Saunders Elsevier, Munchen, 2006.

BIBLIOGRAFÍA

- [7258] SHIN ST, SIMPSON PT, DA SILVA L, JAYANTHAN J, REID L, LAKHANI SR, ROSEN PP. Molecular evidence of progression of microglandular adenosis (MGA) to invasive carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2009, 33:496-504.
- [7259] GEYER FC, KUSHNER YB, LAMBROS MB, NATRAJAN R, MACKAY A, TAMBER N, FENWICK K, PURNELL D, ASHWORTH A, WALKER AA, REIS-FILHO JS. Microglandular adenosis or microglandular adenoma? A molecular genetic analysis of a case associated with atypia and invasive carcinoma. *Histopathology* 2009, 55:732-743.
- [7260] SIMPSON PT, REIS-FILHO JS, GALE T, LAKHANI SR. Molecular evolution of breast cancer. *J. Pathol.* 2005, 205:248-254.
- [7261] SHACKNEY SE and SILVERMAN JF. Molecular evolutionary patterns in breast cancer. *Adv. Anat. Pathol.* 2003, 10:278-290.
- [7262] VOLGELSTEIN B, FEARON ER, HAMILTON SR, KERN SE, PREISINGER AC, LEPPERT M, NAKAMURA Y, WHITE R, SMITS AM, BOS JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 1988, 319:525-532.
- [7263] FARABEGOLI F, CHAMPEME MH, BIECHE I, SANTINI D, CECCARELLI C, DERENZINI M, LIDEREAU R. Genetic pathways in the evolution of breast ductal carcinoma in situ. *J. Pathol.* 2002, 196:280-286.
- [7264] REIS-FILHO JS and LAKHANI SR. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: genetic alterations in pre-invasive lesions. *Breast Cancer Res.* 2003, 5:313-319.
- [7265] VINCENT TL and GATENBY RA. An evolutionary model for initiation, promotion and progression in carcinogenesis. *Int. J. Oncol.* 2008, 32:729-737.
- [7266] BÖCKER W, MOLL R, POREMBA C, HOLLAND R, Van DIEST PJ, DERVAN P, BÜRGER H, WAI D, INA DIALLO R, BRANDT B, HERBST H, SCHMIDT A, LERCH MM, BUCHWALLOW IB. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new biological concept. *Lab. Invest.* 2002, 82:737-746.
- [7267] DE RONDE J, WESSELS L, WESSELING J. Molecular subtyping of breast cancer: ready to use? *Lancet Oncol.* 2010, 11:339-349.
- [7268] COBLEIGH MA, VOGEL CL, TRIPATHY D, ROBERT NJ, SCHOLL S, FEHRENBACHER L, WOLTER JM, PATON V, SHAK S, LIEBERMAN G, SLAMON DJ. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2 overexpression metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin. Oncol.* 1999, 17:2639-2648.
- [7269] FAN C, PRAT A, PARKER JS, LIU Y, CAREY LA, TROESTER MA, PEROU CM. Building prognostic models for breast cancer patients using clinical variables and hundreds of gene expression signatures. *BMC Medical Genomics* 2011, 4:3.
- [7270] DOTIRIOU CH and PUZSTAI L. Gene expression signatures in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2009, 360:790-800.
- [7271] WEIGELT B, HORLINGS HM, KREIKE B, HAYES MM, HAUPTMANN M, WESSELS LF, de JONG D, Van de VIJVER MJ, Van't VEER LJ, PETERSE JL. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J. Pathol.* 2008, 216:141-150.
- [7272] TSUDA HH. Prognostic and predictive value of c-erbB2 (HER2/neu) gene amplification in human breast cancer. *Breast Cancer* 2001, 8:38-44.
- [7273] SOUSSI T and BÉROUD C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 2001, 1:233-240.
- [7274] YAMAUCHI H, STEARNS V, HAYES DF. When is a tumor marker ready for a prime time? A case study of c-erbB2 as a predictive factor in breast cancer. *J. Clin. Oncology* 2001, 19:2334-2356.
- [7275] PRAT A and PEROU CH. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* 2011, 5:5-23.
- [7276] TAVASSOLI FA and DEVILEE P. *Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Pathology and Genetics. WHO Classification of tumours.* IARC Press (Lyon), 2003.
- [7304] FIEGL H, MILLINGER S, MUELLER-HOLZNER E, MARTH C, ENSINGER C, BERGER A, KLOCKER H, GOEBEL G, WIDSCHWENDTER M. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res.* 2005, 65:1141-1145.
- [7307] JOVANOVIĆ J, RONNEBERG JA, TOST J, KRISTENSEN V. The epigenetics of breast cancer. *Mol. Oncol.* 2010, 4:242-254.
- [7310] MARTENS JWM, NIMMIRICH I, KOENIG T *et al.* (19 authors). Association of DNA methylation of phosphoserine aminotransferase with response to endocrine therapy in patients with recurrent breast cancer. *Cancer Res.* 2005, 65:4101-4117.

BIBLIOGRAFÍA

- [7318] WIDSCHWENDTER M, SIEGMUND KD, MÜLLER HM, FIEGL H, MARTH C, MÜLLER-HOLZNER E, JONES PA, LAIRD PW. Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res.* 2004, 64:3807-3813.
- [7332] MOHR U. International Classification of rodent tumours. Part I: The Rat. Intertegumentary system. IARC Scientific Publications nº 122, IARC (Lyon), 1993.
- [7349] HANAHAN D and WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144:646-674.
- [7368] GRIVENNIKOV SI, GRETEN FR, KARIN M. Immunity, inflammation and cancer. *Cell* 2010, 140:883-899.
- [7423] LOPEZ-GARCIA MA, GETER FC, LACROIX. TRIKI M, MARCHIÓ C, REIS-FILHO JS. Breast cancer presursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology* 2010, 57:171-192.
- [7475] MOUSSAVI N, GAVINO V, RECEVEUR O. Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity? *Obesity* 2008, 16:7-15.
- [7495] FU J, OVEISI F, GAETANI S, LIN E, PIOMELLI D. Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR α agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology* 2005, 48:1147-1153.
- [7519] SIEGEL R, NAISHADHAM D and JEMAL A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* 2012, 62:10-29.
- [7520] RUSSO J, TAIT L, RUSSO IH. Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. III The cell of origin of rat mammary carcinoma. *Am. J. Pathol.* 1983, 113:50-66.
- [7594] TANEJA P, MAGLIC D, KAI F, ZHU S, KENDIG RD, FRY EA, INOUE K. Classical and novel prognostic markers for breast cancer and their clinical significance. *Clinical Medicine Insights: Oncology* 2010, 4:15-34.
- [7595] YERUSHALMI R, WOODS R, RAVDIN PM, HAYES MM, GELMON KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010, 11:174-183.
- [7596] PYLAYEV-GUPTA Y, GRABOCKA E, BAR-SAGI D. RAS weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer* 2011, 11:761-774.
- [7597] ROUZAULT A and NOTARIO V. Alternative promoter usage and mRNA splicing in the regulation of the expression of the PCPH gene. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 2011, 42:492.
- [7598] RECIO JA, PAEZ JG *et al.* Both normal and transforming PCPH proteins have guanosine diphosphatase activity but only the oncoprotein cooperates with ras in activating extracellular signal-regulated kinase ERK1. *Cancer Res.* 2000, 60:1720-1728.
- [7602] RAKHA EA, REIS-FILHO JS, BAEHNER F, DABBS DJ, DECKER T, EUSEBI V, FOX SB, ICHIHARA S, JACQUEMIER J, LAKHANI SR, PALACIOS J, RICHARDSON AL, SCHNITT SJ, SCHMITT FC, TAN PH, TSE GM, BADVE S, ELLIS IO. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Research*, 2010, 12:207.
- [7603] WHO Classification of tumours of the breast. Edited by Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van der Vijver MJ. World Health Organization. Classification of tumours. International Agency for Research on Cancer (IARC). Lyon, 2012, 4th edition.
- [7604] PATEY DH and SCARFF RW. The portion of histology in the prognosis of carcinoma of the breast. *Lancet* 1928, 1:801-804.
- [7605] RAKHA EA, EL-SAYED ME, LEE AH, ELSTON CW, GRAINGE MJ, HODI Z, BLAMEY RW, ELLIS IO. Prognostic significance of Nottingham histological grade in invasive breast carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2008, 26:3153 - 3158.
- [7606] Pathology Reporting of Breast Disease: A Joint Document Incorporating the Third Edition of the NHS Breast Screening Programme's Guidelines for Pathology Reporting in Breast Cancer Screening and the Second Edition of the Royal College of Pathologist Minimum Database for Breast Cancer Histopathology. Sheffield: NHS Cancer Screening Programmes and the Royal College of Pathologists. January 2005.
- [7607] SUNDQUIST M, THORSTENSON S, BRUDIN L, NORDENSKJOLD B. Applying the Nottingham Prognostic Index to a Swedish Breast Cancer Population. South East Swedish Breast Cancer Study Group. *Breast Cancer Research Treat.* 1999, 53:1-8.
- [7608] WALKER RA. Prognostic and Predictive Factors in Breast Cancer. 1st edition. New York: Informa Health Care, 2003.
- [7609] HENSON DE, RIES L, FREEDMAN LS, CARRIAGA M. Relationship among outcome, stage of disease and histologic grade for 22.616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. *Cancer* 1991, 68:2142-2149.
- [7610] DERMEDT C, HAIBE-KAINS B, WIRAPATI P, BUYSE M, LARSIMONT D, BONTEMPI G, DELORENZI M, PICCART M, SOTIRIOU C. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin. Cancer Res.* 2008, 14:5158-5165.

BIBLIOGRAFÍA

- [7611] GALEA NH, BLAMEY RW, ELSTON CE and ELLIS IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1992, 22:207-219.
- [7612] GOLDBIRSCHE A, INGLE JN, GELBER RD *et al.* Thresholds for therapies: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol*, 2009, 20:1319-1329.
- [7613] SOTIRIOU C, WIRAPATI P, LOI S *et al.* Gene expression profiling in breast cancer : understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2006, 98:262-272.
- [7614] MORRISSON BJ, SCHMIDT CW, LAKHANI SR, REYNOLDS BA, LÓPEZ JA. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2008, 10:210.
- [7615] SIMS AH, HOWELL A, HOWELL ST, CLARKE RB. Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2007, 4:516-525.
- [7616] RUDEL RA, FENTON SE, ACKERMAN JM, EULING SY, MAKRIS SL. Environmental exposures and mammary gland development: state of the science, public health implications, and research recommendations. *Environ. Health Perspect.* 2011, 119:1053-1061.
- [7618] LI XF, LIN YS, KINSEY-JONES JS, O'BYRNE KT. High-fat diet increases LH pulse frequency and kisspeptin-neurokinin B expression in puberty-advanced female rats. *Endocrinology* 2012, 153:4422-4431.
- [7619] PINILLA L, AGUILAR E, DIEGUEZ C MILLAR RP, TENA-SEMPERE M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 2012, 92:1235-1316.
- [7620] DA SILVA FARIA T, DA FONTE RAMOS C, SAMPAIO FJB. Puberty onset in the female offspring of rats submitted to protein or energy restricted diet during lactation. *J. Nutr. Biochem.* 2004, 15:123-127.
- [7621] IWASA T, MATSUZAKI T, MURAKAMI M, FUJISAWA S, KINOCHI R, GERELTSETSEG G, KUWAHARA A, YASUI T, IRAHARA M. Effects of intrauterine undernutrition on hypothalamic kiss1 expression and the timing of puberty in female rats. *J. Physiol.* 2010, 588.5:821-829.
- [7624] EVANS RM, BARISH GD, WANG YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* 2004, 10:355-361.
- [7625] MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA, GARCÍA-ARELLANO A, TOLEDO E *et al.* (21 authors). A 14-item Mediterranean diet assessment tool and obesity indexes among high-risk subjects: the PREDIMED trial. *PlosONE*, 2012, 7:e43134.
- [7627] PARSA P and PARSA B. Effects of reproductive factors on risk of breast cancer: a literature review. *Asoc. Pac. J. Cancer Prev.* 2009, 10:545-550.
- [7628] HALÁSZ B, KÖVES K, MOLNÁR J, BALIKA K, STOLL V, KOVÁCS G. Hypothalamus and puberty. *Brain Res. Bull.* 1988, 20:709-712.
- [7629] MAEDA KI, OHKURA S, UENOYAMA Y, WAKABAYASHI Y, OKA Y, TSUKAMURA H, OKAMURA H. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res.* 2010, 1364:103-115.
- [7630] SANTORO N, FILICORI M, CROWLEY WF. Hypogonadotropic disorders in men and women: diagnosis and therapy with pulsatile gonadotropin-releasing hormone. *Endocr. Rev.* 1986, 7:11-23.
- [7631] KELCH RP, HOPWOOD NJ, SAUDER S, MARSHALL JC. Evidence for decreased secretion of gonadotropin-releasing hormone in pubertal boys during short-term testosterone treatment. *Pediatr. Res.* 1985, 19:112-117.
- [7632] BELCHETZ PE, PLANT TM, NAKAI Y, KEOGH EJ, KNOBIL E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 1978, 202:631-633.
- [7633] TERASAWA E, KURIAN JR, GUERREIRO KA, KENEALY BP, HUTZ ED, KEEN KL. Recent discoveries on the control of gonadotrophin-releasing hormone neurones in nonhuman primates. *J. Neuroendocrinol.* 2010, 22:630-638.
- [7634] SISK CL, RICHARDSON HN, CHAPPELL PE, LEVINE JE. In vivo gonadotropin-releasing hormone secretion in female rats during peripubertal development and on proestrus. *Endocrinology* 2001, 142:2929-2936.
- [7635] IRWING MS, FRALEY GS, SMITH JT, ACOHIDO BV, POPA SM, CUNNINGHAM MJ, GOTTSCH ML, CLIFTON DK, STEINER RA. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of kiss-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 2004, 80:264-272.
- [7636] MUIR AI, CHAMBERLAIN L, ELSHOURBAGY NA *et al.* (23 authors). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide kiss-1. *J. Biol. Chem.* 2001, 276:28969-28975.
- [7637] OJEDA SR, LOMNICZI A, SANDAU US. Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. *J. Neuroendocrinol.* 2008, 20:732-742.
- [7639] CLARKSON J, BOON WC, SIMPSON ER, HERBISON AE. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology* 2009, 150:3214-3220.

BIBLIOGRAFÍA

- [7648] SMITH JT, CUNNINGHAM MJ, RISSMAN EF, CLIFTON DK, STEINER RA. Regulation of *kiss1* gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 2005, 146:3686-3692.
- [7653] CHRISTIAN CA and MOENTER SM. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr. Rev.* 2010, 31:544-577.
- [7656] AHIMA RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity* 2006, 5:242S-248S.
- [7671] RUSSO J and RUSSO IH. Development of the human breast. *Maturitas* 2004, 49:2-15.
- [7672] POLLÁN M, PASTOR-BARRIUSO R, ARDANAZ E *et al.* (28 authors). Recent changes in breast cancer incidence in Spain, 1980-2004. *J. Natl. Cancer Inst.* 2009, 101:1584-91.
- [7673] BORRÀS J, AMEIJIDE A, VILARDELL L, VALLS J, MARCOS-GRAGERA R and IZQUIERDO A. Trends in cancer incidence in Catalonia, 1985-2002. *Med. Clin. (Barc.)* 2008, 131Suppl1:11-18.
- [7674] MARCOS-GRAGERA R, CARDÓ X, GALCERAN J, RIBES J, IZQUIERDO A and BORRÀS J. Cancer incidence in Catalonia, 1998-2002. *Med. Clin. (Barc.)* 2008, 131Suppl1:04-10.
- [7675] TERRY PD and ROHAN TE. Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2002, 11:953-971.
- [7676] GRAY J, EVANS N, TAYLOR B, RIZZO J, WALKER M. State of the evidence. The connection between breast cancer and the environment. *Int. J. Occup. Environ. Health* 2009, 15:43-78.
- [7677] DIVISI D, DI TOMMASO S, SALVEMINI S, GARRAMONE M, CRISCI R. Diet and cancer. *Acta Biomed.* 2006, 77:118-123.
- [7678] BRODY JG and RUDEL RA. Environmental pollutants and breast cancer. *Environ. Health Perspect.* 2003, 111:1007-1019.
- [7679] CABARAVDIC M. Xenoestrogen effects of chemical compounds: influence on the breast cancer. *Med. Arch.* 2006, 60(Suppl.):97-100.
- [7681] QIN XY, ZAHA H, NAGANO R, YOSHINAGA J, YONEMOTO J and SONE H. Xenoestrogens down-regulate aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 mRNA expression in human breast cancer cells via an estrogen receptor alpha-dependent mechanism. *Toxicol. Lett.* 2011, 206:152-157.
- [7682] ARTANDI SE and DEPINHO RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 2010, 31:9-18.
- [7683] FREED-PASTOR WA and PRIVES C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev.* 2012, 26:1268-1286.
- [7684] NELSON BH. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol. Rev.* 2008, 222:101-116.
- [7685] FERRONE C and DRANOFF G. Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. *J. Clin. Oncol.* 2010, 28:4045-4051.
- [7686] BINDEA G, MLECNIK B, FRIDMAN WH, PAGÈS F, GALON J. Natural immunity to cancer in humans. *Curr. Opin. Immunol.* 2010, 22:215-222.
- [7687] LYNCH HT, SNYDER C, LYNCH J. Hereditary breast cancer: practical pursuit for clinical translation. *Ann. Surg. Oncol.* 2012, 19:1723-1731.
- [7688] LEE EYHP and MULLER WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010, 2:a003236.
- [7692] WILLET WC. Dietary fat and breast cancer. *Toxicol. Sci.* 1999, 52:S127-S146.
- [7693] YANG L, PANG Y, MOSES HL. TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 2010, 31:220-227.
- [7694] SHIELDS JD, KOURTIS IC, TOMEI AA, ROBERTS JM, SWARTZ MA. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science* 2010, 328:749-752.
- [7695] DE NARDO DG, ANDREU P, COUSSENS LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 2010, 29:309-316.
- [7696] QIAN BZ and POLLARD JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010, 141:39-51.
- [7697] KARNOUB AE and WEINBERG RA. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis.* 2006-2007, 26:75-85.
- [7698] DeBERARDINIS RJ, LUM JJ, HATZIVASSILIOU G, THOMPSON CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008, 7:11-20.
- [7699] HSU PP and SABATINI DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 2008, 134:703-707.

BIBLIOGRAFÍA

- [7700] JONES RG and THOMPSON CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 2009, 23:537-548.
- [7701] DIGIOVANNI J and JUCHAU MR. Biotransformation and bioactivation of 7,12-dimethylbenz[α]anthracene (7,12-DMBA). *Drug Metab. Rev.* 1980, 11:61-101.
- [7792] ROUZAUT A, RECIO JA, NOTARIO V. Expression of the protein product of the PCPH proto-oncogen in human tumor cell lines. *Radiat. Res.* 2001, 155:181-187.
- [7793] BLÁNQUEZ MJ, REGADERA J, MARINO J, NEWMAN RE, NOTARIO V. Gradual deregulation and loss of PCPH expression in the progression of human laryngeal neoplasia. *Mol. Carcinog.* 2002, 35:186-195.
- [7794] REGADERA J, BLÁNQUEZ MJ, GONÁLEZ-PERAMATO P, NOTARIO V. PCPH expression is an early event in the development of testicular germ cell tumors. *Int. J. Oncol.* 2006, 28:595-604.
- [7795] VILLAR J, ARENAS MI, MACCARTHY CM, BLÁNQUEZ MJ, TIRADO OM, NOTARIO V. PCPH/ENTPD5 Expression Enhances the Invasiveness of Human Prostate Cancer Cells by a Protein Kinase CD-Dependent Mechanism. *Cancer Res.* 2007, 67:10859-10868.
- [7893] OZER E, SIS B, OZEN E, SAKIZLI M, CANDA T, SARIOĞLU S. BRCA1, c-erbB-2, and H-ras gene expressions in young women with breast cancer. An immunohistochemical study. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2000, 8:12-18.
- [7894] GÖHRING UJ, SCHÖNDORF T, KIECKER VR, BECKER M, KURBACHER C, SCHARL A. Immunohistochemical detection of H-ras protooncogene p21 indicates favorable prognosis in node-negative breast cancer patients. *Tumour Biol.* 1999, 20:173-183.
- [7895] SCHÖNDORF T, RUTZEL S, ANDRACK A, BECKER M, HOOPMANN M, BREIDENBACH M, GOHRING UJ. Immunohistochemical analysis reveals a protective effect of H-ras expression mediated via apoptosis in node-negative breast cancer patients. *Int. J. Oncol.* 2002, 20:273-277.
- [7896] AGNANTIS NJ, APOSTOLIKAS NA, ZOLOTAS VG, SPANDIDOS DA. Immunohistochemical detection of ras p21 oncogene in breast cancer imprints. *Acta Cytol.* 1994, 38:335-340.
- [7897] AGNANTIS NJ, PARISSI P, ANAGNOSTAKIS D, SPANDIDOS DA. Comparative study of Harvey-ras oncogene expression with conventional clinicopathologic parameters of breast cancer. *Oncology* 1986, 43:36-39.
- [7898] SACCANI JOTTI G, MONTANESI M, BOMBARDIERI E, GABRIELLI M, VERONESI P, BIANCHI M, BECCHI G, BOGNI A, TARDINI A. Preliminary study on oncogene product immunohistochemistry (c-erbB-2, c-myc, ras p21, EGFR) in breast pathology. *Int. J. Biol. Markers* 1992, 7:35-42.
- [7899] WATSON DM, ELTON RA, JACK WJ, DIXON JM, CHETTY U, MILLER WR. The H-ras oncogene product p21 and prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1991, 17:161-169.
- [7900] WALKER RA and WILKINSON N. p21 ras protein expression in benign and malignant human breast. *J. Pathol.* 1988, 156:147-153.
- [7901] SPAVENTI R, KAMENJICKI E, PECINA N, GRAZIO S, GRAZIO S, PAVELIC J, KUSIC B, CVRTELA D, DANILOVIC Z, SPAVENTI S et al. (más de 10 autores). Immunohistochemical detection of TGF- α , EGF-R, c-erbB-2, c-H-ras, c-myc, estrogen and progesterone in benign and malignant human breast lesions: a concomitant expression. *In Vivo* 1994, 8:183-189.
- [7902] GOING JJ, ANDERSON TJ, WYLLIE AH. Ras p21 in breast tissue: associations with pathology and cellular localization. *Br. J. Cancer* 1992, 65:45-50.
- [7903] SOMLO G, CHU P, FRANKEL P, YE W, GROSHEN S, DOROSHOW JH, DANENBERG K, DANENBERG P. Molecular profiling including epidermal growth factor receptor and p21 expression in high-risk breast cancer patients as indicators of outcome. *Ann. Oncol.* 2008, 19:1853-1859.
- [7904] CLAIR T, MILLER WR, CHO-CHUNG YS. Prognostic significance of the expression of a ras protein with a molecular weight of 21.000 by human breast cancer. *Cancer Res.* 1987, 47:5290-5293.
- [7913] YU K, LEE CH, TAN PH, HONG GS, WEE SB, WONG CY, TAN P. A molecular signature of the Nottingham prognostic index in breast cancer. *Cancer Res.* 2004, 64:2962-2968.
- [7914] LU X, WANG ZC, IGLEHART JD, ZHANG X, RICHARDSON AL. Predicting features of breast cancer with gene expression patterns. *Breast Cancer Res. Treat.* 2008, 108:191-201.
- [7977] GARCÍA-FLORES AF, RANIERO L, CANEVARI A, JALKANEN KJ, BITAR A, MARTINHO HA, MARTIN AA. High-wavenumber FT-Raman spectroscopy for in vivo and ex vivo measurements of breast cancer. *Theoretical Chemistry Accounts* 2012, 130:1231-1238.
- [7978] AL-AKHRAS MA, ALJARRAH K, AL-KHATEEB H, JARADAT A, AL-OMARI A, AL-NASSER A, MASADEH MM, AMIN A, HAMZA A, MOHAMMED K, AL OLAMA M, DAOUD S. Introducing Cichorium Pumulium as a potential therapeutical agent against drug-induced benign breast tumor in rats. *Electromagn. Biol. Med.* 2012, 31:299-309.

BIBLIOGRAFÍA

[7979] PETERSON NC, SERVINSKY MD, CHRISTIAN A, PENG Z, QIU W, MANN J, DICELLO J, HUSO DL. Tamoxifen resistance and Her2/neu expression in an aged irradiated rat breast carcinoma model. *Carcinogenesis* 2005, 26:1542-1552.

[7981] KAKEHASHI A, TAGO Y, YOSHIDA M, SOKUZA Y, WEI M, FUKUSHIMA S, WANIBUCHI H. Hormonally active doses of isoflavone aglycones promote mammary and endometrial carcinogenesis and alter the molecular tumor environment in Donryu rats. *Toxicol. Sci.* 2012, 126:39-51.