

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA**



**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**TESIS DOCTORAL:**

**“ACIDO RETINOICO Y ACIDOS GRASOS: DOS  
FAMILIAS DE NUTRIENTES MODULADORES DE  
ALGUNAS PROPIEDADES TUMORALES DE LINEAS  
CELULARES HUMANAS EN CULTIVO”**

**Bióloga Patricia Liliana Quiroga**

**Córdoba, 2011.**

**Director de Tesis:**

**Prof. Dr. Aldo Renato Eynard**

**Comisión de Tesis:**

**Prof. Dra. Mirta Ana Valentich**

**Prof. Dra. Norma Pilnik**

*“La Facultad de Ciencias Médicas no se hace solidaria  
con las opiniones de esta Tesis”*

(Art. 28 del reglamento para la Carrera de  
Doctorado en Ciencias de la Salud, RHCD 53/02 y RHCS 195/02)

Dedico este trabajo a mis amores, a quienes  
amo profundamente para

José Ignacio,  
María Sol  
y Edgardo

## AGRADECIMIENTOS

- A mi esposo Edgardo por su acompañamiento y afecto en todo momento.
- A mis hijos por todo su cariño, su infinita paciencia, por tratar de entender esto que quería hacer mamá y ser motores en la vida.
- A mi director Prof. Dr. Aldo R Eynard, por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo, alentarme a continuar, por todo su apoyo y afecto.
- A la Dra. Norma Pilnik por sus valiosos y oportunos aportes y su calidez.
- A la Prof. Dra. Mirta A Valentich, por todo su profesionalismo, sus ideas, su constante cariño y su señalamiento del camino adecuado. Muchas gracias Mirta.
- Al Dr. Damián Maestri por colaborar en el procesamiento de las muestras de Cromatografía de Gas y sus excelentes aportes.
- Al Dr. Gastón Repposi y al Médico Ernesto Grasso por compartir tantos conocimientos tecnológicos, tantas charlas científicas pero no por eso menos divertidas y su buena predisposición en la colaboración para resolver diferentes situaciones. Aprendí mucho de Uds.!!

- A la Dra. Guillermina Bongiovanni por sus profundas enseñanzas que ella hizo tan fáciles y naturales, su voto de confianza desde el principio y su amistad.

- A la Prof. Dra. Eugenia Pasqualini por su asesoramiento en las muestras de cromatografía de Alta definición (HPLC) y tantos años de amistad y alegría. Por su ejemplo de constancia y perseverancia. ¡Muchas Gracias, Euge !!!.

- A mis compañeras de la vida... Sonia, Alejandra, Daniela, Susana. Por su cariño constante, compartir tantas cosas y alentarnos mutuamente a continuar...

- A mi querida amiga Vilma...siempre estás, gracias.

...Y por supuesto ... a vos, a vos mi querido amigo!!!... que ayudaste desde el inicio a que este camino de aprendizaje fuese interesante, alegre y optimista. Por tus aportes científicos, personales y tu acompañamiento. Al Dr. Elio Soria por mostrar que el cariño, la calidez y la excelencia pueden estar juntos... te quiero mucho...

- Mi reconocimiento a todos aquellos compañeros del IBC y de la Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología, pasados y presentes, que hicieron posible a través de consejos y momentos compartidos la realización de este trabajo.

INDICE	
RESUMEN .....	8
ABSTRACT .....	9
1. INTRODUCCION.....	10
1.1. CANCER.....	10
1.2. CANCER DE MAMA .....	14
1.3. ACIDO RETINOICO (vitamina A) .....	17
1.3.1. Ingesta y Metabolismo .....	20
1.3.2. Mecanismo de acción del Acido Retinoico .....	21
1.4. LIPIDOS Y TUMORIGENESIS.....	24
1.5. PEROXIDACION LIPIDICA.....	28
1.5.1. Mecanismos de Acción de los Ácidos Grasos orientados a esta Tesis.....	30
1.6. MARCADORES CELULARES .....	31
1.6.1. DEL CITOESQUELETO .....	31
1.6.2. DE MEMBRANA CELULAR .....	34
HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....	35
2. MATERIALES Y METODOS.....	36
2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	36
2.2. MATERIALES .....	36
2.3. CULTIVOS CELULARES .....	37
2.4. METODOS.....	38
Morfología .....	38
Lípidos totales de membrana.....	38
Determinación de proliferación celular.....	39
Dienos Conjugados (DC).....	39
Determinación de proteínas .....	40
Gamma Glutamyl Transpeptidase (GGTP).....	40
Determinación de metabolitos del ácido araquidónico (AA) y ácido linoleico (LA)	40
Expresión de E-cadherina por Western-Blot (WB).....	41
Inmunocitoquímica (ICQ) para E-cadherina y actina .....	42
2.5. Análisis Estadístico .....	42
3. RESULTADOS.....	44
3.1. Estudio de la diferenciación celular tras 24 horas de tratamiento.....	44
3.1.1. Perfil cromatográfico de ácidos grasos.....	44
3.1.2. Expresión de E-cadherina .....	46
3.1.3. Distribución de microfilamentos (actina) .....	49
3.2. Estudio del estrés celular tras 48 horas de tratamiento.....	52
3.2.1. Formación de dienos conjugados.....	52
3.2.2. Formación de eicosanoides.....	54
3.2.3. Actividad específica de $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa .....	57
3.3. Estudio de la viabilidad celular tras 72 horas de tratamiento .....	58
3.3.1. Viabilidad celular .....	58
3.3.2. Hallazgos citológicos .....	60
4. DISCUSION .....	63
CONCLUSIONES.....	77
GLOSARIO.....	78
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	79
ANEXO .....	103

## RESUMEN

Estudios epidemiológicos y experimentales indican que el ácido retinoico solo por un lado y ácidos grasos insaturados por el otro, ejercen un rol modulador de algunas propiedades neoplásicas. Sin embargo la literatura sobre la importancia de la acción conjunta de estas familias de nutrientes es escasa. Por lo tanto nuestro propósito fue evaluar dicha acción conjunta sobre varios parámetros neoplásicos. Para ello utilizamos dos líneas celulares de mama tumorales humanas en cultivo (MCF-7 y ZR75-1) a las que le agregamos ácido retinoico (RA= ATRA) sólo o combinado con ácidos grasos de distintas familias, dos de ellos esenciales como son: el  $\omega$ -6 (GLA: 18:3, ácido gamamalinoleico) y el  $\omega$ -3 (EPA:20:5, ácido eicosapentaenoico) y otra familia  $\omega$ -9 con los ácidos grasos no esenciales (OA: 18:1, ácido oleico y ETA:20:3, ácido eicosatrienoico). Las células en cultivo fueron tratadas en las condiciones anteriormente mencionadas por 24 y 72hs para luego realizar estudios de evaluación de diferentes parámetros: proliferación y diferenciación celular (E-caderina/actina), de incorporación de lípidos (Cromatografía de Gas), del grado de peroxidación lipídica (evaluación de algunos eicosanoides y dienos conjugados) y de estrés celular (enzima GGTP). El perfil de ácidos grasos de las células cultivadas mostró una relación positiva entre el aporte exógeno y la incorporación de ácidos grasos. Si bien el ácido retinoico fue capaz de inducir diferenciación en una de las líneas de células tumorales, no fue capaz por sí solo de inducir estrés celular, lo que se tradujo en un efecto más atenuado para inducir apoptosis, comparado con los tratamientos conjuntos a diversos AGs. Entre los ácidos grasos de mayor interés en nuestro estudio la oferta exógena de los ácidos grasos de la familia  $\omega$ -6 (GLA) resultó menos concluyente. En cambio los ácidos grasos de las familias  $\omega$ -3 y  $\omega$ -9 indujeron efectos más notorios en los parámetros de diferenciación y estrés celular. En tal sentido, EPA ( $\omega$ -3) fue capaz de potenciar el efecto diferenciador del ácido retinoico. Más aún, promovió en las células la susceptibilidad al estrés, potenciando así sinérgicamente el efecto antitumoral del ácido retinoico. Por su lado, los AGs de la familia  $\omega$ -9 (OA, ETA), mostraron predominantemente efectos pro-oxidantes y citotóxicos. Este estudio muestra que el uso de ácido retinoico conjunto a ciertos AGs, principalmente los provenientes de las familias  $\omega$ -3 y  $\omega$ -9, tendrían un interesante potencial antineoplásico.



## ABSTRACT

Epidemiological and experimental studies indicate that retinoic acid and fatty acids exert separately a modulating role on some neoplastic properties. Nonetheless, literature about the relevance of the summing action of these nutritional families is scarce. Thus, our purpose was to evaluate that synergy over different tumor parameters. Two cellular lines of human mammary cancer were cultured (MCF-7 and ZR-75-1) with retinoic acid (RA=ATRA) alone or combined with fatty acids from different families, two of them essential:  $\omega$ -6 (GLA: 18:3, gamma-linoleic acid) and  $\omega$ -3 (EPA:20:5, eicosapentaenoic acid), and a non-essential one:  $\omega$ -9 (OA: 18:1, oleic acid, ETA:20:3, eicosatrienoic acid). Cells were treated under the mentioned conditions for 24-72 hours in order to study cellular differentiation (E-cadherin, actin) and proliferation, lipid intake (gas chromatography), lipo-peroxidation (eicosanoids, conjugated dienes) and cellular stress (GGTP enzyme). The fatty acid profile of cells showed a positive relation between the exogenous administration and the corresponding intake. Although RA was able to induce differentiation in one of the cellular lines (ZR-75-1, undifferentiated strain), it was not able to induce stress by its own with a moderate apoptotic effect, which was enhanced by fatty acids. Among the studied fatty acids,  $\omega$ -6 (GLA) was less conclusive. In contrast,  $\omega$ -3 and  $\omega$ -9 families (EPA and OA/ETA, respectively) induced more notorious effects related to cellular differentiation and stress. In this sense, EPA could potentiate the RA differentiating effect. Moreover, it sensitized cells to stress, enhancing synergically the retinoic antitumor capacity. Whereas, OA and ETA predominantly exhibited pro-oxidant and cytotoxic effects. This Thesis shows that the simultaneous use of retinoic acid and certain unsaturated fatty acids, mainly from  $\omega$ -3 and  $\omega$ -9 families, could have an interesting antineoplastic potential.

## **1. INTRODUCCION**

### **1.1. CANCER**

El cáncer constituye la segunda causa de muerte en el "mundo occidental" después de las enfermedades cardiovasculares. Si bien la palabra cáncer involucra un grupo de enfermedades neoplásicas que poseen como característica fundamental común la división descontrolada de células atípicas, las manifestaciones patológicas de cada una de ellas es sumamente pleomórfica, tanto desde el punto de vista etiopatogénico como clínico y epidemiológico.

El cáncer se desarrolla mediante un proceso de multietapas a saber: iniciación, promoción, progresión y metástasis (5, 16, 136). El proceso denominado iniciación involucra un daño genético irreversible o no reparable que resulta en mutaciones del ADN en las células somáticas. Para que se desencadene un cáncer clínicamente detectable son necesarias varias mutaciones. Esto explica por qué la incidencia de esta enfermedad aumenta con la edad, hecho que recientemente hemos observado en la población de Córdoba (41). Si el cáncer se produce por una acumulación de mutaciones, cuanto más tiempo se extiende la vida, más probable es que se desarrolle un cáncer. Pocos cánceres pueden ser atribuidos a un único factor o a una simple exposición al mismo agente cancerígeno. Al contrario, la mayoría se deben al resultado de la confluencia, por casualidad, de varios accidentes moleculares independientes cuyos efectos son acumulativos en una determinada célula blanco.

Durante la etapa de promoción, las células que han mutado y han podido sobrevivir a dicha mutación son las que proliferan formando agrupaciones celulares preneoplásicas que pueden permanecer en ese estado durante muchos años. Eventualmente, escapan de los controles que normalmente

limitan su división y comienzan a proliferar sin control progresando a lesiones neoplásicas e invadiendo tejidos vecinos. Finalmente, pueden producir metástasis desarrollando el tumor en otros órganos (23, 170).

De este modo, predomina la asunción que los diferentes cánceres se originan a partir de una célula única que suma múltiples mutaciones en su ADN (genotipo), y se transforma hacia un fenotipo maligno, dando lugar a un clon de células, que forma la masa tumoral neoplásica. A principios de la década del 50, los principales investigadores en carcinogénesis experimental y epidemiológica llegaron a la conclusión que, visto las variaciones geográficas, la incidencia del cáncer humano está muy relacionada con factores del ambiente (13). Pero a su vez la carga genética juega un papel sustantivo en esta enfermedad (63). Se conoce que las características hereditarias de los organismos están codificadas en el ADN. La expresión de éste ADN (genes) puede ser alterada ya que continuamente está expuesto a daños a partir de productos del metabolismo intracelular normal, como reacciones al oxígeno, radicales hidroxilos y peróxidos de hidrógenos, así como también daños a partir de factores externos, exposición a luz ultravioleta y otros factores ambientales donde también se incluyen alimentos, nutrición y actividad física. El concepto de factor ambiental no solo incluye la eventual presencia de carcinógenos químicos, físicos y/o virales, xenobióticos o pesticidas sino también a condicionantes asociados con determinados estilos de vida presentes tanto en los hábitos dietarios como en costumbres y prácticas culturales, que actúan previniendo, induciendo y/o promoviendo el desarrollo de procesos neoplásicos (29). Así, la influencia del ambiente, en su sentido más amplio incidirá significativamente en el riesgo de desarrollar, o no, determinados tumores a lo largo de la vida de los seres humanos, expresándose usualmente en la edad madura y senectud. Estos cambios en la expresión de genes modulados por factores externos sin que se produzcan cambios en la secuencia del ADN es lo que se conoce como modulación "epigenética".

Entonces, los constituyentes dietarios pueden contribuir a la modulación epigenética en las regiones promotoras del ADN (metilación del ADN) ya sea en células normales como en células malignas (135). Los oncogenes y los genes supresores de tumores están presentes en todas las células. En el cáncer, es frecuente que ambos genes hayan mutado, y esas alteraciones pueden contribuir al proceso del cáncer. Es muy importante el efecto combinado de la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumor en la progresión del cáncer. Así, las posibilidades de desarrollarlo están determinadas por la activación o desactivación de ciertos genes, y estos patrones de expresión a su vez están determinados por la epigenética (135).

Algunos componentes dietarios como por ejemplo dietas ricas en los folatos (forma aniónica del ácido fólico) y otros dadores de grupos metilos tales como colina, metionina, son esenciales para la síntesis normal del DNA y la regulación epigenética del mismo. El folato es un importante determinante de la metilación normal. De allí que desbalances o pérdidas de constituyentes dietarios específicos pueden potencialmente aumentar el riesgo de cáncer por inducción de un desequilibrio en los precursores del DNA, llevando a una alteración en la síntesis y reparación del mismo que pueden inducir patrones inadecuados de metilación del DNA con consecuencias en la expresión génica. Estas modificaciones en los sitios promotores del ADN provocan que genes silenciados por largo tiempo comiencen a expresarse (135).

Las diferentes etapas del proceso carcinogénico mencionadas anteriormente pueden ser influidas por factores procarcinógenos y anticarcinógenos, especialmente la etapa de progresión (136), que previamente Beremblum en la década del 50 había propuesto como "iniciación", "promotor" y "antipromotor" (6). Se estima que entre un 80 y 90% del total de muertes por cáncer ha estado relacionado con la dieta y el 35% de todos los

cánceres humanos estarían estrechamente relacionados a causas ambientales, ocupando un papel preponderante la dieta (142). Algunos de los factores exógenos (dieta) y/o los factores endógenos (hormonas) pueden actuar como agentes promotores de modo tal que las células iniciadas (mutadas) progresen hacia un neoplasma. En contraste, otros factores dietarios pueden actuar como protectores aun cuando exista una predisposición genética a generar un determinado tipo de cáncer. Algunas vitaminas, como la vitamina D o el ácido retinoico y micronutrientes actúan como anticarcinógenos, alterando la incidencia de cáncer, la diferenciación y el crecimiento del mismo (120).

Las pérdidas de regulación celular que se presentan en diversos cánceres se deben a daños genéticos inducidos por agentes mutágenos, usualmente poco identificados (145, 174). Las mutaciones afectan genes de manera tal que sus productos estimulan el crecimiento del tejido mediante diferentes caminos, a saber:

- Estimulación excesiva del crecimiento. Esto ocurre cuando genes reguladores normales denominados protooncogenes sufren mutaciones y se transforman en genes anormales conocidos como oncogenes. Muchos de los protooncogenes intervienen en diferentes etapas de ciclo celular por lo que los oncogenes son los responsables de la transformación de una célula normal a una maligna que desarrollará un determinado tipo de cáncer (145).
- La supresión de la inhibición del crecimiento es otro camino que lleva al cáncer. Se produce por una mutación o una delección de un gen supresor. Los genes supresores de tumores se encuentran en las células normales para codificar proteínas con un efecto inhibitorio en la regulación del ciclo celular. Cuando un gen supresor tumoral se altera y origina un gen que es similar a un oncogen, aumentará la probabilidad de que se produzca un tumor (145).

- El ADN dañado puede ser reparado a través de algunas proteínas supresoras de tumores que reparan normalmente el ADN dañado. Existen diferentes mecanismos de reparación previniendo así la acumulación de mutaciones que llevan al cáncer. Si se producen perturbaciones en los genes que codifican estas proteínas, se anulan los sistemas de reparación y esto permite la acumulación de sucesivas mutaciones que pueden llevar al desarrollo de tumores (5, 145).

Existen otras proteínas que controlan la adhesión de las células a un tejido y de éstas a la matriz extracelular como son las variedades de caderinas. Así, cuando la expresión de las mismas no es adecuada las células neoplásicas se desprenden de tumores malignos (54) y pueden viajar hacia otros tejidos y por metástasis, causar nuevos tumores (64, 163)

## 1.2. CANCER DE MAMA

El cáncer de mama es el prevalente entre las mujeres del mundo occidental representando el 31% de todos los tumores de la población femenina y es la principal causa de muerte entre mujeres de 30 a 54 años (). En Córdoba, muestra un comportamiento semejante a otros países de Occidente (41). El aumento del riesgo de cáncer mamario aumenta conjuntamente con la industrialización y el urbanismo. Como se mencionó, el cáncer puede surgir como consecuencia del acúmulo de alteraciones genéticas que interfieren el control normal del crecimiento y diferenciación celular. Estas alteraciones pueden agruparse en: activación de protooncogenes e inactivación de genes supresores de tumores. El gen p53 es el más frecuentemente mutado en todos los cánceres. Es un gen de los denominados supresores del crecimiento tumoral, aunque también puede actuar como oncogen ya que se sabe que la proteína p53 mutante anómala, puede adquirir capacidad de transformación celular por sí misma. Otra función importante es la de intervenir en la reparación del DNA, por lo que se denomina "guardián del genoma". Se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 17 en la

banda 17p 13.15. El gen p53 codifica una fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos y su vida media es inferior a 30 minutos. Cuando se produce un daño en el DNA por sustancias carcinogénicas, radiaciones y otros, el mismo DNA estimula la producción de p53 y esta acumulación nuclear de p53 produce la detención de la célula en fase G1 del ciclo celular, induce la restauración y estimula la apoptosis si no puede repararse el DNA. Otros genes pueden regular la muerte celular programada o apoptosis, evitándola o induciéndola y pueden ser dominantes o recesivos. Entre éstos, son ejemplos de genes antiapoptóticos bcl-2 y bclxS (Hsu y col, 1997). El cociente de los niveles entre los antagonistas de la muerte (bcl-2, bcl-xL) y sus promotores (bax, bad, bcl-xS) determina la forma en que la célula responde a un estímulo apoptótico (28).

La incidencia de cáncer de mama se ha incrementado mucho en el último siglo, existiendo fuertes evidencias que diversos factores ambientales cumplirían un papel importante en el riesgo de padecerla. Así, la alta ingesta de grasas ha recibido especial atención a través de datos sobre la posibilidad de incrementar ó disminuir el riesgo de este mal mediante la simple modificación de hábitos dietarios (4, 132). No solo el alto consumo de grasas sino también el tipo de grasas juegan un papel importante en la carcinogénesis mamaria. Numerosos trabajos han demostrado que la alta ingesta de ciertos lípidos poliinsaturados sería uno de los principales riesgos para el desarrollo del cáncer de mama, en tanto que otros, como se verá luego, ejercerán un rol opuesto junto a la presencia de bajos niveles de antioxidantes. La formación de radicales lipídicos tipo peróxidos, a partir de lípidos poliinsaturados, o de radicales de oxígeno, han sido propuestos como un factor potencial para la promoción de tumores mamarios. Por otro lado, la baja ingesta de antioxidantes, como la vitamina E, el ácido oleico o la vitamina A, potencian la acción procancerígena de una dieta alta en grasas poliinsaturadas (89, 105). Otros autores observaron que ácidos grasos poliinsaturados potencian el efecto tumoricida de éstos sin la presencia de

antioxidantes, como la vitamina E, que actuarían como bloqueadores (32). Ácidos grasos polinsaturados como el gamma linoleico (GLA  $\omega$ -6) actúa sobre las células tumorales sin dañar las células normales produciendo de 2 a 3 veces un incremento en radicales libres y lipoperóxidos. El GLA disminuye el contenido de antioxidantes en células tumorales, la expresión del oncogen- ras pero mejora la actividad de la p53, enzima que actúa protegiendo a las células y tejidos normales de acciones tóxicas de las radiaciones y de drogas anti-cancerígenas. El GLA mejora la acción citotóxica de drogas anticancerígenas impidiendo la resistencia de las células tumorales a las mismas.

Experimentos realizados a partir de 1950 hasta el presente han provisto fuertes evidencias que la vitamina A natural (retinol o sus ésteres de ácidos grasos y precursores como carotenoides) y los análogos sintéticos del retinol, colectivamente conocidos como retinoides, pueden regular la diferenciación celular en una variedad de sistemas experimentales (44, 108). Algunos retinoides son potentes inhibidores de perturbaciones moleculares relacionadas con la transformación neoplásica y otros han ganado importancia como agentes terapéuticos en ciertas enfermedades proliferativas, principalmente las que se asientan en la epidermis (101). La deficiencia de vitamina A en humanos aumenta la susceptibilidad a la carcinogénesis. Así, las células basales de diversos epitelios comienzan a mostrar una marcada hiperplasia junto a una reducción de la diferenciación celular cuando falta esta vitamina. La administración del retinol y de otros retinoides revierte estos cambios en epitelios de glándula mamaria, del tracto respiratorio, de vejiga y piel (146).

Adecuadas o ingestas incrementadas de vitamina A, se han asociado con disminución de cáncer de vejiga, mama, cervix, colorectal, páncreas, próstata, esófago, piel y estómago (140). Se han utilizado estudios experimentales en modelos animales e in vitro para validar éstas



asociaciones y establecer los mecanismos específicos de protección contra la carcinogénesis (158). Mediante estudios epidemiológicos se ha establecido una relación inversa entre los niveles en plasma o ingesta de vitamina A/ $\beta$ -caroteno y desarrollo de diversos tipos de cáncer de mama, pulmón, cabeza y cuello (122)

### 1.3. ACIDO RETINOICO (vitamina A)

La vitamina A es un micronutriente. Los requerimientos diarios en humanos es sólo de 1.5 mg, o 5000 UI, las cuales son cubiertas por una típica dieta occidental (141). La vitamina A y sus metabolitos son vitales para funciones biológicas tales como el desarrollo embrionario, el crecimiento post-natal, la diferenciación celular, la visión, la reproducción y la regulación de la respuesta inmune (121). En este último caso la vitamina A, es efectiva en modular procesos como la activación y proliferación de linfocitos, la diferenciación de células T-Helper, el "homing", especificidad linfocito-tejidos, la producción específica de anticuerpos isotípicos a parte del potencial clínico de los metabolitos de la vitamina A para modular la especificidad de los tejidos en la respuesta inmune y prevenir y/o tratar procesos inflamatorios y autoinmunes (141). El término vitamina A es un término genérico que comprende al retinol, retinal y al ácido retinoico, y también a análogos sintéticos del retinol, conocidos colectivamente como retinoides (retinoides). Los compuestos anteriormente mencionados (retinol, retinal y ácido retinoico) contienen como unidad estructural común un grupo trimethylcyclohexenyl y una cadena de polyene todo trans (all-trans) con cuatro dobles ligaduras. Como se puede observar en la Fig. 1, el retinal y el ácido retinoico son el resultado del metabolismo enzimático del retinol. El ácido retinoico es el metabolito fisiológicamente más activo y si bien la importancia de la vitamina A en la modulación de la visión, es llevada a cabo por retinoides específicos (como el ácido retinoico 11-cis), la

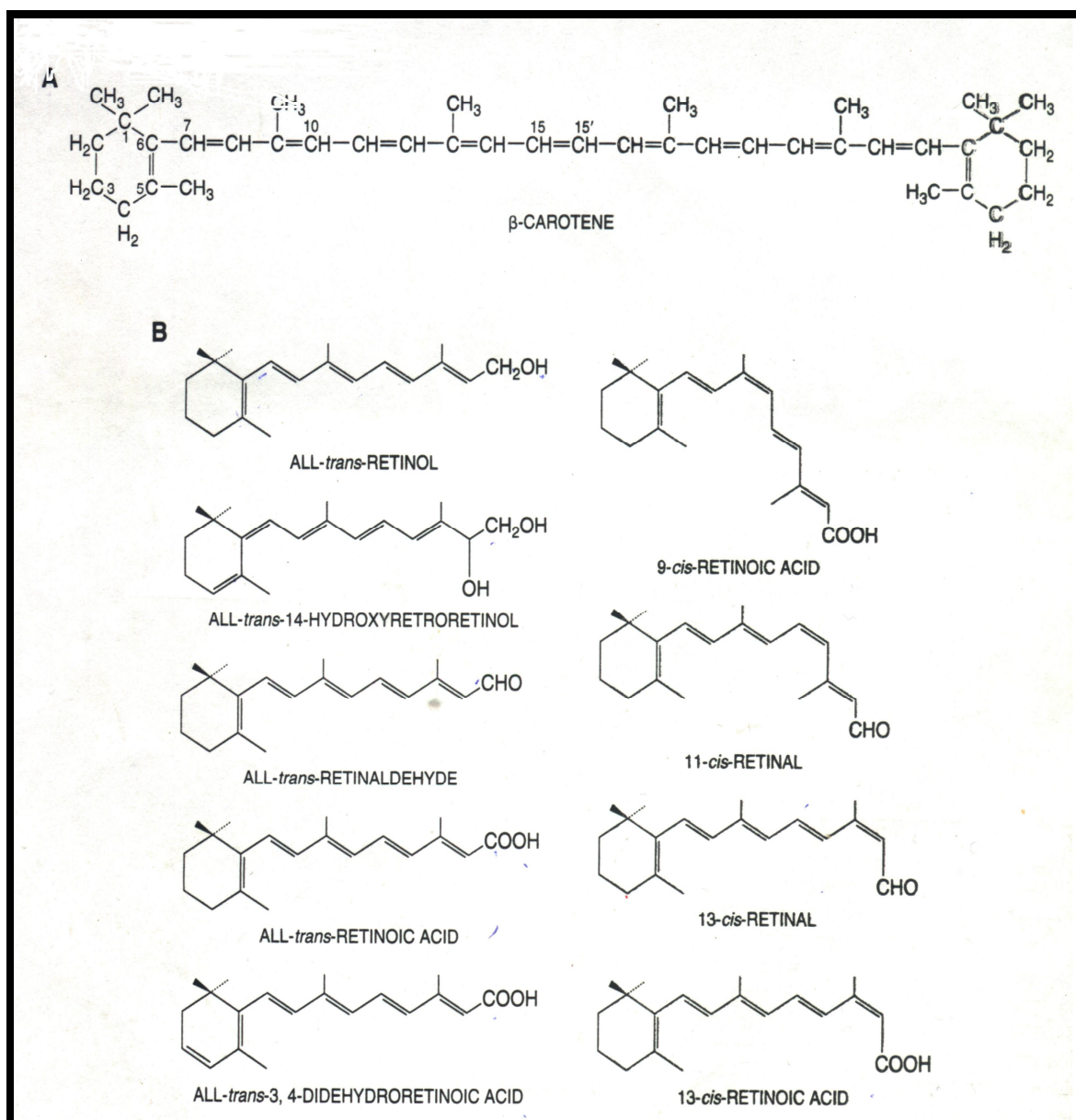
mayoría de las actividades biológicas de la vitamina A en el organismo son mediadas por los isómeros del ácido retinoico.

Los retinoides anteriormente mencionados son importantes en varios procesos fisiológicos pero el exceso de su ingesta puede provocar pérdida de peso y apetito, irritabilidad, disfunciones renales o dolores de huesos y articulaciones (85). El ácido retinoico en su forma all-trans (RA) también conocido como ATRA, se considera la forma más activa de la vitamina A en casi todos los tejidos y es 10 a 100 veces más potente que el retinol en varios sistemas "in vitro" (69). La vitamina A y sus derivados han sido intensamente estudiados como agentes quimiopreventivos y pro-diferenciadores del proceso carcinogénico donde la aplicación del tratamiento con RA se lleva a cabo aumentando la dosis de retinoico endógeno mediante el bloqueo de agentes catabolizadores como la citocromo p450. Wolbach y Howe demostraron que los retinoides son esenciales para la diferenciación y el mantenimiento de los epitelios (17, 175).

Así, la deficiencia dietaria de vitamina A causa alteraciones en la diferenciación, particularmente en los epitelios mucosecretantes simples induciendo una metaplasia, ya que éstos tejidos cambian a un fenotipo pseudo-estratificado. Al mismo tiempo se induce proliferación de células escamosas, citostasis y eventual pérdida de células mucosas (69, 141). Al contrario, la administración de RA provoca el reemplazo de las células escamosas metaplásicas por la diferenciación de nuevas progenies de células mucosecretantes y además re-establece la función epitelial normal (69).

Numerosos estudios epidemiológicos y experimentales dan cuenta de la efectividad del uso terapéutico de los retinoides naturales y sintéticos especialmente en las leucemias promielocíticas agudas (APL en inglés) (3,

30). Estudios clínicos mostraron una alta proporción de pacientes con remisión completa de ésta enfermedad después de un corto período de tratamiento con el ATRA. Sin embargo estas remisiones son breves ya que los pacientes se vuelven clínicamente resistentes al tratamiento, desconociéndose aún la naturaleza de ésta resistencia (133).



**FIGURA 1. Vitamina A y retinoides.**

### 1.3.1. Ingesta y Metabolismo

Más del 90% de la vitamina A de la dieta se obtiene como retinol y retinyl éster, principalmente de alimentos de origen animal tales como el hígado, huevos, leche entera y quesos. Como precursor, los carotenoides, principalmente el  $\beta$ -caroteno, el  $\alpha$ -caroteno y otros provienen de vegetales de hojas verdes, frutas y raíces como zanahorias y batatas (140). Una de las fuentes dietarias de vitamina A es el  $\beta$ -caroteno. La conversión a vitamina A en el organismo se produce a través de dos sistemas enzimáticos denominados carotenooxygenasas: COM1 y COM2. Ambos están presentes en los enterocitos del intestino delgado en humanos. La COM1 pertenece a la familia estructuralmente relacionada con oxigenasas. Esta enzima media la conversión simétrica del  $\beta$  caroteno a vitamina A y es considerada clave para dicha función en mamíferos. Lo transforma en retinilaldeído a través de un clivaje oxidativo central en la doble ligadura entre los carbonos C15'-C15' (95). Ello se produce en toda la variedad de retinoides biológicamente activos, incluidos el 11-cis retinal y el RA. A su vez, la COM2 cataliza un clivaje oxidativo excéntrico de carotenoides (carotenos y licopenos) en la doble ligadura entre los carbonos C9'-C10' (Figura 3) (81,178).

El ácido retinoico all-trans (ATRA), como dijimos, un metabolito natural del retinol, también se forma en los enterocitos a partir del  $\beta$ -caroteno o por el metabolismo del retinol y del retinaldeído. Este proceso involucra a enzimas como las deshidrogenasas (ADH= alcohol deshidrogenasa y AHD=aldeído deshidrogenasa) que requieren la presencia de adenin-dinucleotido-fostato para su posterior incorporación a los quilomicrones (lipoproteínas adsortivas). Posteriormente éstos quilomicrones serán exocitados por los enterocitos (133). Mientras que el retinol es oxidado sólo una vez por éstos complejos enzimáticos para generar retinal (Alcohol deshidrogenasa- ADH), el retinal necesita una doble oxidación (aldeído deshidrogenasa- ALDH) para generar el ácido retinoico. Éste último proceso

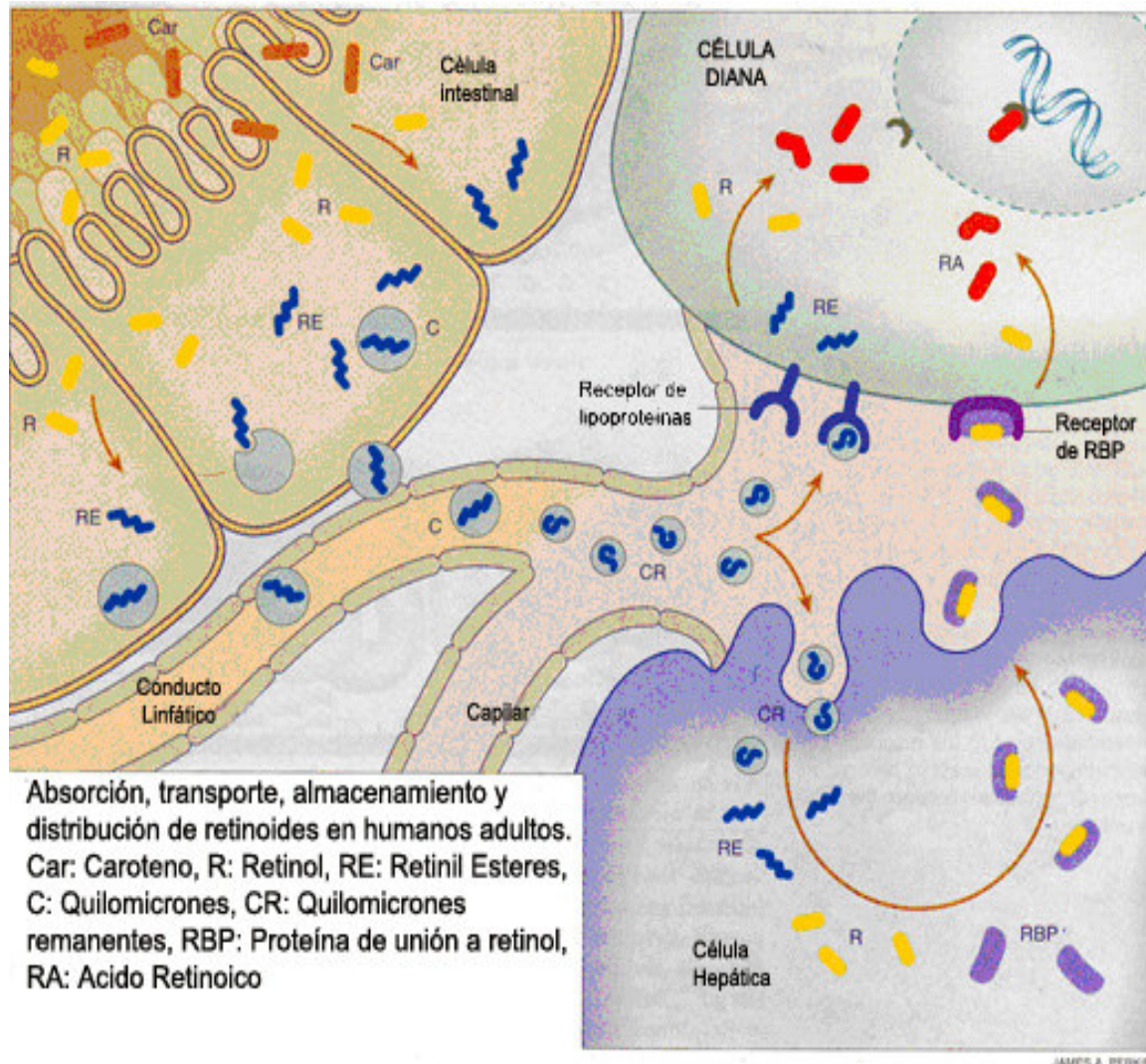
tiene características irreversibles y eventualmente marca la disponibilidad de RA, a través de pasos oxidativos dependientes de la citocromo P450 (69, 133). (Figura 2: Metabolismo de la vitamina A).

A nivel citoplasmático el retinol y el ácido retinoico se unen a dos variedades de proteínas denominadas CRBP (proteína asociada al retinol celular) y proteínas celulares asociadas al ácido retinoico I, II y III (CRABP-I, II y III). Éstas pertenecen a la familia de las pequeñas proteínas citosólicas que se unen a lípidos; ellas realizan la mediación respectivamente del transporte intracelular del retinol y la transferencia del ácido retinoico desde el citoplasma al núcleo celular (176). La CRABP I retiene al RA en el citoplasma y regula su incorporación nuclear, trabajando como un sistema modulado y balanceado. Es interesante que la CRABP II esté sobreexpresada en una amplia variedad de tipos de cáncer tales como neuroblastomas y tumor de Wilm's (68).

### **1.3.2. Mecanismo de acción del Acido Retinoico**

La importancia del RA en la carcinogénesis radica en que puede actuar como supresor de la promoción tumoral a través de diferentes mecanismos celulares como inhibir la proliferación, estimular la diferenciación o inducir la apoptosis (23, 182). Se ha propuesto que el mecanismo de acción del ácido retinoico y de los retinoides en general es mediante la actividad sobre la expresión de genes a través de receptores nucleares de retinoides pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares. Ellos son el receptor del ácido retinoico (RAR) y el receptor de retinoides X (RXR). Cada una de las dos familias está formada a su vez por tres subtipos (alfa, beta y gama) y sus isoformas (131, 147, 153). Ya sea los retinoides (derivados de la vitamina A), el calcitriol (derivado hidroxilado de la vitamina D3) así como las hormonas tiroideas (T3 y T4), son compuestos de naturaleza lipofílica y bajo peso molecular capaces por ende de difundir a través de la membrana

plasmática. Dentro de la célula se convierten en formas biológicamente más activas uniéndose a su receptor nuclear.



**FIGURA: 2 METABOLISMO DE LA VITAMINA A.**

Estos receptores se unen a secuencias específicas de DNA, que se llaman elementos de respuesta a hormona (HRE), actuando como factores de transcripción y regulando directamente la expresión de genes diana específicos. La importancia de estos receptores nucleares radica en la especificidad con que se unen al RA, hallándose una amplia bibliografía

aunque contradictoria, en relación a ese campo (131, 147, 153). Mientras el Receptor del ácido Retinoico (RAR alfa, beta y gamma) se une al compuesto all-trans y al 9- cis ácido retinoico, el RXR (alfa, beta y gamma) tiene preferencia por el ácido retinoico 9-cis y otros retinoides (78). Ambos receptores difieren también en el espectro de proteínas con las cuales ellos pueden interactuar. La actividad funcional de ambos requiere la formación de dímeros con un miembro de la familia de receptores nucleares no esteroideos (78). Mientras el RARs forma un dímero al unirse predominantemente con el RXRs, éste por el contrario, puede interactuar con varios receptores diferentes de significativa función en la proliferación, control de diferenciación y apoptosis celular, indicando su rol maestro en la formación de heterodímeros. Así, se combina con receptores de hormona tiroidea (TRs), receptor de vitamina D (VDR), receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), receptores X de hígado (LXR) y otros. Todos éstos receptores requieren al RXRs como un compañero para formar heterodímeros y así poder regular la transcripción génica (78). La mayoría, sino todos los retinoides deben su acción a la habilidad para alterar esa transcripción (7). Esto es así<sup>4</sup> ya que los receptores RAR y los RXR regulan el mecanismo de transcripción interactuando con los elementos de respuestas específicos (RAREs), ubicados en el ADN, específicamente en sitios promotores de genes diana (7).

La respuesta de los receptores estará definida por la naturaleza de los ligandos, ya que cada receptor de retinoides tiene una única afinidad por retinoides individuales. Los ligandos naturales para los receptores de retinoides son derivados de la vitamina A e incluyen al 13-cis ácido retinoico, al 9-cis y ácido retinoico all-trans (ATRA). A su vez cada receptor una vez unido a su ligando, tiene una respuesta diferente. Así, el RAR $\alpha$  es el receptor dominante que media los efectos del retinoico en la inhibición de la proliferación celular mientras que el RAR $\beta$  es el que media los efectos en proliferación y apoptosis en células cancerosas de mama humana (152).

Por lo anteriormente expuesto podríamos decir que la respuesta celular al ácido retinoico puede estar regulada a varios niveles, como son: a) la cantidad de retinol en sangre, b) la participación de enzimas que convierten el retinol a ácido retinoico, c) la presencia de receptores RAR y RXR, y d) la colaboración de reguladores que interactúan con RAR y RXR.

#### 1.4. LIPIDOS Y TUMORIGENESIS

Como ya se introdujo previamente numerosos trabajos sugieren que existe relación entre el consumo de grasas, tanto en cantidad como en calidad, el desarrollo de ciertos tumores malignos, y los procesos de promoción/antipromoción tumoral (53).

Algunas sustancias clasificadas entre los lípidos poseen una intensa actividad biológica: vitaminas, hormonas y diversos autacoides, como los eicosanoides (34, 130). Estos últimos provienen principalmente de la acción de la enzima delta-6 desaturasa sobre los ácidos grasos polinsaturados.

Los ácidos grasos (AG) son los componentes fundamentales de lípidos neutros y complejos, especialmente los fosfolípidos. Estos últimos son de nuestro particular interés, pues son constituyentes fundamentales en la conformación de la bicapa de todas las membranas celulares. Están constituidos por una cadena hidrocarbonada con un número par de átomos de carbono. Poseen un grupo carboxilo en un extremo y en el otro un grupo metilo terminal. Los ácidos grasos saturados presentan uniones simples entre los carbonos de la cadena, mientras que los insaturados poseen dobles ligaduras. Esta característica, sumada a la variación en el número de átomos de carbono en la cadena, da lugar a la existencia de más de cien ácidos grasos diferentes. Los más abundantes entre los mamíferos poseen entre 14 a 22 carbonos, predominando los de 16 a 18 (11,55).



Los ácidos grasos insaturados pueden ser monoinsaturados si poseen un solo doble enlace, o poliinsaturados si poseen más de dos dobles ligaduras (11). La insaturación confiere a los ácidos grasos características físicas y químicas particulares como poseer menor punto de fusión a mayor número de dobles enlaces, presentar una configuración espacial más rígida que los ácidos grasos saturados debido a la incapacidad de rotación de la doble ligadura, lo que establece la posibilidad de presentar isomería geométrica predominando en la naturaleza los isómeros cis. Dicha rigidez y su bajo punto de fusión otorga, paradójicamente, mayor fluidez a la bicapa de las membranas biológicas. Asimismo son fácilmente oxidables, formando compuestos del tipo peróxidos y pueden hidrogenarse, cualidad aprovechada para la industria de las margarinas (11). Como puede verse en la FIG.3, los ácidos grasos difieren entre sí, por la longitud de su cadena y también por el número y posición de sus dobles enlaces. Se identifican con una notación que indica la longitud de la cadena carbonada y el número y la posición de los dobles enlaces. Así el ácido palmítico (saturado, de 16 carbonos) se representa por 16:0 y el ácido oleico (de 18 carbonos y un doble enlace [cis] en los carbonos 9 y 10 se representa simbólicamente por 18:1  $\omega$ -9 ú  $\omega$ -9. Usaremos en este trabajo la notación omega ( $\omega$ ) aunque a veces se emplea la notación "n", pero que está en progresivo desuso.

Los ácidos grasos saturados más corrientes en los alimentos son el ácido palmítico y el esteárico en tanto que el ácido graso monoinsaturado más común es el ácido oleico. En los mamíferos hay una mezcla de saturados e insaturados que asignan estados de "semifluidos" característicos de cada membrana biológica. En la mayoría de los ácidos grasos poliinsaturados (polienoicos), cuya sigla inglesa es PUFAs (la cual se utilizará en la redacción de este trabajo) los dobles enlaces adicionales están situados, generalmente, entre el doble enlace 9 y 10 y el extremo metilo-terminal de la cadena. En la mayor parte de los PUFAs, los dobles enlaces se hallan separados por un grupo metilo, por ejemplo:  $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$ . Los

dobles enlaces de casi todos los ácidos grasos insaturados que se encuentran en la naturaleza aparecen en configuración geométrica cis y muy pocos poseen configuración trans. De este modo, a menos que se indique lo contrario, los dobles enlaces son cis, ya que es la forma natural en que ingresan con los alimentos y de dicha conformación espacial depende el efecto biológico de los mismos.

Algunos ácidos grasos pueden ser sintetizados por el organismo a partir de carbohidratos o aminoácidos dietarios, mientras que otros deben ser obtenidos mediante su ingesta; son los denominados Ácidos Grasos Esenciales (AGEs) y pertenecen a las familias  $\omega 3$  y  $\omega 6$  (19, 55, 53).

Los AGEs poseen diversas funciones en el organismo, a saber: son requeridos para la estructura normal de las membranas celulares (53, 84), son precursores de eicosanoides (como prostaglandinas, leucotrienos y endocannabinoides) (129) y son necesarios para el transporte del colesterol en el organismo. Además, interaccionan con casi todos los sistemas de segundos mensajeros, regulan la formación de citoquinas y modulan el comportamiento de proteínas de membrana (receptores, canales iónicos y ATPasa) (55).

	Serie n-7	Serie n-9	Serie n-6	Serie n-3
Dieta	Síntesis endógena	Síntesis endógena	Oligoelementos	Oligoelementos
↓	↓	↓	↓	↓
Hidratos de Carbono →	16:0 palmitico	18:0 esteárico	↓	↓
<b>Δ-9-desaturasa</b> →	↓	↓	↓	↓
	16:1 n-7 palmitoléico	18:1 n-9 oleico	18:2 n-6 linoleico	18:4 n-3 α-linolénico
<b>Δ-6-desaturasa</b> →	↓	↓	↓	↓
Elongación →	16:2 n-7 ↓	18:2 n-9 ↓	18:3 n-6-linolénico (GLA) ↓	18:4 n-3 estearidónico ↓
	18:2 n-7	20:2 n-9	20:3 n-6 dihomo-γ-linolénico (DGLA)	20:4 n-3
<b>Δ-5-desaturasa</b> →	↓	↓	↓	↓
Elongación →	18:3 n-7 ↓	20:3 n-9 ↓	20:4 n-6 araquidónico ↓	20:5 n-3 (EPA) ↓
	20:3 n-7	22:3 n-9	22:4 n-6 adrénico	22:5 n-3
<b>Δ-4-desaturasa</b> →	↓	↓	↓	↓
	20:4 n-7	22:4 n-9	22:5 n-6	22:6 n-3 clupanodónico

**Tabla 1.** Cascada de elongación y desturación de los ácidos grasos insaturados de las familias n-7, n-9, n-6, n-3 y los sitios de acción de las desaturasas y elongasas.

Si bien en Occidente la supresión de AGE en la dieta no es frecuente, cuando éstos faltan en la misma, se establece la llamada deficiencia en AGE (DAGE) (19) que se caracteriza, entre otras alteraciones, por producir aceleración de

procesos arterioscleróticos y ser considerada, además, una condición pro-tumorigénica *per se* (150). Esta condición concuerda con los trabajos experimentales de Eynard y col. (53, 54); Muñoz y col (115). Sin embargo, hay estudios que indican que ciertos AGE inhibirían el desarrollo maligno, actuando como antipromotores, según el concepto de promoción-antipromoción de Beremblum (6). Así la manipulación dietaria de aceites de pescado y vegetales ricos en AGEs de la familia  $\omega$ -3 se relacionó con una disminución en el riesgo de desarrollo de ciertas neoplasias de glándula mamaria, colon y preestómago entre otras (53).

Por todos los aspectos mencionados anteriormente es que en este trabajo orientaremos el estudio hacia el empleo de determinados PUFAs y su interacción con vitamina A (RA) como dos familias de nutrientes que influyen en el comportamiento de líneas celulares tumorales y que podrían tener vías en común y la importancia de sus potenciales implicancias médicas.

#### 1.5. PEROXIDACION LIPIDICA

La peroxidación lipídica es un proceso autocatalítico que comienza cuando se extrae un átomo de hidrógeno a un PUFA para formar un radical libre a partir del ácido graso, los peróxidos así generados podrían ser los responsables del daño al ADN (109). Este proceso puede ser iniciado por un radical hidroxilo ( $\text{OH}^*$ ), peroxilo ( $\text{ROO}^*$ ), superóxido ( $\text{O}^{*2}$ ) o perhidroxilo ( $\text{HO}^{*2}$ ). La generación de "radicales lipoperóxidos" resulta en la producción de moléculas capaces de reaccionar a su vez con otros PUFAs, ocasionando así el inicio de una nueva reacción en cadena que produce más y más radicales libres, que inducen una peroxidación incrementada, por ejemplo a partir de aquellos ácidos grasos con más de dos dobles ligaduras, como el gama linoleico (GLA,  $\omega$ -6), que tiene tres o el eicosapentanoico (EPA,  $\omega$ -3), que tiene cinco. Se ha publicado que ésta reacción en cadena ocasiona una

adecuada y suficiente producción de superóxidos, que son citotóxicos preferencialmente para las células malignas desencadenando la apoptosis (93).

A su vez la carencia relativa de sustrato para obtener peróxidos, a partir de los PUFAs en una célula tumoral, podría deberse a la deficiencia de las desaturasas, perturbación enzimática bastante generalizada en este tipo de células (35). La peroxidación lipídica causa una profunda alteración en la integridad estructural y funcional de las membranas celulares así como daños en el ADN (109).

Se conoce que algunas estirpes de células cancerosas son resistentes a la peroxidación lipídica comparadas con las células normales. Algunos estudios de prevención de cáncer están orientados a encontrar agentes naturales con actividad antioxidativa, pues dichas moléculas oxidantes son deletéreas para la célula (113). Sin embargo, la presencia de una cantidad adecuada de peróxidos lipídicos sería un eficiente mecanismo citotóxico, cumpliendo una acción beneficiosa, que aseguraría la eliminación de las células malignas, disparando, el normal mecanismo de apoptosis. Horrobin y colaboradores propusieron hace más de dos décadas, que la mencionada resistencia a la peroxidación se debe al bajo contenido de PUFAs presentes en las membranas de las células neoplásicas es decir, a la falta de sustrato. Esta carencia relativa de peróxidos lipídicos podría ser una circunstancia disparadora de la proliferación descontrolada de los tumores malignos (76), fallando los mecanismos apoptóticos. Corroborando esto, experimentos in vitro muestran que cuando se aportan AGs ( $\omega$ -3,  $\omega$ -6) exógenamente se produce una disminución del crecimiento tumoral mediado por la producción incrementada de lipoperóxidos (67, 172). Hay estudios preliminares realizados con la instilación de 18:3  $\omega$ -6 (GLA) directamente en el lecho tumoral de variedades de gliomas, en pacientes con tumores intratables por otros procedimientos, que han mostrado resultados promisorios (31).

En la última década, ciertos AGEs han mostrado un efecto anticancerígeno en células tumorales humanas, aparentemente debido al aumento en la síntesis de superperóxidos (93). Otros autores relacionan el incremento de la lipoperoxidación con la disminución de incidencia de metástasis (72).

### **1.5.1. Mecanismos de Acción de los Ácidos Grasos orientados a esta Tesis**

Se ha demostrado que algunos PUFAs tales como el GLA,  $\omega$ -6; el AA (ácido araquidónico)  $\omega$ -6; el EPA  $\omega$ -3 (eicosapentaenoico) y el DHA  $\omega$ -3 (docosahexaenoico) poseen acciones citotóxicas y tumoricidas aumentando la generación de radicales libres y la peroxidación lipídica. Dentro de sus amplias funciones, abordaremos la producción de eicosanoides.

Estas biomoléculas son mediadores derivados del metabolismo de los PUFAs, que participan en numerosos procesos normales y patológicos, estando implicados en la patogénesis de una variedad de enfermedades, incluyendo el cáncer y son considerados importantes en la promoción tumoral, progresión y metástasis (181). Los eicosanoides pueden actuar ya sea como moléculas protumorales en vista de sus acciones pro-inflamatorias o como moduladores génicos y antitumorales (113, 36). El metabolismo del ácido araquidónico y de ácidos grasos anteriormente mencionados como el GLA, DGLA (dihommo-gamma linoleico), el EPA y el DHA (ácido docosahexaenoico) dan como resultado los eicosanoides y otros compuestos bioactivos. Aquí nos circunscribiremos a algunos de ellos, originados por las vías enzimáticas ciclo-oxigenasa 1 (constitutiva, COX1) y 2 (inducible, COX2) y 12-lipo-oxigenasa (12-LOX) (159, 151, 173). El estudio de la COX2 ha adquirido mucha importancia ya que ha sido virtualmente detectada en todos los tipos de cánceres, siendo su expresión

menor o nula en las contrapartes tisulares normales (18, 181). Los eicosanoides así como algunos AGs son ligandos naturales de los PPARs, los cuales han sido implicados también en la regulación de la proliferación descontrolada que ocurre en el cáncer. Los PPARs son receptores nucleares descritos como receptores activados por proliferadores de peroxisomas (86), y están representados por tres isoformas (PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  and PPAR $\delta/\beta$ ) codificadas por diferentes genes. Cuando éstos receptores se unen a sus correspondientes ligandos disparan la regulación de importantes funciones celulares, incluyendo la proliferación celular, la diferenciación, así como la respuesta al estrés.

## 1.6. MARCADORES CELULARES

El uso de agentes quimiopreventivos puede proveer a los pacientes un tratamiento prolongado más efectivo para aquellos tumores que expresan alguna moléculas propias de las células diferenciadas. Se conoce que los retinoides son necesarios para mantener una diferenciación celular normal de casi todas las células, incluidas las de origen mesenquimático, ya sea durante la embriogénesis como también en la vida adulta. La diferenciación celular en este sentido juega un papel central en el proceso de retardar, inhibir y raramente revertir la carcinogénesis. Por lo tanto, es importante evaluar parámetros de respuesta celular como los que mencionaremos a continuación.

### 1.6.1. DEL CITOESQUELETO

#### **CADERINAS**

Evidencias experimentales e histopatológicas indican que la caderina-E es una molécula supresora de la metástasis y de la invasión tumoral (79). Este concepto empleado en la estadificación de los tumores en los pacientes se basa en que:

La potencialidad metastásica de diversas líneas celulares es inversamente proporcional a la expresión de caderina-E por parte de las mismas.

Altos niveles de caderina-E en ciertos tumores están relacionados con una supervivencia prolongada y buen pronóstico con bajo riesgo de metástasis.

Bloqueando la caderina-E con un anticuerpo específico o por delección genética, se incrementa la motilidad e invasión y la subsecuente metástasis.

La transfección de células con altos niveles de E-caderina, produce una disminución en la potencialidad de desarrollar metástasis (166).

Las caderinas componen una superfamilia de moléculas de la membrana celular con restos azúcares (son glicoproteínas) dispuestas en el glucocáliz, que requieren  $Ca^{++}$  para su estructura y función. Estas moléculas de adhesión celular homotípicas están ampliamente estudiadas debido a su estrecha relación con la motilidad e invasión neoplásica. Las caderinas han sido identificadas de acuerdo a la distribución específica en los tejidos. Así, la caderina-E (epitelial) se encuentra cerca de la porción apical de la membrana plasmática de células epiteliales a nivel de las uniones estrechas o zonulas ocludens; la caderina -P (placenta) se ubica en células de la placenta o de la epidermis, mientras que la caderina-N se encuentra en nervios y corazón. En ausencia de  $Ca^{++}$  las caderinas sufren profundos cambios conformacionales en su molécula, dando como resultado una rápida degradación mediada por enzimas proteolíticas. Esta es una de las bases moleculares que explican la dehiscencia celular que se produce por acción de agentes quelantes de  $Ca^{++}$ .

**CADERINA-E:** La caderina-E es una proteína de transmembrana de 120-kDa, que se encuentra en todos los epitelios originados de las tres hojas embrionarias. Es sintetizada como precursor polipeptídico de 135 - kDa que luego en su forma madura se acorta (120 -kDa) en el complejo de Golgi, produciéndose allí la glicosidación (180). En su forma madura es selectivamente direccionada a la superficie de la célula, donde cumple con su principal función, la adhesión celular. El gen que codifica la expresión de



caderina-E está ubicado en el cromosoma 16q22.1 (180). Esta proteína está formada por una extensa porción extracelular compuesta por polipéptidos que están unidos a tres dominios homólogos. Estos dominios son denominados alfa, beta y gama (125). Hay tres tipos de subunidades de cateninas, la alfa (102 kDa), la beta (88 kDa) y la gama (82 kDa). De las tres la más conocida es la alfa. De ella se conoce que 1) la célula que tiene normal expresión de E-caderina con bajos niveles de alfa catenina, no agrega o no se adhiere una con otra. 2) la delección del gen de la alfa catenina, o la mutación de la proteína, impide la adhesión. La beta catenina es conocida debido a que el factor de crecimiento hepatocitario (EGF), induce la fosforilación de la beta catenina mediante una tirosina, la cual produce una redistribución de la E-caderina en otras áreas, incrementando la disociación y favoreciendo la motilidad e invasión. El rol de la gama catenina no está firmemente establecido, pero se ha demostrado que la unión de la caderina-E a alfa y beta catenina no es suficiente para modificar el comportamiento maligno de las células, mientras la gama es esencial en este contexto.

## **Actina**

Siendo la morfología celular un parámetro clásico para definir el grado de diferenciación celular, nos resulta de interés evaluar esto en función de como se organiza el citoesqueleto en nuestras condiciones experimentales. Por otro lado, la actina, otra proteína del citoesqueleto, se une a las cateninas y estas a la caderina-E formando un fuerte complejo de unión esencial para la adhesión celular. La actina se encuentra en dos formas principales: la actina-G (por globular) es la forma monomérica, y la actina-F es el polímero helicoidal (50).

La caderina-E unida a las cateninas y éstas a la actina del citoesqueleto, forman un fuerte complejo de unión esencial para la adhesión celular. (123, 38)

### **1.6.2. DE MEMBRANA CELULAR**

#### **GAMMA-GLUTAMYL TRANSPEPTIDASA**

La importancia del uso de antioxidantes dietarios ha sido ampliamente propuesta para contrarrestar los posibles daños inducidos por estrés oxidativo. Algunos nutrientes, como el RA y los AGs, pueden ser utilizados como moduladores del balance redox, dado que alteraciones en el mismo tienen profundas implicancias en el desarrollo de procesos neoplásicos. Entonces nos interesa evaluar el efecto de los mencionados nutrientes sobre los mecanismos de defensa antioxidante de las células. Entre ellos se encuentra la GGTP, enzima involucrada en la reconstitución de los depósitos intracelulares de glutatión, péptido clave en la resistencia celular al daño oxidativo. Este hecho está asociado al desarrollo de cáncer y quimioresistencia (144). Los cambios de la concentración de GSH (glutatión) en sangre podrían dar una medida del stress oxidativo in vivo. La captación de GSH de cada órgano o tejido depende de la actividad de la enzima gamma glutamil transpeptidasa ( $\gamma$ -GT o GGTP) localizada en la membrana celular (39). La enzima (GGTP, EC 2.3.2.2, CD224) es una carboxipeptidasa, proteína integral de membrana, que cataliza la reacción (5-L-glutamil)-péptido+AA (aminoácido). Esta enzima participa en el metabolismo del glutatión (GSH) y es activada por estrés oxidativo (96). Desde el punto de vista químico el glutatión (GSH) es un compuesto de bajo peso molecular con un grupo sulfhidrilo (-SH) más importante en plantas y animales. Se trata de un tripéptido formado por los aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína (Glu-Gly-Cys).

## **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

Como se ha fundamentado precedentemente y considerando que los ácidos grasos insaturados y el ácido retinoico presentan ambos naturaleza lipofílica y que las vías celulares que regulan estarían asociadas, en el presente trabajo de Tesis nos planteamos la siguiente hipótesis:

El ácido retinoico, sólo o en combinación con ácidos grasos insaturados de las familias  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 y  $\omega$ -9, algunos de ellos con posibles efectos antineoplásicos, podría/n producir modificaciones favorables sobre parámetros de proliferación, peroxidación lipídica, citodiferenciación, citotoxicidad, en dos líneas de células tumorales de mama humana.

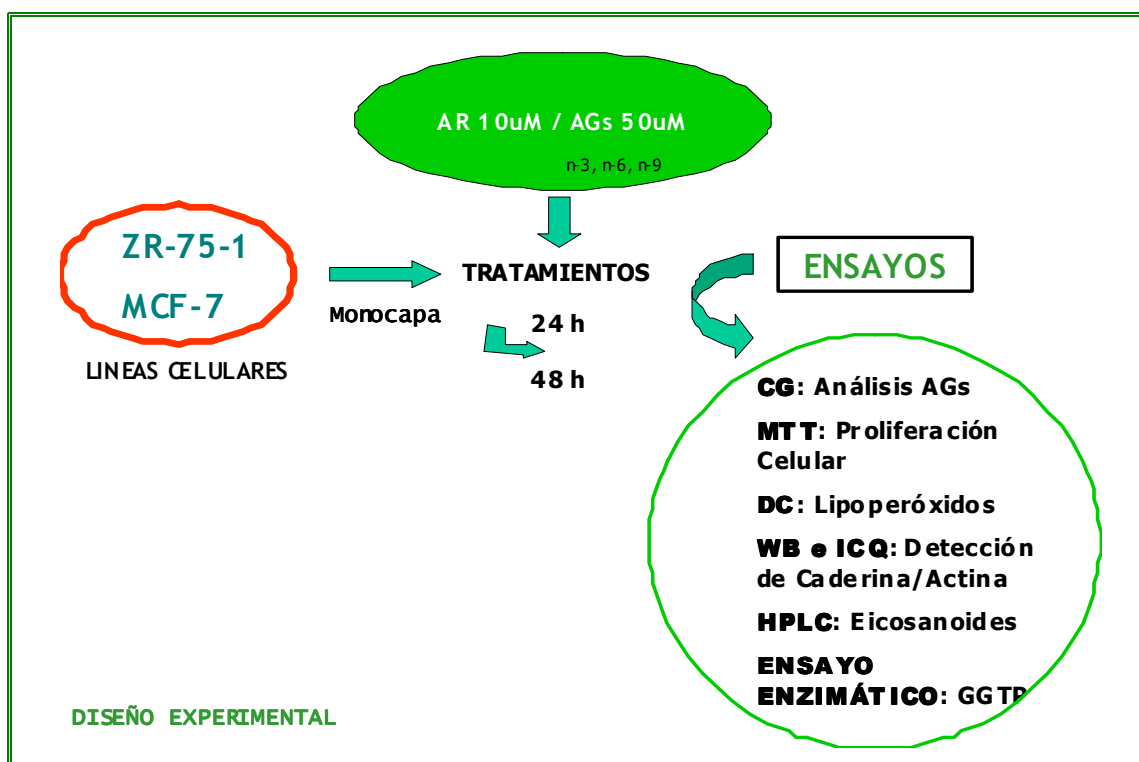
Así los objetivos del presente proyecto de Tesis fueron:

1. Establecer si el perfil lipídico de membranas de las dos líneas celulares tumorales de mama es modificado por los diferentes tratamientos exógenos, basados en la combinación del ácido retinoico con distintos aportes de ácidos grasos.
2. Determinar si dichos tratamientos in vitro pueden disminuir la proliferación celular y/o inducir la diferenciación de líneas tumorales provenientes de adenocarcinoma de mama humano.
3. Valorar el efecto de los diferentes tratamientos sobre indicadores de peroxidación lipídica y estrés celular.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

En la figura 3, se plantea de manera esquemática las condiciones experimentales in vitro para el estudio de las variables correspondientes en dos líneas celulares tumorales mamarias humanas; ZR-75-1 y MCF-7.



**FIGURA 3. DISEÑO EXPERIMENTAL.**

### 2.2. MATERIALES

Los insumos de cultivo fueron: medio RPMI-1640, estreptomycin, penicilina (Sigma-Aldrich, EEUU), suero fetal bovino (SFB, NATOCOR, Arg.), material plástico y descartable (ETC, Arg.). Se utilizaron los ácidos grasos  $\gamma$ -linolénico 18:3 $\omega$ -6 (GLA), eicosapentaenoico 20:5 $\omega$ -3 (EPA), oleico 18:1 $\omega$ -9

(OA) (Nu-Chek-Pre Inc., EEUU), eicosatetraenoico 20:3  $\omega$ -9 (ETA), ácido retinoico all-trans (RA), (ATRA) (Sigma-Aldrich, EEUU).

Anticuerpos: IgG murina anti-E-cadherina humana (HECD-1, Santa Cruz, EEUU), IgG de conejo anti-actina humana, IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugada a peroxidasa, IgG de burro anti-IgG de ratón conjugada a Texas Red, IgG de cabra anti-IgG de conejo conjugada a FITC (Sigma-Aldrich, EEUU).

Otros materiales: Reactivos, colorantes y otros (Sigma-Aldrich, EEUU), solventes (Cicarelli, Arg.), estándares de HPLC (Biomol, EEUU), gases (Air Liquide, Arg.).

### 2.3. CULTIVOS CELULARES

Se emplearon dos líneas celulares provenientes de adenocarcinomas de glándula mamaria humana obtenidas de la American Type Culture Collection, EEUU. Las líneas celulares utilizadas, MCF-7 y ZR-75-1 provienen de mujeres caucásicas de 69 y 66 años respectivamente con características de crecimiento muy similares si bien pueden presentar diferentes grados de diferenciación celular.

Después de un análisis del número de células óptimo para obtener una respuesta lineal en cada ensayo utilizando estas células, se sembraron en frascos de 25cm<sup>2</sup> ó en placas de 96 y 6 pozos de acuerdo a cada experimento. Las células se cultivaron en medio RPMI, enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina (15 UI/mL), estreptomycin (100 ug/mL), glucosa (1 g/L), HEPES (1M) y 75% de bicarbonato de sodio, bajo una atmósfera con 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a 37 °C. Las células se cultivaron durante 24 horas hasta la obtención de monocapas y luego se realizaron los diferentes ensayos después de tratarlas durante 24 ó 72 horas

adicionales de cultivo de acuerdo al tiempo óptimo de cada experimento y según el protocolo de nuestro laboratorio (130). La concentración final del vehículo de los AGs y del RA fue de etanol al 0,0 1% ya que mayores concentraciones resulta tóxico para las células. Se controló periódicamente la sobrevida por medio del método de exclusión del colorante Azul de Tripano.

## 2.4. METODOS

### **Morfología**

El control morfológico de las líneas celulares se llevó a cabo mediante la observación directa, sin coloración, con el microscopio óptico invertido Olympus CK2 y se procedió a obtener fotografías a magnificaciones de 200 y 400X.

### **Lípidos totales de membrana**

Con el objeto de disponer de un parámetro bioquímico del perfil de ácidos grasos de las membranas de las células cultivadas, indicativos de que la oferta exógena había sido incorporada por las células, se las homogeneizaron y se obtuvo una fracción enriquecida en membranas mediante centrifugación a 35.000 g durante 1 hora a 4°C. El pellet de membranas fue tratado con cloroformo/metanol 2:1 (v/v) y filtrado según la técnica de Folch (60). El extracto crudo de lípidos así obtenido, se particionó con agua y la fase clorofórmica fue evaporada bajo una atmósfera de nitrógeno. La metilación de los ésteres lipídicos se realizó con metóxido de sodio a temperatura ambiente de acuerdo al método de Yurawecz (37) Los ésteres lipídicos se recuperaron en la fase hexano y se concentraron bajo flujo de Nitrógeno.

La separación de los metil ésteres de los ácidos grasos de membranas celulares se efectuó mediante cromatografía líquida gaseosa empleando una

columna capilar de CP wax 52 CB de 30 m de longitud, y 0.25 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase. Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 250 °C. Se utilizaron dos equipos: un Shimadzu modelo GC- R1A con detector de ionización de llama y un CLAIRUS 500 de Perkin Elmer. La temperatura del horno se programó desde 180°C a 240°C (2°C/min.). La identificación de los ácidos grasos se realizó mediante el tiempo de retención de ácidos grasos testigos según es rutina en nuestro laboratorio (20) y su contenido se expresó en porcentajes respecto al total.

### **Determinación de proliferación celular**

Se sembraron células neoplásicas (CN) en placas de 96 pozos a una concentración de 10000 CN/mL. La proliferación celular fue medida mediante la utilización del ensayo con MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue). El depósito de formazán citoplasmático, disuelto con 10% de Tritón X 100, se midió en un lector de ELISA, a una longitud de onda de 540nm. Los valores obtenidos son indicativos de las células que permanecen vivas en el momento del ensayo, siendo entonces un parámetro para evaluar proliferación celular.

### **Dienes Conjugados (DC)**

Con el propósito de determinar la capacidad de formar lipoperóxidos a partir de lípidos de membrana, se sembraron 500.000 células neoplásicas en placas de 6 pozos. Las células se homogeneizaron en buffer-PBS. Los lípidos de membrana fueron extraídos como se indicó precedentemente. Se descartó la fase superior, junto con las proteínas desnaturalizadas ubicadas en la interfase. La fase inferior fue secada bajo nitrógeno. Los lípidos fueron resuspendidos en etanol según la metodología utilizada por Bongiovanni y col. (14) midiéndose la absorbancia a 233 nm contra un blanco de etanol en

un espectrofotómetro Hitachi U-2000. La concentración de dienos conjugados fue expresada como densidad óptica/mg de proteínas.

### **Determinación de proteínas**

Las proteínas fueron cuantificadas según las técnicas corrientes utilizadas en el laboratorio. Se siguió la metodología indicada por Lowry y col. (103) teniendo en cuenta la ausencia de interferentes en la reacción.

### **Gamma Glutamyl Transpeptidase (GGTP)**

La enzima gama glutamil transpeptidasa (GGTP, EC 2.3.2.2, CD224) participa en el metabolismo del glutatión (GHS) y es activada por estrés oxidativo (Kugelman y col., 1994). A las células cultivadas en placas de 96 wells y después de los distintos tratamientos, se les retiró el medio y se le agregó 20  $\mu$ l Triton X-100. La actividad de GGTP fue determinada usando 0,1 M glicil-glicina y 5 mM L-gama-glutamyl-p-nitroanilidina como sustratos contenidos en el kit comercial de Wiener. La concentración de p-nitroanilina (PNA) se determinó a 410 nm en condiciones de velocidad inicial realizando varias determinaciones en función del tiempo de incubación, según Valentich (167), Quiroga A (137). La actividad específica se expresó en mIU/mg de proteínas (1 IU= 1  $\mu$ mol de producto/min a pH 8.5 y 25 °C).

### **Determinación de metabolitos del ácido araquidónico (AA) y ácido linoleico (LA)**

Se determinó la liberación, de los siguientes metabolitos del AA: 12-(S)-HHT producido por la vía COX y 12-(S)-HETE proveniente de la activación de la vía 12- LOX. La determinación de todos los metabolitos se realizó según metodología utilizada por Pasqualini y col. (130) resumida a continuación.

Extracción: suspensiones de  $10 \times 10^6$  células/ml se trataron con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y estimuladas con ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187  $10^{-3}$  M durante 15 min a 37 °C. La reacción se detuvo con 1 mL de metanol. Estas suspensiones



fueron diluidas con agua bidestilada y filtradas en columnas de extracción de fase sólida (Strata C18-T 100 ng/ml Phenomenex). Los metabolitos se eluyeron de las columnas con 1 mL de metanol y se secaron con nitrógeno hasta el momento de su análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Análisis por HPLC: Para separar, identificar y cuantificar los eicosanoides se utilizó un cromatógrafo Beckman SYSTEM GOLD, provisto de una bomba (Programable Solvent Module 126) y con detector UV (Programable Detector Module 166). La separación se realizó en una columna Phenosphere-Next C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm). Las muestras se resuspendieron en 100 µl de acetonitrilo y el volumen de inyección fue de 50 µl. Se realizó un gradiente de disolventes comenzando con 50 % del disolvente A (0.02 % de ácido acético en agua bidestilada) y 50 % del B (0.02 % ácido acético en acetonitrilo). Se redujo paulatinamente la proporción de A hasta llegar a 100 % de B a los 25 min de corrida. Posteriormente, entre los 30 y 35 minutos, la proporción del disolvente A se aumentó linealmente hasta restablecer la composición original del sistema. Se trabajó a flujo (1 mL/min) y temperatura (27 °C) constantes durante el tiempo total de análisis. Se utilizó una longitud de onda de 235 λ hasta el final del análisis (130).

Identificación: Los eicosanoides se identificaron comparando sus tiempos de retención relativos con estándares comerciales (BIOMOL Research Laboratory Inc. USA).

Preparación de la curva de calibración y cuantificación: se realizó una curva de calibración con cada uno de los estándares comerciales 12-HHT y 12-HETE. La cuantificación se hizo en base a ng/10<sup>6</sup> células/mL.

### **Expresión de E-cadherina por Western-Blot (WB)**

Obtenidas las monocapas de células, éstas se despegaron con trispina, se lavaron con buffer-PBS y se resuspendieron en buffer Tris Clorhídrico, pH 9,5 conteniendo inhibidores de proteasas. Las células se homogeneizaron con un homogeneizador OMNI 1000 (high-20000 RPM) y centrifugaron a

35.000 g durante 1 hora a 4°C. Una alícuota del pellet de células fue incubado con buffer control a temperatura ambiente durante media hora. Las muestras se conservaron a -20° C para ser utilizadas en la realización de Western blot según la técnica descrita por Towbin (165), con algunas modificaciones. Se realizó la corrida electroforética en gel de poliacrilamida al 10%, utilizando como estándar de peso molecular a la mezcla Caleidoscop de Bio-Rad (miosina 208 kDa, galactosidasa 127 kDa, albúmina bovina 85 kDa, anhidrasa carbónica 45 kDa, inhibidor de tripsina 32.8 kDa, lisozima kDa, apotininina 7.4 kDa). Las proteínas separadas por electroforesis fueron posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La E-cadherina se marcó con HECD-1 y se reveló por la reacción de peroxidasa, utilizando un anticuerpo conjugado con solución de revelado (peróxido de hidrógeno al 30%, 4-cloronaftol y buffer PBS). Las bandas coloreadas fueron cuantificadas mediante el programa Beta 4.0.3 Scion Image (DO/banda).

### **Inmunocitoquímica (ICQ) para E-cadherina y actina**

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pozo en placas de 6 pozos. A las 24 horas de adhesión, las células en monocapa, se trataron durante 24 h según el protocolo experimental fijándolas posteriormente con metanol a -20° C durante 10 minutos. Se incubó durante la noche a 4°C con anticuerpo primario en BSA 2%. Luego del lavado, las células se incubaron en estufa por una hora con un anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo. Tras adecuados números de lavados con buffer PBS, se observaron con microscopio de fluorescencia (Axioscop 20 Zeiss, fluorescencia HB 50).

#### **2.5. Análisis Estadístico**

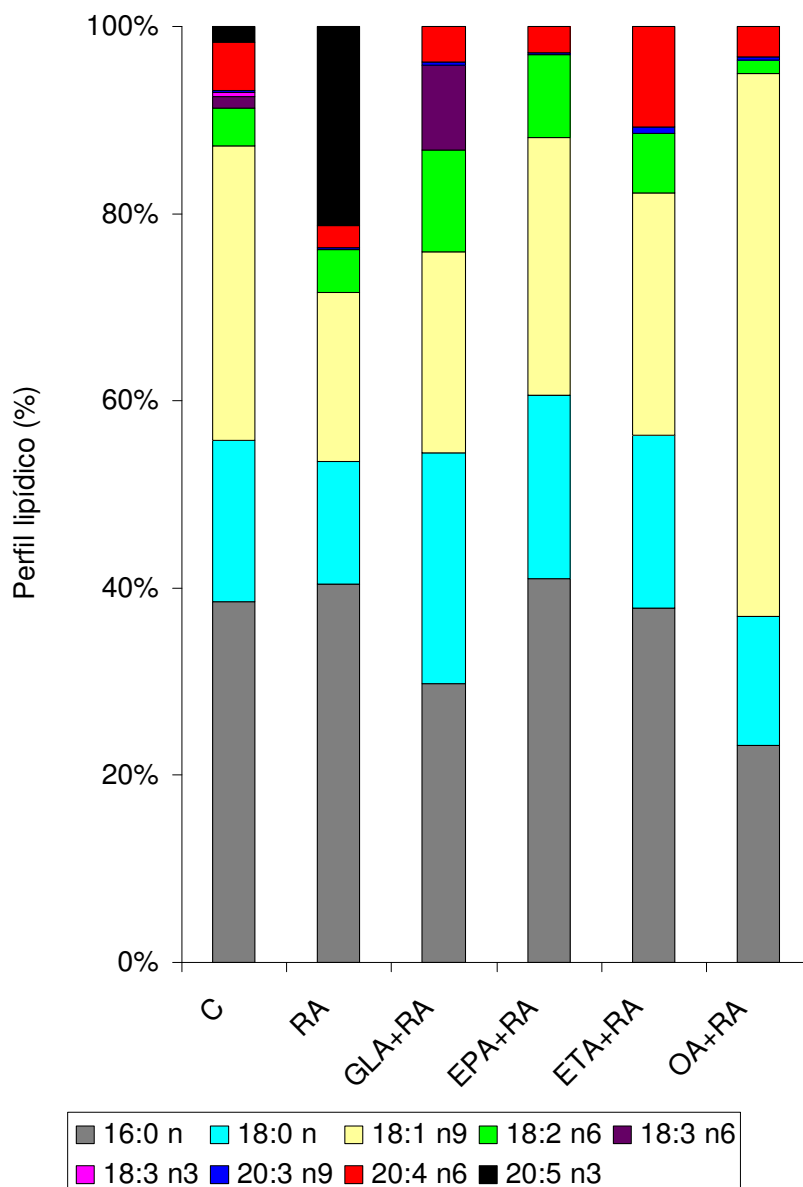
Los datos fueron expresados como media  $\pm$  error estándar ( $m \pm EE$ ) de  $\geq$  tres experimentos separados realizados en triplicado. Modelos de ANOVA fueron utilizados para evaluar el efecto de los tratamientos siendo éstos C, RA, RA+GLA, RA+EPA, RA+ETA, RA+OA, sobre las diferentes respuestas celulares estudiadas. Para la comparación de las medias, se empleó el test

de L-Fisher, considerando un nivel de significación de  $\alpha=0,05$ . El grado de asociación entre respuestas de tipo continuo fue determinado por el coeficiente de correlación (CC).

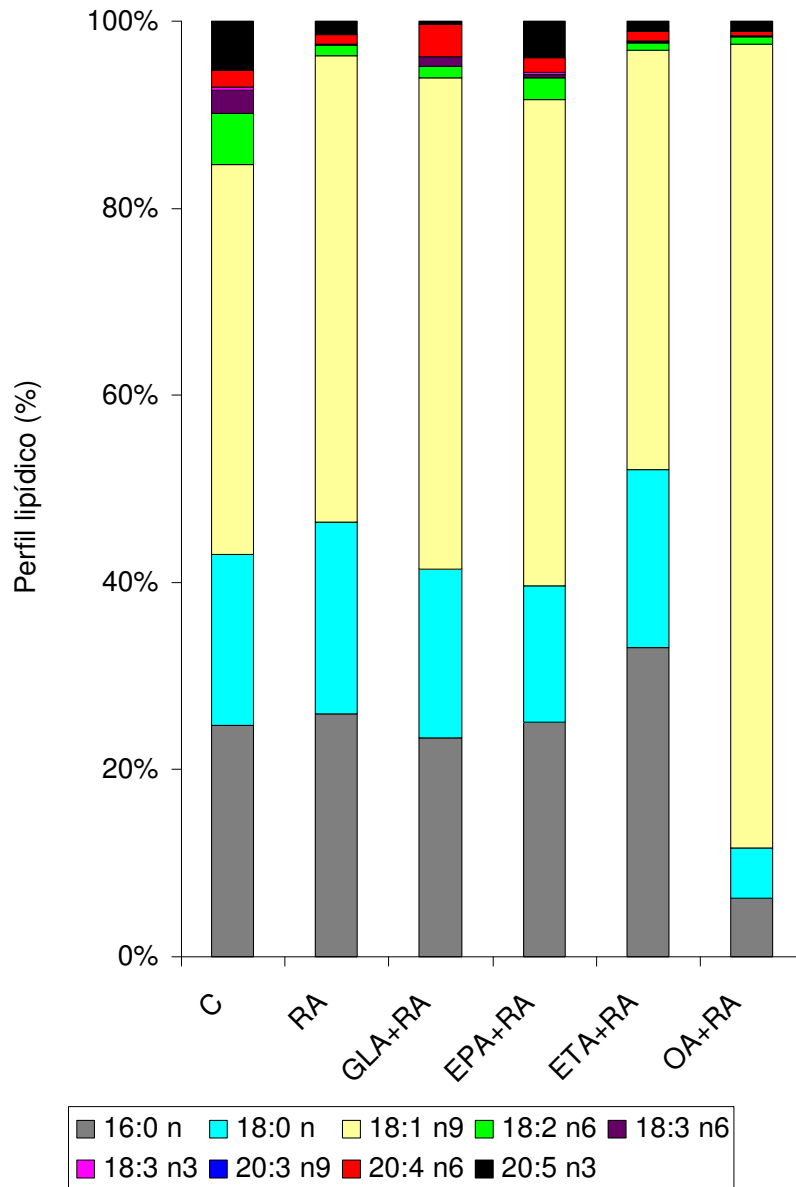
### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Estudio de la diferenciación celular tras 24 horas de tratamiento

##### 3.1.1. Perfil cromatográfico de ácidos grasos.



**Fig. 4.** Perfil lipídico (porcentaje representativo de 3 experimentos separados) de las células **MCF-7** bajo los siguientes tratamientos (24 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA), respectivamente.



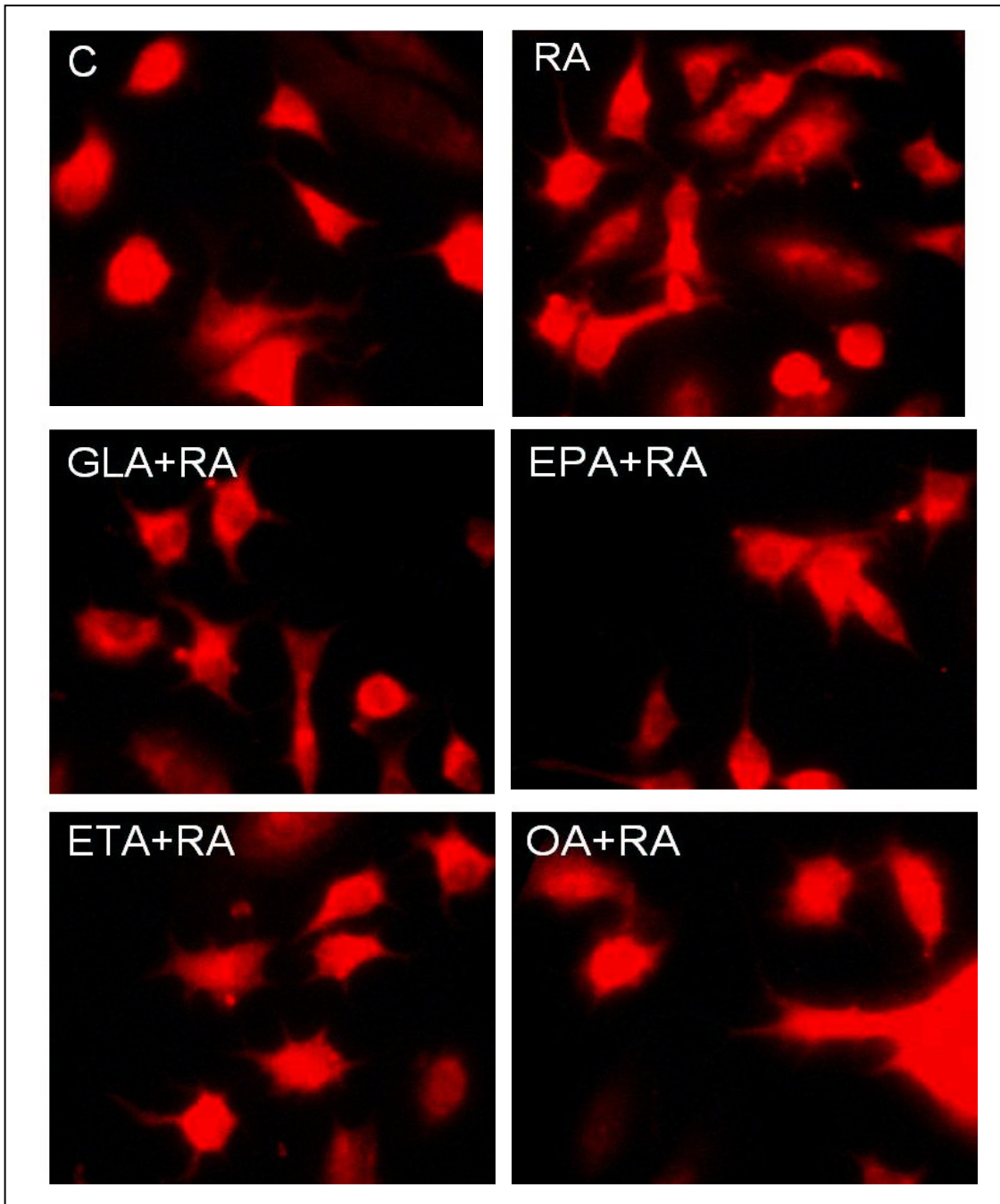
**Fig. 5.** Perfil lipídico (porcentaje representativo de 3 experimentos separados) de las células **ZR-75-1** bajo los siguientes tratamientos (24 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA), respectivamente.

Se determinó el perfil lipídico de las células tumorales a fin de confirmar la incorporación de cada uno de los ácidos grasos utilizados en cultivo, debido a que éstos juegan un rol crítico en la fisiología celular y en la

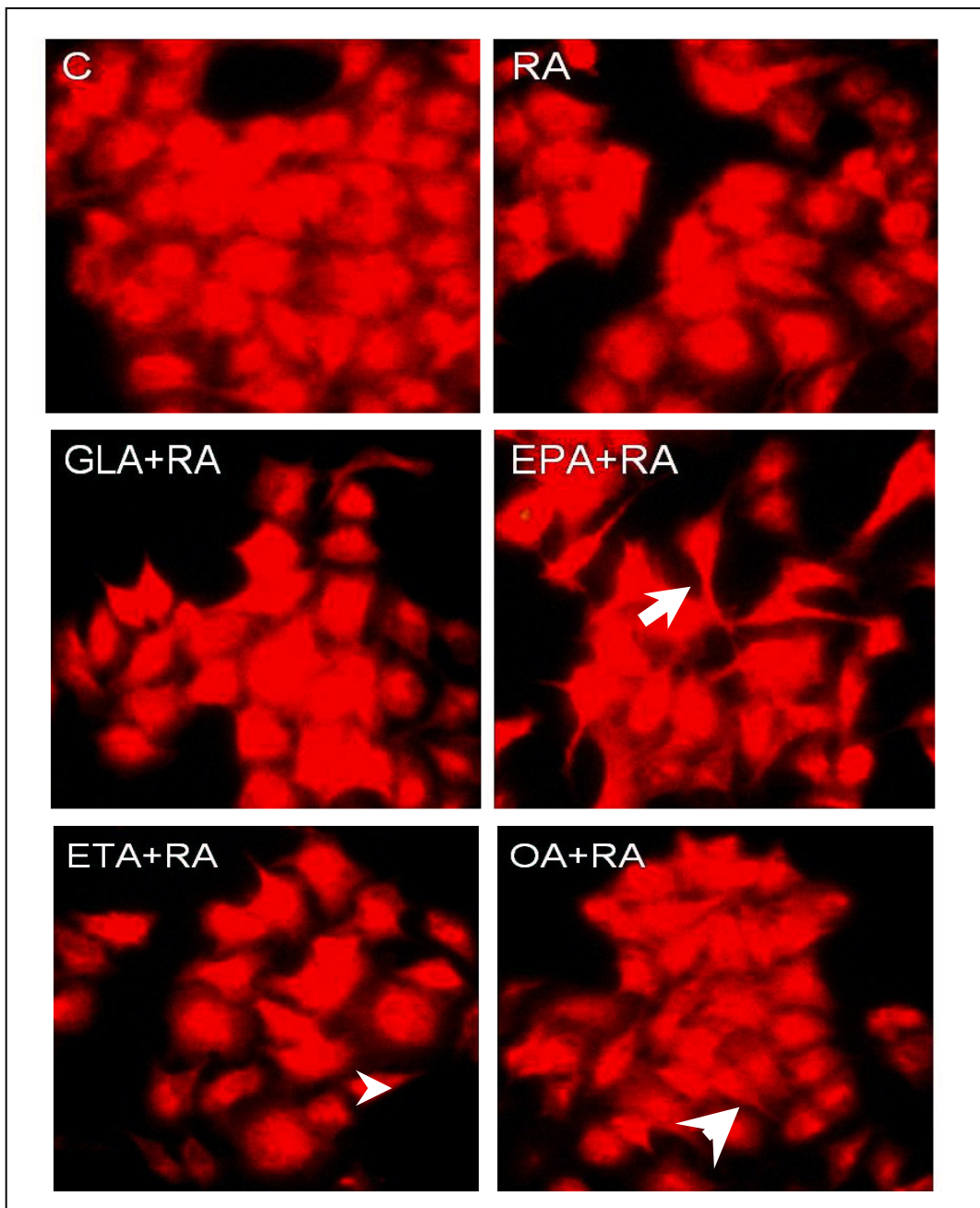
carcinogénesis. Se encontró una correlación razonable entre los ácidos grasos de membranas celulares (valores porcentuales) y el aporte exógeno de cada uno de ellos, además de diferencias en el perfil de ácidos grasos entre las dos líneas celulares empleadas (Figuras 4 y 5).

### **3.1.2. Expresión de E-cadherina**

Por inmunocitoquímica (Figuras 6 y 7) y Western-blotting (Figura 8), se evaluó la expresión de E-cadherina por ser un marcador de diferenciación celular, dado que numerosos tipos de tumores la pierden durante el proceso de carcinogénesis. Se encontró que las células MCF-7 presentaban mayor expresión de E-cadherina que las células ZR-75-1 (comparación con sus respectivos controles). Además, ambas líneas exhibían diferente morfología. Así las MCF-7 eran poligonales y poseían prolongaciones finas y alargadas, mientras que las ZR-75-1 tenían apariencias más redondeadas, con escasas prolongaciones más cortas. Con respecto a los tratamientos empleados, la línea MCF-7 no presentó modificaciones relevantes en la expresión de E-cadherina, conservando los cultivos las mismas características observadas en los controles. En cambio, la línea ZR-75-1 respondió al tratamiento con RA con modificaciones más marcadas, ya que las células adquirieron forma poligonal. Con el agregado de GLA, se observó un aumento de la marcación y acentuación de los cambios descritos con RA. En los cultivos tratados con RA más EPA, dichas modificaciones fueron aún más notorias. Por otro lado, se encontró que las células tratadas con RA más OA presentaban ligeramente más marcación con respecto a las tratadas sólo con RA, mientras que con ETA se observaba una característica forma poligonal con una marcación mayor para E-cadherina.

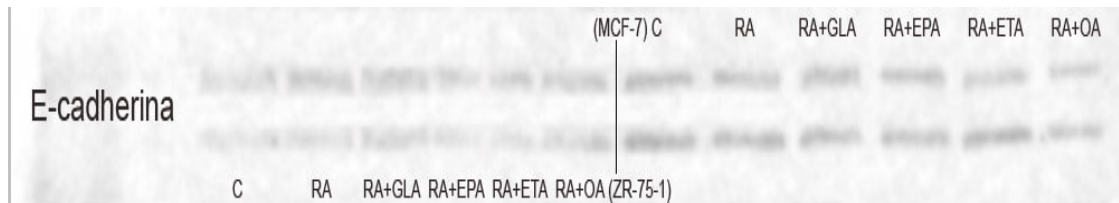


**Fig. 6. Expresión de E-cadherina de las células MCF-7** (representativo de 3 experimentos separados) bajo los siguientes tratamientos (24 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA), respectivamente. Nótese la escasa modificación en la morfología bajo los diferentes tratamientos comparados con el control.



**Fig. 7 Expresión de E-cadherina de las células ZR-75-1** (representativo de 3 experimentos separados) bajo los siguientes tratamientos (24 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA), respectivamente. Obsérvese (con flechas) las prolongaciones más desarrolladas de las células tratadas comparadas con el control, especialmente con EPA, ETA y OA.





**Fig. 8. Expresión de E-cadherina de las células MCF-7 y ZR-75-1** (representativo de 3 experimentos separados) bajo los siguientes tratamientos (24 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA), respectivamente. En las células MCF-7 se observan bandas más intensas de acuerdo a la expresión de la proteína comparada con la línea ZR-75-1, una línea más indiferenciada donde la expresión es menos intensa aunque inducible.

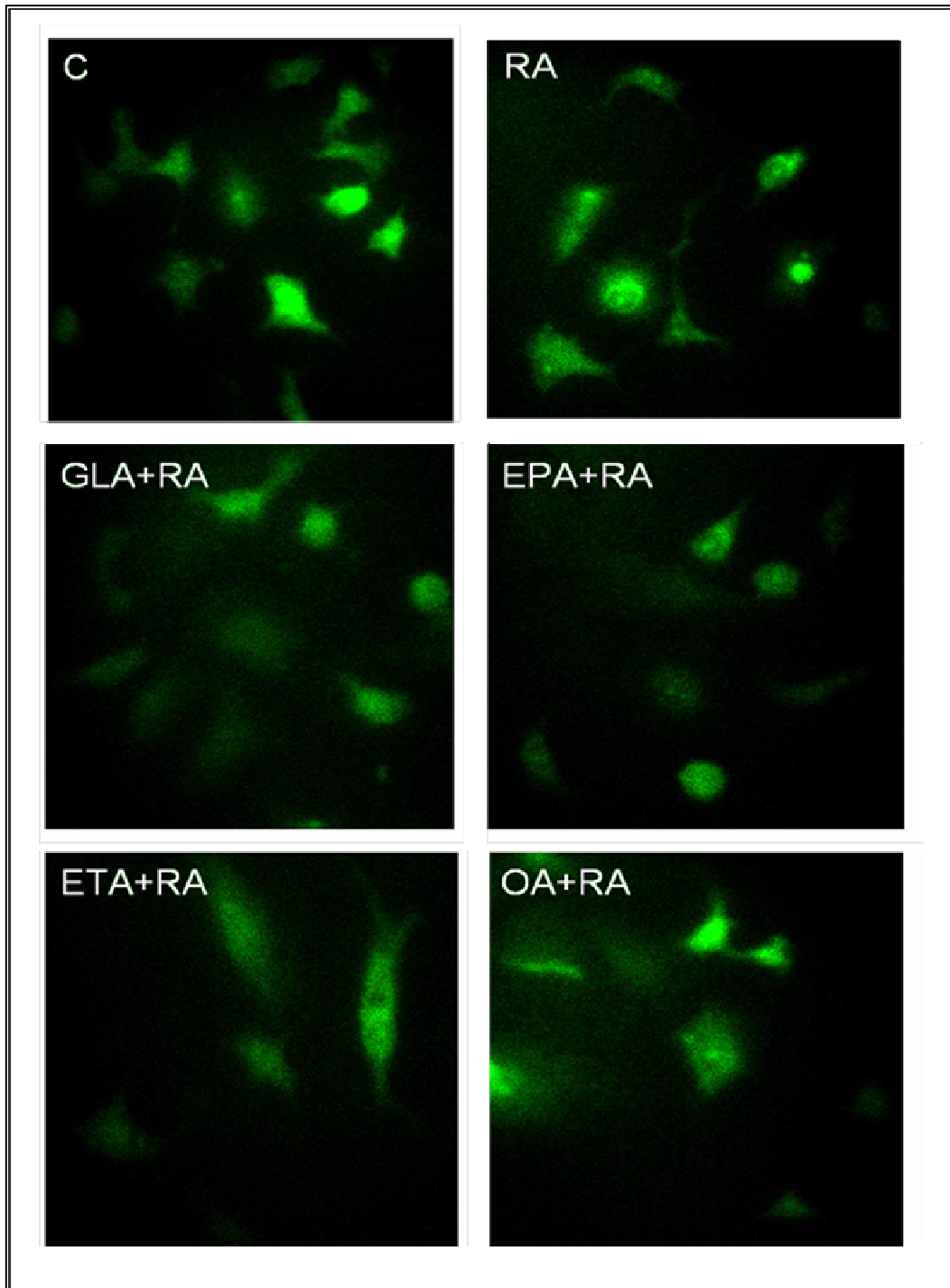
### 3.1.3. Distribución de microfilamentos (actina)

Dado que el citoesqueleto participa en diferentes procesos que regulan la homeostasis y la diferenciación celular, se estudió la organización de los microfilamentos de actina (Figuras 9 y 10).

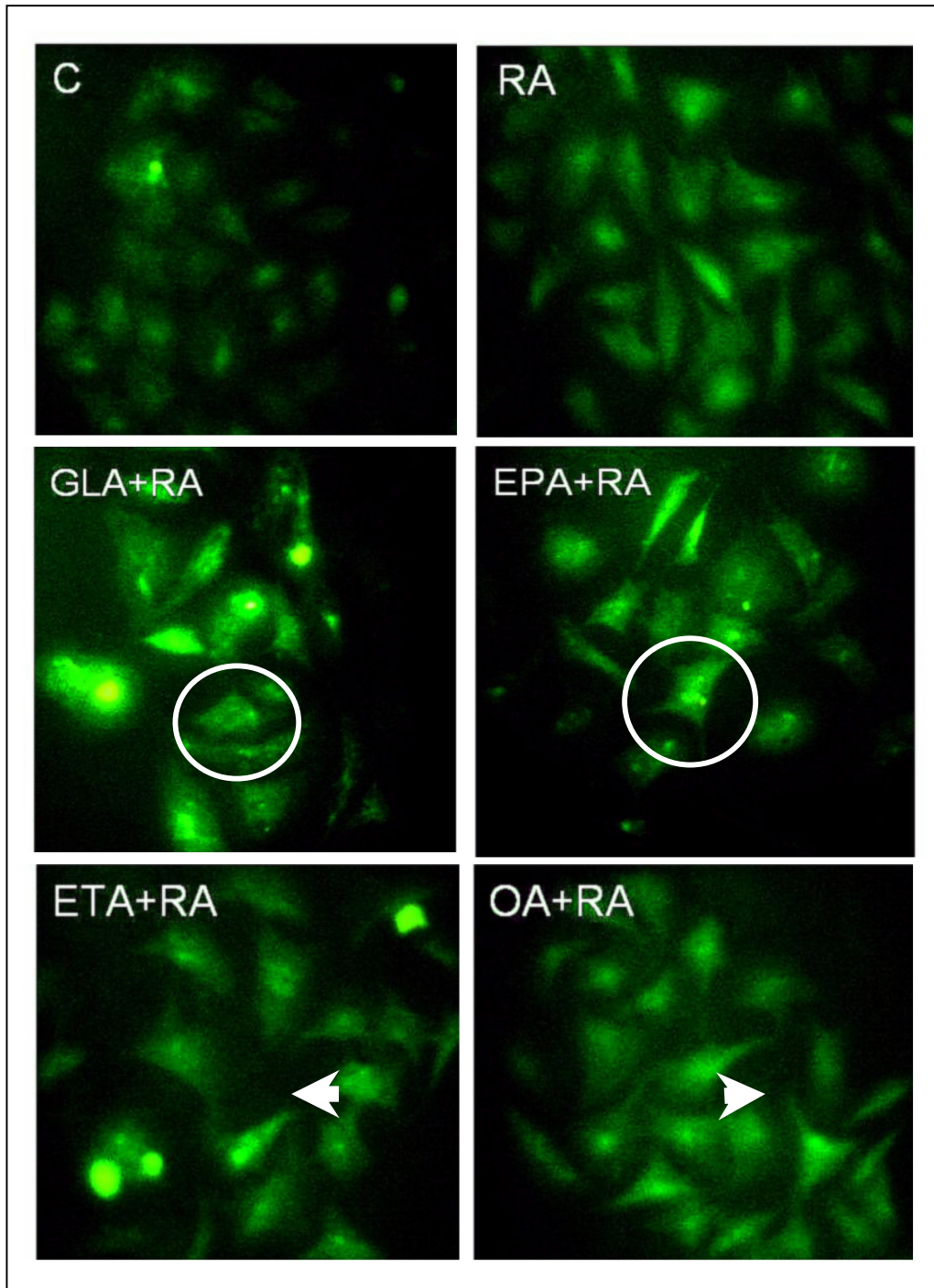
Así, al igual que como sucedió con la expresión de E-cadherina, ambas líneas tumorales tenían diferente morfología (MCF-7: poligonal con prolongaciones alargadas; ZR-75-1: redondeada con prolongaciones cortas).

Las células MCF-7 no mostraron cambios de relevancia cuando fueron tratadas con RA solo o combinados con los distintos ácidos grasos.

En cambio, en la línea ZR-75-1, se encontró un aumento de la marcación ante la presencia de RA, solo y también bajo los otros tratamientos. Además de los cambios morfológicos ya descritos al analizar la expresión de E-cadherina, se halló que los ácidos grasos GLA y EPA inducían un cambio en la distribución de la actina, observándose pequeñas agrupaciones corpusculares citoplasmáticas.



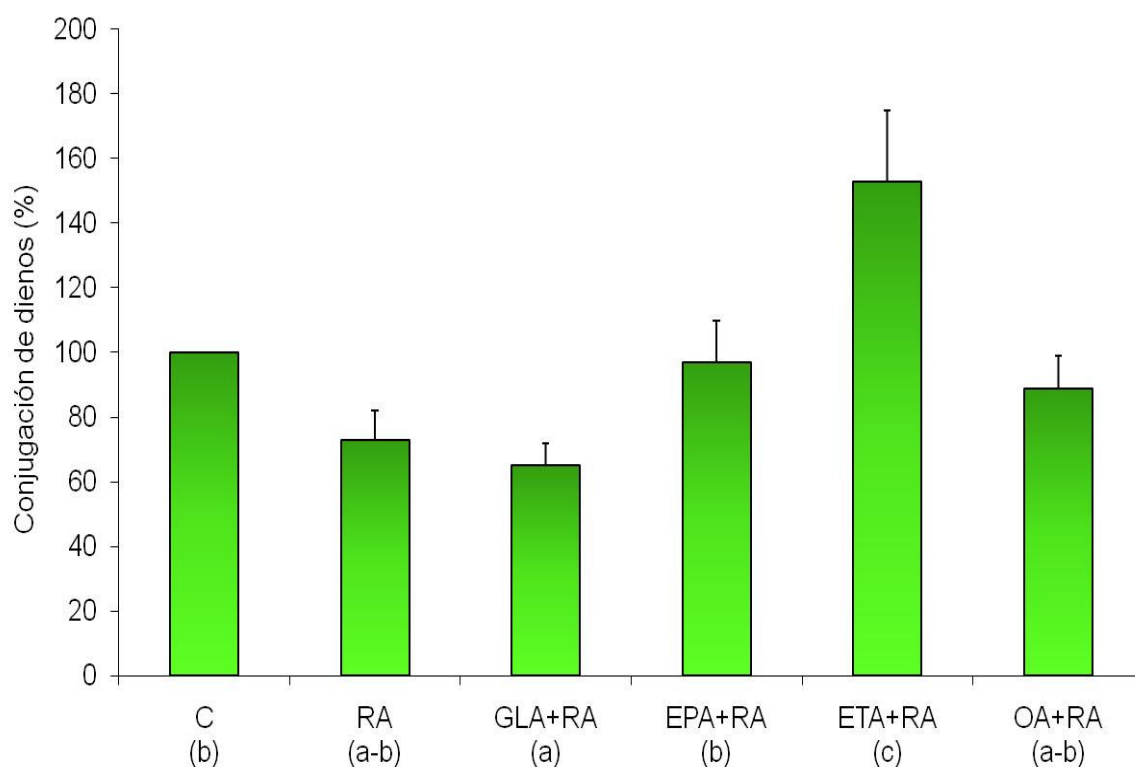
**Fig. 9.** Distribución de microfilamentos de actina de las células **MCF-7** (representativo de 3 experimentos separados) bajo los siguientes tratamientos (24 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA,EPA+RA, ETA+RA y OA+RA), respectivamente. Nótese la escasa modificación morfológica en las células bajo los co-tratamientos.



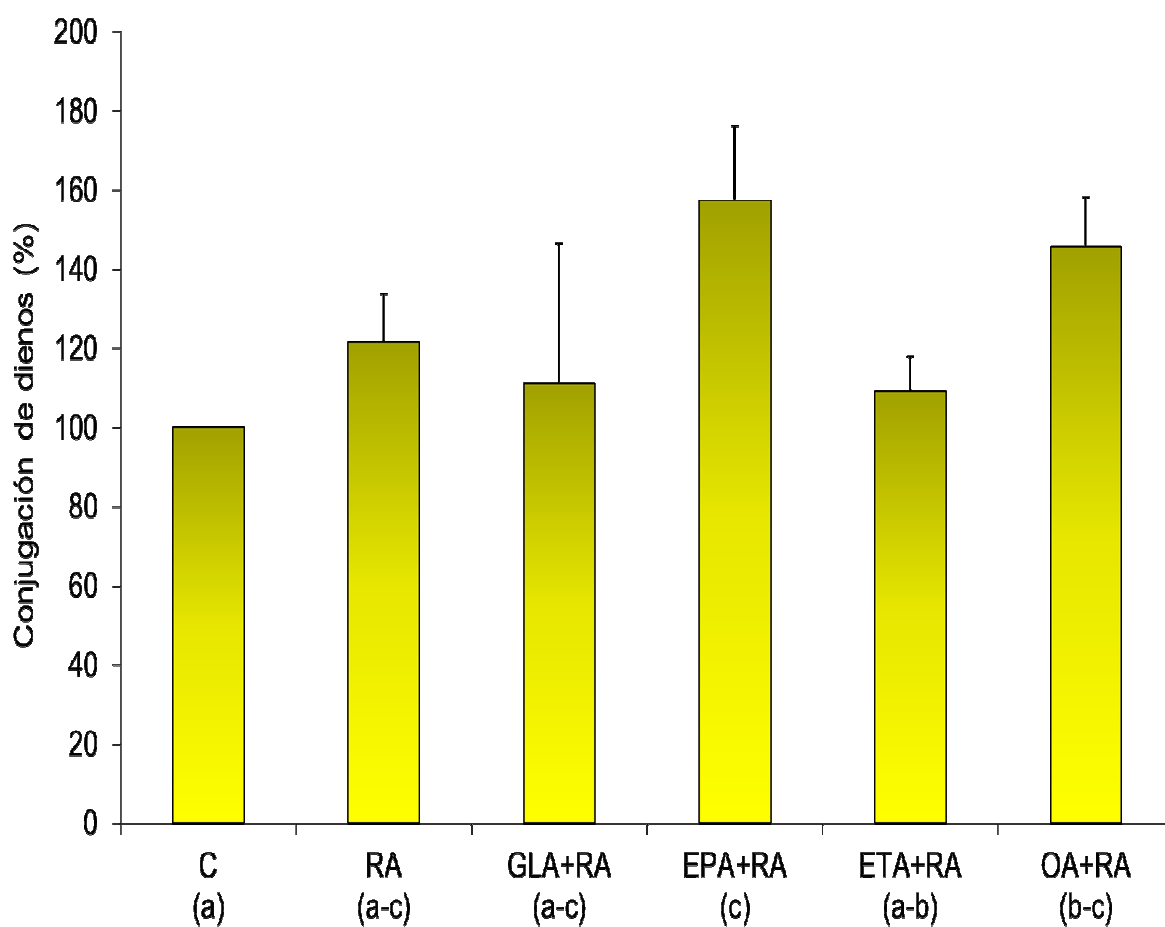
**Fig. 10.** Distribución de microfilamentos de actina de las células **ZR-75-1** (representativo de 3 experimentos separados) bajo los siguientes tratamientos (24 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA), respectivamente. En los campos marcados con un círculo se evidencian las prolongaciones en las células con los co-tratamientos comparados con el control.

### **3.2. Estudio del estrés celular tras 48 horas de tratamiento**

#### **3.2.1. Formación de dienos conjugados**



**Fig.11. Formación de dienos conjugados (%) en las células MCF-7 bajo los siguientes tratamientos (48 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA), respectivamente. Letras diferentes indican diferencia estadística ( $p < 0,05$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ).**



**Fig. 12.** Formación de dienos conjugados (%) en las células **ZR-75-1** bajo los siguientes tratamientos (48 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA), respectivamente. Letras diferentes indican diferencia estadística ( $p < 0,05$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ).

La determinación del daño oxidativo de los lípidos es de relevancia en carcinogénesis, ya que compromete la integridad estructural y funcional de las membranas celulares y, por consiguiente, su diferenciación y viabilidad. En nuestros estudios, ambas líneas tumorales no mostraron cambios oxidativos en sus membranas bajo el tratamiento con RA sólo, pero sí respondieron en diferente medida, según la línea, a la combinación de RA y algunos de los ácidos grasos empleados. En las células MCF-7 (Figura 11)

solo se observó un aumento de los dienos conjugados cuando se agregó ETA en los cultivos. Mientras que, la combinación de RA más GLA redujo su formación. En la línea ZR-75-1 (Figura 12), sólo la incorporación de EPA a los cultivos tratados con RA fue capaz de elevar la formación de dienos conjugados respecto a control.

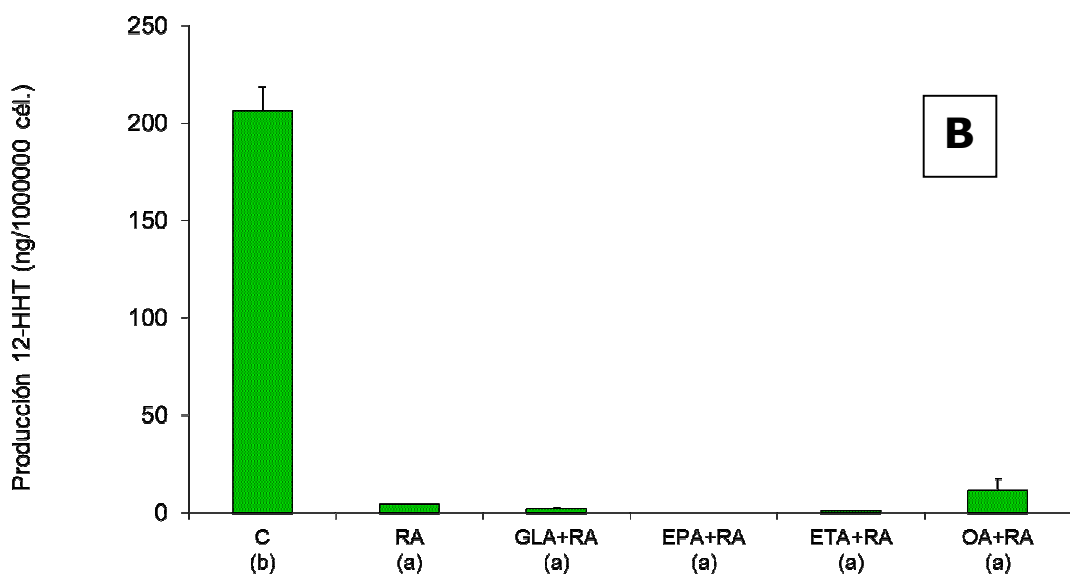
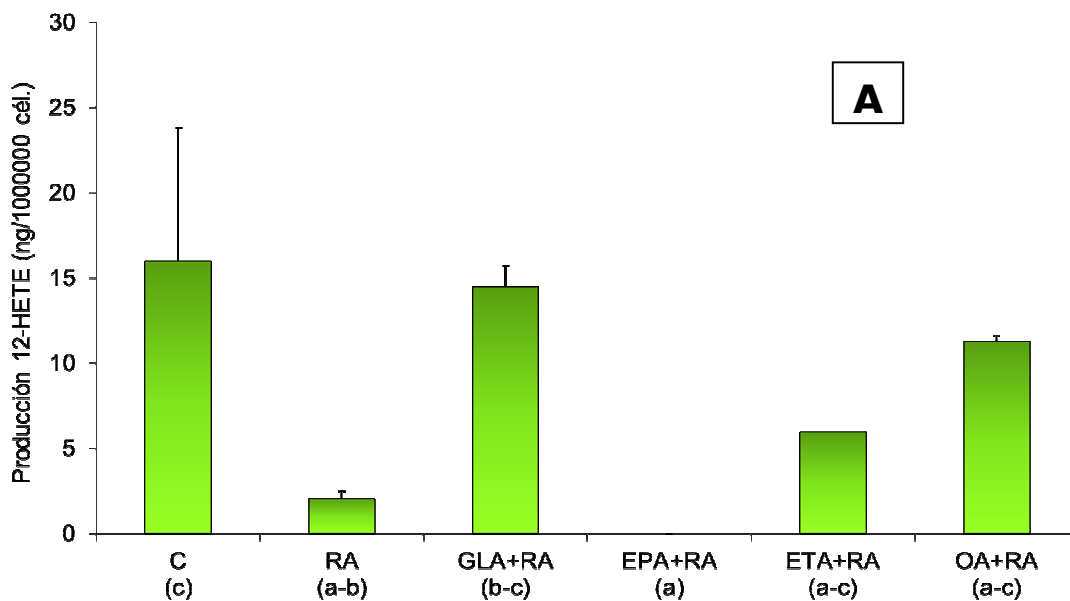
### **3.2.2. Formación de eicosanoides**

Evaluamos la síntesis de eicosanoides producido por la actividad de ambas vías enzimáticas (12-HHT: vía COX; 12-HETE: vía 12-LOX).

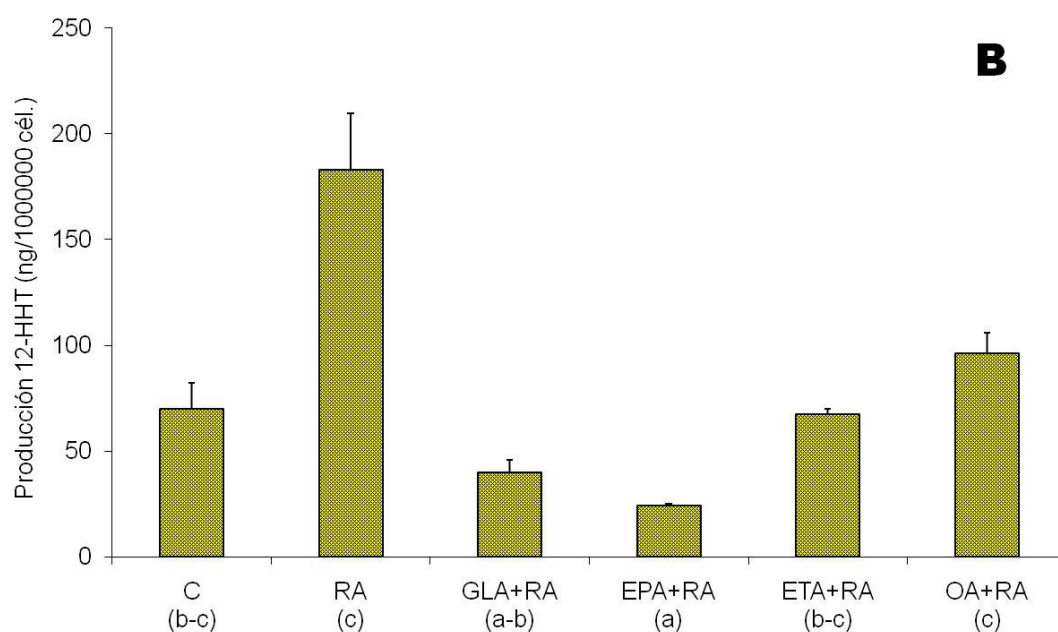
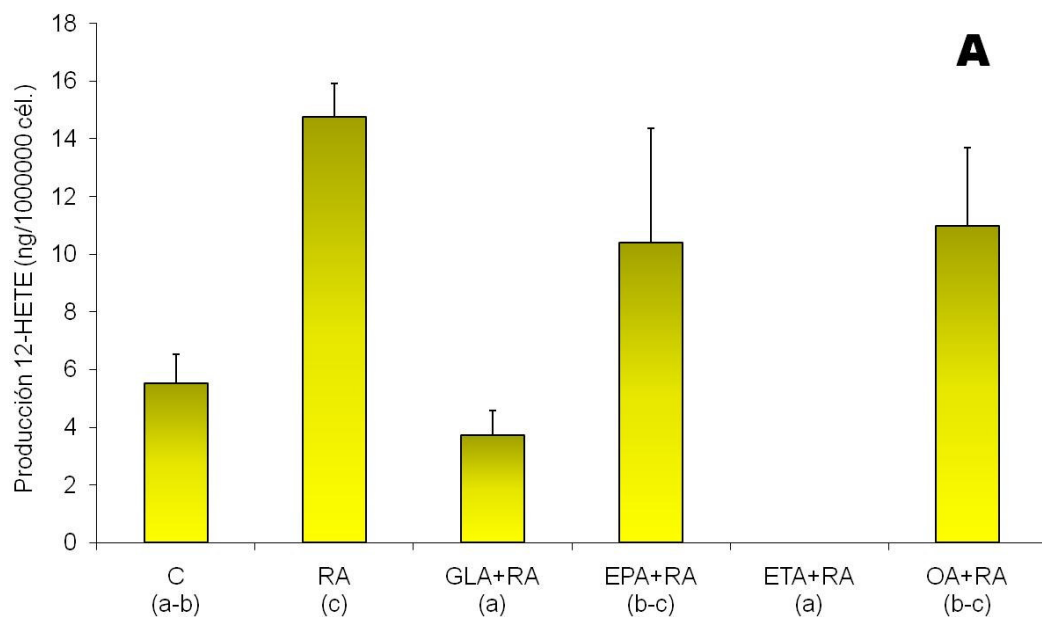
En nuestros experimentos se encontró mayor actividad de vía LOX comparada con COX en ambas líneas celulares tumorales (Figuras 13 y 14).

Las células MCF-7 presentaron una mayor producción de eicosanoides a través de ambas vías enzimáticas comparadas con las ZR-75-1. En este contexto, el agregado del ácido retinoico sólo a los controles en células MCF-7 mostró un efecto inhibitor de las enzimas 12-LOX y COX. Con respecto a los ácidos grasos  $\omega$ -9, en las células MCF-7, se halló menor formación de 12-HHT sin efecto sobre 12-HETE.

En las células ZR-75-1 en cambio el agregado de RA mostró un efecto inductor en la liberación de eicosanoides. En cuanto a los AGs el agregado del ácido graso  $\omega$ -6 GLA, inhibió la actividad LOX mientras que EPA ( $\omega$ -3) también inhibió pero la vía COX. Con relación al efecto de los ácidos grasos  $\omega$ -9, la combinación de éstos AGs con RA no produjo cambios significativos en la producción de los biolípidos medidos.



**Fig. 13.** Producción de eicosanoides: **A) 12-HETE (vía LOX)** en las células **MCF-7** bajo los siguientes tratamientos (48 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA, respectivamente). **B) 12-HHT (vía COX)** en las células MCF-7 bajo los siguientes tratamientos (48 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA), respectivamente. Letras diferentes indican diferencia estadística ( $p < 0,05$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ).

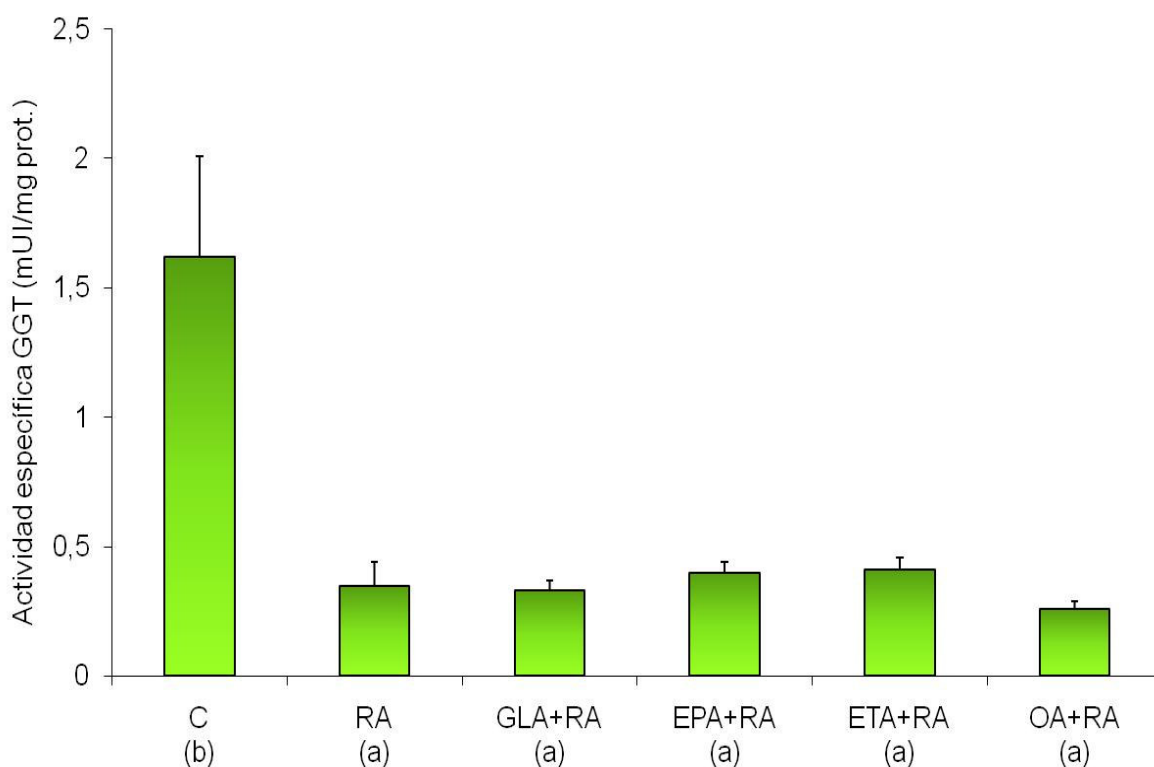


**Fig. 14.** Producción de eicosanoides: **A) 12-HETE (vía LOX)** y en las células **ZR-75-1** bajo los siguientes tratamientos (48 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA, respectivamente). **B) 12-HHT (vía COX)** en las células ZR-75-1 bajo los siguientes tratamientos (48 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA), respectivamente. Letras diferentes indican diferencia estadística ( $p < 0,05$ , media  $\pm$  error estándar,  $n = 3$ ).



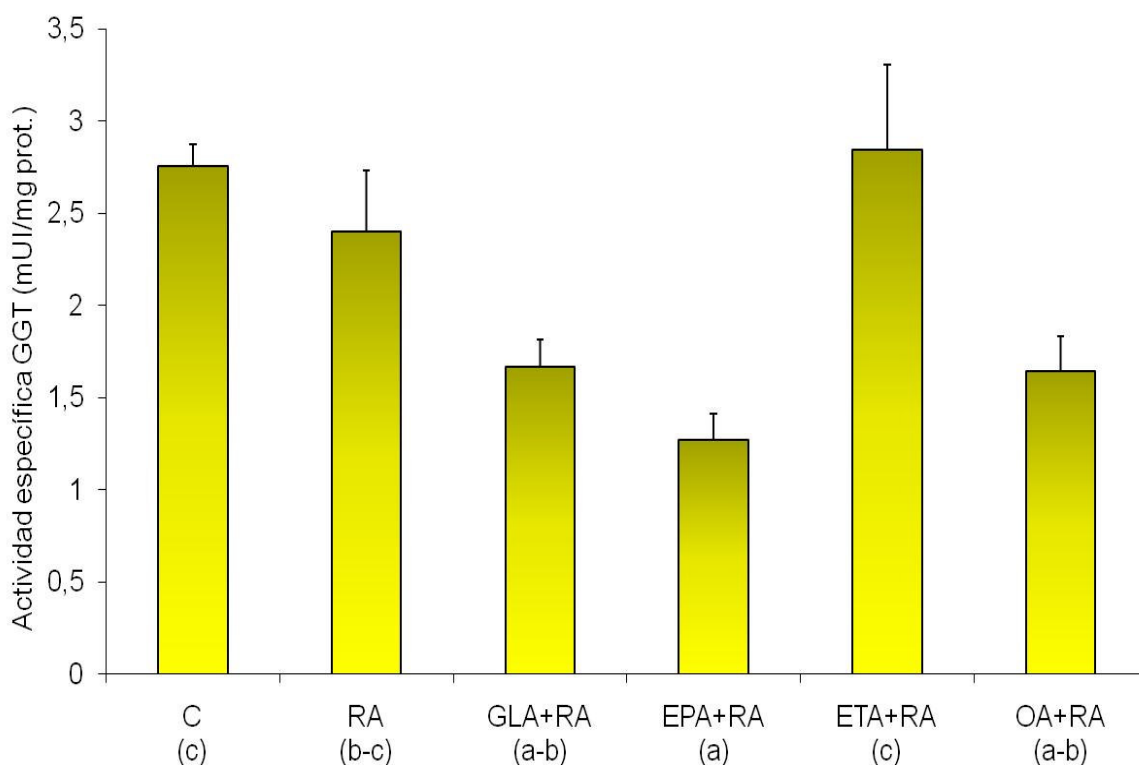
### 3.2.3. Actividad específica de $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa

Como se dijo, la actividad de esta enzima de membrana puede ser considerada como un marcador indirecto relacionado a malignidad (Figuras 15 y 16). De hecho, los controles de las líneas celulares estudiadas mostraron distintos niveles basales de la enzima, teniendo MCF-7 menor actividad enzimática que ZR-75-1. Todos los tratamientos (RA solo o combinado con algún ácido graso) fueron capaces de inhibir significativamente la actividad específica de la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa en las células MCF-7.



**Fig. 15.** Actividad específica de  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa (GGT) de las células **MCF-7** bajo los siguientes tratamientos (48 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA), respectivamente. Letras diferentes indican diferencia estadística ( $p < 0,05$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ).

En cambio, la línea ZR-75-1 tuvo un comportamiento diferente, ya que la inhibición de la enzima se observó sólo bajo el tratamiento combinado de RA más EPA.



**Fig. 16.** Actividad específica de  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa (GGT) de las células **ZR-75-1** bajo los siguientes tratamientos (48 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA), respectivamente. Letras diferentes indican diferencia estadística ( $p < 0,05$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ).

### **3.3. Estudio de la viabilidad celular tras 72 horas de tratamiento**

#### **3.3.1. Viabilidad celular**

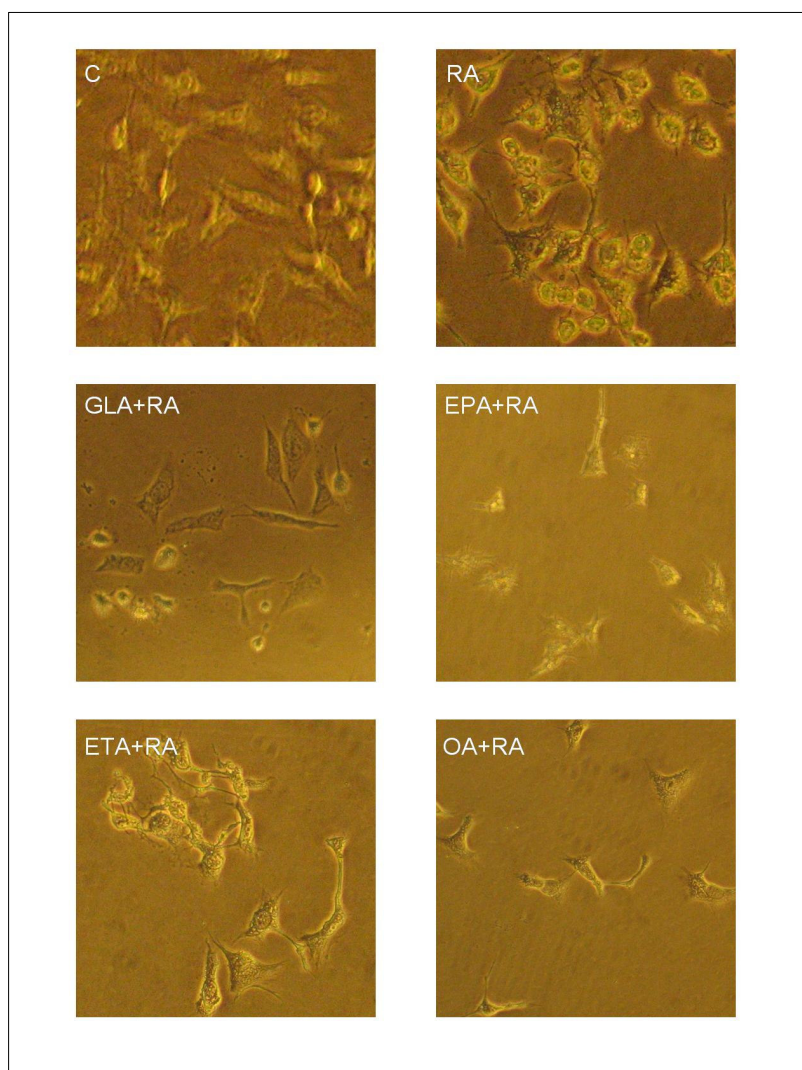
Dado que la perturbación de la proliferación celular es una característica neoplásica, se evaluó el efecto de los diferentes tratamientos sobre la viabilidad celular (Tabla II). Al comparar con los controles, la línea MCF-7

presenta mayor proliferación que la línea ZR-75-1. No obstante, en ambas líneas celulares, el agregado sólo de RA disminuyó la viabilidad celular. A su vez, cada línea presentó respuestas diferentes según el ácido graso que fue añadido. Así, en la línea MCF-7, el efecto antiproliferativo de RA fue incrementado por EPA y OA, mientras que GLA lo hizo en menor medida. En la línea ZR-75-1, se observó un aumento significativo del efecto de RA en las células co-tratadas con EPA, OA y ETA.

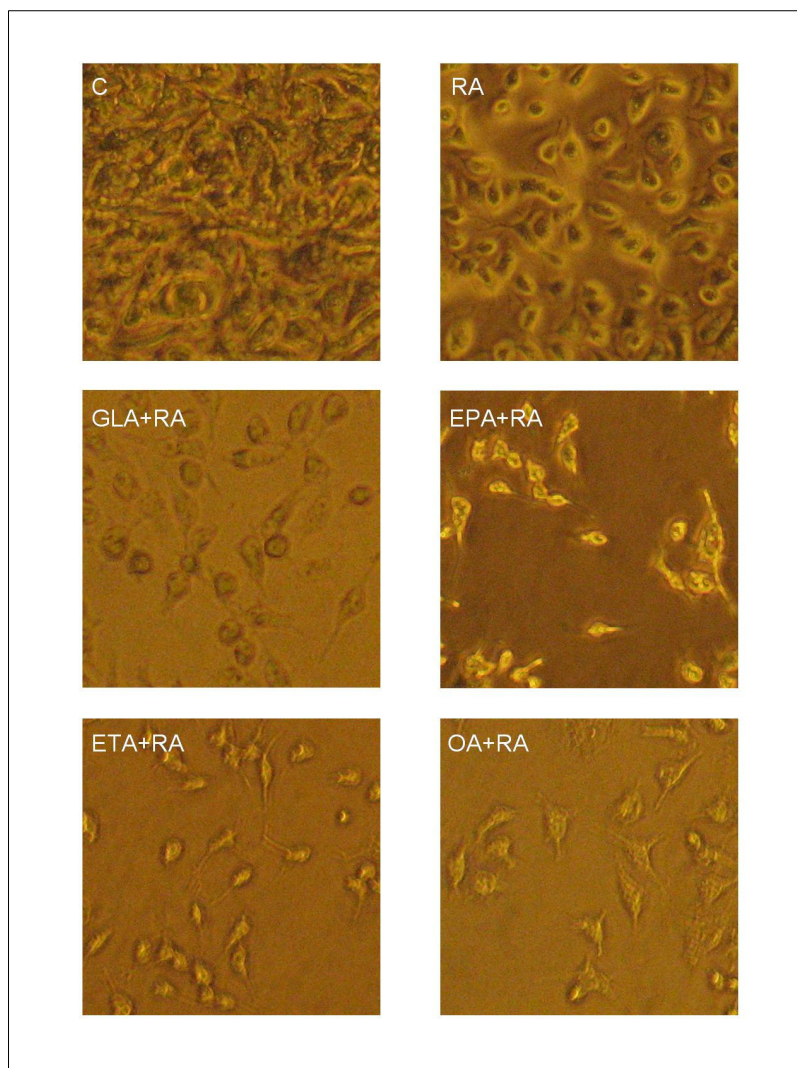
<b>Tabla II. Viabilidad de células tumorales por ensayo de MTT</b>				
<b>(absorbancia x 103 a 540 nm, media ± error estándar)</b>				
<b>Línea MCF-7</b>				
Tratamiento (72 h)*	Células sembradas por pozo (x103)			Estimación lineal (R2)
	10	20	30	
C	309,0 ± 14,7	326,5 ± 12,1	380,8 ± 31,8	3,6 (0,4)
RA	213,8 ± 35,8	183,3 ± 28,2	186,5 ± 21,1	-1,4 (0,1)
GLA+RA	79,5 ± 7,3	156,5 ± 9,8	156,0 ± 5,5	3,8 (0,7)
EPA+RA	43,5 ± 5,1	46,5 ± 4,1	78,0 ± 15,2	1,7 (0,4)
ETA+RA	94,0 ± 13,5	186,3 ± 36,3	219,0 ± 8,0	6,3 (0,6)
OA+RA	37,5 ± 6,4	27,3 ± 4,5	80,5 ± 8,4	2,2 (0,5)
<b>Línea ZR-75-1</b>				
C	600,4 ± 40,8	726,0 ± 56,3	1231,3±136,3	31,6 (0,7)
RA	460,3 ± 35,2	534,0 ± 22,7	721,0 ± 32,3	13,0 (0,8)
GLA+RA	420,7 ± 32,9	443,3 ± 27,0	517,7 ± 42,6	4,9 (0,3)
EPA+RA	211,3 ± 26,9	352,7 ± 1,0	416,3 ± 47,4	10,3 (0,7)
ETA+RA	273,0 ± 7,7	387,3 ± 33,9	394,5 ± 34,5	6,1 (0,5)
OA+RA	314,0 ± 43,1	337,7 ± 37,0	468,5 ± 6,3	7,7 (0,5)
* Tratamientos: control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido γ-linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA, respectivamente). Campos resaltados: Disminución significativa (p<0,05) respecto al control correspondiente (por columna y por línea).				

### 3.3.2. Hallazgos citológicos

Dado que las células que ven comprometida su viabilidad pueden adquirir características morfológicas particulares, la morfología resultante fue evaluado por microscopía invertida y de fluorescencia. De esta manera, se obtuvieron resultados concordantes con los hallados con el ensayo de MTT, en el sentido que hubo pocas figuras mitóticas (Figuras 17 y 18).



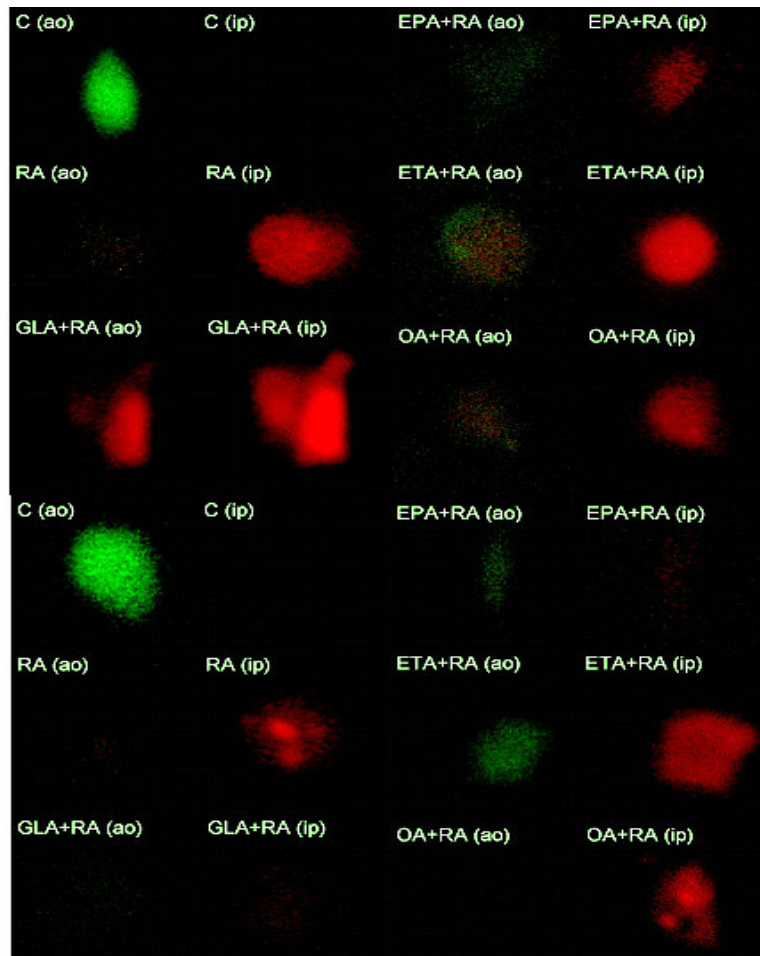
**Fig. 17.** Morfología celular de las células **MCF-7** (representativo de 3 experimentos separados) bajo los siguientes tratamientos (72 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o co-tratadas con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA), respectivamente. **Obsérvese la reducción de la densidad celular en las células co-tratadas comparadas con el control.**



**Fig. 18.** Morfología celular de las células **ZR-75-1** (representativo de 3 experimentos separados) bajo los siguientes tratamientos (72 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA), respectivamente. **Nótese la reducción de la densidad celular en los co-tratamientos comparadas con el control.**

Además de los cambios cuantitativos, se observó que la morfología adquirida tras 24 horas de tratamiento podría ser indicativo de grados de diferenciación celular, se mantuvo hasta el final en ambas líneas neoplásicas (72 horas de cultivo), La disminución de la proliferación celular

observada, se relacionó con el hecho de que ambas líneas efectivamente tenían comprometida su viabilidad, evaluada por la captación de yoduro de propidio. Sin embargo aún podían en mayor o menor grado captar el naranja de acridina, indicando integridad de la membrana plasmática, observándose algunas figuras apoptóticas características (Fig. 19).



**Fig. 19. Doble citofluorescencia de las células MCF-7 (sup.) y ZR-75-1 (inf.)** (representativo de 3 experimentos separados) bajo los siguientes tratamientos (72 h): control (C), ácido retinoico solo (RA), o con ácido  $\gamma$ -linoleico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico u oleico (GLA+RA, EPA+RA, ETA+RA y OA+RA), respectivamente. Naranja de acridina: ao; yoduro de propidio: ip. La viabilidad de las células control se evidencia por la captación del naranja de acridina (en la imagen células en verde). Mientras que la captación del yoduro de propidio indica lo contrario (en la imagen células en color rojo). La captación de ambos fluoróforos indica pérdida de la viabilidad con integridad de membranas (apoptosis).

#### **4. DISCUSION**

En las células tumorales, el metabolismo de los ácidos grasos escapa, o no responde adecuadamente a los mecanismos regulatorios requeridos para la homeostasis celular normal (129). Así, las células cancerosas presentan perfiles lipídicos alterados, no comparables a una célula normal. Dado esto, se postuló que la restauración del perfil a valores cercanos a lo normal por el agregado exógeno de ácidos grasos tendría implicancias beneficiosas sobre la biología celular y la malignidad de éstas células (129). Las líneas celulares utilizadas muestran diferentes perfiles, destacándose la mayor proporción de ácidos grasos insaturados en la línea ZR-75-1 respecto de MCF-7. Específicamente se observó un alto nivel de OA. Esto es importante ya que este perfil se asocia a una mayor fluidez de membrana, que es una característica de las poblaciones celulares que muestran constantes y rápida división mitótica (105).

Por otra parte, el RA cumple un rol central en el metabolismo de lípidos y en su mecanismo de acción como modulador de la fisiología celular (155). Entonces, el tratamiento combinado de éste junto a un determinado ácido graso, podría inducir cambios específicos en el perfil lipídico de las células tumorales estudiadas. Fue posible observar diferencias porcentuales en la incorporación entre las familias de ácidos grasos utilizadas y las líneas celulares cancerosas mamarias estudiadas.

En el caso de las líneas MCF-7 tratadas sólo con RA exógeno, mostraron un incremento del ácido graso EPA, que no se observó en el tratamiento combinado de EPA y RA. Por lo que en el primer caso el RA se estaría comportando como inductor, mientras que en el segundo caso como inhibidor, siendo este efecto específico para la mencionada línea. Estos resultados coinciden con los de otros investigadores en los cuales el aporte exógeno de ácidos grasos de diferentes familias modificó el perfil lipídico de

las células neoplásicas (81). Modificaciones lipídicas de membrana como las observadas hacen posible que las células se tornen más susceptibles a la acción de diversos agentes capaces de inducir en las mismas variadas respuestas (citotoxicidad y citodiferenciación). Ello se debe a modificaciones en la bicapa lipídica, compuesta principalmente por fosfolípidos. Los ácidos grasos que conforman éstas moléculas son los que le dan principalmente la fluidez a la membrana. La relación fluidez/viscosidad modifica la relación ligando/receptor (171). Entre los ligandos se pueden mencionar a agentes mitogénicos, factores de crecimiento, que actúan sobre receptores de membrana, al propio ácido retinoico y que están estrechamente relacionado al proceso neoplásico (155).

El efecto de nutrientes liposolubles sobre la expresión de genes es un campo promisorio para el desarrollo de estrategias antitumorales, ya que representaría una vía directa de regulación de su activación génica. Así, los AG insaturados son capaces de disparar señales celulares a través del sistema de segundos mensajeros, mientras que el RA actúa como ligando de receptores nucleares/factores de transcripción (65). Se conoce que el RA interacciona con receptores nucleares (RARs y RXRs) para activar la expresión de genes de respuesta a RA, y con las proteínas celulares que unen RA o CRABPs y también, dos enzimas de la familia citocromo P450, las CYP26A1 y CYP26B1, metabolizan el RA a formas inactivas y susceptibles de degradación (47).

Consecuentemente, las respuestas celulares a tratamientos combinados podrían generar un espectro más amplio de respuesta. Por ello, es importante evaluar diferentes efectos de tratamientos combinados con diversos ácidos grasos y RA, sobre la malignidad de las líneas en estudio, principalmente en lo que se refiere a inducción temprana de la diferenciación y/o posterior compromiso de la viabilidad celular.



La baja expresión o pérdida de E-caderina, proteína de adhesión celular homotípica, se correlaciona con un mayor potencial metastático, ya que las células afectadas pierden sus propiedades adhesivas facilitando movimientos migratorios y eventualmente metástasis (50). Es interesante que el ácido retinoico sólo o combinado con los ácidos grasos de diferentes familias, interviene en la motilidad celular y en los procesos de invasión y metástasis modificando la adhesión celular y la vía de traducción de señales relacionadas a estos procesos (50,54).

En nuestros resultados al evaluar la expresión de E-cadherina, se observó que las células tumorales *per se* tienen diferente expresión de la proteína en cuestión, dependiendo de la línea celular que se trate. Esto podría corresponder al grado propio de diferenciación de la línea que se trate, siendo las células MCF-7 una línea más diferenciada presentando un mayor grado de expresión de esta proteína (130). Las células MCF-7, bajo los diferentes tratamientos empleados no mostró modificaciones respecto a la expresión de caderina. Esto se relaciona con el hecho que es ya una estirpe diferenciada entonces, las respuestas a los tratamientos efectuados podrían estar solapadas o poco evidentes.

Al observar los resultados de la línea ZR-75-1, una línea más indiferenciada vemos como respondió al agregado exógeno de RA, solo y también combinado con los ácidos grasos GLA, EPA y OA aumentando en todos los casos la expresión de E-Cadherina. Se sabe que el ácido retinoico es un poderoso citodiferenciador celular (105). Los retinoides, como el retinoico modulan diversos procesos como la diferenciación celular, apoptosis, proliferación y la morfogénesis en los vertebrados, y en su uso han demostrado ser clínicamente eficaces. Por otro lado algunos AGs ya sean de la familia  $\omega$ -6,  $\omega$ -3 ù  $\omega$ -9, también ejercen una acción beneficiosa en el proceso neoplásico, favoreciendo la aparición de características fenotípicamente deseables tales como desencadenar apoptosis, o disminuir

la proliferación celular. No sucede lo mismo con otros UFAs que pueden aparecer en las células y tejidos en condiciones nutricionales anormales. Así, el ácido eicosatrienoico (ETA 5, 8,11; 20:3  $\omega$ -9) cuyo precursor es el ácido oleico, un ácido graso no esencial, aparece en cantidades elevadas en los tejidos cuando existe una deficiencia en ácidos grasos de la familia  $\omega$ -6. Esta condición está asociada a alteraciones en la proliferación, diferenciación y apoptosis celular (53, 54).

Sin embargo y contrastando con esos resultados en lo que al ácido retinoico se refiere, podríamos decir que en los nuestros, los AGEs como el GLA y el EPA y el no esencial OA, son reguladores positivos y beneficiosos para la expresión de la E-caderina, al menos en la línea más indiferenciada (ZR-75-1). Sus efectos biológicos estarían mediados a través de la activación de los receptores del ácido retinoico (RAR/RXR), que actúan como factores de transcripción regulando la expresión de numerosos genes.

Las manipulaciones nutricionales en cuanto a la cantidad y calidad de los ácidos grasos pueden modificar estructural y funcionalmente a las membranas celulares. Como ya se mencionó, los ácidos grasos condicionan muy significativamente las propiedades del "ambiente" o "dominio" de membrana en el cual las proteínas están insertas, como la E-caderina. Cambios en estos dominios alterarían las funciones de ciertas proteínas intrínsecas que, por otra parte, actúan como receptores, enzimas y canales iónicos (59). Es importante aquí una fluidez de la membrana celular adecuada y precisa, que dependerá de la composición de los fosfolípidos en los ácidos grasos junto con el colesterol. En efecto, se conoce que ciertos procesos de transporte, propiedades biofísicas de algunas membranas y determinadas actividades enzimáticas de la membrana cesan o se perturban cuando la viscosidad de la bicapa aumenta por encima de un valor umbral (20).

Por lo expuesto podemos decir que la expresión de E-caderina, una glicoproteína intrínseca de membrana, parece depender en parte del grado de diferenciación de la línea celular en estudio y puede ser modulada por el agregado exógeno de ácido retinoico y ácidos grasos.

La estrecha relación que existe entre el citoesqueleto y otras proteínas estructurales de la célula quedó evidenciada por la correspondencia observada entre los cambios en la distribución de actina y la marcación de caderina-E en nuestros resultados (98). Además de los cambios morfológicos mencionados que estarían asociados al efecto diferenciador de los tratamientos empleados en nuestros experimentos, debe tenerse en cuenta que los microfilamentos forman parte de la respuesta temprana a estrés celular. En este sentido, estaríamos hablando de una alteración de la biología tumoral. Más aun, las agrupaciones corpusculares (ver fig. 10) observadas refuerzan esta idea, ya que corresponderían a perturbaciones en el estado de polimerización de actina y formación de gránulos de estrés (153).

En nuestros estudios observamos que la producción de dienos conjugados (DC) estuvo relacionada no sólo al aporte exógeno de RA sino a la combinación de éste con las diferentes familias de ácidos grasos empleadas. La estirpe MCF-7 presentó un incremento de la peroxidación lipídica, evaluada por la liberación de DC, cuando se trató con RA con el agregado de ETA. Hubo, a su vez una disminución de los DC cuando se le ofreció a las células tanto RA como GLA. La célula cancerosa por perturbaciones en el metabolismo de los ácidos grasos utiliza los no esenciales, como el ácido oleico, elongándolo y desaturándolo hasta obtener 20:3  $\omega$ -9, ETA, el ácido graso anómalo empleado en nuestro estudio para tratar de suplir la carencia en AGEs (53). Una interpretación para esto puede radicar en el aprovechamiento vicariante por parte de esta estirpe neoplásica de ese sustrato anómalo. La disminución de peróxidos lipídicos

en células tratadas con RA y GLA podría deberse a la labilidad que presentan los DC, de metabolizarse rápidamente a otros productos de peroxidación no mensurables (7).

El papel y el significado de los lipoperóxidos, en la neoplasia, es contradictorio pero no por eso menos importante (89). Los mismos se producen y liberan en células normales, pero relativamente a bajas concentraciones, evitando la producción en cascada de DC a partir de los lípidos insaturados. Esto es así porque por un lado los lípidos están protegidos de la oxidación por antioxidantes naturales como la vitamina A, D y E. Por el otro debido a que hay un sistema efectivo que no solo previene la oxidación sino que ejecuta la remoción de lípidos oxidados que pudiesen haberse formado. La vitamina A y sus derivados, objetos de nuestros estudios entre otros sistemas, es importante en ese sentido sea evitando la oxidación como en remover lipoperóxidos, en resistir la oxidación como en remover lípoperóxidos que se hubiesen formado (101).

A través del empleo de un sistema in vitro, la actividad de los retinoides como antioxidantes ha sido clasificada de la siguiente manera: el retinol es más efectivo que retinal y éste más que el retinyl- palmitato y éste a su vez, más que ácido retinoico (148). Sin embargo también se consideran a los retinoides como moléculas con actividad redox, ya que pueden ejercer sus efectos antioxidantes, o bien prooxidantes, dependiendo principalmente de las concentraciones de vitamina A y del entorno lipídico (107). A pesar de las evidencias sobre las propiedades antioxidantes de la vitamina A discutidas precedentemente (112), hay que tener en cuenta que el  $\beta$ -caroteno (provitamina A) fue ineficaz en ensayos clínicos de quimioprevención del cáncer de pulmón en los ensayos de Eficacia de Caroteno y Retinol (CARET) (123) y en el Estudio de Alfa Tocoferol, Beta Caroteno (ATBC) (168). Ambos ensayos pusieron de manifiesto que el  $\beta$ -caroteno, no sólo no protege a los fumadores del riesgo del cáncer de

pulmón, sino que hasta favorecería su aparición, hallazgos que desencadenaron la suspensión inmediata de la investigación mencionada. Los últimos datos al respecto revelan que, la exposición simultánea al estrés oxidativo y a los productos de transformación del  $\beta$ -caroteno en éstos pacientes, favorece los efectos genotóxicos del estrés oxidativo (1). Alternativamente, el exceso de la vitamina A suministrada de conocido efecto antioxidante, podría haber eliminado el efecto citotóxico de los lipoperóxidos que, como se discutió precedentemente son necesarios para desencadenar la apoptosis selectiva de las células cancerosas (67, 76).

En relación a lo precedente las células cancerosas son altamente resistentes a la peroxidación. Ellas siempre forman niveles más bajos de peróxidos lipídicos que las células normales del mismo tejido, no canceroso, evitando así un posible daño al ADN y su consecuente muerte celular. En efecto, algunos autores han propuesto que se produce significativa liberación de radicales-lipoperóxidos del tipo superóxidos, dando como resultado la muerte de la célula tumoral, por un efecto citotóxico específico (143). En la línea ZR-75-1 el ácido retinoico ya sea con el añadido del ácido graso  $\omega$ -3 EPA o el  $\omega$ -9 OA, incrementó la producción de DC. Este dato corrobora lo propuesto por Das y colaboradores, quienes comunicaron que el aceite de pescado, rica fuente natural de EPA, produjo un efecto citotóxico beneficioso sobre células tumorales mamarias humanas. Ellos postularon que el efecto observado está asociado a un incremento de los productos de peroxidación lipídica de las células tumorales (33). Numerosos trabajos previos tanto in vivo como in Vitro, han señalado que el aporte de ácidos grasos poliinsaturados como el EPA incrementa la producción de radicales superóxidos en otras estirpes neoplásicas. Ello da pie a la hipótesis de que los lipoperóxidos, actuarían como mediadores de la acción tumoricida (31, 33). Lo discutido precedentemente no explica el efecto prooxidante del ácido oleico, pero sí podría considerar que posee una doble ligadura que puede ser causal de lipoperóxidos.

Entonces, la presencia de una cantidad adecuada y bien balanceada de peróxidos lipídicos sería un eficiente mecanismo citotóxico, que aseguraría la eliminación de las células malignas, disparando, tal vez el normal mecanismo de apoptosis. Horrobin y colaboradores propusieron hace más de dos décadas, que la mencionada resistencia a la peroxidación se debe al bajo contenido de PUFAs presentes en las membranas de las células neoplásicas. Esto es, a falta de sustrato, se genera una perturbación metabólica que resulta en una carencia relativa de peróxidos lipídicos. Ello podría ser una circunstancia co-adyuvante para favorecer la proliferación alterada característica de los tumores malignos (76, 105). Por lo tanto el rol de los lipoperóxidos en lo que respecta a las células cancerosas podría ejercer un papel bimodal, como discutiremos a continuación. Los lipoperóxidos intracelulares actuarían de dos maneras: por un lado serían perjudiciales para las células normales cuando están en exceso produciéndole daño a veces irreversibles en el ADN (18). Pero por otro lado tendrían un efecto beneficioso desencadenando citotoxicidad y apoptosis selectiva de la célula tumoral (47).

Como mencionamos en la introducción, los eicosanoides son importantes biomoléculas lipídicas, generadas a partir del metabolismo de varios AGs, entre ellos el AA por dos vías enzimáticas COX (1,2) y 12- LOX. En nuestros estudios las células controles de MCF-7 mostraron mayor producción de eicosanoides a través de ambas vías en comparación con las células ZR-75-1. En este contexto, el RA se comportó como un inhibidor de la liberación de eicosanoides en MCF-7 (una línea con niveles basales más altos de eicosanoides) y como un inductor en ZR-75-1 (una línea con niveles basales más bajos de eicosanoides). En ésta última línea más indiferenciada, mientras los efectos de RA sobre la actividad vía LOX fueron suprimidos por GLA, el EPA fue un inhibidor de la vía COX, independientemente del efecto hallado para RA. En este sentido, el RA

podría estar produciendo una sobreactividad de las enzimas 12- LOX y COX, o su sobreexpresión, con el consecuente aumento de sus derivados metabólicos. Algunos autores indican que el RA promueve la actividad incrementada de COX2 y favorece la liberación de la PGE2 en algunos tipos de cáncer (2).

A pesar de que el tratamiento con GLA produjo un aumento en el porcentaje de AA (ver Figura 5), esto no se vio reflejado en una mayor liberación de los metabolitos derivados tales como 12-HETE y 12 HHT, por lo cual el GLA disminuyó la actividad de las enzimas, 12-LOX y COX previamente inducidas por RA. Igual que con GLA, el ETA disminuyó la actividades de ambas enzimas, marcadamente la vía 12-LOX, a juzgar por la disminución de su metabolito principal, el 12-HETE. El tratamiento con OA más RA no produjo la liberación de los metabolitos 12-HETE y 12-HHT respecto a sus controles. Es conocido que una cantidad elevada de ácido oleico en las células inhibe la actividad de las enzimas delta 6 y delta 5 desaturasas, importantes para la producción de otros ácidos grasos como el AA, que al estar poco o nada presente, puede resultar en la la producción disminuída de eicosanoides (35).

La disminución de la libración del 12-HHT observada en esta línea más indiferenciada (ZR-75-1), con el agregado de EPA, coincide con los resultados hallados por Das (36) en células cancerosas de mama donde el tratamiento con EPA inhibió la cascada metabólica del AA principalmente a través de un freno de la actividad en la célula de la vía COX.

Con respecto a los ácidos grasos  $\omega$ -9, en las células MCF-7, se halló menor formación de 12-HHT sin efecto sobre 12-HETE, efecto similar al observado con RA administrado sólo. Como mencionamos anteriormente la alta oferta de  $\omega$ -9, inhibe la actividad de enzimas ya que como sustrato alternativo compite por las mismas, desviando la vía de producción de metabolitos.

Observamos una gran actividad de la GGTP en ambas líneas celulares, indicando esto una mayor resistencia al daño oxidativo. A fin de evaluar la eficacia de este mecanismo se probaron los diferentes tratamientos, donde las células MCF-7 resultaron ser más susceptibles a dicho efecto inducido por retinoico, independientemente de la presencia o no de ácidos grasos. De hecho el RA al producir la disminución de la actividad de la enzima es de prever la recuperación del nivel intracelular del glutatión, lo que podría traer aparejado una pérdida en la resistencia celular al estrés (63).

En cambio, en la línea ZR-75-1 los co-tratamientos inhibidores fueron con GLA, OA y EPA siendo éste último el único AG que mostró mayor efecto que al utilizar el ácido retinoico solo. En este caso GLA y OA resultaron ser adecuados inhibidores, pero sin poder diferenciarlos claramente del efecto del RA. En cambio el EPA ( $\omega$ -3) mostró ser un potente inhibidor de la actividad de la enzima. Quizás también por ser un ácido graso que produce un importante aumento en la liberación de radicales libres (32). A su vez está comprobado que el EPA como otros AGs de la familia  $\omega$ -3 (ácido docosahexaenoico) pueden modificar el estrés oxidativo e inhibir el metabolismo del AA a través de la COX y producir así moléculas antiinflamatorias con propiedades antineoplásicas (117, 139).

Consistentes y numerosas evidencias han demostrado que el desarrollo y progresión del cáncer podría deberse a la acumulación de numerosas alteraciones genéticas, las cuales resultan finalmente en un fenotipo agresivamente maligno (135). En nuestros estudios el RA sólo, en ambas líneas tumorales de mama, disminuyó la proliferación celular mostrando un efecto citotóxico también, efecto que se vio aumentado por el agregado de determinados ácidos grasos a los cultivos celulares.



Los efectos antitumorales de los retinoides son atribuidos a su influencia sobre la proliferación, diferenciación y apoptosis celular (131). Los mecanismos moleculares por los cuales el RA actúa sobre los procesos de inhibición de crecimiento tumoral y diferenciación son aún poco claros. Sin embargo si se conoce que el RA induce la liberación de ácido araquidónico y que éste y sus metabolitos pueden jugar un importante rol en la homeostasis tisular (57). En nuestro trabajo, ambas líneas celulares fueron sensibles al agregado exógeno del RA con una marcada disminución de la proliferación, y en ambas el agregado de EPA y OA aumento significativamente dicho efecto antiproliferativo. En la línea MCF-7 presentó, por el agregado de GLA una disminución en la proliferación celular (PC) mientras que en ZR-75-1 el ETA también disminuyó la PC. Para algunos autores la actividad anticancerígena del RA estaría mediada por los receptores nucleares (RAR) y por la proteína intracelular que se liga al retinoico (CRABP-II) (177). Un resultado interesante surgido de nuestro trabajo fue la inhibición del crecimiento celular por RA, que coincide con resultados previos de Donato LJ (45). Estos autores mostraron que en células en cultivo de mama se produjo la interrupción del ciclo celular, controlando al gen Btg2, que es un receptor directo del RA, seguido por una inducción hacia la apoptosis.

Por otro lado, al efecto antiproliferativo del RA observado por otros autores en condiciones experimentales a las nuestras, se suma el hecho que algunos ácidos grasos de cadena larga, no esenciales, como los  $\omega$ -9 (OA y ETA) tienen un efecto inhibitorio sobre la proliferación avalando los resultados de Pasqualini et al (128) donde observaron que los ácidos grasos  $\omega$ -9 reducen el crecimiento tumoral, la metástasis y la producción de eicosanoides pro-tumorigénicos como el 12 (S)-HETE and 15 (S)-HETE. En forma más reciente estudios epidemiológicos han señalado que las poblaciones del mediterráneo tiene un menor riesgo de padecer diversos tipos de tumores (132). Ello ha sido atribuido entre otras posibles causas al alto consumo de

aceite de oliva, que es muy rico en ácido oleico (51). Por otra parte es ampliamente conocido que los AGEs de la familia  $\omega$ -3 también tienen efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos (48).

Por lo anteriormente expuesto se puede inferir que el RA solo disminuye *per se* la proliferación celular. Dicho efecto observado se ve potenciado por el uso de los AGEs, de la familia  $\omega$ -3 y los no esenciales, de la familia  $\omega$ -9 como el ácido oleico.

Con la finalidad de avanzar en el conocimiento sobre la citotoxicidad observada por los tratamientos descritos, se evaluó algunos parámetros ligados a la funcionalidad de las membranas celulares en células cuya viabilidad se vio comprometida. Así al analizar las microfotografías de fluorescencia confirmamos la viabilidad de los controles y observamos que los tratamientos inducían muerte celular de modo diferente. Dado que las células que eran positivas para el yoduro de propidio se marcaban al mismo tiempo con naranja de acridina, pudimos concluir que las membranas y por ende las células conservaban cierta funcionalidad e integridad, principalmente en estadios más tempranos del tratamiento experimental. Estos hechos indicarían que la forma predominante de muerte celular es la apoptosis, estando esto apoyado por los cambios morfológicos observados.

Nuestros resultados corroboraron y ampliaron las evidencias indicativas que el RA induce en las células tumorales mamarias apoptosis, hecho ampliamente registrado (88). Un posible mecanismo de acción es a través de la capacidad de éste isómero de aumentar la actividad de caspasas en el citoplasma. Ello induce la liberación mitocondrial de la citocromo C al citosol provocada por el estrés oxidativo. A su vez, ello puede aumentar los niveles intracelulares de la caspasa-3 disparando el proceso de apoptosis (124). Por otro lado, el RA potencia la acción de enzimas antioxidantes como las catalasas y la glutatión peroxidada (73).

Alternativamente, diversas estirpes de células tumorales humanas bajo tratamientos con AGs de la familia  $\omega$ -3, especialmente el EPA, el docosahexenoico y GLA desencadenan apoptosis debido a la generación intracelular de radicales libres y a la formación de peróxidos lipídicos (105).

Como corolario del presente trabajo podemos decir que deficiencias metabólicas o nutricionales del RA y de los AGEs, situaciones nutricionales no sólo capaces de alterar el crecimiento, desarrollo y mantenimiento adecuados de todo el organismo, sino que producirían perturbaciones desfavorables en el papel modulador homeostático de los controles de proliferación, diferenciación y apoptosis, eventualmente generando condiciones de riesgo para el desarrollo de ciertos tumores malignos como el de mama y otros. En efecto, la regulación de la expresión génica juega un rol crítico en la modulación del metabolismo en mamíferos. Entre éstos, receptores nucleares como los PPARs y los receptores de retinoides (RAR, RXR) están implicados no sólo en la homeostasis lipídica y el metabolismo energético sino también regulando toda la fisiología celular. En tal sentido la interacción entre ambas vías tendría efecto importante sobre el desarrollo de células tumorales.

Con el conjunto de datos disponibles, el resultado de hábitos dietarios saludables, o bien de intervenciones nutricionales utilizando derivados de ácidos grasos y vitamina A generalmente denominados nutraceuticos se basarían en la modulación de las mencionadas vías, ya que constituyen puntos comunes de regulación de la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celular. Así, la actividad quimiopreventiva y antitumoral derivada del uso conjunto de nutrientes dependerá de los efectos sinérgicos a nivel transcripcional de los mismos. No obstante, el grado de diferenciación de las células mamarias se presenta como un preconditionante de la respuesta epigenética a nutrientes. Por lo tanto el estudio nutrigenómico de diferentes

receptores para ligandos dietarios serán de gran valor en el desarrollo de intervenciones clínico-nutricionales (138).

## CONCLUSIONES

Factores epigenéticos emergen como respuesta a los mecanismos en el desarrollo del cáncer. De todos los factores ambientales, la dieta jugaría un rol crítico en la prevención y patobiología del cáncer y la manipulación dietaria tiene un significativo papel en la iniciación y progresión de un cáncer. En el presente trabajo hemos aportado datos originales del efecto del ácido retinoico y algunos AGs exógenos sobre dos líneas de cáncer de mama humanos, comprobándose la hipótesis planteada por los diferentes resultados obtenidos.

Si bien el ácido retinoico fue capaz de inducir diferenciación en una de las líneas celulares, no fue capaz por sí solo de inducir estrés celular, lo que se tradujo en un efecto más atenuado para inducir apoptosis, comparado con los tratamientos conjuntos a diversos AGs.

Entre los ácidos grasos de mayor interés en nuestro estudio la oferta exógena de los ácidos grasos de la familia  $\omega$ -6 (GLA) resultó menos concluyente. En cambio los ácidos grasos de las familias  $\omega$ -3 y  $\omega$ -9 indujeron efectos más notorios en los parámetros de diferenciación y estrés celular. En tal sentido, el EPA ( $\omega$ -3) fue capaz de potenciar el efecto diferenciador de ácido retinoico. Más aún, promovió en las células la susceptibilidad al estrés, potenciando así sinérgicamente el efecto antitumoral del ácido retinoico. Por su lado, los AGs de la familia  $\omega$ -9 (OA, ETA), mostraron predominantemente efectos pro-oxidantes y citotóxicos.

En resumen, el uso conjunto de ácido retinoico y ciertos AGs, principalmente los provenientes de las familias  $\omega$ -3 y  $\omega$ -9, tendrían un potencial antineoplásico que debiera ser considerado en el desarrollo de coadyuvantes naturales en terapias oncológicas futuras.

## **GLOSARIO**

AR: ácido retinoico

AGs: ácidos grasos

AGEs: ácidos grasos esenciales.

UFAs: unnsaturated fatty acids (ácidos grasos insaturados)

RAR: Receptor Acido Retinoico

RXR: Receptor Retinoides X

PPARs: Receptores activados por proliferadores de peroxisomas.

LOX: Lipooxigenasa

COX: Ciclooxygenasa

AA: Ácido araquidónico

PUFAs: polynsaturated fatty acids (Ácidos grasos polinsaturados)

HPLC: High permomance liquid cromathografy (Cromatografía de alta definición)

GC: Gas Cromathografy (Cromatografía de Gas)

GGTP: Gamma glutamyl transpeptidasa.

12- (S)HETE: 12(S)- Hydroxieicosa-5Z,8Z,10E,14Z-tetraenoic acid.

12 (S)HHT: 12(S)-Hydroxyheptadeca-5Z,8E,10E-trienoic acid.

EPA: ácido eicosapentaenoico

ETA: ácido eicosatetraenoico

GLA: ácido gama-linoleico

OA: ácido oleico

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alija AJ, Bresgen N, Sommerburg O, Langhans CD, Siem W, Eckl PM. Beta-carotene breakdown products enhance genotoxic effects of oxidative stress in primary rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 27:1128-1133, 2006.
2. Alique M, Herrero JF, Lucio-Cazana FJ. All-trans retinoic acid induces COX-2 and prostaglandin E2 synthesis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: Involvement of retinoic acid receptors and extracellular-regulated kinase 1-2. *J Neuroinflammation* 4:1, 2007.
3. Aljurf M, Al Qurashi F, Al Mohareb F, Sahovic E, Al Sharif F, Al Zahrani H, Al Shanqeeti A, Owaidah T, Iqbal A, Zaidi SZ, Nurgat ZA, Sanz M, Chaudhri N. High efficacy and low toxicity of APL induction with concurrent idarubicin/ATRA followed by a novel and simplified outpatient post-remission therapy using single doses of idarubicin and intermittent ATRA. *Med Oncol* 27:702-707, 2010.
4. Andreatta MM, Navarro A, Muñoz SE, Aballay L, Eynard AR. Dietary patterns and food groups are linked to the risk of urinary tract tumors in Argentina. *Eur J Cancer Prev* 19:478-484, 2010.
5. Anisimov VN. Biology of aging and cancer. *Cancer Control* 14:23-31, 2007.
6. Armuth V, Berenblum I. A possible in vivo skin model for tumour promoter assays. *Cancer Lett* 15:343-346, 1982.
7. Bastien J, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328:1-16, 2004.

8. Belonogov RN, Titova NM, Lapeshin PV, Ivanova YR, Shevtsova AO, Pokrovskii AA. Changes in the content of protein and lipid oxidative modification products in tumor tissue at different stages of lung cancer. *Bull Exp Biol Med* 147:630-631, 2009.
9. Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a003129, 2009.
10. Bidgoli SA, Ahmadi R, Zavarhei MD. Role of hormonal and environmental factors on early incidence of breast cancer in Iran. *Sci Total Environ* 408:4056-4061, 2010.
11. Blanco A. Lípidos. En: *Química Biológica* (7<sup>o</sup> ed.). Córdoba: Edit. El Ateneo, pp. 77-93, 2001.
12. Blaner WS. Cellular metabolism and actions of 13-cis-retinoic acid. *Am Acad Dermatol* 45:S129-S135, 2001.
13. Bode AM, Dong Z. Signal transduction molecules as targets for cancer prevention. *Sci Signal* 2:mr2, 2009.
14. Bongiovanni GA, Eynard AR, Calderón RO. Altered lipid profile and changes in uroplakin properties of rat urothelial plasma membrane with diets of different lipid composition. *Mol Cell Biochem* 271:69-75, 2005.
15. Bortuzzo C, Hanif R, Kashfi K, Staiano-Coico L, Shiff SJ, Rigas B. The effect of leukotrienes B and selected HETEs on the proliferation of colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1300:240-246, 1996.



16. Brash D, Cairns J. The mysterious steps in carcinogenesis. *Br J Cancer* 101:379-380, 2009.
17. Brent N, Rexer, Wen Li Zheng, Ong DE. Retinoic acid biosynthesis by normal human breast epithelium is via aldehyde dehydrogenase 6, absent in MCF-7 cells. *Cancer Res* 61:7065-7070, 2001.
18. Brown JR, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 in lung carcinogenesis and chemoprevention: Roger S. Mitchell lecture. *Chest* 125:S134-S140, 2004.
19. Burr Burr GO, Burr MM. On the nature role of the fatty acids essential in nutrition. *J Biol Chem* 86:587-621, 1930.
20. Calderón RO, Eynard AR. Fatty acids specifically related to the anisotropics properties of plasma membrane from rat urothelium. *BB Acta* 1483:174-184, 2000.
21. Calviello G, Serini S, Piccioni E, Pessina G. Antineoplastic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in combination with drugs and radiotherapy: preventive and therapeutic strategies. *Nutr Cancer* 61:287-301, 2009.
22. Chambers AF, Naumov GN, Vantyghem SA, Tuck AB. Molecular biology of breast cancer metastasis: Clinical implications of experimental studies on metastatic inefficiency. *Breast Cancer Res* 2:400-407, 2000.
23. Cheepala SB, Yin W, Syed Z, Gill JN, McMillian A, Kleiner HE, Lynch M, Loganantharaj R, Trutschl M, Cvek U, Clifford JL. Identification of the B-Raf/Mek/Erk MAP kinase pathway as a target for all-trans retinoic acid during skin cancer promotion. *Toxicol In Vitro* 22:1205-1212, 2008.

24. Chlapek P, Redova M, Zitterbart K, Hermanova M, Sterba J, Veselska R. Enhancement of ATRA-induced differentiation of neuroblastoma cells with LOX/COX inhibitors: an expression profiling study. *J Exp Clin Cancer Res* 29: 45, 2010.
25. Comba A, Pasqualini ME. Primers on molecular pathways - Lipoxygenases: Their Role as an Oncogenic Pathway in Pancreatic Cancer. *Pancreatology* 9:724-728, 2009.
26. Connolly JM, Gilhooly EM, Rose DP. Effects of reduced dietary linoleic acid intake, alone or combined with an algal source of docosahexaenoic acid, on MDA-MB-231 Breast cancer cell Growth and apoptosis in nude mice. *Nutrit Cancer* 35:44-49, 1999.
27. Corsino PE, Davis JB, Nørgaard PH, Teoh Parker NH, Law M, Dunn W, Law BK. Mammary tumors initiated by constitutive cdk2 activation contain an invasive basal-like component. *Neoplasia* 10:1240-1252, 2008.
28. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Neoplasia. En: Robbins: Patología estructural y funcional (6º ed.). Madrid: Edit. Interamericana, pp. 227-347, 2000.
29. Crosignani P, Nappi C, Ronsini S, Bruni V, Marelli S, Sonnino D, The Italian EVRA Contrast Study Group. Satisfaction and compliance in hormonal contraception: The result of a multicentre clinical study on women's experience with the ethinylestradiol/norelgestromin contraceptive patch in Italy. *BMC Womens Health* 9:18, 2009.
30. Dai CW, Zhang GS, Shen JK, Zheng WL, Pei MF, Xu YX, Cao YX, Yi Y, Yang JJ, Peng HL, Zhong HY, Li RJ. Use of all-trans retinoic acid in combination with arsenic trioxide for remission induction in patients with

newly diagnosed acute promyelocytic leukemia and for consolidation/maintenance in CR patients. *Acta Haematol* 121:1-8, 2009.

31. Das NP. Effects of vitamin A and its analogs on nonenzymatic lipid peroxidation in rat brain mitochondria. *J Neurochem* 52:585-588, 1989.

32. Das UN. Essential fatty acids and their metabolites could function as endogenous HMG-CoA reductase and ACE enzyme inhibitors, anti-arrhythmic, anti-hypertensive, anti-atherosclerotic, anti-inflammatory, cytoprotective, and cardioprotective molecules. *Lipids Health Dis* 7:37, 2008.

33. Das UN. Essential fatty acids: A review. *Curr Pharm Biotechnol* 7:467-482, 2006.

34. Das UN. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol J* 1:420-439, 2006.

35. Das UN. A defect in  $\Delta 6$  and  $\Delta 5$  desaturases may be a factor in the initiation and progression of insulin resistance, the metabolic syndrome and ischemic heart disease in South Asians. *Lipids Health Dis* 9:130, 2010.

36. Das UN. Influence of polyunsaturated fatty acids and their metabolites on stem cell biology. *Nutrition* 27:21-25, 2011.

37. de Antueno RJ, Knickle LC, Smith H, Elliot ML, Allen SJ, Nwaka S, Winther M. Activity of human Delta5 and Delta6 desaturases on multiple n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett* 509:77-80, 2001.

38. de Freitas Junior JC, Silva BD, de Souza WF, de Araújo WM, Abdelhay ES, Morgado-Díaz JA. Inhibition of N-linked glycosylation by tunicamycin

induces E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and inhibits cell proliferation in undifferentiated human colon cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.*,2010

39. Deneke SM, Baxter DF, Phelps DT, Fanburg BL. Increase in endothelial cell glutathione and precursor amino acid uptake by diethyl maleate and hyperoxia. *Am J Physiol* 257:L265-L271, 1989.

40. Díaz MP, Osella AR, Aballay LR, Muñoz SE, Lantieri MJ, Butinof M, Paz RM, Pou S, Eynard AR, La Vecchia C. Cancer incidence pattern in Cordoba, Argentina. *Eur J Cancer Prev* 18:259-266, 2009.

41. Dilprit B, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST. Differential effects of prostaglandin derived from  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1751-1756, 2003.

42. Ding XZ, Tong WG, Adrian TE. 12-lipoxygenase metabolite 12(S)-HETE stimulates human pancreatic cancer cell proliferation via protein tyrosine phosphorylation and ERK activation. *Int J Cancer* 94:630-636, 2001.

43. Diplock AT, Balasubramanian KA, Manohar M, Mathan VI, Ashton D. Purification and chemical characterization of the inhibitor of lipid peroxidation from intestinal mucosa. *Biochem Biophys Acta* 962:42-50, 1998.

44. Dollé P. Developmental expression of retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal* 7:e006, 2009.

45. Donato LJ, Suh JH, Noy N. Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: the cell cycle control gene Btg2 is a direct target for retinoic acid receptor signaling. *Cancer Res* 67:609-615, 2007.
46. Duester G, Mic FA, Molotkov A. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact* 143-144:201-210, 2003.
47. Dymkowska D, Wojtczak L. Arachidonic acid-induced apoptosis in rat hepatoma AS-30D cells is mediated by reactive oxygen species. *Acta Biochim Pol* 56:711-715, 2009.
48. Edwards IJ, Sun H, Hu Y, Berquin IM, O'Flaherty JT, Cline JM, Rudel LL, Chen YQ. In vivo and in vitro regulation of syndecan 1 in prostate cells by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 283:18441-18449, 2008.
49. Emil R, Egelman EH. Actin structure and function: what we still do not understand. *J Biol Chem* 282:36133-36137, 2007.
50. Endo Y, Deonauth K, Prahalad P, Hoxter B, Zhu Y, Byers SW. Role of Sox-9, ER81 and VE-cadherin in retinoic acid-mediated trans-differentiation of breast cancer cells. *PLoS ONE* 3:e2714, 2008.
51. Escrich E, Solanas M, Moral R, Escrich R. Modulatory Effects and Molecular Mechanisms of Olive Oil and Other Dietary Lipids in Breast Cancer. *Curr Pharm Des* 2011, en prensa.
52. Eynard AR, Lopez CB. Conjugated linoleic acid (CLA) versus saturated fats/cholesterol: their ratios in fatty and lean meats may be involved in the risk for colon cancer. *Lipids Health Dis* 2:6-12, 2003.

53. Eynard AR. Does chronic essential fatty acid deficiency (EFAD) constitute a protumorigenic condition? *Med Hypotheses* 48:55-62, 1997.
54. Eynard AR, Jiang WG, Mansel RE. Eicosatrienoic acid (20:3 n-9) inhibits the expression of E-cadherin and desmoglein in human squamous cell carcinoma in vitro *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (6):37, 1998.
55. FAO-OMS. *Grasas y aceites en la nutrición humana*. N° 57. Consulta de Expertos. Washington DC: OMS, 1993.
56. FAO-OMS. *Papel de las grasas y aceites dietéticos en la alimentación humana*. N° 3. Consulta de expertos. Washington DC: OMS, 1998.
57. Farooqui AA, Antony P, Ong WY, Horrocks LA, Freysz L. Retinoic acid-mediated phospholipase A2 signaling in the nucleus. *Brain Res Brain Res Rev* 45:179-195, 2004.
58. Ferber EC, Kajita M, Wadlow A, Tobiansky L, Niessen C, Ariga H, Daniel J, Fujita Y. A Role for the Cleaved Cytoplasmic Domain of E-cadherin in the Nucleus. *J Biol Chem* 283:12691-12700, 2008.
59. Ferber EC, Kajita M, Wadlow A, Tobiansky L, Niessen C, Ariga H, Daniel J, Fujita Y. A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus. *J Biol Chem* 283:12691-12700, 2008.
60. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497, 1957.

61. Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HE, Behrens J, Sommer T, Birchmeier W. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex *Nat. Cell Biol* 4:222-231, 2002.
62. Futreal PA. Cancer and genomics. *Nature* 409:850, 2001.
63. 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* 14:2829-2839, 2005.
64. Geiger TR, Peeper DS. Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1796:293-308, 2009.
65. Ginestier C, Wicha MS. Mammary stem cell number as a determinate of breast cancer risk. *Breast Cancer Res* 9:109, 2007.
66. Glasgow WC, Eling TE. Epidermal growth factor stimulates linoleic acid metabolism in BALB/c 3T3 fibroblasts. *Mol Pharmacol* 38:503-510, 1990.
67. Gonzalez MJ, Schemmel RA, Gray JI, Dugan L, Sheffield LG, Welsch CW. Effect of dietary fat on growth of MCF-7 and MDA-MB231 human breast carcinomas in athymic nude mice: relationship between carcinoma growth and lipid peroxidation product levels. *Carcinogenesis* 12:1231-1235, 1995.
68. Gupta A, Kessler P, Rawwas J, Williams BR. Regulation of CRABP-II expression by MycN in Wilms tumor. *Exp Cell Res* 314:3663-3668, 2008.
69. Hansen LA, Sigman CC, Andreola F, Ross SA, Kelloff GJ, De Luca LM. Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis* 21:1271-1279, 2000.

70. Harbige LS. Fatty acids, the immune response, and auto-immunity: A question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids* 38:323-341, 2003.
71. Hessel S, Eichinger A, Isken A, Amengual J, Hunzelmann S, Hoeller U, Elste V, Hunziker W, Goralczyk R, Oberhauser V, von Lintig J, Wyss A. CMO1 deficiency abolishes vitamin A production from beta-carotene and alters lipid metabolism in mice. *J Biol Chem* 282:33553-33561, 2007.
72. Heukamp I, Gregor JI, Kilian M, Kiewert C, Jacobi CA, Schimke I, Walz MK, Guski H, Wenger FA. Influence of different dietary fat intake on liver metastasis and hepatic lipid peroxidation in BOP-induced pancreatic cancer in Syrian hamsters. *Pancreatology* 6:96-102, 2005.
73. Hong TK, Lee-Kim YC. Effects of retinoic acid isomers on apoptosis and enzymatic antioxidant system in human breast cancer cells. *Nutr Res Pract* 3: 77-83, 2009.
74. Honn KV, Tang DG, Gao X, Butovich IA, Liu B, Timar J, Hagmann W. 12-lipoxygenases and 12 (S)-HETE: role in cancer metastasis. *Cancer Metast Rev* 13:365-396, 1994.
75. Horrobin DF, Ziboh VA. The importance of linoleic acid metabolites in cancer metastasis and in the synthesis and actions of 13-HODE. *Adv Exp Med Biol* 433:291-294, 1997.
76. Horrobin DF. Unsaturated lipids and cancer. En: *New approaches to cancer treatment. Unsaturated lipids and photodynamic therapy.* Nova Scotia: Churchill Communications Europe, pp. 3-29, 1994.



77. Houghton JM, Coussens L, Karin M. Feeding the flame: New research adds to role of inflammation in cancer development. *J Natl Cancer Inst* 96:251-253, 2005.
78. Howe LR. Retinoids and breast cancer prevention. *Clin Cancer Res* 13:5983-5987, 2007.
79. Hsu HP, Shan YS, Jin YT, Lai MD, Lin PW. Loss of E-cadherin and beta-catenin is correlated with poor prognosis of ampullary neoplasms. *J Surg Oncol* 101:356-362, 2010.
80. Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJW. Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12401-12406, 1997.
81. Hu KQ, Liu C, Ernst H, Krinsky NI, Russell RM, Wang XD. The biochemical characterization of ferret carotene 9'-10'-monooxygenase catalyzing cleavage of carotenoids in vitro and in vivo *J Biol Chem* 281:19327-19338, 2006.
82. Hulbert AJ, Turner N, Storlien LH, Else PL. Dietary fats and membrane function: Implications for metabolism and disease. *Biol Rev* 80:155-169, 2005.
83. Hyde CAC, Missailidis S. Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis. *Intern Immunoph* 9:701-715, 2009.
84. Innis SM. Human milk: Maternal dietary lipids and infant development. *Proc Nutr Soc* 3:397-404, 2007.

85. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington DC: The National Academies Press, 2001.
86. Isseman I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645-650, 1990.
87. Jump DB. Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41:41-78, 2004.
88. Jiménez-Lara A M, Aranda A, Gronemeyer H. Retinoic acid protects human breast cancer cells against etoposide-induced apoptosis by NF-kappaB-dependent but cIAP2-independent mechanisms. *Mol Cancer* 9: 15, 2010.
89. Kandouz M, Nie D, Pidgeon GP, Krishnamoorthy S, Maddipati KR, Honn KV. Platelet-type 12-lipoxygenase activates NF-kappa B in prostate cancer cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 71:189-204, 2003.
90. Kang KS, Wang P, Yamabe N, Fukui M, Jay T, Zhu BT. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in MCF-7 cells in vitro and in vivo via reactive oxygen species formation and caspase 8 activation. *PLoS One* 5:e10296, 2010.
91. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 115:81-103, 2007.

92. Karmali RA, Marsh J, Fuchs C. Effect of omega-3 fatty acids on growth of rat mammary tumor. *J Natl Cancer Inst* 73:457-461, 1984.
93. Kello M, Mikes J, Jendzelovský R, Koval J, Fedorocko P. PUFAs enhance oxidative stress and apoptosis in tumour cells exposed to hypericin-mediated PDT. *Potochem Photobiol Sci*. 9(9):1244-51, 2010.
94. Kiningham KK, Cardozo ZA, Cook C, Cole MP, Stewart JC, Tassone M, Coleman MC, Spitz DR. All-trans-retinoic acid induces manganese superoxide dismutase in human neuroblastoma through NF-kappaB. *Free Radic Biol Med* 44:1610-1616, 2008.
95. Kloer DP, Schulz GE. Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cell Mol Life Sci* 63:2291-2303, 2006.
96. Kugelman A, Choy HA, Liu R, Shi MM, Gozal E, Forman HJ. Gamma-glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar L2 epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:586-592, 1994.
97. Kuniyasu H. The roles of dietary PPARgamma ligands for metastasis in colorectal cancer. *PPAR Res* 2008:529720, 2008.
98. Kwiatkowski AV, Maiden SL, Pokutta S, Choi HJ, Benjamin JM, Lynch AM, Nelson WJ, Weis WI, Hardin J. In vitro and in vivo reconstitution of the cadherin-catenin-actin complex from *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:14591-14596, 2010.
99. Larue L, Antos C, Butz S, Huber O, Delmas V, Dominis M, Kemler R. A role for cadherins in tissue formation. *Development* 122:3185-3194, 1996.

100. Leaver HA, Rizzo MT, Whittle IR. Antitumor actions of highly unsaturated fatty acids: cell signaling and apoptosis. *Prost Leuk Essen Fatty Acids* 66:1-3, 2002.
101. Lee HP, Casadesus G, Zhu X, Lee HG, Perry G, Smith MA, Gustaw-Rothenberg K, Lerner A. All-trans-retinoic acid as a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 9:1615-1621, 2009.
102. Lindqvist A, Andersson S. Biochemical properties of purified recombinant human beta-carotene 15,15'-monooxygenase. *J Biol Chem* 277:23942-23948, 2002.
103. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951.
104. Lu J, Tan L, Li P, Gao H, Fang B, Ye S, Geng Z, Zheng P, Song H. All-trans retinoic acid promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells via multiple pathways. *BMC Cell Biol* 10:57, 2009.
105. Lu X, Yu H, Ma Q, Shen S, Das UN. Linoleic acid suppresses colorectal cancer cell growth by inducing oxidant stress and mitochondrial dysfunction. *Lipids Health Dis* 9:106, 2010.
106. Mahéo K, Vibet S, Steghens JP, Dartigeas C, Lehman M, Bougnoux P, Goré J. Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA: a role for lipoperoxidation. *Free Radic Biol Med* 39:742-751, 2005.
107. Mantymaa P, Guttorm T, Siitonen T, Saily M, Savolainen ER, Levonen AL, Kinnula V, Koistinen P. Cellular redox state and its relationship to the inhibition of clonal cell growth and the induction of apoptosis during all-trans

retinoic acid exposure in acute myeloblastic leukemia cells. *Haematologica* 85:238-245, 2000.

108. Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P. Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal* 7:e002, 2009.

109. Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 182: 219-222, 2002.

110. Masahide M, Yoshimura R. The target of arachidonic acid pathway is a new anticancer strategy for human prostate cancer. *Biologics* 2:725-732, 2008.

111. Mitra SE, Facy F, Del Signore C, Vanhems P. Perception of epidemic's related anxiety in the General French Population: a cross-sectional study in the Rhône-Alpes region. *BMC Public Health* 10:191, 2010.

112. Mora JR, Makoto I, Von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev immunol* 8:685-698, 2008.

113. Moreno JJ. New aspects of the role of hydroxyeicosatetraenoic acids in cell growth and cancer development. *Biochem Pharmacol* 77:1-10, 2009

114. Morrison WR, Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* 5:600-608, 1964.

115. Muñoz SE, Silva RA, Lamarque A, Guzman CA, Eynard AR. Protective capability of dietary *Zizyphus mistol* seed oil, rich in 18:3,n-3, on the development of two murine mammary gland adenocarcinomas with high or low metastatic potential. *Prost Leuk Essent Fatty Acids* 53:135-138, 1995.

116. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93:229-240, 1998.
117. Narayanan NK, Narayanan BA, Reddy BS. A combination of docosahexaenoic acid and celecoxib prevents prostate cancer cell growth in vitro and is associated with modulation of nuclear factor-kappaB, and steroid hormone receptors. *Int J Oncol* 26:785-792, 2005.
118. Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Ann Rev Biochem* 55:69-102, 1986.
119. Neuhouser M, Sorensen B, Hollis BW, Ambs A, Ulrich CM, McTiernan A, Bernstein L, Wayne S, Gilliland F, Baumgartner K, Baumgartner R, Ballard-Barbash R. Vitamin D insufficiency in a multiethnic cohort of breast cancer survivors. *Am J Clin Nutr* 88:133-139, 2008.
120. Neuhouser ML, Barnett MJ, Kristal AR, Ambrosone CB, King IB, Thornquist M, Goodman GG. Dietary supplement use and prostate cancer risk in the Carotene and Retinol Efficacy Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:2202-2206, 2009.
121. Niederreither K, Dollé P. Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet* 9:541-553, 2008.
122. Niles R. Recent advances in the use of vitamin A (retinoids) in the prevention and treatment of cancer. *Nutrition* 16:1084-1090, 2000.
123. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL, Valanis B, Williams JH, Barnhart S, Hammar S.

Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 334:1150-1155, 1996.

124. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12:913-22, 2007.

125. Ozawa M. p120-independent modulation of E-cadherin adhesion activity by the membrane-proximal region of the cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 278:46014-46020, 2003.

126. Palace VP, Khaper N, Qin Q, Singal PK. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med* 26:746-761, 1999.

127. Pasqualini ME, Berra MA, Calderón RO, Cremonezzi DC, Giraudo C, Eynard AR. Dietary lipids modulate eicosanoid release and apoptosis of cells of a murine lung alveolar carcinoma. *Prostag Leuk Essent Fatty Acids* 72:235-240, 2005.

128. Pasqualini ME, Berra MA, Yurawecz MP, Reposi G Eynard AR. Dietary manipulation of precursor polyunsaturated fatty acids modulates eicosanoid and endocannabinoid synthesis: A potential tool to control tumor development. *Crit Nutr Food Sci* 3:161-175, 2008.

129. Pasqualini ME, Heyd VL, Manzo P, Eynard AR. Association between E-cadherin expression by human colon, bladder and breast cancer cells and the 13-HODE:15-HETE ratio. A possible role of their metastatic potential. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68:9-16, 2003.

130. Pasqualini ME, Mohn CE, Petiti JP, Manzo P, Eynard AR. COX and LOX eicosanoids modulate platelet activation and procoagulation induced by two murine cancer cells. *Prost Leuk Essent Fatty Acids* 63:377-383, 2000.
131. Patel JB, Mehta J, Belosay A, Sabnis G, Khandelwal A, Brodie AMH, Soprano DR, Njar VCO. Novel retinoic acid metabolism blocking agents have potent inhibitory activities on human breast cancer cells and tumour growth. *Br J Cancer* 96:1204-1215, 2007.
132. Pauwels EK. The protective effect of the mediterranean diet: Focus on cancer and cardiovascular risk. *Med Princ Pract* 20:103-111, 2011.
133. Perkovich M. Retinoic acid metabolism. *J Am Acad Dermatol* 45:S136-S142, 2001.
134. Pitot HC. The natural history of neoplastic development progression. En: *Fundamentals of Oncology* (3<sup>o</sup> ed.). New York: Marcel Dekker Inc., pp. 163-200, 1986.
135. Pogribny IP. Epigenetic events in tumorigenesis: putting the pieces together. *Exp Oncol.* 32(3):132-6, 2010
136. Pogenberg V, Guichou JF, Vivat-Hannah V, Kammerer S, Pérez E, Germain P, de Lera AR, Gronemeyer H, Royer CA, Bourguet W. Characterization of the interaction between retinoic acid receptor/retinoid X receptor (RAR/RXR) heterodimers and transcriptional coactivators through structural and fluorescence anisotropy studies. *J Biol Chem* 28:1625-1633, 2005.
137. Quiroga A, Quiroga PL, Martínez E, Soria EA, Valentich MA. Anti-breast cancer activity of curcumin on the human oxidation resistant cells ZR-



75-1 with  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase inhibition. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, Vol. 8, pp. 261–266, 2010

138. Quiroga PL, Eynard AR, Soria EA, Valentich MA. Interaction between retinoids and eicosanoids: Their relevance to cancer chemoprevention. *Curr Nutr Food Sci* 5:126-133, 2009.

139. Reese AC, Fradet V, Witte JS.  $\omega$ -3 Fatty Acids, Genetic Variants in COX-2 and Prostate Cancer. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2:149-158, 2009.

140. Ross AC, Harrison EH, Rucker RB, Zempleni J, Suttie JW, McCormick DB. Vitamin A: Nutritional aspects of retinoids and carotenoids. En: *Handbook of vitamins* (4<sup>o</sup> ed.). Boca Raton: Taylor & Francis Group, pp. 1-40, 2007.

141. Ross CA. Vitamin A and immune function: Retinoic acid modulates population dynamics in antigen receptor and CD38-stimulated splenic B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14139-14141, 2005.

142. Ross SA. Evidence for the relationship between diet and cancer. *Exp Oncol*.32(3):137-42, 2010.

143. Shaikh IA Thiébaud AC, Brown I, Wahle KW, Heys SD. Enhancing cytotoxic therapies for breast and prostate cancers with polyunsaturated fatty acids. *Nutr Cancer* 62:284-296, 2010.

144. Sekine Y, Osei-Hwedieh D, Matsuda K, Raghavachari N, Liu D, Furuya Y, Koike H, Suzuki K, Remaley AT. High fat diet reduces the expression of glutathione peroxidase 3 in mouse prostate. *Prostate*. 2011

145. Shen Z. Genomic instability and cancer: An introduction. *J Mol Cell Biol* 3:1-3, 2011.
146. Siddikuzzaman C, Guruvayoorappan C, Berlin Grace. All Trans Retinoic Acid and Cancer. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2010.
147. Siddiqui RA, Zerouga M, Wu M, Castillo A, Harvey K, Zaloga GP, Stillwell W. Anticancer properties of propofol-docosahexaenoate and propofol-eicosapentaenoate on breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 7:R645-R654, 2005.
148. Siitonen T, Alaruikka P, Mäntymaa P, Savolainen ER, Kavanagh TJ, Krejsa CM, Franklin CC, Kinnula V, Koistinen P. Protection of acute myeloblastic leukemia cells against apoptotic cell death by high glutathione and gamma-glutamylcysteine synthetase levels during etoposide-induced oxidative stress. *Ann Oncol* 10:1361-1367, 1999.
149. Simmons DP, Andreola F, De Luca LM. Human melanomas of fibroblast and epithelial morphology differ widely in their ability to synthesize retinyl esters. *Carcinogenesis* 23:1821-1830, 2002.
150. Sincler HM. Deficiency of essential fatty acids in lower animals. En: *Essential fatty acids*. London: Butterworths Scientific Publications, pp. 249-256, 1957.
151. Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 107:1491-1495, 2001.
152. Soprano KJ, Soprano DR. Retinoic acid receptors and cancer. *J Nutr* 132:S3809-S3813, 2002.

153. Soria EA, Eynard AR, Bongiovanni GA. Modulation of early stress-related biomarkers in cytoplasm by the antioxidants silymarin and quercetin using a cellular model of acute arsenic poisoning. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 107:982-987, 2010.
154. Soria EA, Goleniowski ME, Cantero JJ, Bongiovanni GA. Antioxidant activity of different extracts of Argentinian medicinal plants against arsenic-induced toxicity in renal cells. *Hum Exp Toxicol* 27:341-346, 2008.
155. Stoll BA. Linkage between retinoid and fatty acid receptors: Implications for breast cancer prevention. *Eur J Cancer Prev* 11:319-325, 2002.
156. Tanaka T, De Luca LM. Therapeutic potential of "retinoids" in cancer prevention and treatment. *Cancer Res* 69:4945-4947, 2009.
157. Tang DG, Eunhye L, Cern J, Kehrer JP. Fatty acid oxidation and signaling in apoptosis. *Biol Chem* 383:425-442, 2002.
158. Tang XH, Gudas LJ. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annu Rev Pathol.* 6:345-64, 2011.
159. Tapiero H, Ba GN, Couvreur P, Tew KD. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed Pharmacother* 56:215-222, 2002.
160. Thiébaud AC, Chajès V, Clavel-Chapelon F, Gerber M. Unsaturated fatty acids intake and breast cancer risk: epidemiological data review. *Bull Cancer* 92:658-669, 2005.
- 161.

162. Thiébaud AC, Chajès V, Gerber M, Boutron-Ruault MC, Joulin V, Lenoir G, Berrino F, Riboli E, Bénichou J, Clavel-Chapelon F. Dietary intakes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of breast cancer. *Int J Cancer* 124:924-931, 2009.
163. Timpson P, Serrels A, Canel M, Frame MC, Brunton VG, Anderson KI. Quantitative real-time imaging of molecular dynamics during cancer cell invasion and metastasis in vivo. *Cell Adh Migr* 3:351-354, 2009.
164. Tong WG, Ding XZ, Adrian TE. The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 296:942-948, 2002.
165. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354, 1979.
166. Tricaud N, Perrin-Tricaud C, Bruses J L, Rutishauser, U. Adherens junctions in myelinating Schwann cells stabilize Schmidt-Lanterman incisures via recruitment of p120 catenin to E-cadherin *J Neurosci* 25:3259-3269, 2005.
167. Valentich MA, Monis B. Postnatal ontogeny of gamma glutamyltranspeptidase activity of pancreas in essential fatty acid deficient rats treated with nitrosomethylurea. *Biochem Int* 22:141-147, 1990.
168. Virtamo J, Pietinen P, Huttunen JK, Korhonen P, Malila N, Virtanen MJ, Albanes D, Taylor PR, Albert P. Incidence of cancer and mortality following alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation: A post-intervention follow-up. *JAMA* 290:476-485, 2003.

169. Wang XD, Russell RM, Liu C, Stickel F, Smith DE, Krinsky NI. Beta-oxidation in rabbit liver in vitro and in the perfused ferret liver contributes to retinoic acid biosynthesis from beta-apocarotenoids. *J Biol Chem* 271:26490-26498, 1996.
170. Ward Y, Wang W, Woodhouse E, Linnoila I, Liotta L, Kell K. Signal pathways which promote invasion and metastasis: Critical and distinct contributions of extracellular signal-regulated kinase and ral-specific guanine exchange factor pathways. *Mol Cell Biol* 21:5958-5969, 2001.
171. Watkins EB, Miller CE, Majewski J, Kuhl TL. Membrane texture induced by specific protein binding and receptor clustering: active roles for lipids in cellular function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, en prensa.
172. Welsch CW. Review of the effects of dietary fat on experimental mammary gland tumorigenesis: Role of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 18:757-773, 1995.
173. Whelan J, McEntee MF. Dietary (n-6) PUFA and intestinal tumorigenesis. *J Nutr* 134:S3421-S3426, 2004.
174. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 14:473-486, 2004.
175. Wolbach SB, Howe PR. Tissue changes following deprivation of fat-soluble vitamin A. *J Exp Med*, 42:753-777, 1925.
176. Wolf G. Identification of a membrane receptor for retinol-binding protein functioning in the cellular uptake of retinol. *Nutr Rev* 65:385-388, 2007.

177. Wolf G. Retinoic acid as cause of cell proliferation or cell growth inhibition depending on activation of one of two different nuclear receptors. *Nutr Rev* 66:55-59, 2008.
178. Wyss A, Wirtz GM, Woggon WD, Brugger R, Wyss M, Friedlein A, Riss G, Bachmann H, Hunziker W. Expression pattern and localization of beta,beta-carotene 15,15-dioxygenase in different tissues. *Biochem J* 354:521-529, 2001.
179. Xia SH, Wang J, Kang JX. Decreased n-6/n-3 fatty acid ratio reduces the invasive potential of human lung cancer cells by downregulation of cell adhesion/invasion-related genes. *Carcinogenesis* 26:779 -784, 2005.
180. Yagi T, Takeichi M. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev* 14:1169-1180, 2000.
181. Yashimoto A, Kasahara K, Kawashima A, Fujimura M, Nakao S. Characterization of prostaglandin biosynthetic pathway in non-small cell lung cancer. A comparison with small cell lung cancer and correlation with angiogenesis, angiogenic factors and metastases. *Oncol Rep* 13:1049-1057, 2005.
182. Zanotto-Filho A, Cammarota M, Gelain DP, Oliveira RB, Delgado-Cañedo A, Dalmolin RJ, Pasquali MA, Moreira JC. Retinoic acid induces apoptosis by a non-classical mechanism of ERK1/2 activation. *Mol Cancer* 8:27, 2009.
183. Zanotto-Filho A, Schroder R, Moreira JC. Xanthine oxidase-dependent ROS production mediates vitamin A pro-oxidant effects in cultured Sertoli cells. *Free Radic Res* 42:593-601, 2008.

## **ANEXO**

### **PUBLICACIONES Y CONGRESOS CIENTIFICOS ESPECIFICOS DE ESTA TESIS.**

1-Quiroga PL, Eynard A, Soria EA, Valentich MA. Interaction between retinids and eicosanoids: their relevance to cancer chemoprevention. *Current Nutrition and Food Science*, vol 5:126-133, 2009.

2-Quiroga PL, Soria EA, Valentich MA, AR Eynard. Differential effects of retinoica cid plus n-9 unsaturated fatty acids on two human breast cáncer lines. UICC, World cancer Congress Genova, Switzerland, August, 2008.

3- Quiroga PL, Eynard AR, Valentich MA, Soria EA. "Modulación de parámetros de malignidad tumoral en células cancerosas de mama por ácido retinoico y ácidos grasos insaturados". 7 JIC de la FCM, UNC, 2006, Córdoba, Argentina.

4- Quiroga PL, Eynard AR, Valentich MA y Soria EA. "Retinoic acid and fatty acids: effects on human breast cancer cells". *Biocell*, 224, 2007. I Reunión conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina, 2007. Huerta Grande, Argentina

### **PUBLICACIONES Y CONGRESOS CIENTIFICOS EN EL AREA DE ESTA TESIS (COLABORACIONES)**

1-Elio A Soria, Aldo R Eynard, Patricia L Quiroga, Guillermina Bongiovanni. "Differential effects of quercetin and silymarin on arsenite-induced cytotoxicity in two human breast adenocarcinoma cell lines". *Life Sciences* 81: 1397-1402, 2007.

2-Analía Quiroga, Elio Soria, Patricia Quiroga, Estefanía Martínez and Mirta A. Valentich. "Effect of curcumine on cultured ZR-75-1 cancer cells". Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 6(6), 309-374, 2007.

3-Analía Quiroga, Patricia L. Quiroga, Estefanía Martínez, Elio A. Soria<sup>1</sup> and Mirta A. Valentich. Anti-breast cancer activity of curcumin on the human oxidation resistant cells ZR-75-1 with  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase inhibition. Journal of Experimental Therapeutics and Oncology, Vol. 8, pp. 261–266, 2010.

4. Quiroga A, Soria EA, Quiroga PL, Martínez E, Valentich MA. "Cytotoxic effects of curcumin on the mammary human cancer cells ZR-75-1" Biocell, 136, 2007. I Reunión conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina, 2007. Huerta Grande, Argentina.

5-Pasqualini ME, Quiroga PL, Soria EA, Konigheim B, Contigiani M, Eynard AR. "Estudio del potencial farmacológico del ácido nordhidroguaiaretico de *Larrea divaricata* (Jarilla; Córdoba, Argentina) en dos modelos celulares". XVI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina, SILAE, La Plata, septiembre, 2007.-

6- Soria EA, Quiroga PL, Goleniowski ME, Bongiovanni GA. Reducción por *Lantana grisebachii* de la linfotoxicidad inducida por arsénico. XLII Reunión de la SAFE, Mar del Plata, Argentina, 2010.