



**Universidad Nacional Autónoma de México.**  
**Instituto de Neurobiología.**  
**Doctorado en Ciencias Biomédicas.**

“Análisis del efecto de dietas ricas en yodo y ácido retinoico sobre la inducción de cáncer mamario en ratas tratadas con el cancerígeno *N*-metil-*N*-nitrosourea (MNU)”.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
BIOMÉDICAS  
PRESENTA

M. EN C. PABLO GARCÍA SOLÍS.

Tutora: Dra. Carmen Aceves Velasco.

*Campus UNAM-UAQ Juriquilla, Querétaro, 2006.*



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*“DEUS CARITAS EST,  
ET, QUI MANET IN CARITATE,  
IN DEO MANET, ET DEUS IN EO MANET”  
(1 Io 4, 16).*

*“DEBO A LA CONJUNCIÓN DE UN ESPEJO  
Y DE UNA ENCICLOPEDIA EL  
DESCUBRIMIENTO DE UQBAR...”  
(Borges JL., 1941. Tlön, Uqbar, Orbis Tertius. El Jardín de los senderos que se bifurcan).*

## **DEDICATORIA.**

A mi esposa, Liliana Vázquez García.

A mis padres, Roberto García y Concepción Solís.

A mi Hermano, José Roberto García Solís.

A la familia Vázquez García.

A mis amigos de siempre.

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Universidad Nacional, por brindarme sus riquezas y la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

A la Dra Carmen Aceves, por su amistad, enseñanzas, paciencia, apoyo y confianza.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Teresa Morales Guzmán y Dra. Patricia Ostrosky. Gracias por todas las aportaciones este trabajo de investigación y sobretodo a mi formación profesional.

A los miembros del jurado, que revisaron está tesis: Dra. Carmen Clapp, Dra. Marcela Lizano, Dr. Félix Recillas Targa y Dr. Manuel Salas. Gracias por sus valiosos comentarios y aportaciones a este trabajo de investigación.

Agradezco el apoyo recibido por el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) de México para realizar tres estancias de investigación en la subdirección de investigación. En especial agradezco al Dr. Alfonso Dueñas González, y a todo su equipo de investigadores, a la M en C Alma Chávez, al M en C Enrique Pérez, M en C. Catalina Trejo y M. en C. Blanca Segura Pacheco. También agradezco a la Subdirección de Patología del INCAN, en especial a la Médico adscrita Dra. Teresa Vela y a la Médico residente de patología oncológica Dra. Myrna Arrecillas, por su ayuda en la clasificación histológica de los tumores mamarios de rata y en la evaluación de las inmunohistoquímicas. Agradezco también a mis otros amigos y compañeros del INCAN (Aurora, Fernanda, Jorge, Dra. Silvia Vidal, Lucy y Fabián), a los médicos residentes que compartieron su habitación conmigo (Dr. Francisco Alanis, Dr. Juan Padilla, Dr. Silvestre Torres, Dr. Carlos Del Cid Cuyun, Dr. Enrique Faz, Dr. Didier Parada). Finalmente agradezco de manera muy especial al Radioterapeuta, Dr. Federico Maldonado.

Agradezco a la M en C Adriana González y a la Dra. Ofelia Mora de la FES-Cuatlitlán (UNAM) por su valiosa ayuda en la determinación de los retinoides en los hígados de rata.

Agradezco la ayuda y asesoría técnica de las siguientes personas y Unidades de Apoyo Académico del Instituto de Neurobiología, a la QFB. Guadalupe Delgado y al TLC. Felipe Ortiz Cornejo (Laboratorio D02); al M en C Leopoldo González, a la Ing. Elsa Nydia Hernández (Unidad de Análisis de Imágenes Digitales); al M.V.Z. Martín García Servin (Bioterio), a la Lic. Lourdes Lara (Unidad de Videocoferencia), a la Bib. Pilar Galarza (Biblioteca), al M. en CC. Alberto Lara y al Ing. Omar González (Unidad de Computo); a la QFB. Lourdes Palma y a la Tec. en Hist. Evelyn Flores (Unidad de Microscopia Electrónica); a la Dra. Dorothy Pless (Edición de Escritos Científicos) y finalmente a la Sra. Carmen Vázquez y a la M en C Leonor Casanova (Unidad de enseñanza).

A mis amigos y compañeros del laboratorio, Dra. Brenda Anguiano, M. en C. Yunuen Alfaro, M. en C, Nuri Aranda, M. en C. Omar Arroyo, M. en C. Alejandra López, M. en C. Ofelia Soriano y Q. F. B. Elvira Núñez.

A Liliana Vázquez, gracias por tu ayuda, paciencia y cariño. A mis padres, gracias por todo. A la familia Vázquez García, gracias por todo su apoyo en estos últimos tiempos. Finalmente, a mis amigos *Nano* y *Mármol*.

Esta Tesis se realizó en el Laboratorio de Metabolismo Energético del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección de la Dra. Carmen Aceves Velasco.

Este trabajo fue financiado parcialmente con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México (Proyecto 44976-M) y la UNAM. El autor fue apoyado económicamente con una beca de manutención del CONACYT (Numero de registro: 153808) y por una beca complementaria otorgada por la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (Numero de expediente: 500119785).

## ÍNDICE.

<b>ÍNDICE</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>ANTECEDENTES</b> .....	9
<b>I. GLÁNDULA MAMARIA</b> .....	9
<b>II. CÁNCER MAMARIO</b> .....	17
<b>A. GENERALIDADES</b> .....	17
1. Características histológicas.....	17
2. Dependencia de hormonas.....	21
3. Alteraciones genéticas y epigenéticas.....	23
a. Proto-oncogenes y amplificación génica.....	23
a.1. Oncogén <i>c-erbB2</i> o <i>HER-2/neu</i> .....	25
a.2. Oncogén <i>c-myc</i> .....	25
a.3. Ciclina D1.....	26
b. Genes supresores y pérdida de la heterocigocidad.....	26
b.1. Gen supresor de tumores <i>p53</i> .....	26
b.2. Gen supresor de tumores de retinoblastoma ( <i>Rb1</i> ).....	27
b.3. Gen supresor de tumores <i>p16<sup>INK4A</sup></i> .....	27
b.4. Cromosoma 16q.....	27
c. Cambios epigenéticos.....	28
4. Epidemiología mundial y en México.....	31
<b>B. LA DIETA COMO FACTOR DE RIESGO DEL CÁNCER MAMARIO</b> .....	34
<b>III: MODELOS ANIMALES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DEL CÁNCER MAMARIO</b> .....	36
<b>IV: EL YODO Y LA GLÁNDULA MAMARIA NORMAL Y NEOPLÁSICA</b> .....	41
<b>A. GENERALIDADES</b> .....	41
<b>B. PAPEL DEL YODO EN LA FISIOLOGÍA Y EL DESARROLLO DE LA</b> <b>GLÁNDULA MAMARIA</b> .....	42
<b>C. EFECTOS ANTICANCERÍGENOS DEL YODO EN LA GLÁNDULA MAMARIA</b> .....	43
<b>D. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL YODO</b> .....	46
<b>V. EL ÁCIDO RETINOICO Y LA GLÁNDULA MAMARIA NORMAL Y NEOPLÁSICA</b> .....	47
<b>A. GENERALIDADES</b> .....	47
<b>B. PAPEL DEL ÁCIDO RETINOICO EN EL EPITELIO MAMARIO NORMAL</b> <b>Y SU CARCINOGENÉISIS</b> .....	48
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	51



<b>HIPÓTESIS</b> .....	51
<b>OBJETIVOS</b> .....	51
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	52
A. ANIMALES.....	52
B. INDUCCIÓN DE LA CARCINOGENESIS MAMARIA.....	52
C. EVALUACIÓN DE LA TUMORIGENESIS MAMARIA.....	52
D. NIVELES CIRCULANTES DE T3.....	54
E. TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA...54	
F. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.....	55
G. INMUNOHISTOQUÍMICA DE PCNA.....	56
H. MÉTODO DE TUNEL.....	56
I. ACTIVIDAD DE LA CASPASA-3.....	57
J. DETERMINACIÓN DE RETINOIDES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPEÑO (HPLC).....	58
K. EXPERIMENTOS.....	59
1. Efecto de los tratamientos agudos a base de yodo sobre la tumorigénesis mamaria.....	59
2. Efecto de los tratamientos crónicos de KI, I <sub>2</sub> y T4 sobre la tumorigénesis mamaria.....	60
3. Efecto de los tratamientos agudos y crónicos de retinoides con yodo sobre la tumorigénesis mamaria.....	60
a. Tratamientos agudos.....	60
b. Tratamientos crónicos.....	61
4. Efecto del tratamiento crónico de I <sub>2</sub> sobre la proliferación y muerte celular en el tejido mamario normal y neoplásico.....	61
L. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	62
<b>RESULTADOS</b> .....	63
A. ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y REGISTRO DEL PESO.....	63
B. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS AGUDOS DE YODO SOBRE LA TUMORIGENESIS MAMARIA INDUCIDA CON MNU.....	65
C. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CRÓNICOS A BASE DE YODO Y T4 SOBRE LA TUMORIGENESIS MAMARIA.....	67
D. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS A BASE DE YODO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL NIS, 5'D1, PEN, LPO y p53.....	69
E. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS AGUDOS Y CRÓNICOS DE RETINOIDES CON Y SIN YODO SOBRE LA TUMORIGENESIS MAMARIA.....	71
F. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS DE YODO SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR EN EL TEJIDO MAMARIO NORMAL Y NEOPLÁSICO.....	73

<b>DISCUSIÓN</b> .....	78
<b>CONCLUSIONES</b> .....	84
<b>REFERENCIAS</b> .....	85
<b>ANEXOS</b> .....	94
ANEXO 1. Factores de riesgo de cáncer mamario.....	95
ANEXO 2.....	104
García-Solís P, Alfaro Y, Delgado G, Anguiano B, Guzmán R, Nandi S, Vázquez-Martínez O, Díaz-Muñoz M, Aceves C. 2005. <b>Inhibition of MNU-induced mammary carcinogenesis by molecular iodine (I<sub>2</sub>) but not by iodide (I<sup>-</sup>) treatment. Evidence that I<sub>2</sub> prevents cancer promotion.</b> <i>Molecular and Cellular Endocrinology</i> 236 (1-2), 49-57.	
ANEXO 3.....	114
García-Solís P, Aceves C. 2005. <b>Estudio de factores nutricionales asociados a la prevención del cáncer mamario. Importancia de los modelos animales.</b> <i>Archivos Latinoamericanos de Nutrición</i> 55(3), 211-225.	

## RESUMEN.

En Japón el alto consumo de soya y de las algas cafés ricas en yodo se asocia a una menor incidencia de cáncer mamario comparada con Estados Unidos y el Reino Unido. Estudios en modelos animales de inducción química de cáncer mamario han mostrado que el consumo de dietas ricas en algas marinas cafés y tratamientos a base de la solución de Lugol (una mezcla de KI y yodo molecular) inhiben el crecimiento tumoral. En este trabajo, se analizó el efecto de dietas ricas en yodo (KI o yodo molecular) y retinoides (ácido retinoico y palmitato de retinol) sobre la carcinogénesis mamaria inducida con el *N*-metil-*N*-nitrosourea. Ratas hembra vírgenes Sprague-Dawley recibieron tratamientos agudos (3 semanas) o crónicos (4 meses) de yodo, retinoides, y yodo más retinoides. Los tratamientos agudos no tuvieron ningún efecto sobre la carcinogénesis mamaria. Por otra parte, solo el tratamiento crónico de yodo molecular (0.05% en el agua de bebida, *ad libitum*) mostró una reducción de la incidencia de tumores mamaros (30%) comparado con las ratas control (73%). Adicionalmente, comparando el tratamiento control con el de yodo molecular los tumores mamaros tuvieron un menor tamaño ( $96 \pm 1.5$  vs.  $0.87 \pm 0.98$  cm<sup>3</sup>,  $p < 0.05\%$ ) y menor número de células positivas al marcador de proliferación celular, PCNA ( $250 \pm 51$  vs.  $173 \pm 46$  células positivas/500 células;  $p < 0.05\%$ ). Más aún, los tumores tratados con yodo molecular presentaron mayores índices de muerte celular, medidos con el método de TUNEL y una tendencia a tener mayor actividad de la enzima apoptótica, caspasa-3. En conclusión, el tratamiento crónico de yodo molecular tiene un potente efecto antineoplásico a través de la inhibición de la proliferación celular y parece inducir apoptosis en los tumores mamaros.

**Palabras Clave:** cáncer mamario, *N*-metil-*N*-nitrosourea, ratas, retinoides, yodo.

## **ABSTRACT.**

The high consume of soy and iodine rich brown seaweed have been suggested as nutritional factors that contribute to the lower incidence of breast cancer in Japan than other developing countries like United States and United Kingdom. Studies in animal models of chemical induced mammary carcinogenesis have shown that brown seaweed treatments have a preventive effect of chemical induced-tumors and Lugol's solution (a mixture of KI and molecular iodine) treatment reduced tumor's size. In this work it was analyzed the preventive effect of iodine (KI or molecular iodine) and retinoid (retinoic acid or retinol) enriched diets on *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU)-induced mammary carcinogenesis. Female virgin Sprague-Dawley rats received short (3 weeks) or long-term (4th months) oral iodine, retinoid, or iodine plus retinoid treatments. Short-term treatments did not have effect on mammary carcinogenesis. On the other hand only long-term I<sub>2</sub> (0.05% of molecular iodine in drinking water, *ad libitum*) treated rats exhibited a strong and persistent reduction in mammary cancer incidence (30%) compared to controls (72.7%). On the other hand, mammary tumors of the long-term I<sub>2</sub> treated rats had a smaller size ( $1.96 \pm 1.5$  vs.  $0.87 \pm 0.98$  cm<sup>3</sup>,  $p < 0.05\%$ ) and a fewer positive cells to a cell proliferation marker, PCNA ( $250 \pm 51$  vs.  $173 \pm 46$  positive cells/500 cells;  $p < 0.05\%$ ), than controls. Besides, long-term I<sub>2</sub> treatment increased cell death markers, TUNEL-positive cells and a tendency to higher activity of apoptotic enzyme, caspase-3. In conclusion, chronic I<sub>2</sub> treatment has a potent antineoplastic effect through inhibited cell proliferation and seems induced a cell death in MNU-induced mammary tumors.

**Key words:** iodine, mammary cancer, *N*-methyl-*N*-nitrosourea, rats, retinoids.

## INTRODUCCIÓN.

A nivel mundial el cáncer mamario es la neoplasia más común en la mujer (Parkin et al., 2005). En la actualidad, a pesar de los esfuerzos encaminados para conocer la etiología del cáncer mamario, aún se desconoce la totalidad de los factores de riesgo y por lo tanto no se ha logrado establecer una estrategia sólida de prevención (DeBruin y Josephy, 2002). Los factores de riesgo asociados al cáncer mamario se han agrupado en tres grandes determinantes que son: a) la historia familiar (herencia), b) factores endocrinos y reproductivos y c) factores ambientales donde se incluye el estilo de vida y la dieta (Bray et al., 2004; Charpentier y Aldaz, 2002; DeBruin y Josephy, 2002). Los factores hereditarios solo explican del 5 al 10% de la incidencia mundial del cáncer mamario y se han identificado genes involucrados en la susceptibilidad a padecer esta enfermedad, como son el *BCRA1*, el *BCRA2*, *p53* y *PTEN* (Charpentier y Aldaz, 2002). Entre los factores de riesgo de tipo endocrino y reproductivo se encuentran la menarca temprana, la menopausia tardía, la nuliparidad y el uso de terapia estrogénica de reemplazo. En contraste, la menarca tardía, la menopausia temprana y el embarazo antes de los 20 años están asociados a un menor riesgo de padecer esta enfermedad (Bray et al., 2004; MacMahon et al., 1970; Wynne-Edwards, 2001). En relación a los factores ambientales, el más importante que ha sido señalado en la etiología del cáncer mamario es la dieta (Gerber et al., 2003; Wynne-Edwards, 2001).

Estudios epidemiológicos muestran que las mujeres japonesas tienen un bajo riesgo de padecer esta enfermedad siempre y cuando mantengan una dieta oriental (Cann, et al., 2000). Japón presenta una tasa de incidencia de cáncer mamario de 32.7 casos por 100, 000 mujeres, mientras que en países occidentales desarrollados como Estados Unidos y el Reino Unido es de 99.4 casos por 100, 000 mujeres (Parkin et al., 2005). El consumo abundante de soya y el de algas marinas cafés ha sido señalado como parte de la clave de la dieta oriental que pudiera brindar la protección contra el riesgo de desarrollar cáncer mamario (Cann, et al., 2000; Wynne-Edwards, 2001). Se ha señalado que el

componente de la soya que da la protección contra el cáncer son los fitoestrógenos, mientras que el de las algas marinas cafés es el yodo (Murkies et al., 1998; Cann, et al., 2000). Se estima que el consumo de yodo en Japón alcanza los 5 mg/día, mientras que en Estados Unidos y el Reino Unido es solo de 0.2 mg/día (Cann, et al., 2000). El yodo es captado y organificado por la glándula mamaria gestante, lactante y neoplásica (Tazebay et al., 2000). La captura de yodo por la glándula mamaria está mediada principalmente por el cotransportador de sodio/yoduro (NIS) y hay evidencia de otras posibles vías (Rillema y Hill, 2003; Shennan, 2001; Tazebay et al., 2000). Desde hace más de 30 años se ha sospechado que el yodo, constituyente esencial de las hormonas tiroideas, participa en la fisiología y patología mamaria (Eskin, 1970). Eskin et al. (1975) mostraron que la deficiencia de yodo en ratas hembras producía lesiones atípicas y displásicas en la glándula mamaria. Posteriormente, Eskin et al. (1995) demostraron que la hiperplasia mamaria por deficiencia de yodo se reducía con la suplementación de  $I_2$  (yodo molecular) y se incrementaba con  $I^-$  (yoduro). Utilizando modelos animales de carcinogénesis mamaria con dimetilbenzo(a)antraceno (DMBA), se demostró que tratamientos a base de algas, solución de Lugol (mezcla de KI y  $I_2$ ) o solución de Lugol más acetato de medroxi-progesterona inhiben la progresión tumoral (Funahashi et al., 1999; Funahashi et al., 1996). Los mecanismos por los cuales actúa el yodo se desconocen, pero se sugiere que participa directamente como antioxidante o indirectamente mediante la formación de yodolípidos (Cann, et al., 2000; Venturi et al., 2000). En los tirocitos, células con alta capacidad de acumular yodo, el exceso de este elemento inhibe la proliferación e induce apoptosis (Pisarev y Gärtner, 2000; Vitale et al., 2000).

Por otra parte, al ácido retinoico, compuesto derivado de la vitamina A (retinol), se le han descrito propiedades antineoplásicas en diferentes tipos de neoplasias (Moon y Constantinou, 1997). Sin embargo, su capacidad anti-tumoral con modelos de inducción química de cáncer mamario, ha sido poco estudiada (Moon y Constantinou, 1997). Se ha demostrado que el todo-*trans* ácido retinoico induce la captura de yodo a través de la inducción de la expresión del mRNA del

NIS en la línea celular humana de cáncer mamario MCF-7, tanto *in vitro* como cuando se implanta en ratones (Kogai et al., 2000; Kogai et al., 2004). La captura de yodo inducida por ácido retinoico también se da en tumores mamarios de ratones transgénicos con el oncogén *neu* (Kogai et al., 2004). Por otra parte, el ácido retinoico aumenta la actividad de la enzima 5'desyodasa tipo I (5'D1) en las células MCF-7, e incrementa la expresión del mRNA de la 5'D1 en tumores inducidos con el cancerígeno *N*-metil-*N*-nitrososurea (MNU) (García-Solís y Aceves, 2003; Aceves, comunicación personal). La 5'D1 es una enzima que genera triyodotironina (T3) y yodo a partir de la prohormona tiroidea tetrayodotironina (T4). Es decir, el ácido retinoico aumenta la concentración intracelular de yodo en las células tumorales mamarias a través de dos vías que son la captura de yodo por el NIS, o bien por la desyodación local por la 5'D1. Con el fin de buscar nuevas estrategias de prevención, el presente trabajo plantea el objetivo de evaluar el efecto agudo y crónico de dietas ricas en yodo y ácido retinoico sobre la inducción de cáncer mamario en ratas hembras tratadas con el MNU durante la pubertad.

## **ANTECEDENTES.**

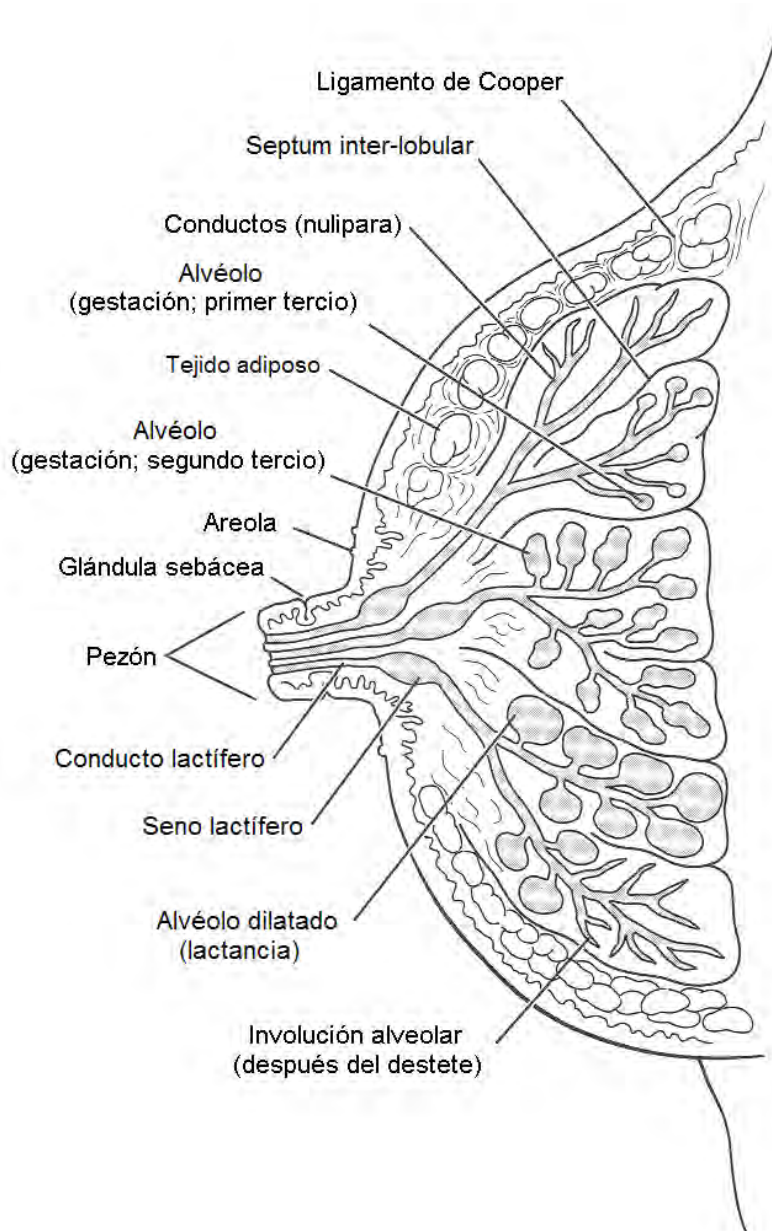
### **I. GLÁNDULA MAMARIA.**

Las glándulas mamarias son órganos especializados que se localizan subcutáneamente, la función de éstas es la de proporcionar nutrición a la descendencia a través de la leche. Las glándulas mamarias son órganos pares que se desarrollan en el embrión a lo largo de dos líneas llamadas líneas mamarias, que se extienden desde la axila hasta la ingle a uno y otro lado de la línea media, en la cara ventral del tórax y del abdomen. Pueden originarse glándulas mamarias en cualquier punto de estas líneas. El número que se forma y su localización varían según la especie. En el ser humano, de ordinario sólo se desarrollan dos en la región pectoral, pero en algunas ocasiones se presentan pezones o masas glandulares accesorios (Fawcett, 1995).

En la mujer adulta, cada glándula mamaria consta de 15 a 20 lóbulos dispuestos en forma radial. Cada lóbulo drena a un conducto lactífero específico el cual desemboca en la punta del pezón (Figura 1) (Birkenfeld y Kase, 1997). Entre las porciones proximales al pezón en los conductos se pueden observar glándulas sebáceas que se abren en la piel (Figura 1). Esta porción de los conductos está revestida por epitelio plano queratinizado que se continúa con la piel del pezón. La mayor parte del pezón corresponde a tejido conjuntivo denso con abundantes fibras elásticas que se unen a la piel de los lados del pezón. El pezón está rodeado por un área circular y pigmentada de piel, llamada areola. La base de la epidermis en el pezón y la areola están invadidas por papilas dérmicas extraordinariamente alargadas, cuyos capilares transportan sangre hasta cerca de la superficie confiriendo así un color rosado a esta región en los individuos inmaduros y rubios. La epidermis se pigmenta en la pubertad y el grado de pigmentación aumenta durante el embarazo. La piel de la punta del pezón está ricamente inervada por terminaciones nerviosas libres, y muestra también órganos sensitivos como corpúsculos de Meissner en las papilas dérmicas. En las zonas laterales del pezón y en la areola existen nervios superficiales y órganos

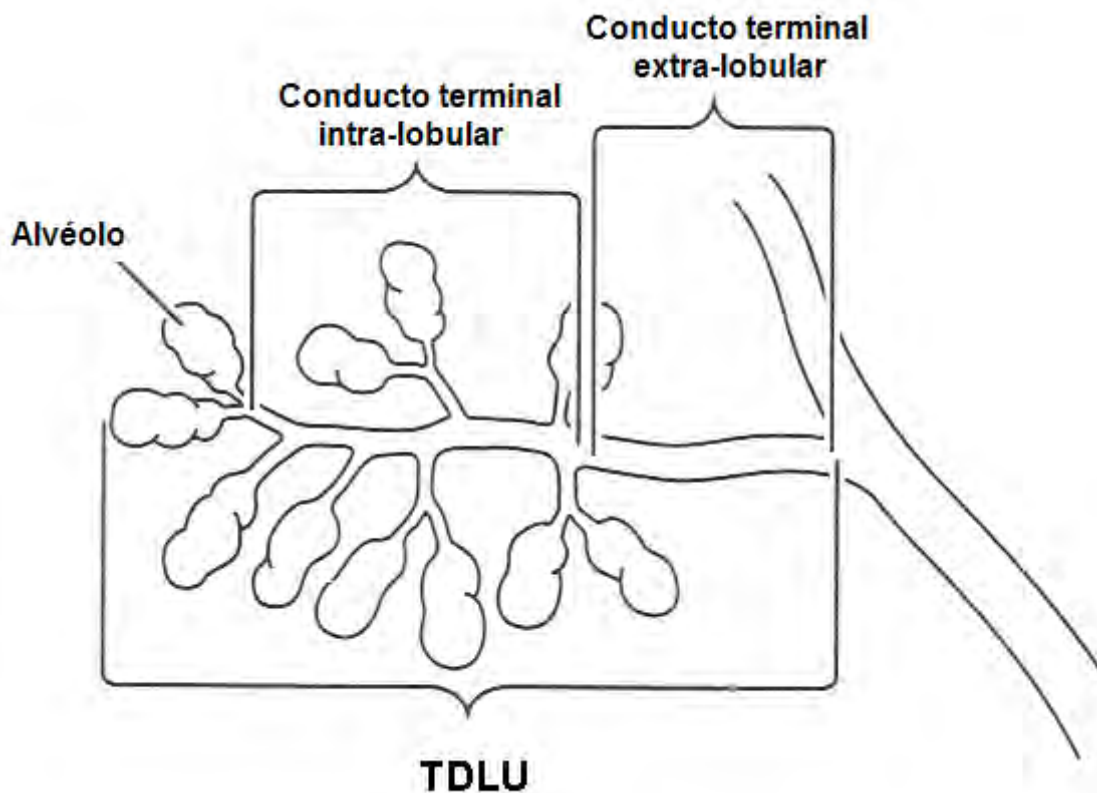


terminales similares, y los corpúsculos de Pacini se localizan también en la dermis reticular y en el tejido glandular. La inervación sensitiva del pezón es importante debido a que su estimulación por la succión de la lactancia inicia una secuencia de acontecimientos neurohumorales que finaliza con la eyección de la leche (Fawcett, 1995).



**Figura 1. Detalles anatómicos de la glándula mamaria humana.** Se ilustran algunos de los cambios que ocurren en el epitelio en diferentes etapas del desarrollo de la glándula mamaria. Modificada de Birkenfeld y Kase, 1997.

En la mujer adulta nulípara cada uno de los 15 a 20 lóbulos de la glándula mamaria está rodeado por tejido conectivo inter-lobular que contiene tejido adiposo. Cada lóbulo mamario a su vez se subdivide en múltiples lóbulos o lobulillos localizados en la porción terminal del sistema de conductos (Figura 1). Cada lobulillo está formado por una colección de 6 a 10 alvéolos, a estos lobulillos se les ha denominado como unidad terminal conducto-lobular (TDLU) (Figura 2), la cual constituye a la unidad funcional de la glándula mamaria (Charpentier y Aldaz, 2002; Fawcett, 1995; Howard y Guterson, 2000).

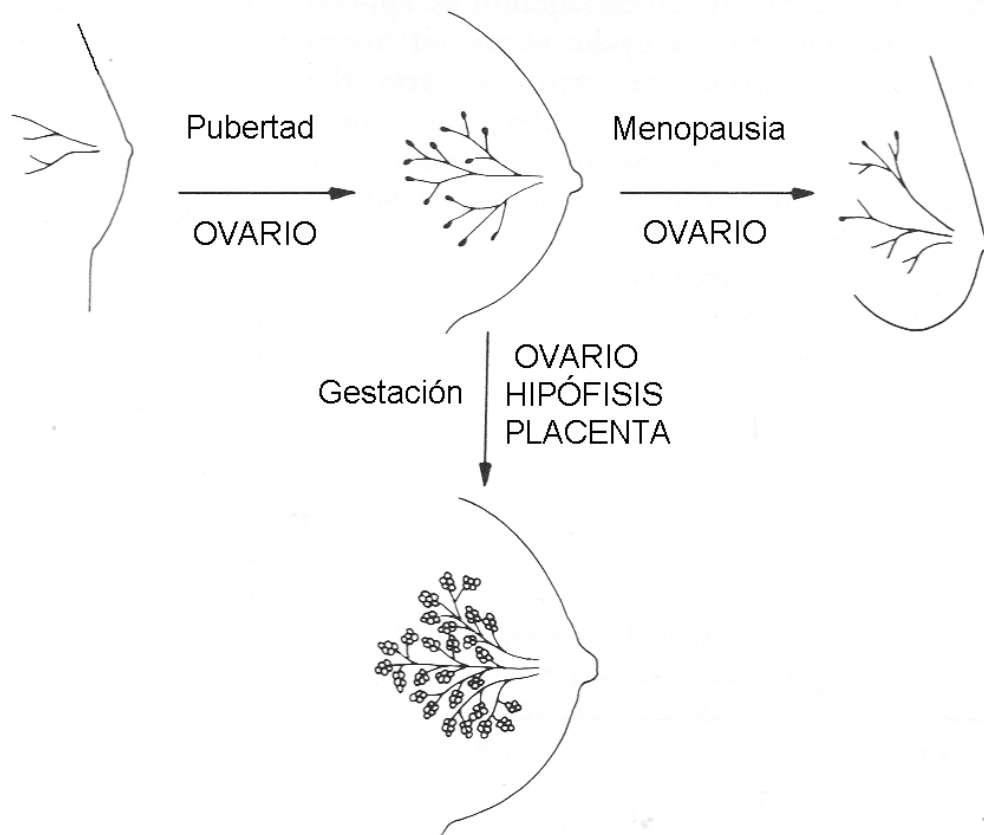


**Figura 2. Unidad terminal conducto-lobular (TDLU) de la glándula mamaria.** El TDLU se considera como la unidad funcional de la glándula mamaria. Modificada de Birkenfeld y Kase, 1997.

Como se puede advertir, la glándula mamaria consta de dos componentes celulares principales: el parénquima, que forma un sistema de conductos ramificados con alvéolos en las porciones terminales, y el estroma que da el sustrato donde el parénquima se desarrolla, alimenta y funciona. El parénquima está formado por células mioepiteliales y epiteliales luminarias (de los conductos y de los alvéolos). El estroma por su parte está formado principalmente por adipocitos, fibroblastos, vasos sanguíneos, linfáticos y matriz extracelular. El estroma mamario también se puede dividir funcionalmente en inter e intra-lobular. Por otra parte, las arterias de la glándula mamaria humana se originan de la arteria mamaria interna, de las ramas torácicas de la arteria axilar y de las arterias intercostales. Discurren a lo largo de los conductos de mayor calibre y dan lugar a redes capilares densas alrededor de los alvéolos glandulares. Las venas drenan en los troncos venosos axilar y torácico anterior (Fawcett, 1995). Los capilares linfáticos son muy abundantes en el tejido conjuntivo que rodea a los alvéolos, y finalizan en un plexo subpapilar después de seguir el curso de los conductos mamarios. Desde el plexo subpapilar se originan varios vasos linfáticos axilares y de la región subclavicular, aunque también presentan conexiones con los linfáticos que atraviesan los espacios intercostales y alcanzan los ganglios linfáticos paraesternales en el tórax. El conocimiento de las principales vías de drenaje linfático tiene una gran importancia clínica debido a la necesidad de extirpar los ganglios linfáticos regionales en las intervenciones de mastectomía radical por cáncer de mama (Fawcett, 1995). En cortes de glándula abdominal de la rata teñidos con hematoxilina y eosina se puede distinguir claramente una cadena de nódulos linfáticos donde se presentan una gran cantidad de linfocitos (Masso-Welch et al., 2000).

Los componentes celulares que se presentan en la glándula mamaria pueden variar según el estado de desarrollo (Medina, 1996). La ontogenia de la glándula mamaria posee ciertas peculiaridades que es importante considerar en la carcinogénesis mamaria.

El desarrollo de la glándula mamaria se puede dividir en cuatro fases que son la fetal, la postnatal, la postpuberal y la adultez (gestación y lactancia) (Medina, 1996). En la etapa fetal las líneas mamarias emergen del ectodermo de la superficie ventral a cada lado de la línea media desde la axila hasta la ingle. Subsecuentemente, en las posiciones correspondientes al lugar de las glándulas mamarias de los individuos adultos según la especie aparecen nódulos de células sobre la línea y descienden hacia la dermis para formar los brotes mamarios. Los brotes mamarios se alargan en cordones de células cuboidales que darán origen al sistema de conductos. Este proceso de elongación no depende de proliferación celular sino del movimiento morfogénico de las células. Posteriormente, para la formación de los conductos y sus ramificaciones ya empieza a haber proliferación celular. Por otra parte, el estroma emerge de la capa mesenquimal y rodea a la glándula rudimentaria. Al nacimiento, la glándula mamaria consta de conductos poco arborizados y en sus porciones terminales bulbos de apariencia sólida con alta capacidad de proliferación (Howard y Guterson, 2000; Medina, 1996; Mephan, 1987). En la glándula mamaria de los roedores existen estructuras bulbares similares que se les conoce como bulbos de los pies terminales (Howard y Guterson, 2000; Masso-Welch et al., 2000). Hasta este punto del desarrollo, el crecimiento de la glándula es isométrico y está confinado principalmente a una extensión modesta del sistema de conductos dentro del cojinete graso (Figura 3). Durante la pubertad existe un crecimiento alométrico de la glándula mamaria donde hay crecimiento tanto del parénquima como del estroma (Figura 3). De hecho, en la mujer el crecimiento del estroma mamario precede al del parénquima y la ganancia neta de tejido epitelial es menor comparada con la cantidad de tejido adiposo (Mephan, 1987; Howard y Guterson, 2000).

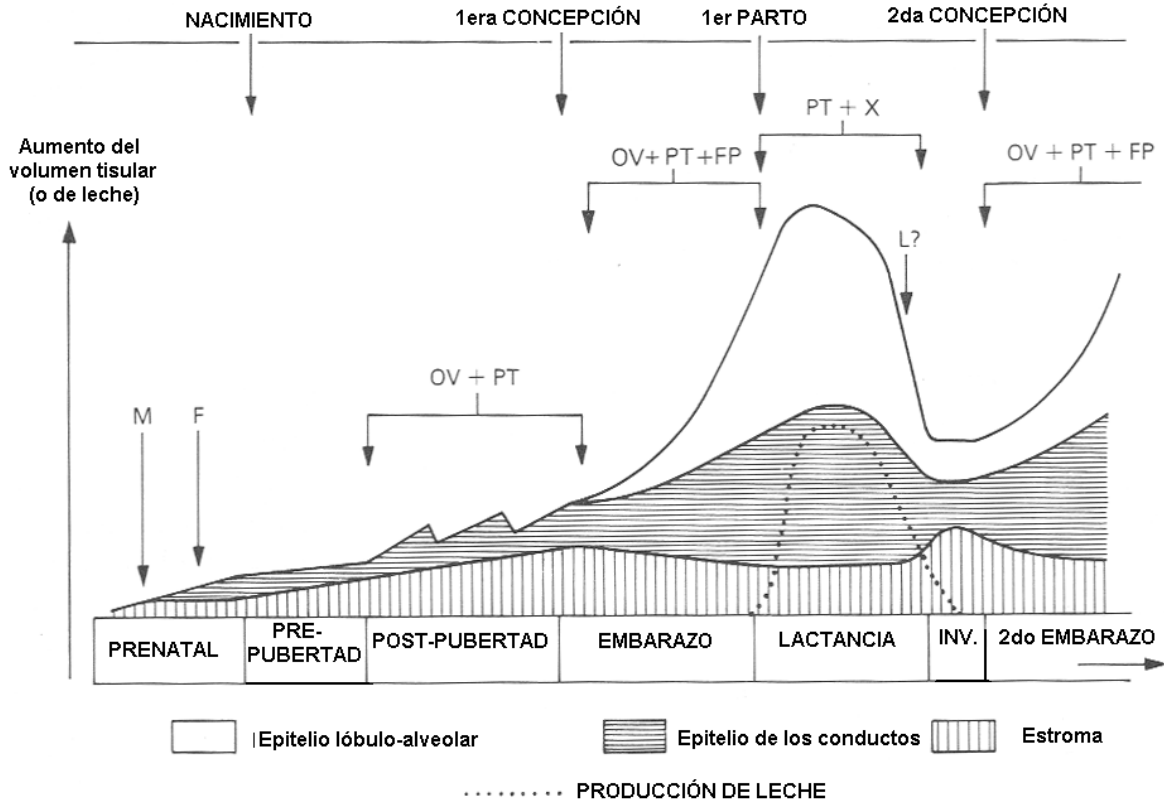


**Figura 3. Representación esquemática del desarrollo de la glándula mamaria en la mujer.** En la pubertad se presenta un crecimiento alométrico de la glándula mamaria y hay un abundante desarrollo del sistema de conductos, el cual depende principalmente de las hormonas de los ovarios (estrógenos y progesterona) y factores de crecimiento paracrinos. Durante la gestación, también existe un crecimiento de los conductos mamarios y se da la diferenciación terminal de las estructuras lóbulo-alveolares encargadas de producir la leche. Durante la gestación destacan por sus efectos mamogénicos las hormonas de los ovarios (estrógenos y progesterona), la placenta (lactógeno placentario) y la hipófisis (prolactina, Hormona de crecimiento). En la menopausia existe la denominada involución senil de la glándula donde la ausencia de hormonas del ovario genera una reducción del parénquima mamario. Modificada de Miller, 1994.

El dimorfismo sexual de la glándula mamaria se da durante la pubertad bajo la influencia de las hormonas. En la mujer los conductos se alargan y se forman las estructuras lobulares y como consecuencia se forma el TDLU. Es importante destacar, que las estructuras bulbares de los sitios terminales de los conductos tanto de las mujeres como de las hembras de los roedores, son los sitios de mayor

proliferación y es donde emergen las nuevas ramas del sistema de conductos y se inicia la formación de las estructuras alveolares (Howard y Guterson, 2000; Masso-Welch et al., 2000). En las hembras juveniles y adultas nulíparas se da un proceso cíclico de proliferación-diferenciación-apoptosis en el epitelio glandular que es regulado primordialmente por las hormonas del ciclo ovárico (Dickson y Lippman, 1995; Medina 1996). Durante la gestación ocurre una rápida e intensa proliferación celular y se lleva a cabo la diferenciación terminal alveolar que trae como consecuencia la capacidad de sintetizar la leche (Lotcher, 1998; Medina 1996). Una vez que cesa la lactancia, los alvéolos sufren de un proceso apoptótico masivo y de remodelación del estroma denominado involución, que da como resultado un epitelio mamario muy similar al que se tenía antes de la gestación (Lotcher, 1998; Medina 1996). Es importante destacar que la glándula mamaria presenta tres tipos de involución que se definen como, involución gradual que es cuando hay una regresión progresiva lenta que se observa después del pico de producción láctea; involución inducida, debido a un súbito destete y la involución senil debido al proceso natural de envejecimiento (Figura 3).

La proliferación y diferenciación del epitelio mamario están reguladas por una gran diversidad de mensajeros neuroendocrinos entre los que se incluyen a los esteroides (estradiol y progesterona), hormonas peptídicas (prolactina, lactógeno placentario), tironinas, factores de crecimiento (Figura 4) (Dickson y Lippman, 1995; Medina 1996). Estos mensajeros actúan directamente y se conoce que también participan en la síntesis y liberación de otros factores locales paracrinos y autocrinos, tanto en el parénquima como en el estroma mamarios (Dickson y Lippman, 1995). La compleja interacción entre los mensajeros neuroendócrinos y los factores locales explican la progresiva y dinámica proliferación/diferenciación/involución de la glándula mamaria, desde la pubertad hasta la menopausia. Esta plasticidad bioquímica y morfológica de la glándula mamaria también es el reflejo de la alta susceptibilidad de su epitelio a la transformación maligna.



**Figura 4. Representación esquemática del crecimiento mamario en rata y ratón.** INV: involución; M: factores del mesénquima; F: Factores fetales endocrinos, OV: Hormonas de los ovarios; PT: Hormonas de la pituitaria; FP: hormonas fetoplacentarias; X: otros factores humorales (por determinar); L: factores locales (desconocidos). Modificada de Mephan, 1987.

## II. CÁNCER MAMARIO.

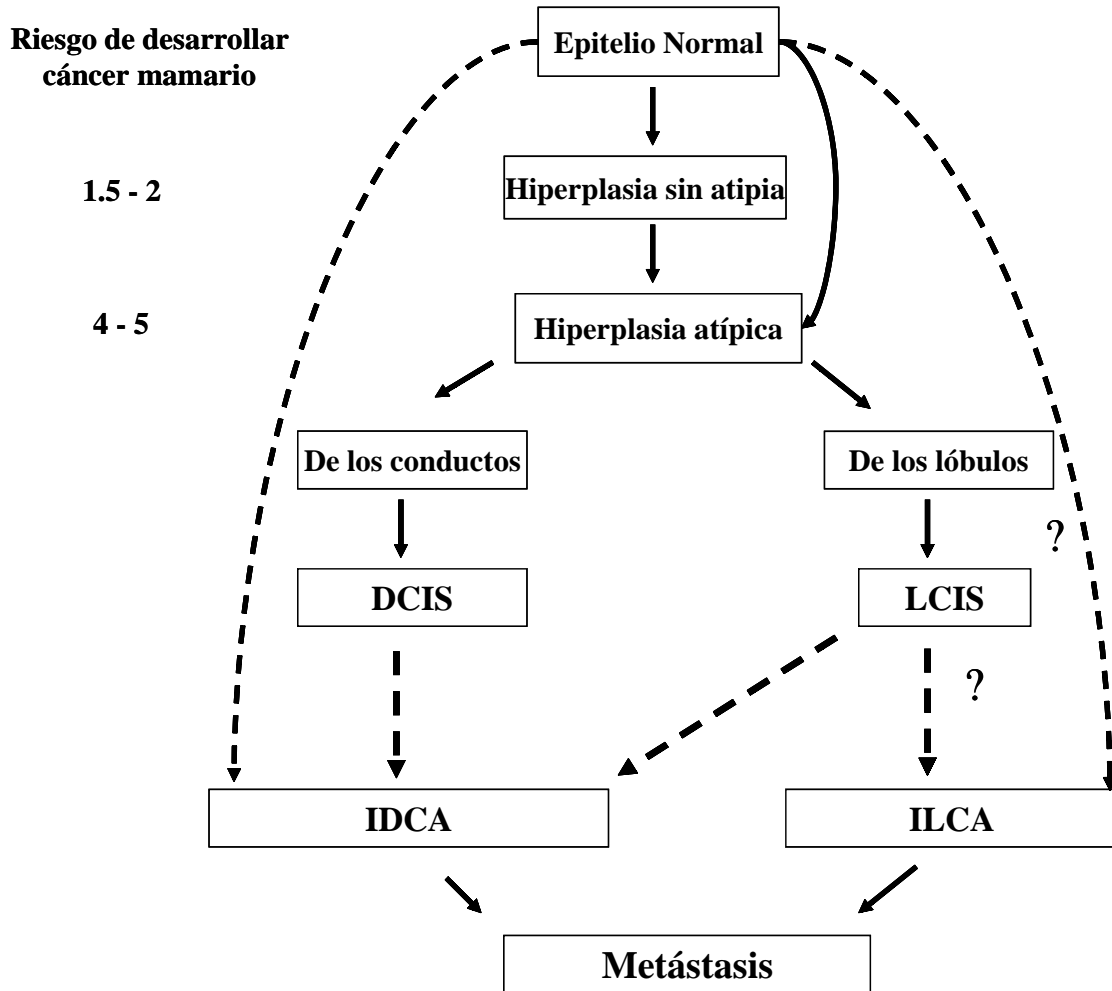
### A. GENERALIDADES.

#### 1. Características histológicas.

El cáncer mamario humano se caracteriza por una heterogeneidad morfológica, genética y molecular. De hecho las lesiones premalignas e invasoras que pueden ocurrir en la glándula mamaria humana presentan diferentes características bioquímicas y moleculares, por lo que se considera al cáncer mamario como un conjunto de enfermedades (Medina y Thompson, 2000). El cáncer mamario, como todas las neoplasias malignas, es el resultado de la acumulación progresiva de daños en el material genético. Consistente con lo anterior en la actualidad se propone que existen cambios morfológicos en el epitelio mamario que pueden indicar una progresión de la carcinogénesis, esto es pasar de una hiperplasia a una hiperplasia atípica y de ésta a un carcinoma *in situ*. Del carcinoma *in situ* a uno invasor y finalmente a la metástasis. Sin embargo, también se acepta que dependiendo del daño genético que inicia la transformación celular algunos de los pasos morfológicos intermedios pueden no presentarse (Charpentier y Aldaz, 2002; Mallon et al., 2000). En la Figura 5 se presenta un modelo que muestra la progresión de los cambios histopatológicos en el cáncer mamario. Antes de continuar, es necesario aclarar algunos aspectos de la nomenclatura utilizada en la clasificación de las lesiones tanto benignas como malignas de la glándula mamaria. En primer lugar, hay que señalar que los tumores malignos mamaros son primordialmente de origen epitelial. Segundo, se acepta que dichos tumores epiteliales se originan principalmente en la TDLU. Tercero, por lo tanto el uso de los términos ductal (de los conductos) y/o lobular (de los lóbulos) en la nomenclatura de las lesiones mamaras no indica el lugar anatómico de origen de la lesión. Cuarto, la nomenclatura utilizada se conserva por razones históricas y prácticas, ya que goza de gran consenso mundial entre los patólogos y que los criterios patológicos utilizados permiten definir claramente



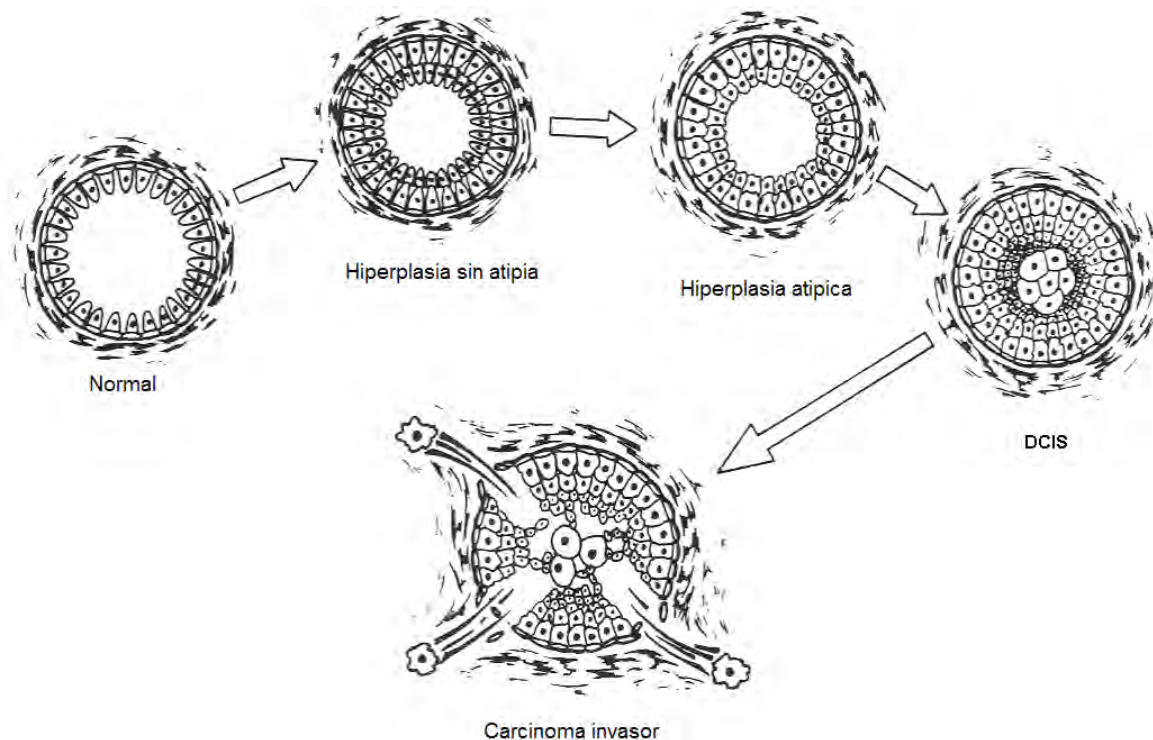
una entidad histopatológica determinada lo que supera la simple asignación nominal (Charpentier y Aldaz, 2002; Mallon et al., 2000).



**Figura 5. Modelo de progresión histopatológica del cáncer mamario y su correspondiente riesgo de desarrollar cáncer.** Una mujer con una hiperplasia sin atipia tiene de 1.5 a 2 veces mayor riesgo de desarrollar cáncer mamario y una mujer con hiperplasia atípica presenta un riesgo mayor (4-5 veces). Las mujeres con DCIS y LCIS tienen mayor riesgo de desarrollar un carcinoma invasor. Note que el LCIS se considera precursor del IDCA. DCIS: carcinoma de los conductos *in situ*; LCIS: carcinoma de los lóbulos *in situ*; IDCA: carcinoma de los conductos invasor; ILCA: carcinoma de los lóbulos invasor. Modificada de Charpentier y Aldaz, 2002.

Como se ya se mencionó, se ha planteado que el paso inicial de la carcinogénesis mamaria puede ser la hiperplasia epitelial o hiperplasia sin atipia, la cual es un aumento en la celularidad del TDLU y de los conductos intra-lobulares (ver Figura 2). Dicha lesión puede ser leve (3-4 capas de células), moderada (> 5 capas de células) o severa. La diferencia entre moderado y severo no está en función del número de capas celulares sino de que en la hiperplasia severa las unidades epiteliales involucradas están distendidas y los espacios luminare están obliterados por las células que están proliferando (Figura 6). El núcleo de las células en la hiperplasia sin atipia varía de tamaño y suelen presentarse en forma de ovoide o de huso, tienen un patrón de cromatina normal y el nucléolo es indistinto. Se ha reportado que la hiperplasia sin atipia se asocia con un aumento en el riesgo de 1.5 a 2 veces de desarrollar cáncer mamario con respecto de la población general (Charpentier y Aldaz, 2002; Mallon et al., 2000). Por otra parte, la hiperplasia con atipia, o atípica, se considera que representa el segundo paso del desarrollo de los carcinomas mamarios. La hiperplasia atípica puede ser tanto de los conductos como de los lóbulos y se caracteriza por poseer francas características anormales y algunas veces es difícil distinguirlas de los carcinomas *in situ* (Figura 6). Existen tres criterios que se utilizan para distinguirlo del carcinoma *in situ* que son: a) las características citológicas, b) el patrón histológico y la evaluación semicuantitativa de la extensión de los cambios presentes. La hiperplasia atípica se asocia con un aumento en el riesgo de 4 a 5 veces de desarrollar cáncer mamario con respecto de la población general (Charpentier y Aldaz, 2002; Mallon et al., 2000). El siguiente paso después de las hiperplasias atípicas son los carcinomas *in situ* dichas neoplasias se caracterizan por estar confinadas dentro de la membrana base y conservan la arquitectura tisular ya que cuando la lesión se expande más allá de este límite a la neoplasia se le considera un carcinoma invasor (Figura 6). Entre ese tipo de las neoplasias se encuentra el carcinoma *in situ* de los conductos (DCIS), el cual representa un grupo altamente heterogéneo de lesiones, con apariencia, comportamiento y biología distintas. Las mujeres diagnosticadas con DCIS tienen un mayor riesgo de desarrollar un carcinoma invasor. Otra lesión neoplásica mamaria es el carcinoma

*in situ* de los lóbulos (LCIS). El LCIS se caracteriza por una población uniforme de células pequeñas unidas, no muy apretadas, que crecen de forma sólida en acinos individuales de las unidades lobulares y ocluyen los espacios luminare. El proceso cubre más del 50% del acino en la unidad lobular. El citoplasma de las células del LCIS puede ser claro o eosinófilo, puede acumular mucina y empujar el núcleo a un lado, el núcleo suele ser pequeño y redondeado y presenta bordes celulares rígidos. Las células del LCIS pueden extenderse a lo largo de las paredes de los conductos adjuntos de las capas de células epiteliales y mioepiteliales.



**Figura 6. Esquematación de la progresión histológica del cáncer mamario. DCIS:** Carcinoma *in situ* de los conductos. Modificada de Miller, 1994.

En lo que respecta a los carcinomas invasores se tiene que el más frecuente es el carcinoma mamario invasor es el de los conductos (IDCA), el cual representa aproximadamente entre un 60 y un 80% del total de los casos de tumores mamarios. La mayoría de los tumores IDCA tienen las características típicas de los adenocarcinomas bien diferenciados o pobremente diferenciados.

Otro tipo de carcinoma mamario invasor es el de los lóbulos (ILCA), el cual representa 10-15% del total de las neoplasias mamarias invasoras. El ILCA tiene un patrón de crecimiento caracterizado por la presencia de células agrupadas en cordones (agrupación en fila india). Los cordones celulares a menudo forman círculos concéntricos a manera de “blancos”. Un ILCA clásico presenta células relativamente pequeñas con núcleos redondeados, con la cromatina condensada y un nucléolo poco prominente. Este tipo de tumor también presenta patrones clínico y metastático diferentes del que presenta el IDCA. Por ejemplo, los pacientes con ILCA tienen mayor riesgo de presentar múltifocos y lesiones contra laterales que los pacientes con IDCA. Otros carcinomas mamarios invasores son el mucinoso, el papilar, el secretor, el tubular, el aprocrino, el medular, el cisto-adenocarcinoma y el mioepitelioma.

Una vez que se da un carcinoma invasor el riesgo de metástasis es inminente. Por lo regular el cáncer mamario inicia la invasión hacia nódulos linfáticos regionales y al sistema vascular en el parénquima mamario. Los principales sitios de metástasis de las células tumorales mamarias son los pulmones, el hígado, el cerebro, la glándula adrenal y los huesos (Mallon et al, 2000).

## 2. Dependencia de hormonas.

Una de las características que más se destacan del cáncer mamario es que en algunos casos requieren para proliferar de la presencia de estrógenos y se les denomina como dependientes de hormonas. Se estima que al menos una tercera parte de los tumores mamarios que se presentan en la mujer son dependientes de hormonas, mientras que las otras dos terceras partes no requieren para su proliferación de los estrógenos (Nandi et al, 1995). En los modelos animales de cáncer mamario se estima que en la rata, el 70% de los tumores son dependientes de hormonas mientras que en el ratón solo el 35% presentan esta característica (Medina, 2000; Nandi et al., 1995; Thompson y Sporn, 2002). La dependencia de hormonas es muy importante tiene implicaciones terapéuticas, etiológicas y en la

propia biología del cáncer mamario. Desde 1896 George Beaston (citado en Strasser-Weippl y Goss, 2003) mostró que la ovariectomía bilateral producía una remisión de los tumores mamarios avanzados en mujeres premenopáusicas. En la actualidad el desarrollo de compuestos moduladores (agonista/antagonista) selectivos del receptor a estrógenos como el tamoxifeno y el raloxifeno, así como el de inhibidores de la aromatasas, enzima encargada de la síntesis de estrógenos, prometen un gran avance en la terapia del cáncer (Strasser-Weippl y Goss, 2003).

La presencia del receptor a estrógenos  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) es la clave de su dependencia a este tipo de hormonas (Russo y Russo, 2004). Los estrógenos a través del  $ER\alpha$  inducen la expresión del receptor de progesterona (PR). Ambas hormonas actúan concordantemente regulando la expresión de varios genes asociados al ciclo celular, así como de factores de crecimiento (Dickson y Lippman, 1995). La presencia del  $ER\alpha$  además de sus implicaciones en la terapia también tiene implicaciones fisiopatológicas ya que los tumores dependientes de hormonas tienen un fenotipo menos agresivo que los tumores independientes de hormonas o ER- (Dickson y Lippman, 1995; Dontu et al., 2004). Los tumores mamarios independientes de hormonas tienen mayores índices de proliferación e invasión tanto *in vivo* como *in vitro*; expresión elevada de enzimas de fase I y fase II del metabolismo de drogas; expresión alterada de receptores de factores de crecimiento (niveles altos de receptores de EGF, pero bajos niveles de receptor IGF-1), y una morfología nuclear más aberrante y pérdida de mediadores bioquímicos de la morfología epitelial (Dickson y Lippman, 1995). Varios autores han señalado que los tumores independientes de hormonas representan por un lado un estado de mayor progresión en la carcinogénesis mamaria, es decir los tumores pasan de un estado de dependencia a uno de independencia (Dickson y Lippman, 1995; Nandi et al., 1995). Por otro lado los tumores independientes a hormonas también indican que en la iniciación tumoral hay orígenes celulares diferentes (Dickson y Lippman, 1995; Dontu et al., 2004; Nandi et al., 1995).

### 3. Alteraciones genéticas y epigenéticas.

Se ha descrito que la promoción y progresión tumorales son procesos que involucran la activación e inactivación coordinada de múltiples genes. En éstos procesos de activación e inactivación y participan varios mecanismos tanto de tipo genético (mutaciones), como epigenéticos (metilación del DNA, acetilación de histonas, etc) (Charpentier y Aldaz, 2002; Szif et al., 2004). Se han realizado varios estudios cuyo objetivo es caracterizar el papel de las alteraciones genéticas en el cáncer mamario. Sin embargo, como ocurre con los otros tipos de tumores sólidos de origen epitelial, éstos presentan un gran número de alteraciones aleatorias que dificultan la identificación de cambios citogenéticos significativos. Esto se debe a la heterogeneidad clonal característica del cáncer mamario, así como a las dificultades técnicas inherentes que presentan los tumores sólidos para obtener preparaciones de alta calidad mostrando cromosomas en metafase (Charpentier y Aldaz, 2002). Sin embargo, se ha logrado identificar varias aberraciones genéticas y cromosómicas las cuales se resumen en la Tabla 1. En esta sección, se describen brevemente algunos de los hallazgos más significativos de las alteraciones genéticas y cromosómicas relacionadas con los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores en el cáncer mamario así como del papel de los cambios epigenéticos.

#### a. Proto-oncogenes y amplificación génica.

Los proto-oncogenes codifican proteínas que están involucradas con las cascadas de señalización de los mitógenos y la proliferación celular. En el cáncer mamario la aberración más común que afecta a los proto-oncogenes es la amplificación. Las alteraciones en el funcionamiento de los proto-oncogenes, ya sea por una mutación o por aumento en la expresión llevan a la presencia constante de estímulos de crecimiento y a una respuesta mitogénica constitutiva. Alteraciones en un solo alelo de un proto-oncogén pueden ser suficientes para iniciar una desregulación del crecimiento celular y cuando esto ocurre se le denomina oncogén (Charpentier y Aldaz, 2002; Osborne et al., 2004).

**Tabla 1. Resumen de aberraciones genéticas en cáncer mamario esporádico.**

Región cromosómica	Hallazgo citogenético	Hallazgo CGH	Ca. invasor % LOH	DCIS % LOH	Blanco(s) posible(s)	Consecuencias posibles
1p	-1p		32	8		
1q	+1q	+1q	30	16		
3p		-3p	22	0		
3q			25	0		
5p			18	0		
5q			13	0		
6p	-6	+6p	30	0		
6q	-6, -6q	-6q, +6q	26	8		
7p	+7	+7p	32	32	<i>EGFR</i>	Sobreexpresión
7q	+7		25	24		
8p	-8, -8p	-8p	18	10		
8q	-8, + 8q	+8q	20	22	<i>c-myc</i>	Sobreexpresión
9p	- 9p		58	30	<i>p16<sup>INK4A</sup></i>	Desregulación
9q			24	0		
10p			11	0		
10q			15	0	<i>PTEN</i>	Reducción de la expresión
11p	-11, -11p	-11p	28	0		
11q	-11, -11q	-11q	30	12	<i>Ciclina D1</i>	Sobreexpresión
13q	-13	-13q	30	18	<i>Rb1, BRCA2, Brush-1</i>	Reducción de la expresión
16p	-16		40	0		
16q	-16, -16q		48	27	<i>CDH1</i>	Reducción de la expresión
17p	-17, 17p	- 17p	57	33	<i>p53</i>	Inactivación
17q	- 17		36	31	<i>BRCA1, NME1</i>	Reducción de la expresión
17q		+ 17q			<i>c-erbB2</i>	Sobreexpresión
18p			25	0		
18q			48	12	<i>Bcl2</i>	Desregulación
19p			18	0		
19q		+ 19q	14	0	<i>ciclina E</i>	Sobreexpresión
20q		+ 20q13	17	6	<i>AIB1</i>	Sobreexpresión
21q			17	5		
22q	-22		36	0		
Xp	-X		22			
Xq	-X		8			

Se indican las principales alteraciones genéticas y cromosómicas que se encuentran en el cáncer mamario. En la columna 2 se muestran los hallazgos citogenéticos encontrados con las técnicas tradicionales y con la hibridación genómica comparativa (CGH). LOH: pérdida de la heterocigocidad. Modificada de Charpentier y Aldaz, 2002.

#### a.1. Oncogén *c-erbB2* o *HER-2/neu*.

El gen *c-erbB2* es miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Esta familia de receptores codifica para glicoproteínas transmembranales con actividad de tirosina cinasa, con una gran homología y una alta especificidad por sus ligandos. Algunos otros miembros de esta familia, entre los que se encuentran el *EGFR*, el *c-erbB2*, el *c-erbB3*, el *c-erbB4*, se ha observado que pueden estar sobre expresados en el cáncer mamario. Se ha demostrado que el gen *c-erbB2* localizado en el cromosoma 17q12 se encuentra amplificado en un 20-40% de los tumores mamarios, ésta amplificación se acompaña de una sobreexpresión tanto del mRNA como de la proteína. La activación del receptor se da por la unión de su ligando específico o de manera independiente cuando hay una alta densidad de la población de receptores en la membrana. La activación del receptor se da por una dimerización y autofosforilación, lo que desencadena múltiples cascadas de señalización dentro de las que se incluyen las vías de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) y las PI3/Akt. La activación de dichas vías tiene varias consecuencias como son aumento de la proliferación celular, la angiogénesis, alteración de las interacciones célula-célula, aumento de la motilidad celular, metástasis y resistencia a la apoptosis. El descubrimiento de la amplificación y sobreexpresión del gen *c-erbB2* en los tumores mamarios se ha asociado con un comportamiento clínico más agresivo y ha tenido implicaciones clínicas y terapéuticas (Charpentier y Aldaz, 2002; Osborne et al., 2004).

#### a.2. Oncogén *c-myc*.

La amplificación del cromosoma 8q resulta en un incremento en el número copias de *c-myc*, el cual es miembro de una familia de genes que codifican para factores de transcripción. En las células normales, la expresión de *c-myc* se acompaña de una estimulación mitogénica y su actividad depende de la presencia de factores de crecimiento. El oncogén *c-myc* se encuentra sobreexpresado, ya sea por amplificación o desregulación en muchos de los tumores mamarios. Se



estima que cerca de un 15 a un 25% de los tumores mamarios presentan amplificación de *c-myc* (Charpentier y Aldaz, 2002; Osborne et al., 2004).

### a.3. Ciclina D1.

El gen de la ciclina D1 se localiza en el cromosoma 11q13, se encuentra sobre expresado en un 40-50% de los tumores mamarios invasores y se ha estimado que en 15-20% de los tumores se encuentra amplificado. La ciclina D1 es una de las ciclinas involucradas en la progresión de la fase G1 a la fase S en el ciclo celular. La alta expresión de la ciclina D1 está asociada positivamente con la presencia de receptores de estrógenos y un índice proliferación aumentado (Charpentier y Aldaz, 2002; Osborne et al., 2004).

### b. Genes supresores de tumores y la pérdida de la heterocigocidad.

Para que se manifieste la ausencia de un gen supresor de tumores es necesario que se eliminen o inutilicen ambas copias de un gen. La inactivación de una de las copias podría deberse a una pérdida a gran escala del cromosoma o por una mutación puntual; la segunda copia podría perderse de una manera similar o por recombinación mitótica o por conversión génica. Estas posibilidades son tales que la segunda copia del gen y normalmente también las regiones flanqueantes en el cromosoma, se pierden totalmente o son reemplazadas por una copia de la región correspondiente del primer cromosoma en defecto. A esto se le denomina pérdida de la heterocigocidad, es decir se pierde la combinación heterocigota normal de los alelos materno y paterno de los genes en la región cromosómica dada (Alberts et al., 2004).

#### b1. Gen supresor de tumores *p53*.

El brazo corto del cromosoma 17 (17p13) es sujeto de pérdida de alelos en más de un 50% de los IDCAs y aproximadamente en un 30% de los DCIS. En esta región se encuentra el gen supresor de tumores *p53*, el cual es un factor de transcripción y tiene diferentes funciones como son el detener el ciclo celular en punto de control G1/S del ciclo celular, inducción de apoptosis y reparación del

DNA. Se ha descrito que p53 se encuentra mutado en 25-45% de los tumores mamarios primarios. Estudios funcionales de células con p53 mutado han mostrado cambios fenotípicos, entre los que destacan inmortalización de la célula, pérdida de la supresión del crecimiento, e incremento en la vida media de la proteína hasta cuatro veces, lo que ocasiona una acumulación de la proteína. La acumulación de p53 se observa por inmunohistoquímica en un 30-50% de los tumores mamarios esporádicos. La inactivación de p53 por mutación y pérdida de la heterocigocidad esta intrínsecamente relacionada con inestabilidad genómica (Charpentier y Aldaz, 2002; Osborne et al., 2004).

#### b.2. Gen supresor de tumores de retinoblastoma (*Rb1*).

En el brazo largo del cromosoma 13 (13q14) se ubica el gen supresor de tumores *Rb1*. Se ha descrito que en un 15-25% de los DCIS presentan una pérdida del cromosoma 13q14, lo que ha permitido sugerir que este cambio ocurre de manera temprana en el desarrollo del cáncer. El gen *Rb1* codifica para una proteína reguladora del ciclo celular que cuando no está fosforilada interactúa con el factor de transcripción E2F y lo inactiva, cuando el *Rb1* está fosforilado el factor E2F está libre y permite la transcripción de proteínas que favorecen la proliferación celular tales como *myc* (Alberts et al., 2004; Charpentier y Aldaz, 2002).

#### b.3. Gen supresor de tumores $p16^{INK4A}$ .

Se ha descrito que la región del cromosoma 9p21 tiene una pérdida alélica en más de 58% de los IDCA y 30% de los DCIS. El gen *p16* codifica para una proteína que inhibe la actividad de los complejos de ciclina-cinasa dependiente de ciclina (cdk) en la fase G1 del ciclo celular, y por lo tanto inhibe la progresión del ciclo (Alberts et al., 2004; Charpentier y Aldaz, 2002).

#### b.4. Cromosoma 16q.

Se ha sugerido que el cromosoma 16q es un sitio primario de anomalía citogenética en el desarrollo de cáncer. En particular se ha mostrado que hay una alta frecuencia de traslocación no aleatoria del brazo largo del cromosoma 16 al 1

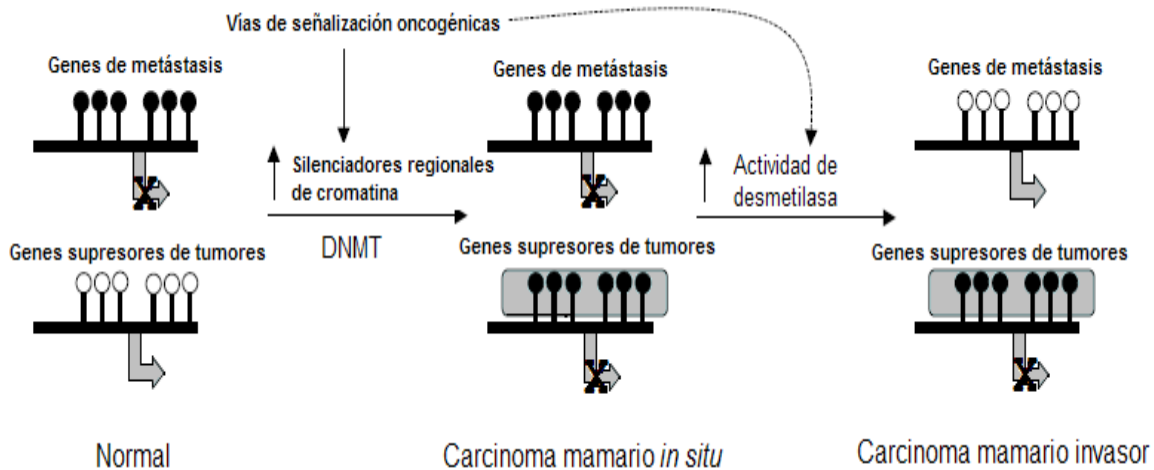
y hay una frecuente pérdida alélica del cromosoma 16q en el cáncer mamario. Se ha sugerido que más de un probable gen supresor de tumores se ubican en el brazo largo del cromosoma 16 y al menos dos regiones han sido consistentemente reportadas que muestran una pérdida de la heterocigocidad, 16q21 y 16q24. El gen *CDH1* ubicado en el cromosoma 16q21 se ha señalado como el candidato de la pérdida de heterocigocidad. El gen *CDH1* codifica para la proteína de adhesión celular E-caderina que está implicada como una “proteína supresora de invasión”. El gen de *CDH1* se encuentra mutado con una alta frecuencia en el ILCA. La falta de expresión de la E-caderina se ha asociado con el patrón característico de crecimiento de este tipo de tumor. Por su parte los IDCA no es común la presencia de mutaciones en el gen *CDH1*. Por otra parte, en la región 16q24, se ubica el gen de la H-caderina el cual también se ha reportado ausente o reducido en un gran número de tumores mamarios (Charpentier y Aldaz, 2002).

#### c. Cambios epigenéticos.

Acompañadas de las alteraciones genéticas en el cáncer también ocurren las alteraciones epigenéticas. Algunos de los principales mecanismos de regulación de la expresión génica son la modificación de las histonas por acetilación y la metilación del DNA. Algunos genes tienen en su región promotora zonas ricas en el dinucleótido CG, conocidas como islas CpG. La metilación del DNA se lleva a cabo por acción de la DNA metiltransferasa (DNMT), la cual cataliza la transferencia de un residuo metilo del donador de metilos S-adenosilmetionina (SAM) a la posición 5 del anillo de citosina. La metilación de las citocinas en las islas CpG tiene como consecuencia cambios en la estructura de la cromatina que la hacen menos accesible a los factores de transcripción. Al DNA metilado se le unen proteínas como la MeCP2 que recluta complejos de proteínas represoras, deacetilasas de histona, metil-transferasas de histona lo que produce una condensación de la cromatina (Szyf et al., 2004).

En el cáncer mamario se ha descrito que ocurre un fenómeno paradójico donde coexisten la hipermetilación regional de ciertos genes y la hipometilación global. Se piensa que la hipometilación global ocurre por un incremento global de

la actividad de desmetilasa mientras que la hipermetilación regional ocurre por cambios locales en la estructura de la cromatina que evitan el acceso de la(s) desmetilasa(s) (Figura 7).



**Figura 7. Hipermetilación e hipometilación en el cáncer mamario.** En las células epiteliales normales los genes supresores de tumores son activos (indicado con la flecha horizontal) y sin metilar (círculos blancos indican islas CpC sin metilar). Por su parte, los genes involucrados en la metástasis se encuentran metilados (círculos negros) e inactivos. La activación de las vías oncogénicas induce la interacción de represores específicos con los genes supresores induciendo inactivación de la cromatina y metilación del DNA (círculos negros). En un estado más avanzado las mismas o adicionales vías oncogénicas producen la inducción de la actividad de desmetilasa, provocando una desmetilación global así como una desmetilación y activación de genes involucrados en la generación de la metástasis. De esta manera el carcinoma adquiere un mayor potencial metastásico. Por su parte, los genes supresores de tumores se mantienen metilados por acción de proteínas represoras que los protegen de la desmetilación y por lo tanto los mantienen inactivos. DNMT: DNA metiltransferasas. Modificada de Szyf et al., 2004.

El significado principal de la hipermetilación regional del DNA en el cáncer mamario es que varios genes supresores se encuentran hipermetilados y por lo tanto inactivos. En la Tabla 2 se muestran algunos de los genes que se encuentran hipermetilados en el cáncer mamario. Se debe notar que algunos de estos genes que se encuentran hipermetilados también se ha descrito que son susceptibles de mutaciones o de pérdida de la heterocigocidad. Entre estos genes se puede mencionar a los de p16 y la E-caderina. La susceptibilidad a la

hipermetilación de estos genes indica la posibilidad de que mientras uno de los alelos puede estar mutado, el otro puede estar hipermetilado y de esta manera inactivar el gen. Otro tipo de genes hipermetilados son el receptor al ácido retinoico  $\beta$  (RAR $\beta$ ), el cual tiene un efecto anti-proliferativo, el gen DAPK1 el cual participa en la apoptosis. También es de destacar que algunos de los tumores mamarios tienen hipermetilado el ER $\alpha$ , la inactivación de este receptor tiene implicaciones funcionales importantes como es la independencia de hormonas. Otros genes hipermetilados son los genes de reparación del DNA el MLH1 y el HSMH2 o inhibidores de proteasas como el TIMP3 (Lacroix et al., 2004; Szyf et al., 2004).

**Tabla 2. Genes hipermetilados en el cáncer mamario.**

<b>Gen</b>	<b>Producto</b>
<i>APC</i>	Poliposis adenomatosa coli
<i>ARHI</i>	Miembro 1 de la familia homologa de Ras
<i>BRCA1</i>	Cáncer mamario 1
<i>CCND2</i>	Ciclina D2
<i>CDH1</i>	Caderina 1, caderina epitelial (E-caderina)
<i>CDH13</i>	Caderina 13, caderina del corazón (H-caderina)
<i>CDKN2A (p16)</i>	Inhibidor 2 <sup>a</sup> de ciclinas dependientes de cinasa (p16)
<i>DAPK1</i>	Proteína cinasa asociada a muerte 1
<i>ER<math>\alpha</math></i>	Receptor de estrógenos $\alpha$
<i>FABP3</i>	Proteína de unión de los ácidos grasos 3 (MDGI)
<i>GJB2</i>	Conexina 26 (Proteína de union estrecha, $\beta$ 2, 26KD)
<i>CPC3</i>	Glipicano 3
<i>GSN</i>	Gelsolina
<i>GSTP1</i>	Glutación S-transferasa $\pi$
<i>HOXA5</i>	Homeo box A5
<i>IL6</i>	Interleucina 6
<i>KLK10</i>	Calicreina 10
<i>MGMT</i>	Metilguanina-DNA metiltransferasa
<i>NME1</i>	Proteína expresada en células no metástasicas 1 (nm23A)
<i>PGR</i>	Receptor a progesterona
<i>PLAU</i>	Urocinasa, activador del plasminógeno
<i>PRDM2</i>	Dominio PR
<i>PRKCDBP</i>	Proteína cinasa C, proteína de unión delta (SRBC)
<i>PRSS8</i>	Prostatina (Proteasa, serina 8)
<i>RARB(2)</i>	Receptor al ácido retinoico beta (RAR $\beta$ )
<i>SLC19A1</i>	Miembro 1 de la familia 19 del transportador de solutos (transportador de folato)
<i>TIMP3</i>	Inhibidor de metaloproteinasas 3

Modificada de Lacroix et al., 2004.

Por otra parte el papel que desempeña la hipometilación del DNA en el cáncer mamario esta estrechamente relacionado con un aumento en la capacidad

de metástasis de las células tumorales. Por ejemplo genes como el *HEPARANASA* que codifica para una proteína que degrada proteoglicanos de heparan-sulfato o el gen *S100A4* que codifica para una proteína que une calcio están hipometilados en células neoplásicas y favorecen la metástasis. Otros genes que se encuentran hipometilados en células cancerosas de mama y que participan en la metástasis son los genes uPA, una serina-proteasa y *SYNUCLEIN*  $\gamma$ . También se ha descrito que genes de la familia MAGE que se encuentra silentes en las células normales se encuentran expresados en las células tumorales. La expresión de antígenos MAGE es indicativo de mal pronóstico para los pacientes y se asocia a carcinomas invasores de los conductos pobremente diferenciados (Szyf et al. 2004).

### 3. Epidemiología mundial y en México.

El cáncer mamario es la neoplasia maligna más frecuente en la mujer, representa el 23% del total de neoplasias que se presentan en el mundo y más de la mitad de los casos se presentan en los países industrializados. Las regiones con las mayores tasas de incidencia de cáncer mamario estandarizadas por edad, son Norteamérica (Estados Unidos y Canadá) y Europa Occidental (Francia, Alemania, Inglaterra) con tasas de 99.4 y 84.6 por 100, 000 mujeres, respectivamente. Por su parte, Japón presenta la más baja tasa de incidencia de cáncer mamario de los países industrializados (32.7 por 100, 000). En Sudamérica (Argentina, Bolivia, Brasil, Uruguay) y Centroamérica (Belice, Guatemala, El Salvador, México, Nicaragua, Panamá) las tasas de incidencia son de 46 y 25.9 por 100, 000, respectivamente. Por otra parte, las cifras de mortalidad ubican al cáncer mamario en la primera posición de muerte por cáncer en mujeres (14%) y es la quinta causa de muerte del total de neoplasias malignas. Norteamérica y Europa Occidental presentan tasas de mortalidad de 19.2 y 22.3 por 100, 000 mujeres, respectivamente. Japón por su parte presenta una tasa de 8.3 por 100, 000 y Sudamérica y Centroamérica tienen tasas de mortalidad de 15.1 y 10.5 por 100, 000, respectivamente (Parkin et al., 2005).

En el año 2000 el país de América con la mayor mortalidad por cáncer mamario fue Argentina (20.7 por 100, 000), superando incluso a Estados Unidos y Canadá (18 por 100, 000) (Tabla 3). En los otros países de Latinoamérica, la tasa de mortalidad fue de 12-15 por 100, 000, con excepción de Colombia, Ecuador y México, con tasas de mortalidad menores de 10 por 100, 000. Otro rasgo importante en la epidemiología del cáncer mamario es su alta presencia en las mujeres de entre 35 y 64 años de edad (Tabla 3). Por otra parte, a pesar de la baja mortalidad por cáncer mamario que presenta México con respecto a Estados Unidos, Canadá y Argentina la tendencia de la tasa de mortalidad en las últimas tres décadas se ha incrementado considerablemente (Tabla 4). Se postula que el incremento en la tendencia de las tasas de mortalidad en México y todo Latinoamérica parece estar ligada principalmente a cambios en los hábitos reproductivos de la mujer, en particular a una reducción en la fertilidad por el control de la natalidad. También se han señalado que los cambios en los hábitos alimentarios, el incremento en el sobrepeso y otros cambios en el estilo de vida, que pueden estar participando en la tendencia hacia arriba de la mortalidad por cáncer mamario (Bosetti et al., 2005; Malvezzi et al., 2004). Al contrario de lo que ocurre en México, en Norteamérica se observa una tendencia en la reducción la mortalidad, se ha estimado que la reducción promedio anual de la tasa de mortalidad de 1990 al 2000 fue de 2.3% (Ghafoor et al., 2003). La reducción de la mortalidad en Norteamérica se atribuye en gran medida a los avances en la terapia, incluido el uso del tamoxifeno y a la revisión periódica con el estudio mamográfico (Bosetti et al, 2005).

**Tabla 3. Mortalidad en cáncer mamario y cervico-uterino en diferentes países de América, 2000.**

País	Mama		Cervico-uterino	
	Tasa Promedio*	Tasa truncada (34-64 años)**	Tasa promedio*	Tasa truncada (34-64 años)**
Argentina	20.65	37.14	10.68	21.49
México	9.9	21.27	14.82	28.36
Cuba	14.82	28.22	14.13	28.09
Estados Unidos	17.56	31.95	4.59	7.92
Canadá	18.24	32.60	3.79	6.14

\*Tasa promedio: tasa estandariza por edad (todas las edades) y \*\*tasa truncada (34-64 años): Tasa para el grupo de edad entre 34-64 años de edad. La tasa de mortalidad está reportada por 100, 000 defunciones. Modificada de Bosetti et al., 2005.

**Tabla 4. Mortalidad en México por cáncer de mama y cervico-uterino en mujeres, 1970-1999.**

Tipo de tumor	1970-74	1995-99	Porcentaje de cambio 95-99/70-74
Mama	5.22	9.65	84.90
Cervico-uterino	19.09	15.35	-19.59

Tasa de mortalidad por 100, 000 defunciones estandarizadas por edad. Modificado de Malvezzi et al. 2004.

Finalmente, si se comparan los datos de mortalidad del cáncer cervico-uterino, primera causa de muerte por cáncer en la mujer en México, vemos que este tipo de neoplasia ha tenido una reducción notable en las últimas décadas (Tabla 4), mientras que el cáncer mamario se encuentra a la alza (Bosetti et al., 2005; Malvezzi et al., 2004). Esto se debe en gran medida a que el cáncer cervico-uterino tiene la posibilidad de la prevención a través del examen histológico periódico (Bosetti et al., 2005; Malvezzi et al., 2004). Esto se hace más evidente cuando se observan las tasas de mortalidad por cáncer cervico-uterino de Norteamérica comparado con las de los países Latinoamericanos (Tabla 3). Desafortunadamente, para el cáncer mamario no se han desarrollado estrategias sólidas de prevención en gran medida debido a que no se ha identificado un agente etiológico principal aunque si han identificado algunos factores de riesgo que se describirán más adelante.



## B. LA DIETA COMO FACTOR DE RIESGO DEL CÁNCER MAMARIO.

Los factores de riesgo de cáncer mamario se han dividido en tres determinantes que son los a) factores heredo-familiares, b) factores reproductivos y c) factores ambientales, dentro de éstos se incluyen el estilo de vida y la dieta. En el Anexo 1 se presenta una revisión de los factores heredo-familiares y reproductivos y algunos ambientales como son la radiación y de compuestos químicos carcinógenos relacionados con la carcinogénesis mamaria. Aquí solo se trata brevemente es la dieta como un factor de riesgo para cáncer mamario.

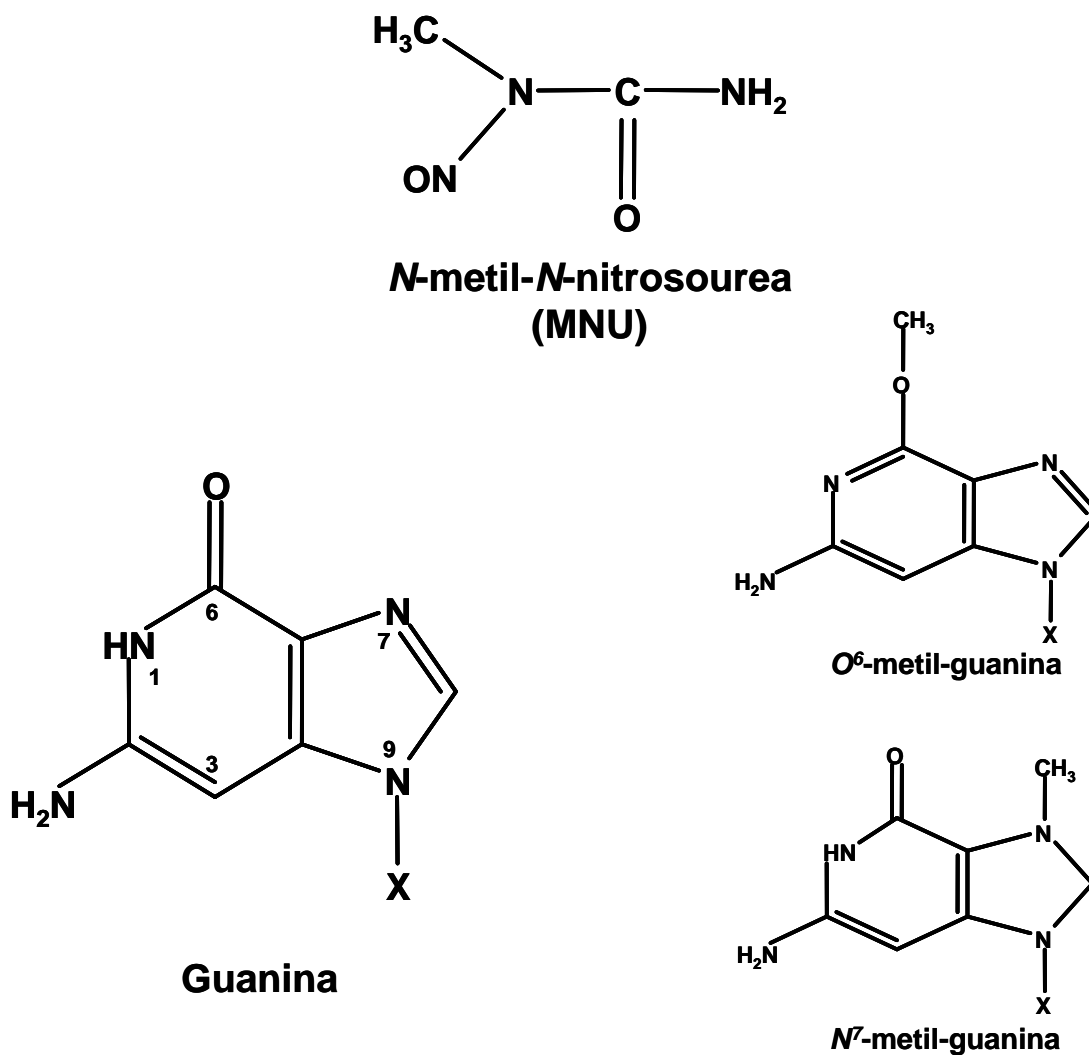
Estudios epidemiológicos en migrantes mostraron la primera evidencia sólida de que los factores ambientales son los principales responsables de la diferencia de incidencia de cáncer mamario presente en las diversas poblaciones del mundo (Bray et al., 2004). Se ha observado en poblaciones de mujeres asiáticas, que comúnmente presentan una baja incidencia de cáncer mamario en sus países de origen, que cuando emigran a Estados Unidos, incrementan el riesgo y la incidencia de esta enfermedad en las generaciones sucesivas (Ziegler et al., 1993). Adicionalmente, también se ha observado un incremento en el riesgo y la incidencia de cáncer mamario en los países en vías de desarrollo asociados a cambios en el estilo de vida que tienden a semejar el perfil de riesgo que se presenta en los países desarrollados (Bray et al., 2004). Con base a los diversos estudios epidemiológicos se han señalado varios factores nutricionales asociados al cáncer mamario, algunos de ellos como componentes de los alimentos y otros que corresponden a la dieta en su conjunto (Gerber et al., 2003). Algunos de los factores nutricionales señalados que aumentan el riesgo de cáncer mamario son: 1) la obesidad, 2) el alto consumo de grasa total y grasa saturada, 3) el consumo de carne al carbón quemada o muy cocida, y 4) la ingesta de alcohol (Gerber et al., 1993; WCRF/AICR, 1997). En contraste, los factores que reducen el riesgo son: 1) el consumo de frutas y verduras, 2) el consumo de carotenoides, 3) el consumo de soya y algas marinas, 4) el consumo de fibra y 5) el aumento de la actividad física (Cann et al., 2000; Gerber et al., 1993; Limer y Speirs, 2004; WCRF/AICR, 1997). Estudios de casos y controles realizados en México han

mostrado un efecto protector contra el riesgo de cáncer mamario por el consumo adecuado de ácidos grasos poliinsaturados y vitamina E en las mujeres posmenopáusicas (Bonilla-Fernández et al., 2003). Por su parte, en las mujeres premenopáusicas un consumo abundante de fibra dietética y de carotenos, se ha asociado con una reducción del cáncer mamario (Bonilla-Fernández et al., 2003). Por otra parte Romieu et al (2004) en un estudio de casos y controles encontraron un mayor riesgo de cáncer mamario asociado al consumo de hidratos de carbono en especial al consumo de sacarosa y fructosa. En el Anexo 2 se presenta un artículo de revisión que donde se exponen algunos de los factores nutricionales más estudiados relacionados con el cáncer mamario humano y como se ha abordado su estudio utilizando los modelos animales de inducción química de cáncer mamario.

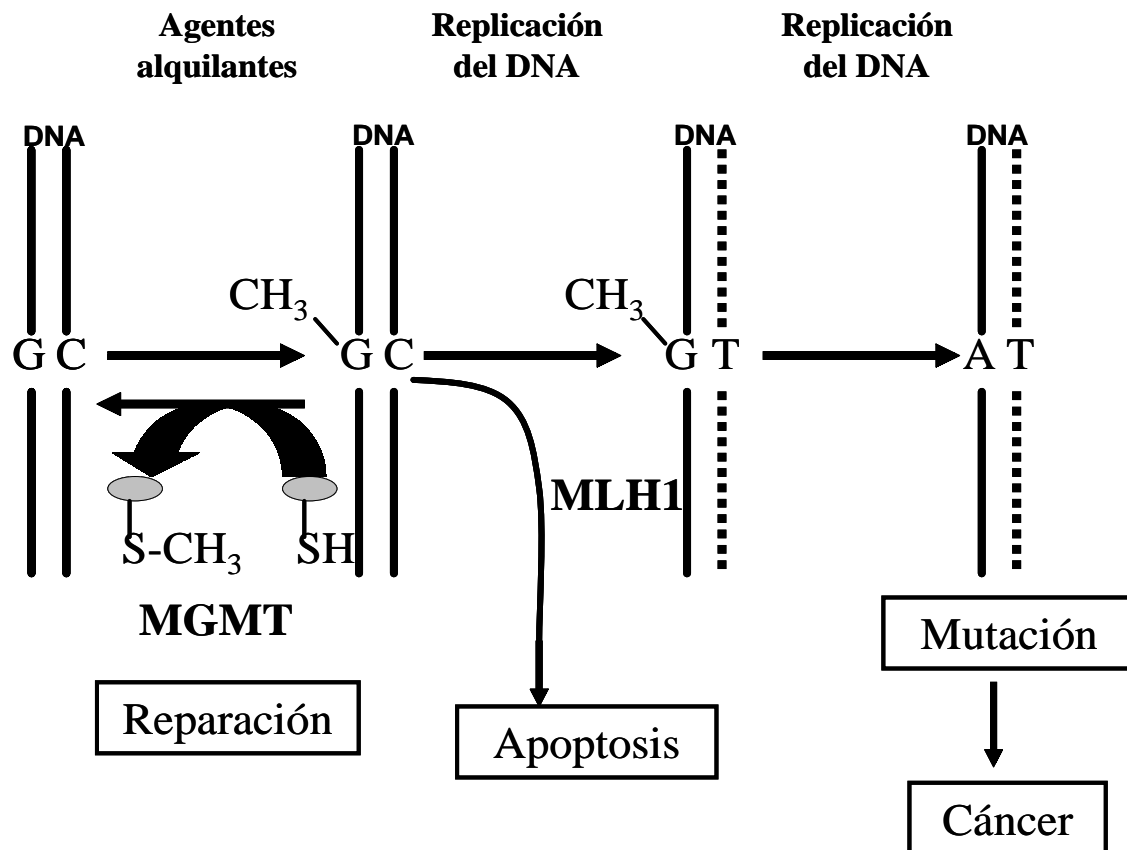
### III: MODELOS ANIMALES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DEL CÁNCER MAMARIO.

Un solo modelo animal no puede abarcar todo el espectro de características presentes en los tipos de cáncer mamario humano. Afortunadamente, existen modelos animales de inducción de cáncer mamario que reúnen ciertas características que los hacen de gran utilidad en el estudio de diversos aspectos de esta enfermedad como son: a) desarrollo en corto tiempo de los tumores, b) los tumores se desarrollan principalmente en la glándula mamaria, c) el carcinógeno causa un pobre o nulo efecto tóxico sistémico; y d) los tumores mamaros tienen un origen histológico y de características patológicas similares a las que se presentan en la mayoría de los casos de cáncer mamario humano. Las especies utilizadas en los modelos animales de cáncer mamario son el ratón y la rata y los carcinógenos más empleados son el *N*-metil-*N*-nitrosourea (MNU) y el 7, 12-Dimetilbenzo[*a*]antraceno (DMBA). El uso en ratas tanto del MNU como del DMBA ha sido ampliamente aprovechado para el estudio de factores preventivos y terapéuticos del cáncer mamario con resultados altamente reproducibles (Medina y Thompson, 2000; Thompson, 2000; Thompson y Sporn, 2002). En estos modelos de inducción química de cáncer mamario en ratas, se utilizan hembras preferentemente de 50 días de edad y de la cepa Sprague Dawley. En el modelo de MNU se utiliza una sola dosis intraperitoneal de 50 mg de MNU por Kg de peso corporal y en el caso del DMBA se aplica una sola dosis intragástrica de 20 mg por rata (Thompson, 2000). Existen diferencias importantes entre el MNU y DMBA que es importante destacar. Por un lado, el MNU es un agente alquilante que actúa directamente en el DNA generando mutaciones (Figuras 8 y 9). El MNU también inhibe tanto a las enzimas de reparación del DNA como a las DNA polimerasas, estimula la proliferación celular y favorece la herencia de DNA-hipometilado a las células hijas (Cha et al., 1994; Clarke, 1997; Mukai y Sekiguchi et al., 2002). Por su parte, el DMBA requiere ser activado por las enzimas de detoxificación de fase I y fase II para adquirir su capacidad genotóxica. El modelo de DMBA es muy útil

para identificar agentes que inhiban la activación de los carcinógenos, como sería la inhibición de la citocromo p-450 (Clarke, 1997; Thompson y Sporn, 2002).



**Figura 8. Estructura del MNU y de las guaninas metiladas.** El MNU es un carcinógeno que actúa directamente en el DNA alquilando preferentemente los residuos de guanina en las posiciones O<sup>6</sup> y N<sup>7</sup>.



**Figura 9. Mecanismos de mutagénesis y carcinogénesis por agentes alquilantes.** Los agentes alquilantes como el MNU son capaces de producir  $O^6$ -metil-guanina y otras bases alquiladas en el DNA. Durante la replicación del DNA la  $O^6$ -metil-guanina puede aparearse tanto con la timina así como con la citosina produciendo transiciones  $G:C \rightarrow A:T$ , estas mutaciones pueden producir eventualmente la inducción tumoral. La mutación es prevenida por dos procesos consecutivos: el primero, reparar la  $O^6$ -metil-guanina transfiriendo el grupo metilo a la  $O^6$ -metil-guanina DNA-metil-transferasa (MGMT); y el segundo, eliminando las células que tienen las lesiones por metilación a través de la apoptosis, donde la proteína reparadora de bases mal apareadas, MLH1, y otras proteínas reparadoras están involucradas. Modificado de Mukai y Sekiguchi, 2002.

Los tumores mamarios generados por el MNU son principalmente adenocarcinomas (>90%) con limitado potencial metastático (Russo et al., 1990 Thompson y Sporn, 2002). La evidencia señala que el carcinógeno afecta las células epiteliales con alta capacidad de proliferación en los bulbos de los pies terminales que son las estructuras que dan origen a las elongaciones de los

conductos y a las estructuras lóbulo-alveolares (Masso-Welch et al., 2000; Russo et al., 2000). En la Tabla 5 se presenta una serie de características comunes entre el tumores mamarios humanos y los generados en ratas con el carcinógeno MNU y en la Tabla 6 se presenta la clasificación de los tumores mamarios de rata propuesta por Russo et al (1990) y Russo y Russo (2000).

**Tabla 5. Características de los tumores mamarios de rata inducidos con MNU y sus similitudes con los tumores mamarios en el humano.**

Rasgo/Característica	Similitud con los tumores mamarios humanos
Histogénesis	Células epiteliales
Patogénesis	Hiperplasia de los conductos, carcinoma <i>in situ</i> de los conductos, carcinoma invasor
Dependencia de las hormonas ováricas	Más del 70% de los tumores mamarios que alcanzan un tamaño palpable sufren una regresión en respuesta a la ovariectomía
Efecto de la gestación	El embarazo a término antes de la iniciación con el carcinógeno protege contra la formación de tumores
Metástasis	En los tumores de ratas las metástasis son infrecuentes aunque se ha reportado su presencia en los pulmones
Características patogénicas	Se han reportado alteraciones en la expresión de TGF $\alpha$ , ErbB2, ciclina D1 y gelsolina

Modificada de Thompson y Sporn, 2002.

Finalmente, con los modelos animales de inducción química de cáncer mamario se pueden desarrollar protocolos tanto de tipo terapéutico como preventivo. Los protocolos de tipo terapéutico se caracterizan por aplicar los carcinógenos y esperar a que los tumores se desarrollen y alcancen un tamaño determinado. Posteriormente, la eficacia del agente terapéutico se evalúa observando su impacto sobre el crecimiento y/o tamaño final de los tumores. Por otra parte, en un experimento típico de prevención, se contrastan los efectos sobre la respuesta al carcinógeno de un potencial agente preventivo con un grupo control que recibe un tratamiento placebo. La respuesta al carcinógeno se evalúa midiendo cuantos animales desarrollaron tumores (incidencia), el número de tumores por rata, la latencia de aparición del primer tumor, la tasa de crecimiento de los tumores y el tamaño final de los mismos. Este tipo de experimentos arrojan

los resultados en un periodo de 4 meses después de aplicado el carcinógeno y son especialmente útiles para evaluar el efecto de potenciales compuestos preventivos de cáncer mamario (Clarke, 1997; Thompson y Sporn, 2002).

**Tabla 6. Clasificación de lesiones mamarias en la rata.**

---

- I. Neoplasias epiteliales.**
    - A. Lesiones benignas
      - 1. Papiloma intraductal
      - 2. Cistoadenoma papilar
      - 3. Adenoma
        - (a) Tubular
        - (b) Lactante
    - B. Lesiones precancerosas
      - Proliferación intraductal (IDP)
    - C. Lesiones malignas.
      - 1. Carcinoma *in situ* de los conductos (DCIS)
        - (a) Papilar
        - (b) Sólido y cribiforme
        - (c) Comedo
      - 2. Carcinoma invasivo
        - (a) Papilar
        - (b) Cribiforme
        - (c) Comedo
        - (d) Tubular
  - II. Neoplasias del estroma**
    - A. Benignas.
      - Fibroma
    - B. Malignas.
      - Fibrosarcoma
  - III. Neoplasias epiteliales y estromales**
    - A. Benignas.
      - Fibroadenoma
    - B) Malignas
      - Carcinosarcoma
  - IV. Lesiones no neoplásicas**
    - Cambios císticos
      - (a) En los conductos I
      - (b) En los lóbulos
- 

Modificada de Russo et al., 1990 y Russo y Russo, 2000.

## **IV. EL YODO, LA GLÁNDULA MAMARIA NORMAL Y NEOPLÁSICA.**

### **A. GENERALIDADES.**

El yodo (I) químicamente se clasifica como un elemento no metálico, sólido, perteneciente a la familia de los halógenos junto con el flúor (F), el cloro (Cl) y el bromo (Br), con número atómico de 53 y peso atómico de 126.91. Entre las propiedades que comparten los halógenos, como su nombre lo indica, está la capacidad de reaccionar con los metales y formar sales. El yodo se sublima a temperatura ambiente formando un gas violeta (Houston, 1999). Bernard Courtois en Paris en el año de 1811 descubrió al yodo a partir de cenizas de algas marinas (Houston, 1999; McDowell, 1992). Transcurrieron alrededor de 100 años para entender el papel crítico del yodo en la fisiología humana. En 1896 Bauman descubrió la presencia de yodo en la glándula tiroides. Kendall en 1913 aisló de la tiroides a la hormona yodada tiroxina o tetrayodotironina (T4), Harrington y Barger en 1927 sintetizaron químicamente a la T4 (Valverde-R et al., 1993). El efecto fisiológico mejor conocido del yodo es como constituyente esencial de las hormonas tiroideas o yodotironinas. Las yodotironinas regulan y participan en un sin número de procesos biológicos como son la proliferación, la diferenciación y el metabolismo celulares. Consecuentemente, tanto la deficiencia (hipotiroidismo) como el exceso (hipertiroidismo), de estas hormonas tienen efectos devastadores en los organismos. De entre los efectos especialmente relevantes de las hormonas tiroideas es que son indispensables para el desarrollo del sistema nervioso en el periodo perinatal de todos los vertebrados. Dado que el yodo es un elemento poco abundante su deficiencia representa un grave problema de salud mundial (McDowell, 1992; Houston, 1999). La Organización Mundial de la Salud estima que 1, 572 millones de personas, cerca del 30% de la población mundial, está en riesgo de padecer enfermedades por deficiencia de yodo (IDD) (Houston, 1999). La IDD más importante es el cretinismo endémico, el cual se presenta en el neonato y tiene como consecuencia retardo mental además de deformidades físicas. El problema de la deficiencia de yodo se ha combatido extensamente a



través de la utilización de yoduro ( $I^-$ ) y yodato ( $IO_3^-$ ) para yodar la sal de mesa (McDowell, 1992; Houston, 1999). Otra de las fuentes dietarias importantes de yodo son los alimentos de origen marino entre los que destacan, por su gran capacidad de acumular yodo, las algas de los géneros *Undaria*, *Laminaria* y *Porphyra* (Cann et al., 2000). La concentración de yodo de las algas cafés del género *Laminaria* puede llegar a ser hasta 30, 000 veces más la concentración de este elemento en el agua de mar (Küpper et al., 1998).

El yodo está usualmente presente en la dieta en forma inorgánica ya sea como yoduro ( $I^-$ ) o como yodato ( $IO_3^-$ ). El yodo ingerido es absorbido rápidamente en el estómago, entra en la circulación, es capturado activamente por las células tiroideas y es utilizado para la síntesis de las yodotironinas. La síntesis y secreción de hormonas tiroideas se puede resumir en los siguientes pasos: a) captura activa del yodo en la tiroides a través del NIS, b) yodación de los residuos de tirosina de la tiroglobulina (Tg) por acción tiroperoxidasa (TPO); c) acoplamiento de las yodotirosinas en la Tg para formar T3 y T4; d) proteólisis de la Tg con consecuente liberación de yodotirosinas y yodotironinas, y secreción de las yodotironinas a la sangre; e) desyodación de las yodotirosinas en la tiroides y reutilización del yodo liberado; f) desyodación de las yodotironinas en la glándula tiroideas (Taurog, 2000).

## B. PAPEL DEL YODO EN LA FISIOLOGÍA Y EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA.

El yodo es captado y organificado por la glándula mamaria gestante y lactante (Cho et al., 2000; Strum, 1978; Tazebay et al., 2000). La captura de yodo por la glándula mamaria está mediada principalmente por el NIS y hay evidencia de otra posible vía constituida por la proteína llamada pendrina (Rillema y Hill, 2003; Shennan, 2001; Tazebay et al., 2000). El yodo capturado por la glándula mamaria lactante a través del NIS se une a residuos de tirosina de la proteína caseína por acción de la enzima lactoperoxidasa (LPO) (Cann et al., 1999; Strum, 1978; Tazebay et al., 2000). La LPO al igual que la TPO catalizan la reacción

utilizando  $H_2O_2$  (Cann et al., 1999; Strum, 1978; Taurog, 2000). El yodo que es captado por la glándula mamaria es secretado a la leche, la cual se convierte en la principal fuente de yodo del neonato (Strum, 1978; Tazebay et al., 2000). Otra fuente de yodo que se encuentra en la glándula mamaria lactante además del NIS es la enzima 5'D1. La 5'D1 genera T3 y yodo libre ( $I^+$ ) utilizando como sustrato a la T4. La 5'D1 al igual que el NIS en la glándula mamaria se encuentra principalmente expresada durante la gestación y más aún durante la lactancia (Aceves et al., 1995). Los tumores mamaros humanos también tienen actividad desyodativa, son capaces de capturar yoduro y expresan NIS (Gallardo del O et al., 2000; Cho et al., 2000; Tazebay et al., 2000). *In vitro* también se ha demostrado que líneas celulares de cáncer mamaro como la MCF-7 expresan a la 5'D1, capturan yodo y expresan al NIS y a la pendrina (García-Solís y Aceves, 2003; Kogai et al., 2000; Rillema y Hill, 2003).

Por otra parte, desde hace más de 30 años se ha sospechado que el yodo participa en la fisiología y patología mamaria (Eskin, 1970). Eskin et al. (1975) mostraron que la deficiencia de yodo en ratas hembras producía lesiones atípicas y displásicas en la glándula mamaria. Posteriormente, Eskin et al. (1995) demostró que la hiperplasia mamaria por deficiencia de yodo se reducía con la suplementación de yodo molecular ( $I_2$ ) y se incrementaba con yoduro ( $I^-$ ). Cabe señalar que el  $I_2$  usualmente no está presente en la dieta y no se han descrito vías de captura de esta forma de yodo. El  $I_2$  se ha usado como desinfectante del agua de beber (Sherer et al., 1991).

### C. EFECTOS ANTICANCERÍGENOS DEL YODO EN LA GLÁNDULA MAMARIA.

Uno de los factores exógenos más importantes que ha sido señalado en la etiología del cáncer mamaro es la dieta (Charpentier y Aldaz, 2002; Wynne-Edwards, 2001). Estudios epidemiológicos muestran que las mujeres japonesas tienen un bajo riesgo de padecer esta enfermedad siempre y cuando mantengan una dieta oriental (Cann, et al., 2000). Japón presenta una tasa de mortalidad por cáncer mamaro de 8 casos/100,000 mujeres mientras que en países occidentales

desarrollados como Estados Unidos y el Reino Unido es de 21 casos/100,000 mujeres (Bray et al., 2004). El consumo de las algas marinas *wakame* (*Undaria*), *nori* (*Porphyra*) y *kombu* (*Laminaria*) ha sido señalado como uno de los componentes clave de la dieta oriental que pudiera brindar la protección contra el riesgo de desarrollar cáncer mamario (Cann, et al., 2000). Este tipo de algas tienen un alto contenido de yodo, se estima que el consumo de yodo en Japón alcanza los 5 mg/día mientras que en Estados Unidos y el Reino Unido es solo de 0.2 mg/día (Cann, et al., 2000).

Experimentalmente existe una serie de trabajos en los cuales se muestra que tratamientos a base de solución de Lugol (solución a base de KI y I<sub>2</sub>), solución de Lugol más acetato de medroxi-progesterona o algas marinas ricas en yodo tienen propiedades antineoplásicas (Kato et al., 1994; Funahashi et al., 1996; Funahashi et al., 1999; Funahashi et al., 2001). Funahashi et al. (1996) mostraron que la administración continua por 4 semanas de solución de Lugol y acetato de medroxi-progesterona inhibe el crecimiento de tumores mamarios inducidos con el cancerígeno DMBA. Este efecto de inhibición del crecimiento tumoral mamario permaneció hasta 4 semanas después de retirar los tratamientos de solución de Lugol y acetato de medroxi-progesterona. Cabe señalar que el contenido de yodo en los tumores tuvo un incremento significativo después de 4 semanas de aplicar los tratamientos. Posteriormente, Funahashi et al. (1999) reportaron que la adición de 1 y 5 % de alga marina *wakame*, que tienen alto contenido de yodo, en la dieta también inhibe el crecimiento de tumores mamarios inducidos con DMBA. El consumo de la dieta adicionada con el alga aumentó significativamente los valores de yodo en el suero pero no modificó los valores de la hormona tiroidea T4. Adicionalmente se mostró que en los tumores mamarios de las ratas tratadas con el alga se redujo el índice de proliferación celular evaluado con inmunodetección de BrdU y aumento en el índice apoptótico medido con el método de TUNEL. También se encontró un aumento en el TGF- $\beta$  en las ratas tratadas con el alga marina. El TGF- $\beta$  se ha demostrado que induce apoptosis en células tumorales y que actúa parácrinamente en las células endoteliales e inhibiendo la angiogénesis. Posteriormente en la misma línea de investigación, Funahashi et al. (2001), con el

argumento de que las dosis utilizadas del alga *wakame* eran muy altas decidieron probar extractos del alga marina *mekabu*. El alga marina *mekabu* al igual que la *wakame* también es rica en yodo (5.7 vs 5.9 mg/100 g) pero tiene la ventaja de ser más barata y de más fácil procesamiento (Funahashi et al., 2001). Los extractos del alga *mekabu* se administraron en el agua de bebida por 32 semanas después de aplicado el DMBA. Los resultados obtenidos muestran que los extractos del alga *mekabu* tienen un alto efecto antineoplásico ya que la incidencia tumoral de las ratas que recibieron el alga fue del 20% contra el 100% de la dieta control. Así mismo se observó un retraso significativo en la aparición de los tumores, mientras que para la dieta control el rango de tiempo de aparición fue de 5-12 semanas posteriores al DMBA para las ratas que recibieron el alga fue de de 24-32 semanas. En el mismo trabajo Funahashi et al. (2001) con experimentos *in vitro* mostraron que el tratamiento a base del alga *mekabu* indujo apoptosis en las líneas celulares MCF-7, MDA.MB-231 y T-47D de manera más efectiva que el medicamento antineoplásico 5-fluorouracil. Otros estudios muestran que la adición de 5% en la dieta del alga *Laminaria angustata* retrasa significativamente la aparición de tumores en ratas tratadas con el cancerígeno DMBA (Teas et al., 1984). Adicionalmente, Yamamoto et al. (1987), encontraron que la adición de un 2% a la dieta de las algas *Porphyra tenera*, *Lamaninaria religiosa* y *Laminaria japonica var ochotensis* inhibían la tumorigénesis mamaria en ratas tratadas con DMBA. El grupo control tuvo un 69% de incidencia tumoral mientras que las ratas tratadas con las algas tuvieron incidencias de 35% para la *P. tenera*, 35% para la *L. religiosa* y de 50% para *L. Japonica var ochotensis*. Si bien es cierto que el conjunto de datos obtenidos a partir de los experimentos con algas marinas no permiten señalar al yodo como el único componente con actividad antineoplásica, los trabajos de Kato et al. (1994) y Funahashi et al. (1996) con yodo inorgánico (KI y I<sub>2</sub>) si lo sugieren como un fuerte candidato. Otros componentes de las algas a los que se les ha identificado actividad antineoplásica en otros tipos de tumores son el ester sulfato y un polisacárido sulfatado llamado fucoidan (Teas et al., 1984; Yamamoto et al., 1987).

#### D. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL YODO.

Venturi et al., (2000) y Smyth (2003) proponen que el yodo, en todas las células que son capaces de concentrarlo, tiene una acción antioxidante. El  $I^-$  en presencia de  $H_2O_2$  y peroxidasas actúa como un donador de electrones, ya que al ser oxidado por la acción de la peroxidasa se pueden yodar residuos de tirosina, histidina o lípidos específicos y como consecuencia neutraliza su propio poder oxidante. Además se conoce que el KI es un “quelante” específico del  $OH^-$  (Asada, 1976 citado en Murata et al., 1986). Estudios *in vitro* que miden el status total antioxidativo utilizando suero de donadores sanos muestran que la adición de NaI (15  $\mu M$ ) es tan efectiva como la adición de ácido ascórbico (50  $\mu M$ ) para prevenir el efecto oxidativo de la adición de  $H_2O_2$  a las muestras de suero (Winkler et al, 2000). Esto sugiere que el  $I^-$  puede estar actuando directamente neutralizando al  $OH^-$  o indirectamente al interactuar con las peroxidasas presentes en el suero. Adicionalmente, respecto del mecanismo antioxidante del yodo se conoce que la deficiencia de yodo aumenta la lipoperoxidación en tiroides (Smyth, 2003), más aun Katamine et al. (1985) describieron que ratas con un consumo crónico (19 meses) de una dieta rica yodo tienen una disminución en la lipoperoxidación basal de lípidos en el cerebro.

Por otra parte en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que el exceso de  $I^-$  induce apoptosis en el tirocito (Mutaku et al., 2002; Vitale et al., 2000). Este efecto parece ser dependiente de la acción de la tiroperoxidasa y por lo tanto se propone que compuestos yodados como lípidos específicos pueden estar mediando este fenómeno (Mutaku et al., 2002; Pisarev y Gärtner, 2000; Vitale et al., 1999). Se han descritos varios lípidos yodados en la tiroides como son la  $\delta$ -yodolactona (6-yodo 8, 11, 14-eicosatrienoico- $\delta$ -lactona) la cual se ha descrito que inhibe la proliferación celular, la captura de yodo y la producción de  $H_2O_2$  (Pisarev y Gärtner, 2000). Además, la administración de radioyodo en las formas de  $I^-$  y  $I_2$  reveló que la forma molecular se distribuye de manera diferente en varios componentes de la sangre. La albúmina y los lípidos sanguíneos presentaron mayor cantidad de  $I_2$  que de  $I^-$ , sugiriendo procesos de halogenación (Thrall et al.,

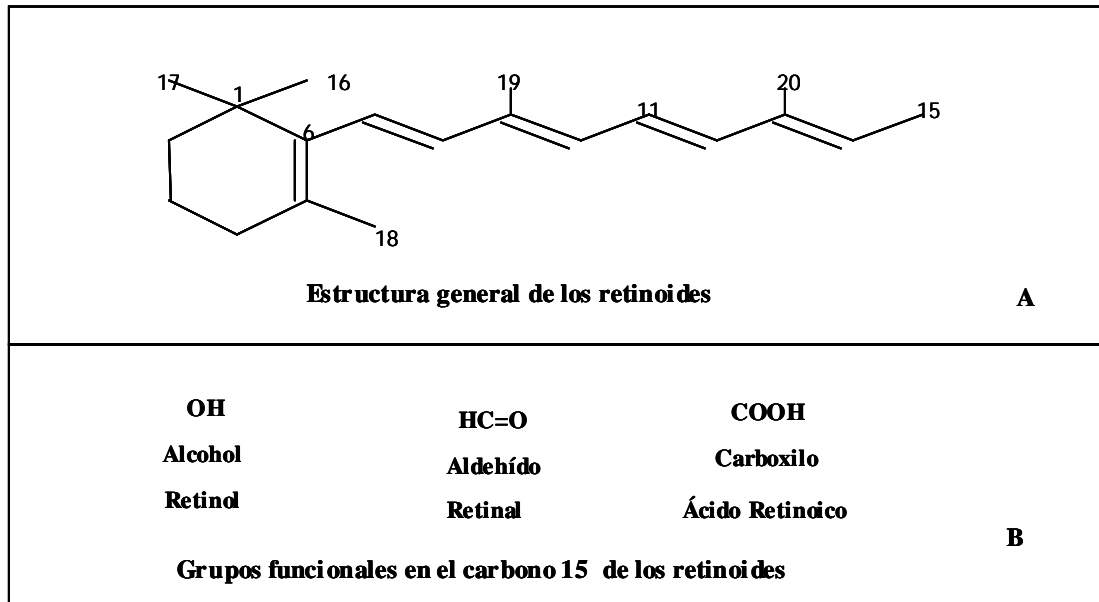
1992). Esto sugiere que dado que el  $I_2$  representa un estado más oxidado que el  $I^-$ , esta molécula podría actuar independiente de la acción de una peroxidasa para producir los efectos descritos para el  $I^-$  como son la inducción de la apoptosis y la inhibición de la proliferación.

## **V. EL ÁCIDO RETINOICO Y LA GLÁNDULA MAMARIA NORMAL Y NEOPLÁSICA.**

### **A. GENERALIDADES.**

Los retinoides están formados por un anillo  $\beta$ -ionona (ciclohexinilo) conjugado a una cadena de unidades isopreno que tiene un grupo funcional de naturaleza variable (alcohol, aldehído, ácido orgánico) en el carbono 15 de la cadena (ver Figura 10) (Blaner, 1993). Los retinoides fisiológicamente más relevantes en los mamíferos son el retinol (Vitamina A), el retinal y el ácido retinoico, estos dos últimos con actividad biológica bien caracterizada (Blaner, 1993). El retinal es producto de la oxidación enzimática del retinol y participa en el ciclo de la visión como cromóforo del pigmento visual rodopsina y no se le conoce otra actividad biológica (Blaner, 1993; Duester, 2000). Por su parte el ácido retinoico es producto de la oxidación enzimática del retinal (Duester, 2000). El ácido retinoico participa en múltiples procesos celulares como son el desarrollo, crecimiento, proliferación y diferenciación celulares (Yang et al., 1999). El ácido retinoico ejerce la mayoría de sus efectos fisiológicos a través de sus receptores, los cuales pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares (Mangelsdorf et al., 1995). Esta superfamilia de receptores nucleares está formada por factores de transcripción dependientes de ligando y a la cual también pertenecen los receptores a vitamina D, hormonas tiroideas y hormonas esteroides (Mangelsdorf et al., 1995). En lo que respecta a los receptores a ácido retinoico se han descrito dos subfamilias de receptores nucleares, los RAR y los RXR (Chambon, 1996). Cada una de estas subfamilias consiste de tres subtipos ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). La subfamilia RAR se activa por los isómeros del ácido retinoico, *todo-trans*, *9-cis* y *13-cis*,

mientras que la familia RXR se activan exclusivamente por el 9-*cis* (Chambon, 1996).



**Figura 10. Estructura de los retinoides y sus precursores.** A) Estructura general de los retinoides. Se ilustra el anillo  $\beta$ -ionona conjugado a la cadena de unidades isopreno y como se numeran sus átomos de carbono. B) Principales grupos funcionales presentes en los retinoides, los cuales se encuentran en el carbono 15 de la molécula y le dan el nombre al retinoide respectivo.

## B. PAPEL DEL ÁCIDO RETINOICO EN EL EPITELIO MAMARIO NORMAL Y SU CARCINOGENÉISIS.

El epitelio de la glándula mamaria es capaz de captar el retinol y sintetizar localmente al ácido retinoico (Hayden et al., 2001; Mirna-Y-López et al., 2000). Estudios con cultivos primarios mostraron varios efectos de los retinoides sobre el epitelio mamario, los cuales fueron: a) participan en la diferenciación del tejido alveolar; b) favorecen la síntesis de caseína; c) disminuyen la proliferación e inducen la apoptosis de algunas células alveolares y d) suprimen la aparición de fenotipos anormales (Lee et a., 1995a y 1995b). En lo que respecta a la glándula mamaria neoplásica se destaca lo siguiente, Sporn et al. (1976) a través de una serie de estudios con retinoides acuñó el término de la quimioprevención del

cáncer. Este término se define como la prevención de cáncer en la población humana por la ingestión de agentes químicos que previenen la carcinogénesis. Estos agentes pueden prevenir la iniciación de la transformación o retrasar el progreso de las células premalignas. Para realizar este papel preventivo, el agente quimiopreventivo debe aumentar los procesos fisiológicos que protegen a un organismo contra el crecimiento de células anormales con potencial para desarrollar un cáncer invasor. Dado que los retinoides participan en el mantenimiento y regulación de la diferenciación celular, y el cáncer es un proceso en el que ocurre la pérdida de la diferenciación, los retinoides han sido considerados como potenciales agentes de quimioprevención del cáncer (Moon y Constantinou, 1997).

El efecto antitumoral del ácido retinoico de sus diferentes isómeros, así como de una gran diversidad de retinoides sintéticos, ha sido objeto de diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* (Lotan, 1996). En las células de cáncer mamario los retinoides inhiben la proliferación celular por varios mecanismos, ya sea reduciendo la expresión o actividad de estimulantes del crecimiento o por incremento en la expresión o actividad de inhibidores del crecimiento. Alternativamente los retinoides pueden inducir diferenciación celular y apoptosis (Yang et al., 1999). El ácido retinoico inhibe la señalización del factor de transcripción AP-1. Los factores transcripción AP-1 están compuestos de heterodímeros de las proto-oncoproteínas Jun y Fos o de homodímeros de Jun (Pfahl y Chytil, 1996). Estos complejos son activados en las células mamarias por factores que estimulan el crecimiento celular como son los estrógenos, el EGF, el TGF $\alpha$  y los IGFs, transduciendo señales mitogénicas en éstas células. El ácido retinoico también induce la expresión de inhibidores del crecimiento como el TGF $\beta$  y el IGFBP-3 y el propio receptor  $\beta$  del ácido retinoico (RAR $\beta$ ) (Yang et al., 1999). Por otra parte se ha demostrado en estudios *in vitro* que el todo-*trans* ácido retinoico induce apoptosis. El mecanismo por el que el ácido retinoico induce apoptosis no se conoce totalmente pero se sabe que en algunos tipos celulares regula a la baja a la proteína Bcl-2 la cual impide la apoptosis. El todo-*trans* ácido retinoico induce la expresión de las citoqueratinas 8 y 18, marcadores de la



diferenciación del epitelio de los conductos, en las células tumorales T47D (Yang et al., 1999).

A pesar de lo anterior y dada la toxicidad del ácido retinoico su capacidad anti-tumoral con modelos de inducción química de cáncer mamario se ha estudiado poco (Moon y Constantinou, 1997; Formelli et al., 1996). En su lugar han sido estudiados retinoides sintéticos, a la fecha se han sintetizado más de 1000 de estos compuestos. Dos de los retinoides sintéticos más utilizados y efectivos para prevenir la carcinogénesis mamaria han sido la *trans*-N-(4-hidroxifenil) retinamida (4HPR; fenretinida) y el acetato de retinal. Estos retinoides sintéticos tienen poca afinidad por las dos subfamilias de receptores al ácido retinoico, RAR y RXR, por lo que sus efectos no se explican por esta vía (Moon y Constantinou, 1997; Formelli et al., 1996). En la literatura que se revisó y localizada hasta ahora los isómeros *trans* y *9-cis* del ácido retinoico siempre se aplicaron posterior a la administración del MNU y siempre fueron aplicados crónicamente (más de dos semanas) (Anzano et al., 1994; Okamoto et al., 1995; Teelmann et al., 1993; Teplitzky et al., 2001). Por otra parte el *trans* ácido retinoico siempre fue menos efectivo que los otros retinoides o tratamientos utilizados. Por su parte el *9-cis* ácido retinoico parece ser el más efectivo de los retinoides naturales (Anzano et al., 1994; Teplitzky et al., 2001).

Otro de los aspectos poco estudiado de los retinoides, es que comparten una gran cantidad de efectos con las hormonas tiroideas debido en parte a que sus receptores nucleares forman heterodímeros. Además recientemente se ha demostrado que el ácido retinoico es capaz de regular la expresión del NIS y de la 5'D1, lo cual lo coloca como un regulador primordial en los efectos tiroideos y/o del yodo tanto en células normales como tumorales.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Todo lo anterior indica que el yodo es un componente celular esencial para mantener la fisiología normal de la glándula mamaria. Datos sólidos de otros laboratorios y del nuestro muestran que las diferentes formas químicas del yodo tienen efectos diferenciales siendo más efectivo el  $I_2$  que el KI en la desaparición de fibrosis benignas, e inhibición del crecimiento de tumores mamarios inducidos químicamente. Sin embargo, no existen estudios que analicen en que periodo de la carcinogénesis está actuando el  $I_2$ , ni tampoco que mecanismos moleculares intervienen en su efecto inhibidor.

## **HIPÓTESIS.**

Por todo lo anterior se postula que (1) la suplementación dietética con yodo tendrá efecto protector sobre la inducción de cáncer mamario en ratas hembras tratadas con MNU, (2) sus mecanismos moleculares involucrarán procesos antiproliferativos y pro-apoptóticos y (3) que la administración conjunta con ácido retinoico, compuesto activo derivado del retinol (Vitamina A), potenciará su efecto protector.

## **OBJETIVOS.**

- Evaluar si la facilitación en la captación de yodo por el ácido retinoico durante la pubertad genera un efecto protector duradero (incidir en la iniciación) sobre la inducción de cáncer mamario en ratas hembras tratadas con el MNU.
- Analizar si el efecto anticancerígeno de los tratamientos de yodo y AR involucran cambios en los componentes de captación y/o generación local de yodo.
- Analizar si los tratamientos de yodo y ácido retinoico afectan procesos de proliferación y/o apoptosis tumoral.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **A. ANIMALES.**

Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley de cuatro semanas de edad obtenidas del bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Las ratas se dividieron en grupos de 4 a 6 animales por jaula en un ambiente controlado ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 12 h de luz, 12 h de oscuridad), con alimento Purina rat chow (ST Louis, MO) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos realizados en los animales de experimentación se hicieron siguiendo las disposiciones y los principios éticos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Recursos Naturales y Pesca, 2001).

### **B. INDUCCIÓN DE LA CARCINOGENESIS MAMARIA.**

A las siete semanas de edad, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina y xilacina (Cheminova de México; México) a una dosis de 30 mg de ketamina y 6 mg de xilacina por Kg de peso corporal. Posteriormente se les aplicó el MNU (Sigma, St. Louis, MO) i.p. en una dosis de 50 mg/Kg de peso corporal. El MNU se disolvió en 0.9% de NaCl, pH 5, y se calentó para disolverlo a  $50-60^\circ\text{C}$  de acuerdo a lo descrito por Thompson (2000). A los grupos de animales que se utilizaron como controles sin MNU se les aplicó i.p. solución de NaCl al 0.9% (vehículo).

### **C. EVALUACIÓN DE LA TUMORIGÉNESIS MAMARIA.**

La evaluación de la tumorigénesis mamaria se llevó a cabo a través de la obtención de tres parámetros que son: la incidencia tumoral, la latencia tumoral, y la media del número de tumores/rata en cada uno de los tratamientos. Adicionalmente también se midió el tamaño final de los tumores. Un mes después de que se aplicó el MNU se inició la palpación de las ratas en la búsqueda de

tumores mamarios. La palpación se realizó una vez por semana durante 4 ó 6 meses según el experimento. También se llevó un registro semanal del peso corporal de los animales desde la entrega y hasta el final del experimento. Un tumor se definió como una protuberancia palpable en la glándula mamaria al menos por dos semanas consecutivas (Teelmann et al., 1993). La incidencia tumoral se calculó como el porcentaje de animales con uno o más tumores por tratamiento. La latencia tumoral se definió como la media del número de semanas posteriores al MNU que tardó en aparecer el primer tumor en cada rata. Cabe señalar que en lo que respecta a la media del número de tumores/rata se obtuvo incluyendo solo a los animales que desarrollaron tumores por tratamiento. Cuando los tumores alcanzaron un diámetro de 1.5 a 2 cm, las ratas fueron sometidas a una cirugía para remover los tumores. Antes de la cirugía los animales fueron anestesiados con la mezcla de ketamina y xilacina que se indicó previamente. Ningún animal fue sometido a más de dos procedimientos quirúrgicos y si antes de cumplir los 4 ó 6 meses de duración del experimento las ratas desarrollaban más de 3 tumores el animal se sacrificaba cuando los tumores alcanzaban un diámetro de de 1.5 a 2 cm. La medición del tumor se llevó a cabo utilizando un Vernier con el que se midieron los dos diámetros mayores de cada tumor y se calculó el volumen utilizando la fórmula de la elipsoide  $((a \times b^2)/2)$ , donde  $a$  es igual al diámetro más largo y  $b$  al más corto (Teelmann et al., 1993). Cumplido el tiempo de duración del experimento los animales se sacrificaban por decapitación y se recolectó la sangre para obtener el suero. El suero obtenido se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Los tejidos (hígado o glándula mamaria normal y tumoral) obtenidos quirúrgicamente o por haber sacrificado a los animales se fijaban en 10% de formalina neutra amortiguada (Sigma, St. Louis, MO) o se congelaban inmediatamente en hielo seco y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Los tejidos fijados se utilizaron para los análisis histológicos y los congelados para los análisis bioquímicos y moleculares.

#### D. NIVELES CIRCULANTES DE T3.

Los niveles séricos de T3 se determinaron por medio de un radioinmunoanálisis homólogo previamente estandarizado en el laboratorio con coeficientes intra e interensayo de 9 y 12% respectivamente (Valverde-R y Aceves, 1989).

#### E. TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

Los mRNAs de la 5'D1, NIS, PEN, LPO, p53 y caspasa-3 se identificaron usando el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semi-cuantitativo en el que se usó un amplicon de la proteína estructural de ciclofilina (Cyc) como control de carga. En la reacción de transcripción reversa (RT) se usaron 2 µg de RNA total y como cebadores oligo(dT) y el oligonucleótido antisentido para NIS, Nis-antisentido (ver Tabla 7). El Nis-antisentido se utilizó en el RT para favorecer la amplificación del mRNA del NIS que se expresa muy pobremente en la glándula mamaria durante la pubertad. La reacción de PCR se llevó a cabo usando de 1 a 4 µL de la mezcla del RT. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos de los diferentes mRNAs se muestran en la Tabla 7. Cada ciclo de PCR consistió de un primer paso de desnaturalización del DNA a 95°C por 45 s, un paso de alineación a -- 55°C para Cyc, 5'D1, NIS y caspasa-3, de 58°C para PEN y de 60°C para p53, de 61°C para LPO -- por 45 s, y un paso de elongación a 72°C por 45 s. El tamaño resultante de los fragmentos amplificados para cada uno de los mRNAs fue de 521 pb para Cyc, 377 pb para NIS, 297 pb para LPO, 487 pb para PEN y 250 pb para 5'D1, de 291 pb para p53 y 201 pb para caspasa-3. Los productos de PCR se sometieron a una electroforesis corriéndose en un gel de agarosa al 2% y visualizados con bromuro de etidio. Los tamaños de las bandas fueron confirmados con marcadores de peso molecular de DNA de 1 Kb. Después se tomó una fotografía del gel la cual fue digitalizada y las bandas fueron analizadas por densitometría.

Tabla 7. Secuencias de oligonucleótidos iniciadores para RT-PCR.

mRNA	No. de acceso del GenBank	Sentido / Antisentido (5' →3')
Cyc, del nt 7 al 526	M19533	AGA CGC CGC TGT CTC TTT TCG / CCA CAC AGT CGG AGA TGG TGA TC
5'D1, del nt 377 al 627	X57999	GCA CCT GAC CTT CAT TTC TT / CTG GCT GCT CTG GTT CTG
NIS, del nt 790 al 809	U60282	CCG GAT CAA CCT GAT GGA CT / CCT GAG GGT GCC ACT GTA AG
PEN, del nt 1491 al 1978	AF167412	CAT TCT GGG GCT GGA CCT C / CCT TCG GGA CAT TCA CTT TCA
LPO, del nt 1042 al 1339	XM_220831	AAA GCC CAG TGT GAC GAG CA / GCC GTC CAT GGT CTG AGA CT
P53, del nt 287 al 578	X13058	CTG GCC TCT GTC ATC TTC CG / CCG TCA CCA TCA GAG CAA CG
Caspasa-3, nt 627 a 828	NM_012922	GCC GAC TTC CTG TAT GCT TA / CAC GGG ATC TGT TTC TTT GC

Cyc: ciclofilina; 5'D1: 5'-desyodasa tipo I; NIS: simporter de sodio/yoduro; PEN: pendrina; LPO: lactoperoxidasa.

## F. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.

Las glándulas mamarias abdominales así como los tumores mamarios inducidos con MNU se fijaron en 10% de formalina neutra. Los tejidos se embebieron en parafina y se hicieron cortes de 5 µm. Dichos cortes se montaron en laminillas tratadas con 3-amino-propil-trietoxi-silano (Sigma, St. Louis, MO). Cada corte se desparafino en xileno y se hidrató en diluciones de etanol con concentraciones descendientes y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HyE). Los cortes de glándula mamaria así como de los tumores fueron valorados histopatológicamente con la ayuda de la Dra. Teresa Andrea Vela Chávez, patóloga adscrita a la Dirección de Patología del Instituto Nacional de Cancerología (Secretaría de Salud, México), y de la Dra. Myrna Doris Arecillas Zamora, médico residente de patología oncológica en el mismo Instituto. Los tumores y las lesiones preneoplásicas se clasificaron de acuerdo a los criterios establecidos por Russo et al (1990) y Russo y Russo (2000).

## G. INMUNOHISTOQUÍMICA DE PCNA.

Para determinar el efecto del tratamiento de I<sub>2</sub> sobre la glándula mamaria normal y neoplásica se realizó la detección del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) por medio de inmunohistoquímica. Cortes de 5 µm de glándula mamaria normal y de tumores mamarios inducidos con MNU después de desparafinarse, se rehidrataron y se sometieron a un tratamiento de desenmascaramiento antigénico utilizando una solución 10 mM de citrato de sodio a baño María durante 30 minutos. Después de que se enfriaron las laminillas se inhibió la actividad de peroxidasa endógena con una solución al 0.3% de peróxido de hidrógeno. La unión inespecífica se bloqueó con 2% de leche en polvo libre de grasa disuelta en PBS con 20% de suero fetal bovino (1 h a 37°C). Posteriormente, los cortes se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos en una cámara húmeda con el anticuerpo monoclonal anti-PCNA de rata, clona PC10 (DakoCytomation, Carpinteria, CA), diluído 1:150. Los complejos inmunorreactivos se visualizaron con anti-inmunoglobulina de ratón marcado con peroxidasa de rábano (EnVision<sup>tm</sup>+System, peroxidase, DakoCytomation, Carpinteria, CA). La diaminobenzidina se usó como cromógeno para generar un precipitado color café debido a la reacción de la peroxidasa. Los células se contratiñeron con hematoxilina. Las células que expresaron el antígeno fueron identificadas por una tinción café en el núcleo utilizando un microscopio de luz. También se utilizaron cortes de tejidos que fueron incubados con o sin anticuerpos primarios y secundarios para probar la especificidad de los anticuerpos. Para cuantificar las células epiteliales positivas se realizó un recuento de las células positivas en un total de 500 células.

## H. MÉTODO DE TUNEL.

La apoptosis se determinó en cortes de tejidos embebidos en parafina usando el método de TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, fluoserosein, POD; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). Los cortes de 5 µm se

trataron de acuerdo a las instrucciones de manufactura. Las células positivas fueron visualizadas con diaminobenzidina y contrateñidas con hematoxilina. El resultado se expresó en porcentaje de células positivas.

Para la estandarización del método se utilizó como control positivo una rata que tenía dos tumores mamarios inducidos con MNU, uno en cada glándula mamaria axilar. La rata recibió 12 mg/Kg de peso corporal de docetaxel (Taxotere, Aventis, México) y 4 mg/Kg de peso corporal de doxorubicina (Doxotec, Laboratorios Columbia, México), ambos fármacos se aplicaron en una sola ocasión via intraperitoneal. La dosis aplicada se determinó en función de lo reportado en la literatura (Song et al., 2001). Tanto el docetaxel como la doxorubicina son fármacos utilizados en la quimioterapia del cáncer mamario humano que se conoce inducen apoptosis en las células tumorales (Gligorov y Lotz, 2004). Después de 3 días de aplicada la combinación docetaxel y doxorubicina la rata presentó una pérdida del 15% del peso corporal y los tumores redujeron su tamaño en un 60% en promedio.

#### I. ACTIVIDAD DE LA CASPASA-3.

La actividad de la caspasa-3 se determinó utilizando el método colorimétrico estandarizado de Sigma (St. Louis, MO) con las modificaciones realizadas por Stark et al. (2003) y Abd et al. (2005). Brevemente, los tumores mamarios fueron homogeneizados en el amortiguador de lisis en una proporción de 150  $\mu$ L de amortiguador por 100 mg de tejido. Los homogenizados se centrifugaron a 16,000 g por 20 min y se colectó el sobrenadante. Para realizar el ensayo se utilizaron 100  $\mu$ g de proteína y como sustrato de la caspasa-3 al DEVD-pNa. El DEVD-pNa está compuesto del cromóforo *p*-nitroanilida (pNa) y el tatrapéptido sintético DEVD (Asp-Glu-Val-Asp). La caspasa-3 corta específicamente en el carboxilo terminal del aspartato del DEVD liberando el pNa el cual produce una coloración amarilla que se monitorea espectrofotométricamente a 405 nm. La cantidad de color amarillo producida es proporcional a la actividad de caspasa-3 presente en el tejido. Las muestras se incubaron a 37°C en movimiento constante y protegidas de



la luz en placas de 96 pozos y se leyeron a 405 nm en un lector de ELISA. La concentración de proteína se determinó con el método de Bradford (BioRad protein assay, Blo-RAd, Richmond, CA). Los resultados se expresaron en unidades de nanomoles de pNa liberado/ h/ mg de proteína.

#### J. DETERMINACIÓN DE RETINOIDES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPEÑO (HPLC).

La extracción de los retinoides del hígado se realizó de acuerdo al procedimiento reportado por Mora et al. (2000). Se pesaron 500 mg de hígado de rata y se homogeneizaron con 1.5 g de sulfato de sodio (Sigma) y 50 mg de ácido ascórbico, posteriormente el tejido se hidrolizó con 1.5 mL de 20% KOH en metanol 12 h a temperatura ambiente y en la oscuridad. Los retinoides se extrajeron 3 veces con 3 mL de hexano. El sobrenadante se colectó en un solo vial ámbar y se evaporó con N<sub>2</sub>. El residuo se almacenó a -70°C y antes del análisis de HPLC se reconstituyó en 200 µL de una solución de hexano, isopropanol y ácido acético en una proporción de 1000: 4.3:0.675 (solución A). Finalmente, se inyectaron 50 µL de cada muestra por duplicado al sistema de HPLC. El sistema de HPLC utilizado contaba con un detector ultravioleta (350 nm) y una columna de absorción de sílica gel (Hypersil® Silica 5 µm, 25 x 5.6 mm) a través de la cual se hizo pasar, a un flujo de 1.0 mL/min, una fase móvil compuesta de la solución A y una solución B compuesta de hexano, isopropanol y ácido acético en una proporción 1000:17.5:0.675. La curva estándar se construyó a concentraciones crecientes de retinol y ácido retinoico (1.0 nM-10 mM). Se hizo un análisis de área bajo la curva y los resultados se expresaron como nmol del retinoide/g de tejido (Miyagi et al., 2001).

## K. EXPERIMENTOS.

### 1. Efecto de los tratamientos agudos a base de yodo sobre la tumorigénesis mamaria.

A la quinta semana de edad las ratas se dividieron en 3 grupos que recibieron los siguientes tratamientos: a) control, b) 0.05 % de KI en el agua de bebida (KI) y c) 0.05 % de I<sub>2</sub> en el agua de bebida (I<sub>2</sub>). El agua de bebida y el agua utilizada para hacer las soluciones de I<sub>2</sub> y KI siempre fue destilada. La solución de I<sub>2</sub> se elaboró considerando la solubilidad de yodo ( $1.33 \times 10^{-3}$  M) y la concentración fue corroborada a través de una titulación con tiosulfato de sodio (Kenkel, 1994). Después de 2 semanas a un subgrupo de ratas de cada uno de los tratamientos se le aplicó el MNU o solución salina (vehículo). Una semana después de aplicado el MNU los tratamientos se descontinuaron y un grupo de 4 ó 5 ratas por cada tratamiento se sacrificaron por decapitación y se recolectó el tejido mamario. Las ratas restantes se utilizaron para evaluar la tumorigénesis mamaria. Después de 16 semanas los animales se sacrificaron y se colectó el tejido mamario normal y neoplásico. En la Figura 11 se muestra un esquema del diseño experimental.

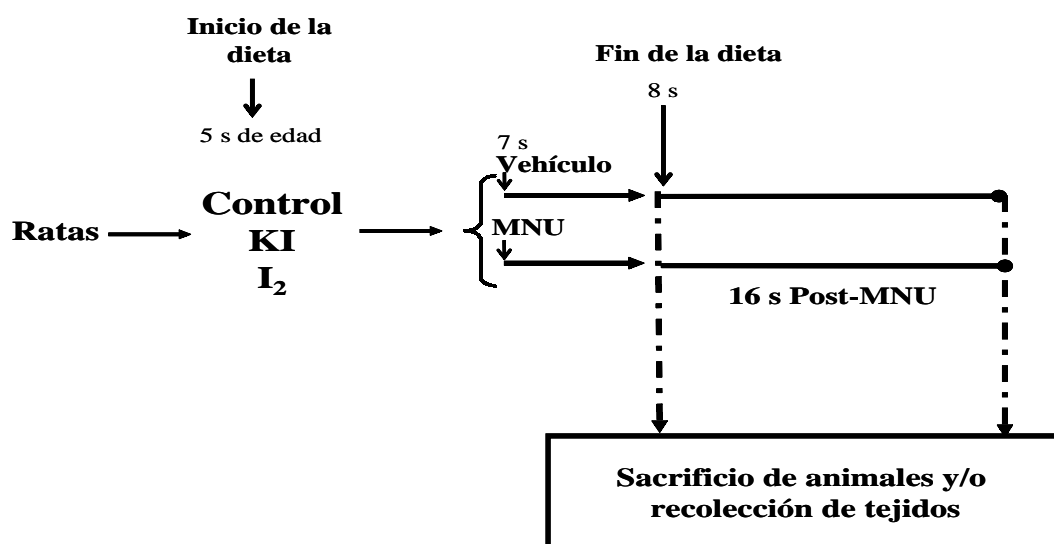


Figura 11. Diseño Experimental: Efecto agudo de tratamientos a base de yodo en la carcinogénesis mamaria inducida en ratas con MNU.

## 2. Efecto de los tratamientos crónicos de KI, I<sub>2</sub> y T4 sobre la tumorigénesis mamaria.

Ratas de cinco semanas de edad se dividieron en 4 grupos que recibieron los siguientes tratamientos en el agua de bebida: a) control, b) 0.05 % de KI (KI), c) 0.05 % de I<sub>2</sub> (I<sub>2</sub>) y d) 3 µg/mL de tiroxina (T4). A las siete semanas de edad se aplicó el MNU o solución salina. Los tratamientos continuaron hasta por 26 semanas después de aplicado el carcinógeno. A las 16 semanas de aplicado el MNU, 5 ratas de cada uno de los grupos experimentales fue sacrificado por decapitación y la sangre se colectó para medir los niveles de triyodotironina (T3) en el suero. El tejido mamario normal y neoplásico se obtuvo y se procesó como se indicó anteriormente.

## 3. Efecto de los tratamientos agudos y crónicos de retinoides con yodo sobre la tumorigénesis mamaria.

### a. Tratamientos agudos.

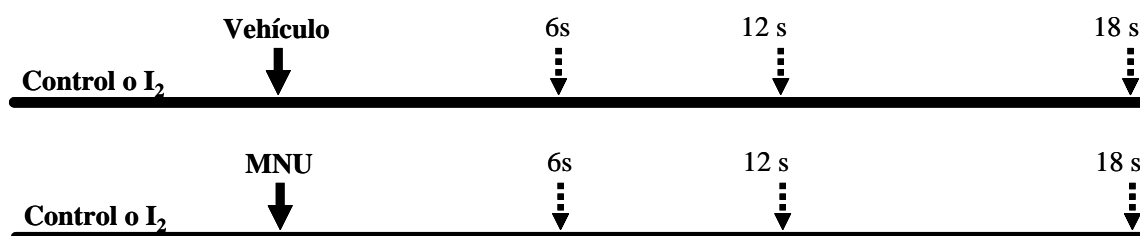
A la quinta semana de edad las ratas se dividieron en 5 grupos que recibieron los siguientes tratamientos: a) control (dieta global para roedor 16 % de proteína, Harlan Teklan; Madison, WI); b) dieta control enriquecida con 0.005% de todo-*trans* ácido retinoico (Harlan Teklan; Madison, WI); c) dieta control enriquecida con 0.005% de todo-*trans* ácido retinoico y 0.05 % de KI en el agua de bebida (AR-KI), d) dieta enriquecida con 0.005% de todo-*trans* ácido retinoico y 0.05 % de I<sub>2</sub> en el agua de bebida (AR-I<sub>2</sub>). Después de 2 semanas a un subgrupo de ratas de cada uno de los tratamientos se le aplicó el MNU o solución salina. Una semana después de aplicado el MNU los tratamientos se descontinuaron y un subgrupo de 4 ó 5 ratas por cada tratamiento se sacrificaron por decapitación. El tejido mamario se congeló inmediatamente en hielo seco y se almacenó a -70°C para la extracción de RNA. Las ratas restantes se utilizaron para evaluar la tumorigénesis mamaria. Después de 16 semanas los animales se sacrificaron y los tejidos se colectaron como ya fue descrito.

b. Tratamientos crónicos.

Ratas de 5 semanas de edad se dividieron en 3 grupos que recibieron por 16 semanas los siguientes tratamientos: a) control (Purina rat chow, ST Louis, MO); b) dieta control y 1000 UI de palmitato de retinol (Aventis Pharma, México) por vía oral una vez por semana durante 4 meses (Retinol) c) Tratamiento de Retinol más 0.05% de I<sub>2</sub> en el agua de bebida (Retinol-I<sub>2</sub>). A las siete semanas de edad se aplicó el MNU o solución salina y se evaluó la tumorigénesis mamaria.

4. Efecto del tratamiento crónico de I<sub>2</sub> sobre la proliferación y muerte celular en el tejido mamario normal y neoplásico.

A ratas de 5 semanas de edad se les agrupó aleatoriamente en uno de los siguientes tratamientos, a) control y b) I<sub>2</sub> (0.05% en el agua de bebida). A las 6 semanas de edad a un subgrupo de ratas de cada uno de los tratamientos se les aplicó una sola dosis de MNU (50 mg/Kg de peso, i.p.). A las 6, 12 y 18 semanas después de aplicado el MNU un grupo de 4 a 6 ratas de cada uno de los tratamientos se sacrificaron y se obtuvo el tejido mamario no tumoral y se fijó en formalina para el análisis de la presencia de lesiones preneoplásicas, la proliferación celular y la apoptosis. En la Figura 12 se muestra un esquema del diseño experimental.



**Figura 12. Diseño de experimental: Curso temporal del desarrollo de lesiones preneoplásicas.** Ratas hembras de 5 semanas de edad recibieron los siguientes tratamientos, a) control (C) y b) I<sub>2</sub> (0.05% en el agua de bebida). Una semana después se les aplicó 50 mg de MNU/Kg de peso, i.p. (Flechas sólidas). Las flechas punteadas indican las semanas post-MNU en las que se sacrificaron los animales para la recolección de tejidos.

## L. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

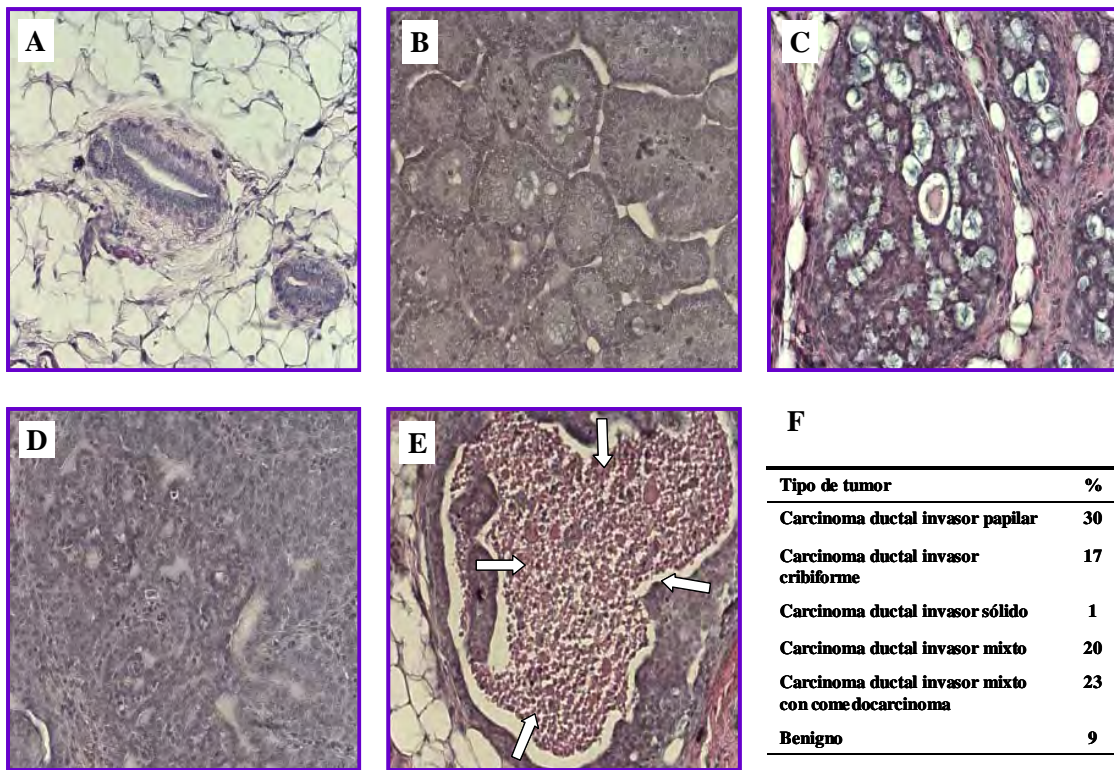
Los resultados del RT-PCR, el HPLC, número de tumores por rata, tamaño de los tumores y latencia de aparición de los tumores por rata se analizaron con el método de análisis de varianza (ANOVA) para grupos independientes y la prueba *post hoc* de diferencia honestamente significativa de Tukey (HSD-Tukey). Los resultados de incidencia tumoral se analizaron con la prueba de  $\chi^2$ . Para los resultados de la inmunohistoquímica de PCNA, TUNEL y actividad de la caspasa-3 se utilizó la prueba t de Student no pareada de una vía.

## **RESULTADOS.**

### **A. ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y REGISTRO DEL PESO.**

El análisis histológico de los tumores mamarios inducidos con MNU en todos los experimentos mostró la presencia de diferentes tipos y patrones histológicos de carcinomas como son el papilar, el sólido, el cribiforme y el comedo o con combinaciones de los diferentes tipos (carcinomas mixtos). El análisis histológico también reveló la presencia de tumores benignos tanto epiteliales como del estroma. No se encontró ninguna correlación entre el tipo de tumor y los diferentes tratamientos utilizados. La Figura 13 muestra cortes representativos de glándula mamaria normal y de los diferentes tipos histológicos de carcinoma. Adicionalmente, la Figura 13 contiene una tabla que muestra el porcentaje de aparición de los diferentes tipos de tumores encontrados.

Por otra parte, se ha establecido claramente que una reducción del aporte energético o una reducción en la ganancia de peso inhiben la formación de tumores mamarios en modelos animales (Kritchevsky et al., 1997). Por lo tanto, se debe estar seguro que los compuestos de aparente actividad antineoplásica no deben su efecto a una inhibición del consumo energético o a la reducción de la ganancia de peso durante el desarrollo. Por tal motivo se llevó un registro semanal del peso de las ratas de todos los grupos experimentales. No se observaron diferencias en la ganancia de peso por lo que el factor de falta de ganancia de peso en la inducción de cáncer no está presente en este estudio (datos no mostrados). Además cabe señalar que ningún animal que recibió solución salina en lugar de MNU desarrolló tumores.



**Figura 13. Clasificación histológica de los tumores mamarios inducidos con MNU.** (A-E) Micrografías de cortes de glándula mamaria normal y neoplásica teñidos con HyE, 20x. A) Glándula mamaria normal de rata virgen de 4 meses de edad, B) Carcinoma ductal invasor papilar, C) Carcinoma invasor cribiforme; D) Carcinoma invasor sólido E) Comedocarcinoma, las flechas indican la extensa zona de necrosis característico de este tipo de tumor mamario. F) Tabla de clasificación de los tumores mamarios inducidos con MNU, se muestra el porcentaje de aparición de cada tipo tumoral. Los tumores mixtos son aquellos que presentan 2 o más patrones histológicos de los carcinomas de tipo papilar, cribiforme y sólido. Aquellos tumores mixtos que presentan zonas de comedocarcinoma se clasificaron en un subgrupo diferente. Todos los carcinomas son de los conductos. Los tumores benignos pueden ser tanto del epitelio como del estroma.

## B. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS AGUDOS DE YODO SOBRE LA TUMORIGÉNESIS MAMARIA INDUCIDA CON MNU.

En este experimento se estudió si los tratamientos agudos de I<sub>2</sub> y KI podrían actuar en el paso de iniciación de la formación de tumores mamarios inducidos con MNU. Los tratamientos a base de yodo se administraron 2 semanas antes de aplicar el MNU y se continuaron aplicando una semana más después. La Tabla 8 muestra un resumen de la tumorigénesis mamaria 16 semanas después de haber aplicado el MNU y no se observan diferencias significativas en la incidencia, latencia tumoral y número de tumores por rata. Sin embargo, en la Figura 14 se observa que en los animales a los cuales se les quitó el tratamiento con I<sub>2</sub> los tumores aparecen más tempranamente. Después de 8 semanas de que se aplicó el MNU los animales que recibieron el tratamiento con I<sub>2</sub>, presentaban un 50% de incidencia tumoral mientras que los controles y los tratados con KI presentaban menos de un 20 % de Incidencia. A las 12 semanas después de aplicado el MNU, el grupo de ratas que recibieron por 3 semanas el I<sub>2</sub> ya habían alcanzado un 100% en la incidencia tumoral mientras que las ratas control y las tratadas con el KI presentaban una incidencia tumoral de un 50% y un 37% respectivamente. Estos resultados sugieren que la interrupción del tratamiento con I<sub>2</sub> se acompaña por un acelerado desarrollo de los tumores mamarios.

Tabla 8. Resumen del efecto de los tratamientos agudos de KI y yodo molecular (I<sub>2</sub>) sobre la tumorigénesis mamaria después de 16 semanas de la administración del MNU.

Tratamiento	No. de ratas con tumor	Incidencia %	Latencia tumoral (semanas) †	Tumores por rata†
MNU	11/12	91.7	11.0 ± 2.9	2.3 ± 1.4
KI-MNU	9/13	69.2	11.6 ± 2.2	1.8 ± 0.7
I <sub>2</sub> -MNU	10/10	100	9.3 ± 1.8	1.9 ± 0.6

Ratas de cinco semanas de que edad fueron tratadas por 3 semanas con 0.05% de KI ó I<sub>2</sub> en el agua de beber. A las siete semanas de edad, las ratas recibieron una sola dosis i.p. de MNU (50 mg/Kg peso corporal). †Se muestra la media ± la desviación estándar.



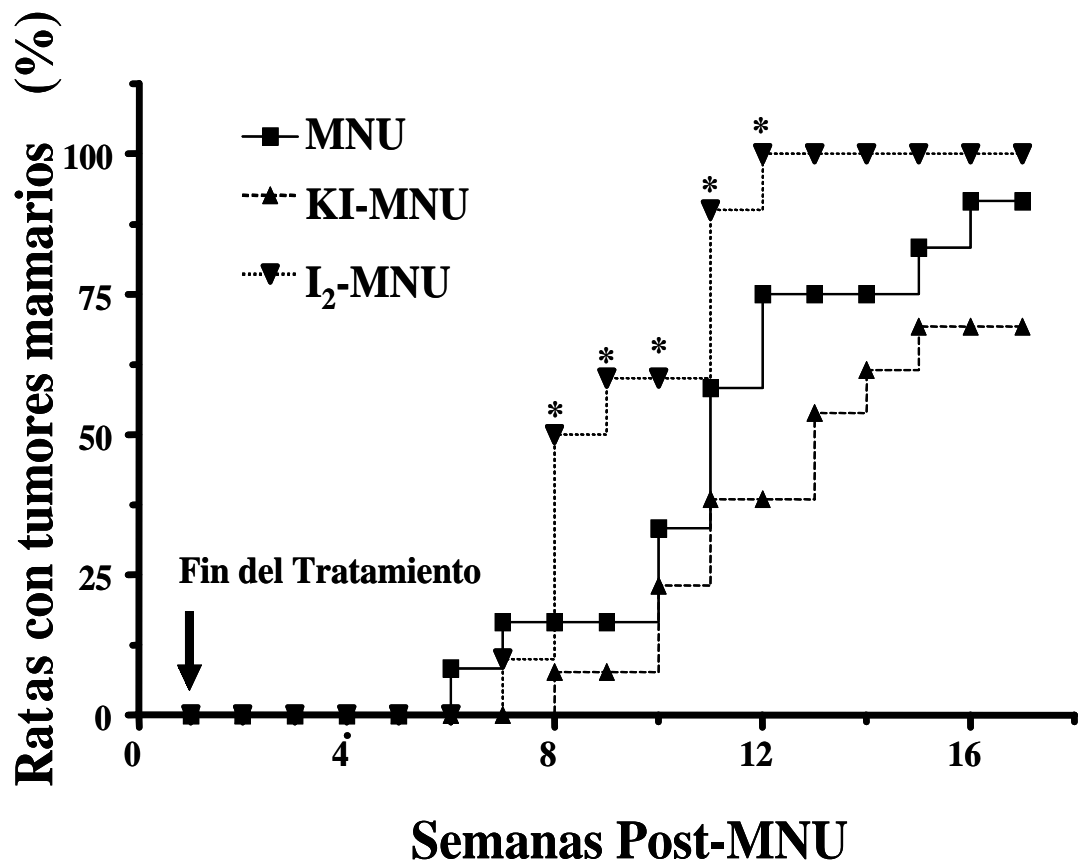


Figura 14. Efecto de los tratamientos agudos de yodo sobre la incidencia de tumores inducidos con MNU. Ratas de 5 semanas de edad durante 3 semanas con 0.05% de KI o I<sub>2</sub> en el agua de bebida por 3 semanas. A las 7 semanas de edad el MNU (50 mg/Kg peso corporal) fue administrado. La flecha indica el fin de los tratamientos de yodo. El asterisco (\*) representa diferencias significativas comparadas con el grupo de MNU ( $p < 0.05$ ).

### C. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CRÓNICOS A BASE DE YODO Y T4 SOBRE LA TUMORIGÉNESIS MAMARIA.

La Tabla 9 resume el efecto de los tratamientos crónicos de KI, I<sub>2</sub> y T4 sobre la tumorigénesis mamaria después de 16 semanas de aplicado el cancerígeno. La administración crónica de I<sub>2</sub> fue el único tratamiento que tuvo un efecto antineoplásico. La Figura 15 muestra el curso temporal de la incidencia tumoral en los grupos tratados con KI, I<sub>2</sub> y T4. En la semana 12 después de aplicado el MNU, el grupo tratado con I<sub>2</sub> presentaba solamente un 10% de incidencia tumoral Mientras que el grupo control y el tratado con T4 presentaban una incidencia tumoral del 72% y el grupo tratado con KI del 90%. En la semana 13 post-MNU, las ratas tratadas con I<sub>2</sub> alcanzaron un 30% de la incidencia tumoral y se mantuvieron así hasta la semana 16. La incidencia tumoral del resto de los grupos ya era mayor que un 72%. Más aún, la aparición del primer tumor también se retrasó en los animales tratados con el I<sub>2</sub> comparado con los otros grupos (12 semanas versus 10 semanas, respectivamente). Después de 16 semanas de la aplicación del MNU, el grupo de I<sub>2</sub> se dividió en dos; un grupo mantuvo el tratamiento con I<sub>2</sub> mientras que al otro le fue interrumpido. Después de 8 semanas de haber quitado el tratamiento con I<sub>2</sub> el grupo de animales tuvo una incidencia tumoral del 100 %. Este resultado indica que se requiere la presencia continua del I<sub>2</sub> para mantener el efecto antineoplásico.

Tabla 9. Efecto de los tratamientos crónicos de KI, I<sub>2</sub> y T4 sobre la tumorigénesis mamaria después de 16 semanas de la administración de MNU.

Tratamiento	No. de ratas con tumor	Incidencia %	Latencia tumoral (semanas) <sup>†</sup>	Tumores por rata <sup>†</sup>
MNU	8/11	72.7	10.8 ± 0.9	1.5 ± 0.7
KI-MNU	10/11	93.7	9.8 ± 1.2	1.8 ± 0.6
I <sub>2</sub> -MNU	3/10*	30.0*	12.7 ± 0.6	1.0 ± 0.0
T4-MNU	9/11	81.8	9.9 ± 2.9	2.5 ± 1.7

Ratas de cinco semanas de edad que recibieron en el agua de bebida los siguientes tratamientos KI (0.05%), I<sub>2</sub> (0.05%) o T4 (3 µg/mL). Dos semanas después las ratas recibieron una sola dosis de MNU (50 mg/Kg peso corporal). Los tratamientos continuaron hasta por 16 semanas. <sup>†</sup> Se muestra la media ± la desviación estándar. \*Significativamente diferente (P < 0.05) comparado con el MNU.

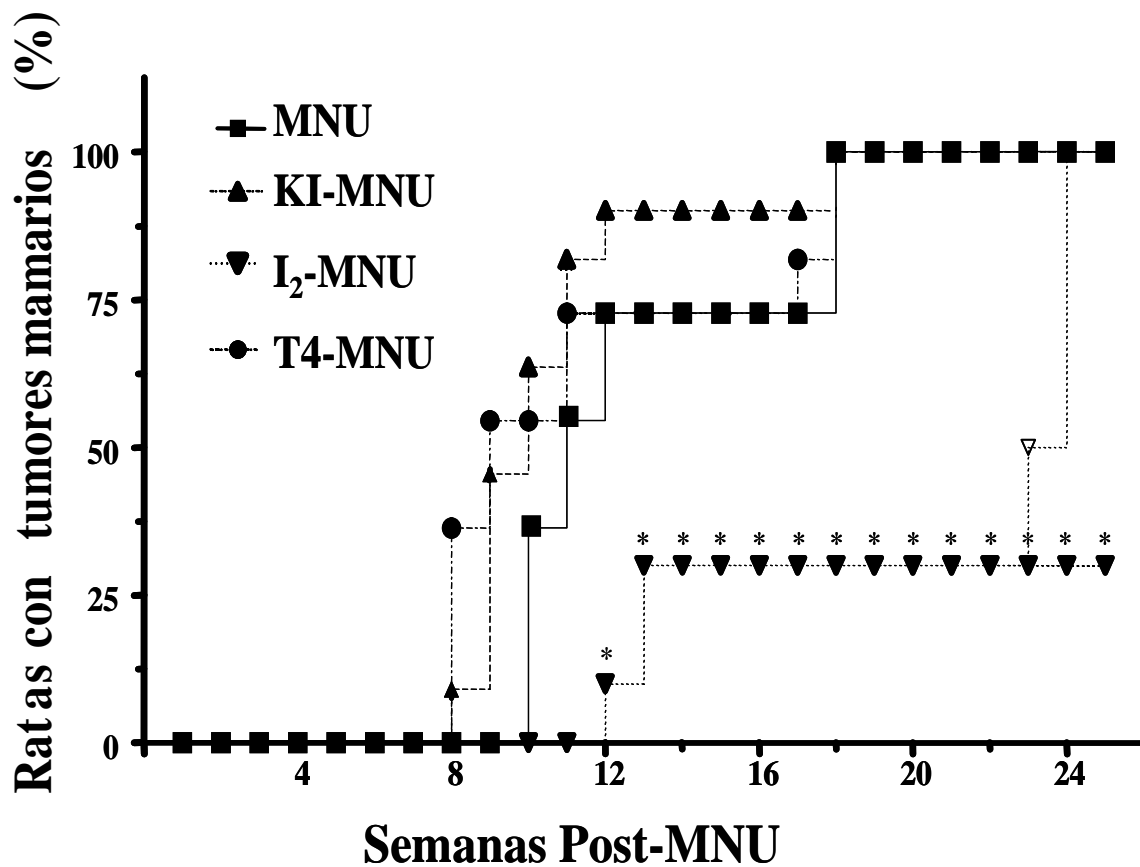


Figura 15. Efecto de los tratamientos crónicos de yodo y T4 sobre la incidencia de tumores mamarios inducidos con MNU. Ratas de 5 semanas de edad que recibieron en el agua de bebida KI (0.05%), I<sub>2</sub> (0.05%) o T4 (3 µg/mL). Dos semanas después fueron inyectadas con el MNU (50 mg/Kg peso corporal). Los tratamientos fueron administrados hasta por 16 semanas después de aplicado el MNU, cumplido ese plazo los animales tratados con I<sub>2</sub> se dividieron en dos grupos, un grupo mantuvo el tratamiento mientras que el otro recibió solo el agua de bebida.\* Representa una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) comparada con el grupo de MNU.

Por otra parte para determinar si los animales con los tratamientos a base de yodo tenían cambios en su estatus tiroideo se midieron los niveles circulantes de la hormona tiroidea T3. La Figura 16 muestra los niveles circulantes de T3 después de 16 semanas de que se aplico el MNU o el vehículo. Los datos muestran que solo los animales tratados con T4 presentan un incremento significativo en los niveles circulantes de T3.

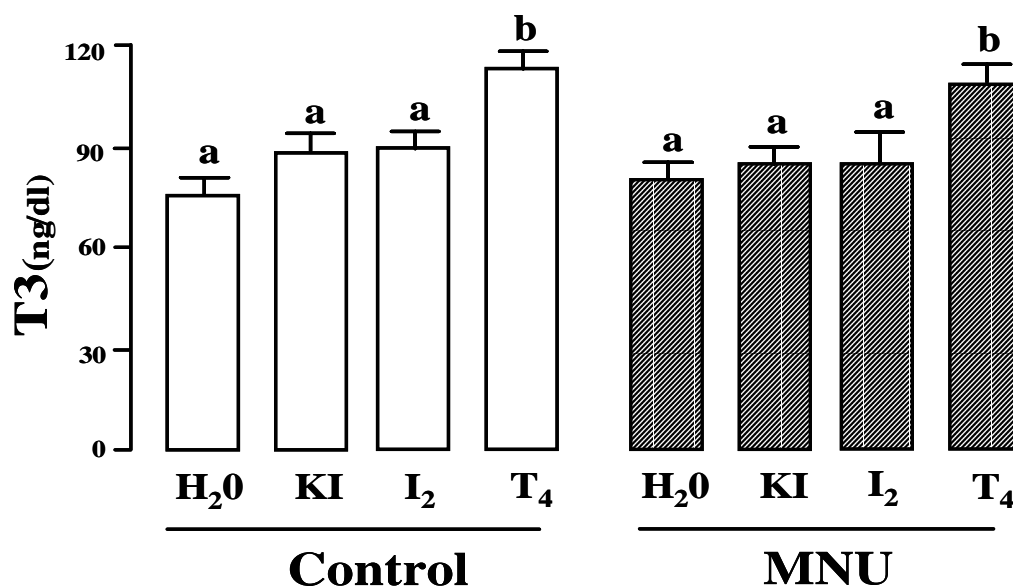


Figura 16. Niveles circulantes de T3 en ratas tratadas cónicamente con yodo. Los resultados representan la media  $\pm$  la desviación estándar (n= 5 ratas). 16 semanas después de aplicado el MNU las ratas fueron sacrificadas. Diferentes superíndices representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

#### D. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS A BASE DE YODO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL NIS, 5'D1, PEN, LPO y p53.

Para establecer si los tratamientos podrían afectar la captura y/o generación local de yodo en la glándula mamaria se determinó la expresión de los mRNAs de la 5'D1, el NIS, la PEN y la LPO. También se determinó la expresión del mRNA de p53 para empezar a dilucidar las vías por las cuales el I<sub>2</sub> está actuando. La Figura 17 muestra la expresión de estos genes en los diferentes grupos después de 3 semanas con tratamiento continuo. Los datos muestran que el tratamiento de I<sub>2</sub>

incrementó la expresión de la 5'D1 en el tejido normal pero no en los animales tratados con MNU. En contraste, la expresión de la PEN aumenta en los animales tratados con I<sub>2</sub> que recibieron el MNU. Los mRNAs del NIS y de p53 no presentaron cambios. Por otra parte, no se encontró expresión del mRNA de la LPO en estos grupos (datos no mostrados).

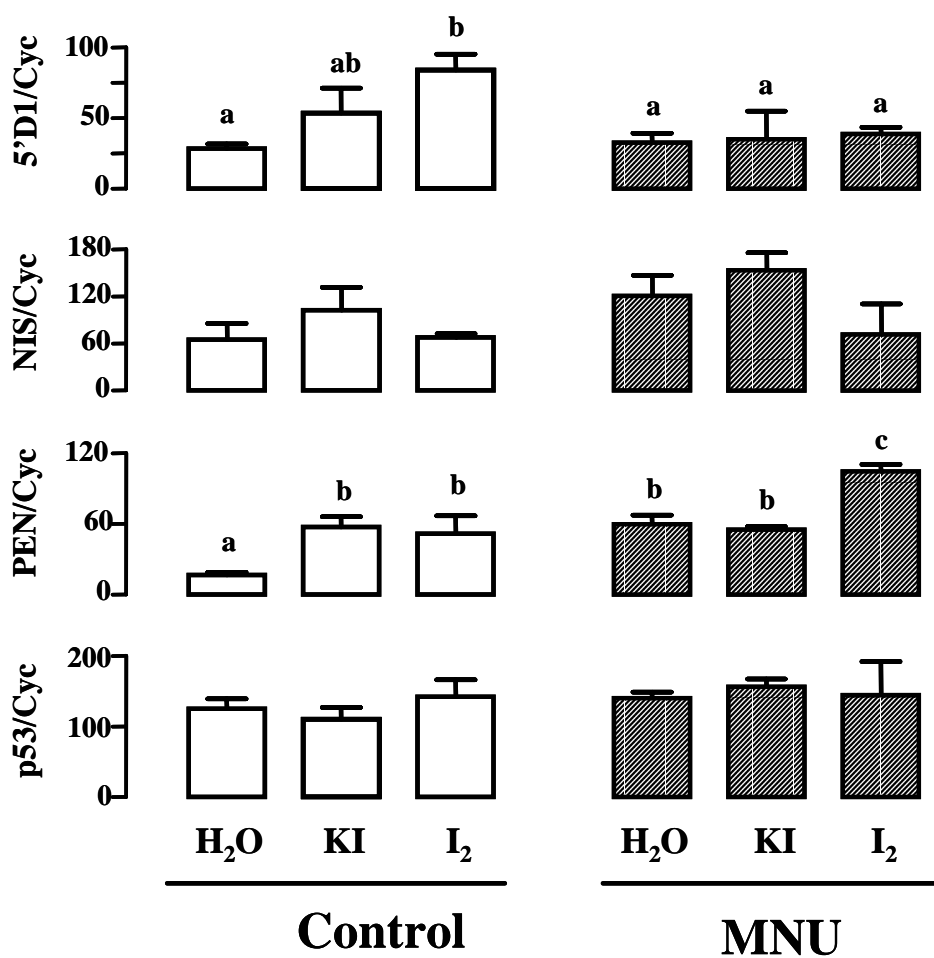


Figura 17. Expresión de los mRNAs de la 5'D1, el NIS, la PEN and p53 mRNAs en la glándula mamaria de ratas tratadas con yodo. Después de 3 semanas de tratamiento y una semana después de aplicado el MNU se sacrificaron los animales. La expresión del mRNA se determinó mediante un RT-PCR semi-cuantitativo como se describe en los materiales y métodos. La proteína estructural ciclofilina (Cyc) fue amplificada para corroborar la cantidad e integridad del RNA. La abundancia relativa de los diferentes mRNA fue calculada usando valores obtenidos del análisis densitométrico de los amplicones específicos para cada mRNAs y normalizado por el amplicon del mRNA de la Cyc. Los valores se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar; los experimentos fueron repetidos 3 veces con tres muestras independientes de RNA. Diferentes superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## E. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS AGUDOS Y CRÓNICOS DE RETINOIDES CON Y SIN YODO SOBRE LA TUMORIGÉNESIS MAMARIA.

En la Tabla 10 se muestra un resumen de los resultados de la tumorigénesis mamaria después de 16 semanas de aplicado el MNU, en ratas tratadas con retinoides tanto de forma aguda como crónica con y sin tratamientos a base de yodo. Ninguno de los tratamientos mostró una inhibición sobre la formación de tumores, incluso, el tratamiento crónico de retinol más I<sub>2</sub> suprime el efecto inhibitor de la tumorigénesis que tiene el I<sub>2</sub> solo.

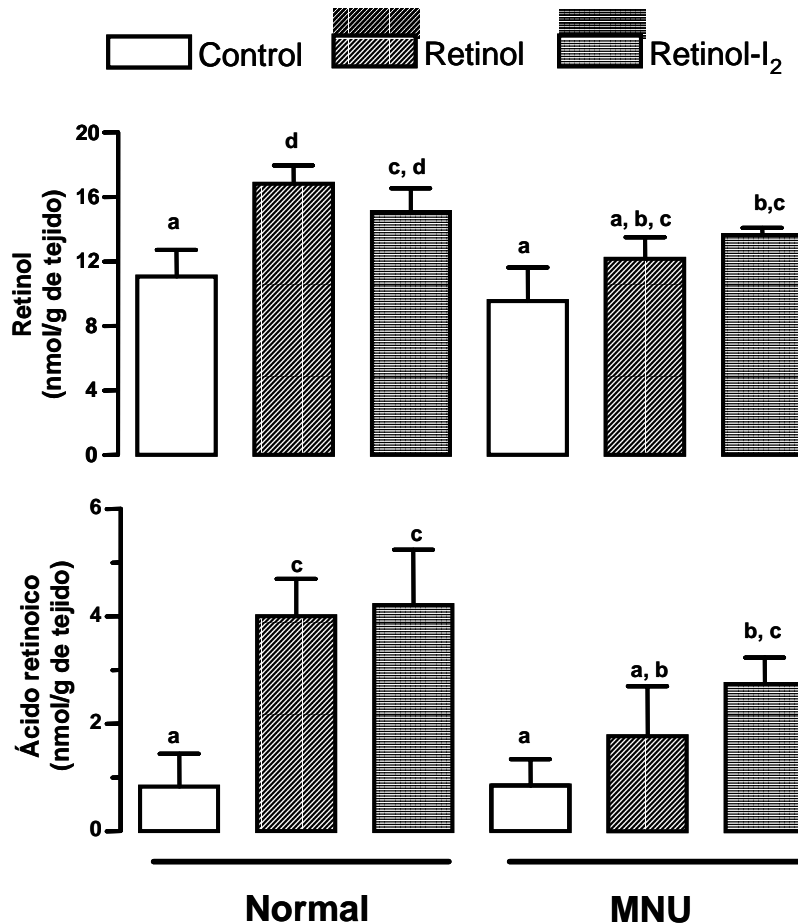
Tabla 10. Efecto de los tratamientos agudos y crónicos de retinoides en combinación con yodo sobre la tumorigénesis mamaria después de 16 semanas de la administración de MNU.

Tratamiento	No. De ratas con tumor	%	Latencia tumoral (semana) <sup>†</sup>	Tumores por rata <sup>†</sup>
<b>Agudo</b>				
MNU	26/27	96.3	11.9 ± 3.3	2.3 ± 1.2
AR-MNU	15/16	93.8	12.5 ± 2.1	2.5 ± 1.3
AR-KI-MNU	9/11	81.8	11.6 ± 2.1	1.9 ± 1.1
AR-I <sub>2</sub> -MNU	6/9	66.7	8.8 ± 2.3	2.8 ± 1.2
<b>Crónico</b>				
MNU	9/9	100	11.4 ± 2.7	2.8 ± 1.6
Retinol-MNU	10/10	100	9.6 ± 2.9	2.7 ± 1.2
Retinol-I <sub>2</sub> -MNU	9/10	90	11.8 ± 2.3	1.7 ± 0.7

Ratas de 5 semanas que de edad recibieron por 3 semanas alimento adicionado con 0.005% de ácido retinoico (AR) o bien recibieron una vez por semana durante 18 semanas una dosis oral de 1000 U.I. de palmitato de retinol (retinol). Los tratamientos de retinoides se acompañaron con 0.05% de KI o I<sub>2</sub> en el agua de bebida. A las 7 semanas de edad las ratas recibieron una sola dosis de MNU (50 mg/Kg peso corporal). <sup>†</sup> Se muestra la media ± la desviación estándar.

Por otra parte en la Figura 18 se muestran los niveles hepáticos de retinol y ácido retinoico en los animales tratados con el 1000 UI semanales de palmitato de retinol. Dado que los retinoides se almacenan en el hígado se ha establecido que su concentración en este tejido es útil para determinar el estatus de vitamina A (Blaner et al., 1985). La Figura 18 muestra que el tratamiento con palmitato de retinol es efectivo para elevar los niveles hepáticos en aquellos animales que no recibieron el MNU pero en aquellos que recibieron el carcinógeno el tratamiento fue menos efectivo. Esto sugiere que el tratamiento con MNU induce cambios en

el hígado que modifican el almacenamiento de la vitamina A y la síntesis de ácido retinoico, el cual ejerce su efecto a niveles de la regulación de varios genes involucrados en el proceso de la carcinogénesis. En la Figura 18 también se observa que el tratamiento con I<sub>2</sub> no modifica el almacenamiento del retinol ni la síntesis de ácido retinoico en los animales normales (no tratados con MNU).



**Figura 18.** Contenido hepático de retinoides en ratas hembra normales y tratadas con MNU después de 18 semanas de la administración de retinol. Ratas de 5 semanas de edad recibieron una vez por semana durante 18 semanas una dosis oral de 1000 U.I. de palmitato de retinol (Retinol) o retinol más 0.05% de I<sub>2</sub> en el agua de bebida (Retinol-I<sub>2</sub>). A las 7 semanas de edad las ratas recibieron una sola dosis de MNU (50 mg/Kg peso corporal). *Panel Superior:* niveles hepáticos de Retinol/g de tejido, *Panel inferior:* niveles hepáticos de ácido retinoico/g de tejido. Se muestra la media ± la desviación estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05).

Finalmente, cabe señalar que el tratamiento agudo con ácido retinoico durante la pubertad en las ratas control y tratadas con MNU no modificó la actividad de la 5'D1 y solo se encontró una tendencia a la alza no significativa en

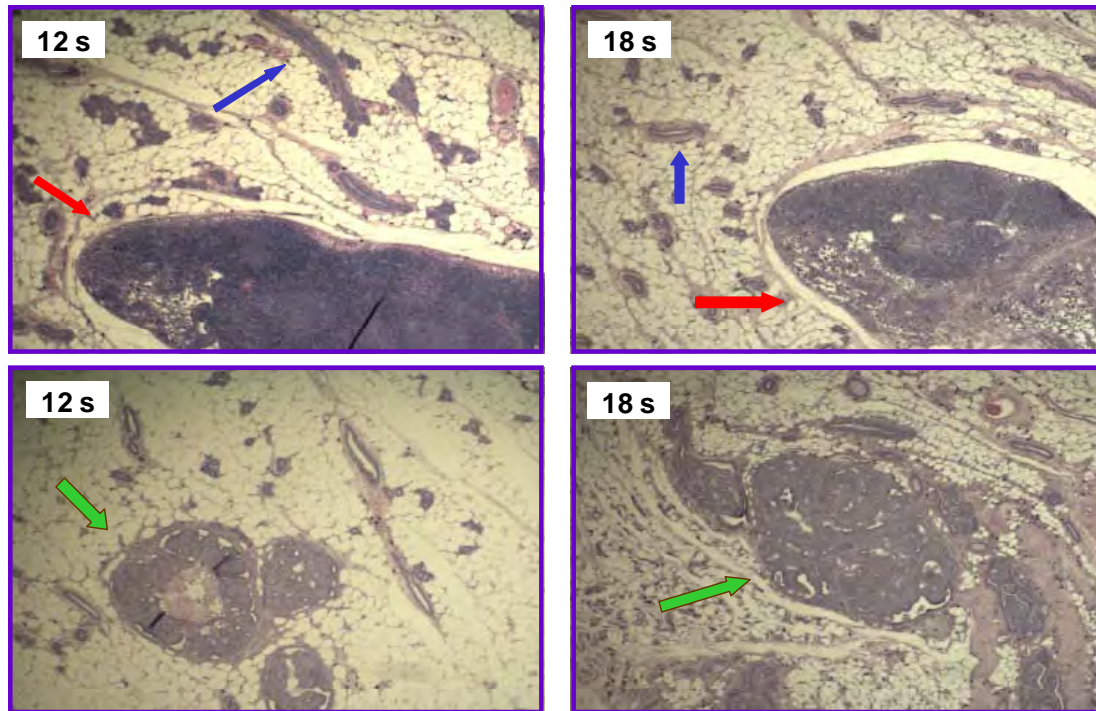
la expresión de los mRNA de la 5'D1 y del NIS en las ratas control (datos no mostrados) (García-Solís et al., 2003).

## F. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS DE YODO SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR EN EL TEJIDO MAMARIO NORMAL Y NEOPLÁSICO.

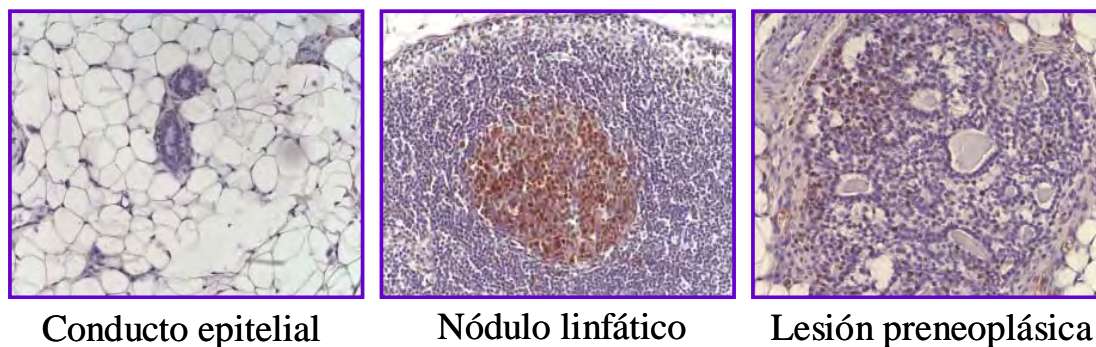
Dado que solo el tratamiento de I<sub>2</sub> (0.05%) en el agua de bebida tiene un efecto antitumoral, se decidió explorar si este tratamiento prevenía la presencia de lesiones preneoplásicas y/o inhibía la proliferación celular en la glándula mamaria tanto normal como tumoral. El diseño experimental utilizado para abordar estas preguntas consistió en analizar la glándula mamaria no tumoral de ratas tratadas y no tratadas con MNU, control y con I<sub>2</sub> a través del tiempo (6, 12 y 18 semanas después de aplicar el MNU o el vehículo). Las lesiones preneoplásicas se encontraron tanto a las 12 y 18 semanas después de aplicar el MNU. No se encontraron diferencias en cuanto a la incidencia y número de lesiones preneoplásicas entre las ratas control y las tratadas con el I<sub>2</sub>. En la Figura 19, se muestran cortes representativos de glándula mamaria de ratas con 12 y 18 semanas post-MNU donde se observa la presencia de lesiones preneoplásicas. Por otra parte, la forma como se evaluó la proliferación celular fue mediante una inmunohistoquímica para el antígeno de proliferación celular (PCNA). El PCNA es una subunidad de la DNA-polimerasa- $\delta$  que se encuentra expresada en la fase S del ciclo celular. Estudios previos en el modelo animal de tumorigénesis mamaria con MNU, muestran que el PCNA es un marcador adecuado para evaluar la proliferación toda vez que arroja resultados similares que cuando se utilizan otros marcadores como son la presencia de la ciclina D1 y la incorporación de BrdU (Ip et al., 2000). Las células epiteliales de los cortes de glándulas mamarias no tumorales tratadas con y sin MNU fueron negativas para el PCNA en su gran mayoría (Figura 20). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre grupos a través del tiempo. Por otra parte, como era de esperarse, los centros germinales del nódulo linfático presente en la glándula mamaria abdominal mostraban células positivas a PCNA (Williams et al., 2002) aunque las células



epiteliales de la mama fueran negativas (Figura 20). También las lesiones mamarias preneoplásicas presentaron mayor número de células positivas a PCNA (Figura 20).

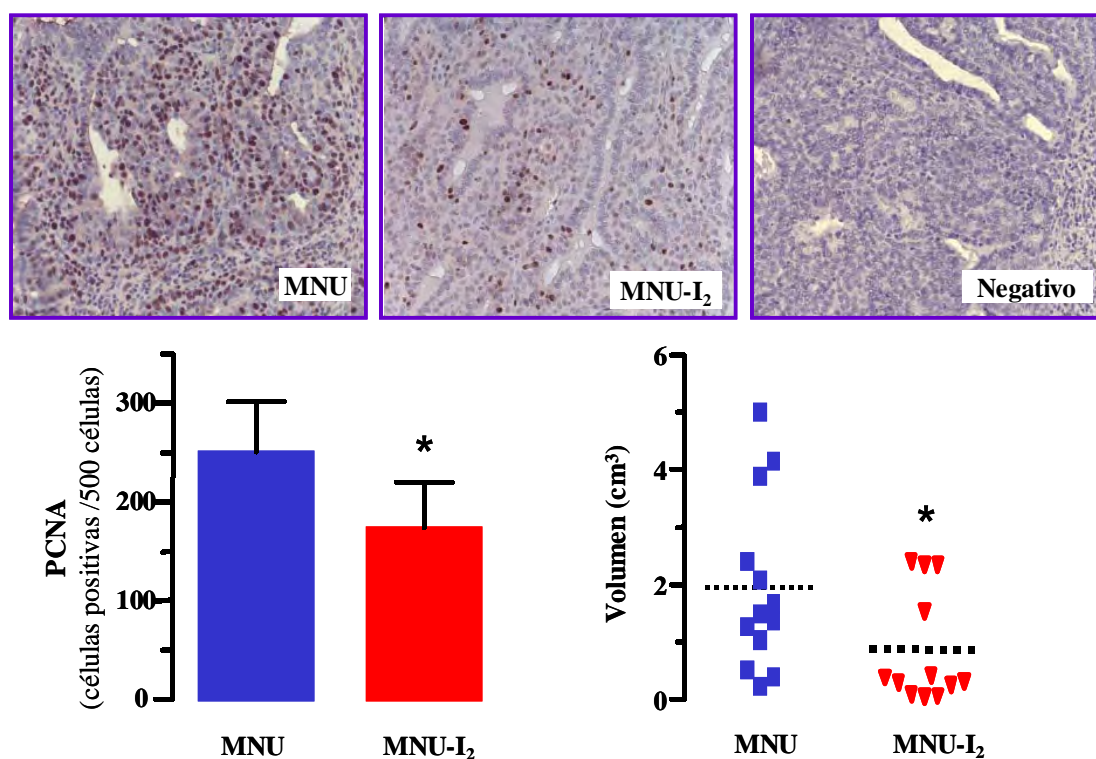


**Figura 19. Lesiones preneoplásicas en la glándula mamaria de ratas de 12 y 18 semanas después de aplicado el MNU.** *Panel superior:* Cortes representativos de tejido mamario normal teñidos con HyE, 4x. Las flechas rojas señalan el nódulo linfático y las flechas azules señalan un conducto epitelial. *Panel Inferior:* Cortes representativos de tejido mamario teñidos con HyE (4x) donde se advierte la presencia de lesiones preneoplásicas (flechas verdes).



**Figura 20. Inmunohistoquímica a PCNA en tejido mamario abdominal no tumoral.** *Panel de la izquierda:* Conducto epitelial mamario negativo a PCNA. *Panel central:* centro germinal del nódulo linfático mamario positivo a PCNA. *Panel de la derecha:* Lesión preneoplásica positiva a PCNA. Todas las estructuras pertenecen al mismo corte histológico, 20x. Las células positivas se revelaron con diaminodenzidina (tinción café) y se hizo una contratincción con hematoxilina.

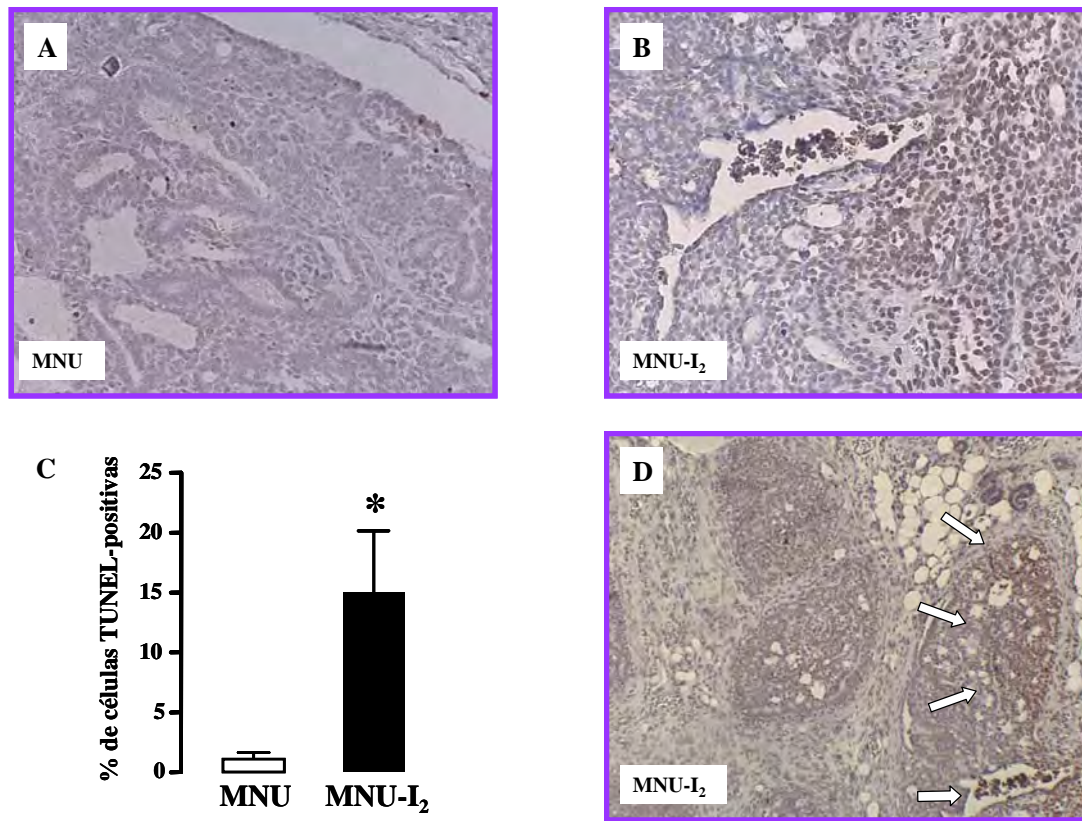
Por otra parte, se encontró que en las ratas tratadas con el I<sub>2</sub> los tumores mamarios presentan un menor número células epiteliales positivas a PCNA con respecto al control ( $250 \pm 51$  vs  $173 \pm 46$  células positivas/500 células) (Figura 21). Además el tamaño de los tumores de las ratas tratadas con el I<sub>2</sub> fue significativamente menor. Estos resultados señalan que el tratamiento con I<sub>2</sub> está inhibiendo la proliferación celular en los tumores mamarios.



**Figura 21.** Efecto del I<sub>2</sub> sobre la proliferación en los tumores mamarios. *Panel superior:* Inmunohistoquímica de PCNA en cortes representativos de tumores mamarios de rata control (MNU), tratada crónicamente con I<sub>2</sub> (MNU-I<sub>2</sub>) y control negativo (tumor mamario al cual no se le agregó el anticuerpo primario), 20x. Las células positivas se revelaron con diaminobenzidina (tinción café) y se realizó una contratinción con hematoxilina. *Panel Inferior izquierda:* Cuantificación de células positivas a PCNA sobre 500 células. *Panel Inferior derecha:* Tamaño de los tumores mamarios de las ratas control y las tratadas con I<sub>2</sub>. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0.05\%$ ).

Para evaluar la muerte celular en los tumores mamarios se utilizó el método de TUNEL. En la Figura 22 (A y B) se muestran cortes representativos de tumores mamarios de ratas tratadas con o sin I<sub>2</sub>. En la Figura 22B se observa que los

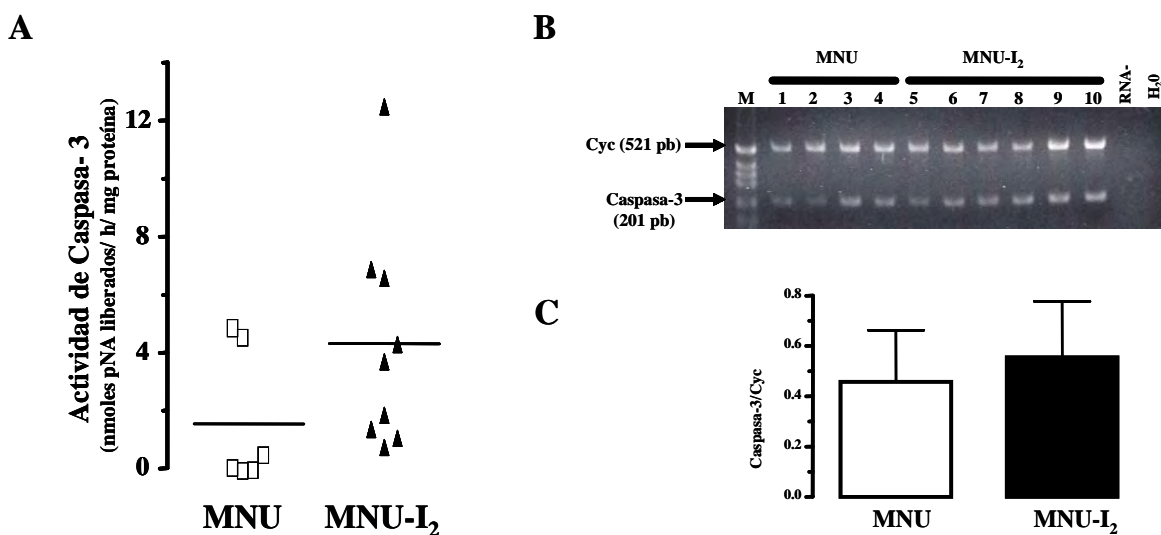
tumores de las ratas tratadas con  $I_2$  presentan un mayor porcentaje de células TUNEL-positivas (15%) con respecto a los controles (1.13%). Es importante hacer notar que en los tumores de las ratas tratadas con  $I_2$ , no hay una distribución homogénea de las células TUNEL-Positivas sino que hay zonas específicas y altamente positivas a TUNEL (Figura 22 D).



**Figura 22. Efecto del  $I_2$  sobre la muerte celular en los tumores mamarios.** A y B) Cortes representativos de tumores mamarios de rata control (MNU) y de rata tratada crónicamente con  $I_2$  (MNU- $I_2$ ) a los cuáles se les aplicó la técnica de TUNEL. Las células en apoptosis se revelaron con diaminobenzidina (tinción café) y se realizó una contratinción con hematoxilina, 20x. C) Porcentaje de células TUNEL-Positivas en tumores mamarios tratados con o sin  $I_2$ . El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0.05\%$ ). D) Corte representativo de tumor mamario donde las flechas ilustran una zona específica y altamente positiva a TUNEL en una rata tratada con  $I_2$  (MNU- $I_2$ ), 10x.



Por otra parte, dado que la técnica de TUNEL detecta células donde hay fragmentación de DNA también se analizó la actividad de la caspasa-3, una enzima ejecutora que se activa en la fase final de muerte celular por apoptosis, en homogenizados de tejidos tumorales. En la Figura 23A se observa que los tumores de las ratas tratadas con I<sub>2</sub> muestran una tendencia a tener mayor actividad de la caspasa-3 ( $2.5 \pm 3.3$  vs.  $4.9 \pm 3.8$ ). Adicionalmente se analizó si el I<sub>2</sub> inducía la expresión del mRNA de la caspasa-3, en la Figura 23 B y C se muestra que la expresión de la caspasa-3 es similar tanto en los animales control como en los tratados con I<sub>2</sub>.



**Figura 23. Actividad y Expresión del mRNA de la caspasa-3 en tumores de ratas control (MNU) y tratadas con I<sub>2</sub> (MNU-I<sub>2</sub>).** A) Actividad de la caspasa-3 en los tumores mamarios tratados con o sin I<sub>2</sub>. La actividad de la caspasa-3 está expresada como nanomoles de p-nitroanilida liberados/ h/ mg de proteína (nmoles pNA liberados/ h/ mg proteína). B) Productos de RT-PCR de cilofilina (Cyc) y caspasa-3 visualizados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carriles: M, marcador de peso molecular; 1-4, tumores mamarios controles; 5-10, tumores mamarios de ratas tratadas con I<sub>2</sub>; RNA- (control negativo de la RT), producto de reacción de RT sin RNA; H<sub>2</sub>O (control negativo de la PCR), reacción con todos los reactivos para PCR sin cDNA. Análisis densitométrico de los productos mostrados en B. Se muestra el coeficiente de caspasa-3/Cyc. El amplicon de la Cyc se utilizó como control de carga. La gráfica muestra la media  $\pm$  la desviación estándar.

## DISCUSIÓN.

En esta tesis se muestra que el  $I_2$  es un potente agente protector del cáncer mamario inducido con MNU. Estos datos concuerdan con otros estudios que muestran que dietas a base de algas marinas ricas en yodo o a base de solución de Lugol (mezcla de  $I_2$  y KI) tienen un efecto protector contra la tumorigénesis mamaria inducida químicamente (Funahashi et al., 1999; Funahashi et al., 2001; Kato et al., 1994). El hallazgo que muestra que es necesario que el tratamiento con  $I_2$  se dé crónicamente para que prevenga la tumorigénesis mamaria, sugiere que su efecto es a nivel de la promoción tumoral. Esto coincide con los hallazgos epidemiológicos que muestran una baja incidencia de cáncer mamario en las poblaciones de origen japonés siempre y cuando mantengan su dieta tradicional en la cual se incluye las algas ricas en yodo (Le Marchand et al., 1985). Más aún, los datos confirman que el  $I_2$  pero no el  $I^-$ , contribuye al mantenimiento de la integridad normal de la glándula mamaria. Eskin et al. (1995) mostraron que la deficiencia de yodo altera la estructura y función de la glándula mamaria de la rata, especialmente en las células alveolares, y que el  $I_2$  es más efectivo en disminuir la hiperplasia ductal y la fibrosis perilobular mamaria (Eskin et al., 1995). En seres humanos también se ha mostrado que el tratamiento con  $I_2$  reduce los síntomas (dolor, nodulación) en las mujeres con enfermedad benigna fibroquística de la mama (Ghent et al., 1993; Kessler, 2004).

Por otra parte los datos muestran que el tratamiento con  $I_2$  incrementa la expresión de PEN sugiriendo que éste podría ser una de las vías para la captura de más  $I_2$  aunque no la única. Datos recientes en nuestro laboratorio muestran que en tejido mamario de ratas vírgenes o en células de cáncer mamario humano (MCF-7), la captura de  $I_2$  se lleva a cabo aún en presencia de inhibidores del NIS y PEN como el perclorato y la furosemida respectivamente (Arroyo-Helguera y Aceves, 2005; García-Solís et al, 2005a; García-Solís et al., 2005b). Las vías de captura del yodo en el tejido mamario de animales tanto vírgenes como lactantes parecen incluir al NIS, la PEN y un intercambiador de  $SO_3^-/I^-$  (Shennan, 2001; Rillema y Hill, 2003). Otro resultado interesante es el hecho de que la

administración de MNU parece modificar la regulación de la expresión del mRNA de la 5'D1. Esta enzima está presente solo durante la pubertad, gestación y lactancia (Aceves et al., 1995), y podría representar una fuente alternativa de I<sub>2</sub>. Efectivamente, la conversión de T4 a T3 se acompaña de la generación local de altas concentraciones de yodo. Sin embargo, el proceso de carcinogénesis, tanto en la tiroides como en la glándula mamaria de animales y humanos, se acompaña de una pérdida y/o desregulación de la expresión de la 5'D1 (Gallardo de la O et al., 2000; Aceves et al., 2002; García-Solís y Aceves, 2003). Es posible que en el proceso de carcinogénesis haya mecanismos involucrados en el apagado de genes relacionados con la captura y generación local de yodo, como son el NIS y la 5'D1. De hecho, la idea de administrar el ácido retinoico en la etapa peripuberal, antes y después de aplicar el MNU se hizo con la intención de inducir la expresión del NIS y la 5'D1. Estudios previos han mostrado que el ácido retinoico estimula la expresión del NIS y la 5'D1 en células de cáncer mamario (García-Solís y Aceves, 2003; Kogai et al., 2000) y que tratamientos a base de retinol aumentan la expresión de la 5'D1 en el tejido mamario de ratas lactantes (López et al., 2002). Sin embargo, los resultados obtenidos señalan de la administración peripuberal del ácido retinoico no modifica significativamente la expresión del mRNA del NIS y la 5'D1. De este modo la administración peripuberal del ácido retinoico no es suficiente para prevenir la transformación ni detener la promoción tumoral en la glándula mamaria de las ratas. Por otra parte, la administración crónica de palmitato de retinol tampoco redujo la carcinogénesis. Se ha descrito que en la glándula mamaria neoplásica el metabolismo de los retinoides está afectado tanto la vía de síntesis de ácido retinoico como su señalización al afectarse proteínas como la proteína celular que une al retinol-tipo I (CRBP-I) y sus receptores (RAR $\alpha$ ) (Kuppumbatti et al., 2000; Mirna-Y-López et al., 2000; Yang et al., 1999). Más aún, los resultados presentados muestran que las ratas tratadas con MNU tienen alterado el metabolismo de los retinoides. Al menos a nivel hepático las ratas tratadas con MNU muestran menor capacidad de almacenar retinol y menor concentración de ácido retinoico indicando indirectamente déficit en su síntesis. Por otra parte, el hecho de que los tratamientos crónicos del palmitato de retinol,

precursor del ácido retinoico, cancelen el efecto protector del  $I_2$  sugiere que este retinoide altera el metabolismo de este tipo de yodo. De hecho estudios *in vitro* han mostrado que el retinol y el ácido retinoico son capaces de reducir el  $I_2$  a  $I^-$  (Lucy y Lichti, 1969). El  $I^-$  como ya se ha visto no tiene efecto sobre la carcinogénesis mamaria inducida con MNU.

La falta de efecto del tratamiento de KI en el presente trabajo se puede explicar por la falta de expresión de la LPO en la glándula mamaria de las ratas púberes y vírgenes y que solo está presente durante la gestación y la lactancia (Strum, 1978). La LPO es un homólogo de la TPO; ambas enzimas son capaces de oxidar al  $I^-$  para que éste se una a lípidos y proteínas. No se ha identificado cual es la especie de yodo que se forma con la oxidación del  $I^-$  y entre los candidatos se incluye, al  $I^+$  (yodonio),  $I^0$  (radical libre de yodo),  $IO^-$  (hipoyodito), y el  $I_2$  (Smyth, 2003). Se ha demostrado que el exceso de KI induce apoptosis en tirocitos y células cancerosas que tienen actividad de TPO. Vitale et al. (2000) mostraron que el exceso de KI induce apoptosis en los tirocitos, pero si se inhibe la actividad de TPO con propiltiouracilo el efecto pro-apoptótico del KI se cancela. Por su parte Zhang et al. (2003), usando células de carcinoma de pulmón trasfectadas con NIS o con NIS/TPO, observaron que solo en las células que tenían NIS/TPO el exceso de KI induce la apoptosis. Estos resultados indican que el  $I^-$  del KI necesita ser oxidado para que ejerza su efecto citotóxico. En el presente estudio, encontramos que en la glándula mamaria de ratas control y tratadas con MNU no hay expresión del mRNA de la LPO. Experimentos *in vitro* han demostrado que el  $I_2$  es capaz de formar T4 en ausencia de TPO (Thrall et al., 1992). Esta evidencia sugiere que el  $I_2$ , una especie oxidada del yodo, parece no necesitar de la actividad de la LPO para ser incorporado a lípidos y proteínas. De hecho se ha propuesto que el posible mecanismo por el cual el yodo es capaz de inducir apoptosis es a través de la formación de compuestos yodados llamados yodolactonas (Aceves et al., 2005). Las yodolactonas son derivados del ácido araquidónico y son capaces de inhibir la proliferación celular e inducir apoptosis en tirocitos en cultivo (Pisarev y Gartner, 2000; Langer et al, 2003). Un probable blanco molecular de las yodolactonas podría ser los llamado receptores activados

de la proliferación de los peroxisomas (PPAR), los cuales son receptores que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y regulan la transcripción de genes (Mangesldorf et al., 1995). Los receptores PPAR tienen como ligandos endógenos a lípidos de cadena larga como el ácido araquidónico (Aceves et al, 2005). En particular el PPAR $\gamma$  es uno de los que llaman más la atención debido que sus ligandos sintéticos específicos como la tiazolidinediona inhiben el crecimiento de células tumorales de mama, colon y próstata (Shen y Brown, 2003). Además, se demostró que la tiazolidinediona y el GW7845, otro ligando del PPAR $\gamma$ , tienen un efecto protector contra el desarrollo de cáncer mamario (Shen y Brown, 2003; Sporn et al., 2001).

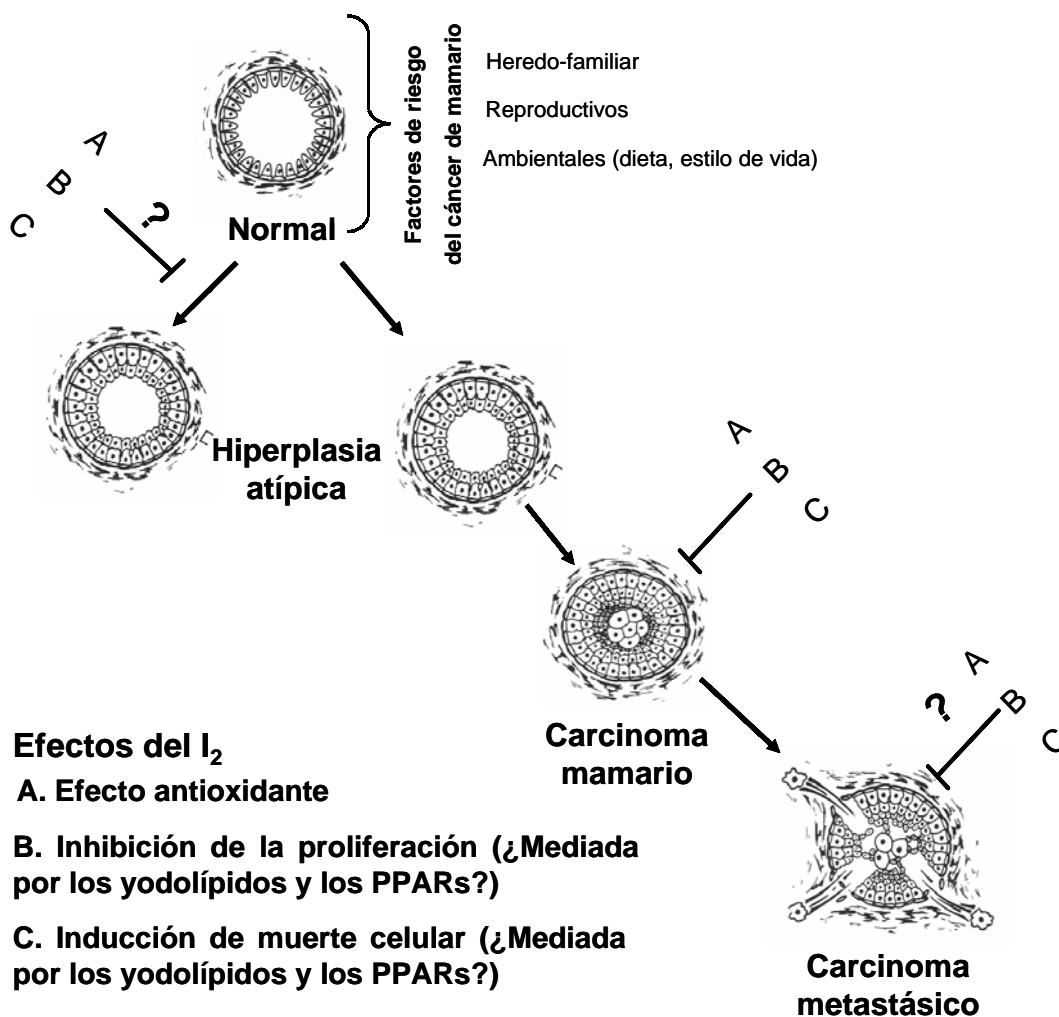
Por otra parte, los datos presentados muestran que los tumores de las ratas tratadas con I<sub>2</sub> tienen menor presencia de PCNA y menor tamaño que los tumores controles, lo cual indica una inhibición de la proliferación celular. También el tratamiento con I<sub>2</sub> incrementa el número de células TUNEL-positivas indicando la presencia de fragmentación de DNA y por consiguiente muerte celular. En este caso la mayor presencia de fragmentación de DNA se acompañó de una tendencia a presentar mayor actividad de la caspasa-3. La caspasa-3 es una enzima ejecutora en las fases finales del programa de muerte celular por apoptosis. Esta enzima es activada por escisión y en su activación convergen tanto la vía intrínseca (mitocondrial) como extrínseca (receptor de muerte) de la apoptosis (Alberts et al., 2004; Nicotera y Melino, 2004). El hecho de que no se haya encontrado diferencias significativas en la actividad de la caspasa-3 entre los tumores control y los tratados con I<sub>2</sub> se puede explicar porque mientras que en el TUNEL, una prueba histoquímica, se muestra que la fragmentación del DNA ocurre en zonas específicas y no tiene una distribución homogénea, la actividad de la caspasa-3 se determina en un homogeneizado tisular por lo que la actividad de la enzima se diluye. Lo anterior no descarta que la muerte celular este ocurriendo independientemente de la actividad de las caspasas (Lockshin y Zakeri, 2004). La razón por la cual hay zonas específicas de células TUNEL-positivas específicas y no generalizadas en los tumores de las ratas tratadas con I<sub>2</sub> se ignora. Sin embargo, es probable que este tipo de marcaje este relacionado



con mayor presencia de vasos sanguíneos o que se trate de una subpoblación de células tumorales más sensibles al yodo. Estudios donde se relacione la presencia de endotelio así como la presencia de receptores como el receptor a estrógenos  $\alpha$  o los diferentes tipos de receptores PPAR, pueden ser útiles para dilucidar ésta interrogante.

Por otra parte, recientemente varios autores han propuesto que el yodo actúa como antioxidante (Venturi et al., 2000; Smyth, 2003). En las células capaces de concentrar  $I^-$ , éste actúa como un donador de electrones en presencia de  $H_2O_2$  y peroxidasas (Venturi et al., 2000). Datos en nuestro laboratorio muestran que el  $I_2$  es capaz de disminuir la lipoperoxidación basal en la glándula mamaria (Alfaro, 2005; García-Solís et al., 2005a). La evidencia experimental revela que los radicales libres como las especies reactivas de oxígeno están involucradas en la iniciación y promoción de la carcinogénesis, se han encontrado mutaciones en genes como en el gen supresor de tumores *p53* o en los oncogenes de la familia de *ras* (Ray et al., 2000). Ciertamente se ha encontrado que las glándulas mamarias aparentemente normales de las ratas tratadas con MNU o de los tumores mamarios presentan altos niveles de lipoperoxidación mamaria (Alfaro, 2005; García-Solís et al., 2005a).

Finalmente, los mecanismos por los cuales el  $I_2$  inhibe la formación de tumores mamarios no se conocen, sin embargo, hasta ahora su efecto parece darse a tres niveles, primero, inhibiendo la proliferación de las células transformadas, segundo, induciendo apoptosis y en tercer lugar, a través de su mecanismo antioxidante compitiendo con los radicales libres por los lípidos y el DNA o interactuando directamente con los radicales libres. Por otra parte, aunque este estudio no muestra que el  $I_2$  ejerza sus efectos directamente, los datos muestran claramente que si el  $I_2$  requiere transformarse en el organismo su efecto no es mediado por las hormonas tiroideas ni por el  $I^-$ . Se requieren más estudios para dilucidar los mecanismos bioquímicos que involucran la captura, metabolismo y señalización del  $I_2$ . En la Figura 24 se muestra un esquema donde se presentan los diferentes niveles a los que puede estar actuando el  $I_2$ .



**Figura 24. Efectos antineoplásicos del  $I_2$  en la glándula mamaria.** En el esquema se muestra como el  $I_2$  puede estar actuando para prevenir las neoplasias en la glándula mamaria. En primer lugar se muestran los tres principales determinantes de los factores de riesgo del cáncer mamario. En segundo lugar se proponen tres tipos de efectos del  $I_2$ , (A) efecto antioxidante; (B) inhibición de la proliferación; y (C) inducción de muerte celular. Se ha descrito que el  $I_2$  reduce la presencia de lesiones benignas, tanto del epitelio (hiperplasia atípica) como del estroma, en ratas con deficiencia de yodo). Pero todavía se ignoran los mecanismos los mecanismos de acción. Por otro lado, el  $I_2$  inhibe la proliferación e induce la muerte celular en los tumores mamarios inducidos con MNU, pero no se sabe si el  $I_2$  es capaz de inhibir la metástasis. Finalmente, todavía se desconoce si el  $I_2$  ejerce sus efectos a través de los yodolípidos y la familia de receptores de la proliferación de los peroxisomas (PPARs). Esquema basado en datos de Eskin et al., 1995 y García-Solís et al., 2005a.



## **CONCLUSIONES.**

En resumen, los datos presentados en este trabajo muestran que el tratamiento crónico con I<sub>2</sub> inhibe la tumorigénesis mamaria inducida con MNU. Esta acción es a nivel de la promoción tumoral y el mecanismo de protección parece estar en función de la inhibición de la proliferación celular e inducción de la muerte celular. Los tratamientos crónicos de I<sub>2</sub> no se acompañan de efectos secundarios que involucren cambios en el peso corporal y el estatus tiroideo. Por lo que se propone que el I<sub>2</sub> podría ser un buen candidato para ser usado en estudios clínicos como un coadyuvante en la terapia del cáncer mamario.

## REFERENCIAS.

- Abd M, Hassan H, Mohamed M, Meki A, Abdel-Ghaffar S y Hussein M. 2005. The biochemical and morphological alterations following administration of melatonin, retinoic acid and *Nigella sativa* in mammary carcinoma: an animal model. *Int. J. Exp. Path.* 86, 383-393.
- Aceves C, Anguiano B y Delgado G. 2005. Is iodine a gatekeeper of the integrity of the mammary gland? *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 10, 189-195.
- Aceves C, Rodón FC, Ramírez-C I, Wilson S, Pineda-C O, López-B L, Mancilla R y Valverde-R C. 1995. Mammary 5'deiodinase (5'D) during the breeding cycle of the rat: indirect evidence that 5'D type I is specific to the alveolar epithelium. *Endocrine* 3, 95-99.
- Aceves, C, Gopainathrao G, Rajkumar L, Guzman R, Yang, J y Nandi, S. 2002. Deiodinase type 1 (D1) in *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced rat mammary carcinomas: differential expression in early and late arising tumors. 84th Annual Meeting of the Endocrine Society, San Francisco, CA, 2002, p. 299 (Abstract).
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P. 2004. *Biología molecular de la célula*, 4ta edición. Barcelona: Ediciones Omega. Pp. 983-1026.
- Alfaro Y. 2005. Yodo, un potente antioxidante protector del cáncer mamario inducido por *N*-metil-*N*-nitrosourea (Tesis de Maestría). Querétaro, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Anzano MA, Byres SW, Smith JM, Peer CW, Mullen LT, Brown CC, Roberts AB y Sporn MB. 1994. Prevention of breast cancer in the rat with 9-*cis* retinoic acid as a single agent and in combination with tamoxifen. *Cancer Res.* 54, 4614-4617.
- Arroyo-Helguera O y Aceves C. 2005. Captura y efecto antiproliferativo del yodo molecular (I<sub>2</sub>) en cultivos celulares de cáncer mamario. Jornadas del Instituto de Neurobiología 12vo aniversario. Querétaro, Qro., p. 18 (Abstract).
- Birkenfeld A y Kase NG. 1997. Functional anatomy and physiology of the female breast. En DJ Marchant (Ed). *Breast disease.* (pp. 5-13). Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders Company.
- Blaner WS. 1993. Biochemistry and pharmacology of retinoids. En: W Hong y R Lotan (Eds.), *Retinoids in oology.* (pp 1-41). New York: Marcel Dekker.
- Blaner WS, Hendriks HJ, Brouwer A, de Leeuw AM, Knook DL y Goodman DS. 1985. Retinoids, retinol-binding proteins, and retinyl palmitate hydrolase distributions in different types of rat liver cells. *J. Lipid Res.* 26, 1241-1251.
- Bonilla-Fernández P, López-Cervantes M, Torres-Sánchez L, Tortolero-Luna L y López-Carrillo L. 2003. Nutritional factors and breast cancer in Mexico. *Nutr Cancer* 45, 145-155.
- Bosetti C, Malvezzi M, Chatenoud L, Negri E, Levi F y La Vecchia C. 2005. Trends in cancer mortality in the Americas, 1970-2000. *Ann. Oncol.* 16, 489-511.

- Bray F, McCarron P y Parkin DM. 2004. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res.* 6, 229-239.
- Cann SA, van Netten JP y Glover DW. 1999. Iodide accumulation in extrathyroidal tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 821.
- Cann SA, van Netten JP y van Netten C. 2000. Hypothesis: Iodine, selenium and the development of breast cancer. *Cancer Causes Control* 11, 121-127. -2943.
- Cha RS, Thilly WG y Zarbl H. 1994. *N*-nitroso-*N*-methylurea-induced rat mammary tumors arise from cells with preexisting oncogenic *Hras1* gene mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3749-3753.
- Chambon P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10, 940-954.
- Charpentier A y Aldaz CM. 2002. The molecular basis of breast cancer. En WB Coleman y GJ Tsongalis (Eds.), *The molecular basis of human cancer.* (pp. 347-363). New Jersey: Humana Press.
- Cho J, Léveillé R, Kao R, Rousset B, Parlow AF, Burak W Jr, Mazzaferri E y Jhiang S. 2000. Hormonal regulation of radioiodide uptake activity and Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter expression in mammary glands. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2936-2943.
- Clarke R. 1997. Animal models of breast cancer: experimental design and their use in nutrition and psychosocial research. *Breast Cancer Res. Treat.* 46, 117-133.
- DeBruin LS y Josephy PD. 2002. Perspectives on the chemical etiology of breast cancer. *Environ. Health Perspect.* 110 (Suppl 1), 119-128.
- Dickson R y Lippman M. 1995. Growth factors in breast cancer. *Endocrine Rev.* 16, 559-589.
- Dontu G, El-Ashry D y Wicha MS. 2004. Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 193-197.
- Duester G. 2000. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function. Production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* 267, 4315-4324.
- Eskin BA. 1970. Iodine metabolism and breast cancer. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 32, 911-947.
- Eskin BA, Grotkowski CE, Connolly CP y Ghent WR. 1995. Different tissue responses for iodine and iodide in rat thyroid and mammary glands. *Biol. Trace Element Res.* 49, 9-19.
- Eskin BA, Shuman R, Krouse T y Merion JM. 1975. Rat mammary gland atypia produced by iodine blockade with perchlorate. *Cancer Res.* 35, 2332-2339.
- Fawcett DW. 1995. *Tratado de histología.* 12 ed. Madrid: Interamericana/McGraw-Hill. Pp 934-946.
- Funahashi H, Imai T, Mase T, Sekiya M, Yokoi K, Hayashi H, Shibata A, Hayashi H, Shibata A, Hayashi T, Nshikawa M, Suda N, hibi Y, Mizuno Y, Tsukamura K, Hayakawa A y Tanuma S. 2001. Seaweed prevents breast cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 92, 483-487.
- Funahashi H, Imai T, Tanaka Y, Tobinaga J, Wada M, Morita T, Yamada F, Tsukamura K, Oiwa M, Kikumori T, Narita T y Takagi H. 1996. Suppressive effect of iodine on DMBA-induced breast tumor growth in the rat. *J. Surg. Oncol.* 61, 209-213.

- Funahashi H, Imai T, Tanaka Y, Tsukamara K, Hayakawa Y, Kikumori T, Mase T, Itoh T, Nishikawa M, Hayashi H, Shibata A, Hibi Y, Takahashi M y Narita T. 1999. Wakame seaweed suppresses the proliferation of 7, 12-dimetilbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 90, 922-927.
- Formelli F, Barua A y Olson J. 1996. Bioactivities of N-(4-hidroxyphenyl) retinamide and retinoyl  $\beta$ -glucuronide. *FASEB J.* 10, 1014-1024.
- Gallardo de la O E, Rojas-Huidobro R, Solorio-Montoya C y Aceves C. 2000. Análisis de la desyodación en tejido mamario humano, normal y neoplásico. XXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Acapulco, Gro., p. C-115 (Resumen).
- García-Solís P y Aceves C. 2003. 5'Deiodinase in two breast cancer cell lines: effect of triiodothyronine, isoproterenol and retinoids. *Mol. Cell Endocrinol.* 201, 25-31.
- García-Solís P, Anguiano B, Aceves C. 2003. Yodo y cáncer mamario I. Efecto de la inducción del cotrasportador Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> (NIS) y la desyodasa tipo I (D1) mamarios por ácido retinoico en la susceptibilidad a la carcinogénesis por N-Metil-N-Nitrososurea (MNU). XII Congreso Latinoamericano de Nutrición. Acapulco, Gro., p. 232 (Resumen CBN-61).
- García-Solís P, Alfaro Y, Anguiano B, Delgado G, Guzman RC, Nandi S, Díaz-Muñoz, Vázquez-Martínez O y Aceves C. 2005a. Inhibition of N-methyl-N-nitrososurea-induced mammary carcinogenesis by molecular iodine (I<sub>2</sub>) but by iodide (I<sup>-</sup>) treatment. Evidence that I<sub>2</sub> prevents cancer promotion. *Mol Cell Endocrinol.* 236, 1-2.
- García-Solís P, Delgado G, Anguiano B y Aceves C. 2005b. Differential uptake and signaling of molecular iodine (I<sub>2</sub>) in lactating, virgin, or neoplastic mammary glands. 13<sup>th</sup> International Thyroid Meeting. *Thyroid* 15 (Supplement 1), S-128.
- Gerber B, Muller H, Reimer T, Krause A y Friese K. 2003. Nutrition and lifestyle factors on the risk of developing breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 79, 265-276.
- Ghafoor A, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R y Thun M. 2003. Trends in breast cancer by race and ethnicity. *CA Cancer J. Clin.* 53, 342-355.
- Ghent W, Eskin BA, Low D y Hill L. 1993. Iodine replacement in fibrocystic disease of the breast. *Can. J. Surg.* 36, 453-460.
- Gligorov J y Lotz JP. 2004. Preclinical pharmacology of the taxanes implications of the differences. *Oncologist.* 9 (2suppl), 3-8.
- Hayden L, Hawk S, Sih T y Satre M. 2001. Metabolic conversion of retinal to retinoic acid mediates the biological responsiveness of human mammary epithelial cells to retinol. *J Cell Physiol.* 186, 437-447.
- Houston R. 1999. Iodine. Physiology, dietary sources and requirements. En: MJ Sadler y JJ Strain y B Caballero (Eds.), *Encyclopedia of human nutrition.* (pp 1138-1146). San Diego: Academic Press.

- Howard A y Guterson BA. 2000. Human breast development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5, 1-19.
- Ip C, Thomson HJ y Ganther HE. 2000. Selenium modulation of cell proliferation and cell cycle biomarkers in normal and premalignant cells of the rat mammary gland. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 9, 49-54.
- Katamine S, Hoshino N, Totsuka K y Sususki M. 1985. Effects of the long-term (17-19 months) feeding of high-iodine eggs on lipid metabolism and thyroid function rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 31, 339-353.
- Kato N, Funahashi H, Ando K y Takagi H. 1994. Suppressive effect of iodine preparations on proliferation of DMBA-induced breast cancer in rat. *J. Jpn. Soc. Cancer Ther.* 29, 582-588.
- Kenkel J. 1994. *Analytical chemistry for technicians*, 2nd edition. Florida: CRC press LLC. Pp 164-166.
- Kessler JH. 2004. The effect of supraphysiologic levels of iodine on patients with cyclic mastalgia. *Breast J.* 10, 228-236.
- Kogai T, Shultz JJ, Johnson LS, Huang M y Brent GA. 2000. Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8519-8524.
- Kogai T, Kanamoto Y, Che LH, Taki K, Moatamed F, Schultz JJ y Brent GA. 2004. Systemic retinoic acid treatment induces sodium/iodide symporter expression and radioiodide uptake in mouse breast cancer models. *Cancer Res.* 64, 415-422.
- Kritchewsky D. 1997. Caloric restriction and experimental mammary carcinogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 46, 161-167.
- Kuppumbatti Y, Bleiweiss I, Mandeli J, Waxman S y Mirna-Y-López R. 2000. Cellular retinol-binding protein expression and breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 200, 475-480.
- Küpper FC, Schweigert N, Ar Gall E, Legendre J-M, Vilter H y Kloareg B. 1998. Iodine uptake in *Laminariales* involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodine. *Planta* 207, 163-171.
- Lacroix M, Toillon RA y Leclercq G. 2004. Stable 'portrait' of breast tumors during progression: data from biology, pathology and genetics. *Endocr. Relat. Cancer* 11, 497-522.
- Langer R, Burzler C, Bechtner G y Gartner R, 2003. Influence of iodide and iodolactones on thyroid apoptosis. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 111, 325-329.
- Lee PP, Darcy KM, Shudo K y Ip MM. 1995a. Interaction of retinoids with steroid and peptide hormones in modulating morphological and functional differentiation of normal rat mammary epithelial cells. *Endocrinology* 136, 1718-1730.
- Lee PP, Lee MT, Darcy KM, Shudo K y Ip MM. 1995b. Modulation of normal mammary epithelial cell proliferation, morphogenesis, and functional differentiation by retinoids: a comparison



- of the retinobenzoic acid derivative RE80 with retinoic acid. *Endocrinology*. 136, 1707-1717.
- Le Marchand L, Kolonel LN y Nomura AM. 1985. Breast cancer survival among Hawaiian Japanese and Caucasian women. Ten year rates and survival by place of birth. *Am. J. Epidemiol.* 122, 571-578.
- Limer JL y Speirs V. 2004. Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res.* 6, 119-127.
- Lockshin RA y Zackeri Z. 2004. Caspase-independent cell death? *Oncogene* 23, 2766-2773.
- López ML, Aguiano B, Izaguirre O y Aceves C. 2002. Efecto diferencial de la hipervitaminosis A sobre la desyodación de tironinas en ratas lactantes. XXIV Congreso Nacional Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. Puerto Vallarta, Jal., p. C-68 (Resumen).
- Lotan R. 1996. Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J.* 10, 1031-1039.
- Lotcher A. 1998. Plasticity of mammary epithelia during normal development and neoplastic progression. *Biochem. Cell Biol.* 76, 997-1008.
- Lucy JA y Lichti Fu. 1969. reactions of vitamin A with acceptors of electrons. Interactions with iodine and the formation of iodide. *Biochem J.* 122, 231-241.
- Mallon E, Osin P, Nasisri N, Blain I, Howard B y Guterson B. 2000. The basic pathology of human breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5, 139-163.
- Malvezzi M, Bosetti C, Chatenoud L, Rodríguez T, Levi F, Negri E y La Vecchia C. 2004. Trends in cancer mortality in México, 1970-1999. *Ann. Oncol.* 15, 1712-1718.
- Mangelsdorf D, Thimm C, Beato M, Herlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P y Evans R. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Masso-Welch PA, Darcy KM, Stangle-Castor NC e Ip MM. 2000. A development atlas of rat mammary gland histology. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5, 165-185.
- McDowell LR. 1992. *Minerals in animal and human nutrition*. San Diego: Academic Press. Pp. 225-245.
- McMahon B, Cole T, Lin M, Mirra A, Ravnihar B, Salber E, Valaroas V y Yuasa S. 1970. Age at first birth and breast cancer risk. *Bull. World Health Organ.* 43, 209-221.
- Medina D. 1996. The mammary gland: A unique organ for the study of development and tumorigenesis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1, 5-19.
- Medina D. 2000. Mouse models for mammary cancer. En: BB Asch (Ed). *Methods in mammary gland biology and breast cancer research*. (pp. 3-17). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Medina D y Thompson HJ. 2000. A comparison of the salient features of mouse, rat, and human mammary tumorigenesis. En: BB Asch (Ed). *Methods in mammary gland biology and breast cancer research*. (pp. 31-36). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Mephan TB. 1987. *Physiology of lactation*. Philadelphia: Open University Press.

- Miller WR. 1994. *Medical Intelligence Unit: Estrogen and breast cancer*. Austin Texas. R. G. Landers Company. Pp 1-53.
- Mirna-Y-López R, Li W, Kuppumbatti Y, rexer B, Jing Y y Ong D. 2000. Retinol conversion to retinoic acid is impaired in breast cancer cell lines relative to normal cells. *J. Cell Physiol.* 185, 302-309.
- Miyagi M, Yokoyama H, Shiraishi H, Matsumoto M y Ishii H. 2001. Simultaneous quantification of retinol, retinal, and retinoic acid isomers by high performance liquid chromatography with a simple gradient. *J. Chromatogr. B* 757, 365-368.
- Moon RC y Constantinou AI. 1997. Dietary retinoids and carotenoids in rodent models of mammary tumorigenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 46, 181-189.
- Mora O, Romano JL, Gonzalez E, Ruiz F y Shimada A. 2000. Low cleavage activity of 15, 15'-dioxygenase to convert  $\beta$ -carotene to retinal in cattle compared with goats, is associated with the yellow pigmentation of adipose tissue. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 70, 199-205.
- Mukai T y Sekiguchi M. 2002. Gene silencing in phenomena related to DNA repair. *Oncogene* 21, 9033-9042.
- Murkies AL, Wilcox G y Davis SR. 1998. Phytoestrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 297-303.
- Mutaku JF, Poma J-F, Many M-C, Deneff J-F y van den Hove M-F. 2002. Cell necrosis and apoptosis are differentially regulated during goiter development and iodine-induced involution. *J. Endocrinol.* 172, 375-386.
- Nandi S, Guzman RC y Yang J. 1995. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: A unifying hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 3650-3657.
- Nicotera P y Melino G. 2004. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 23, 2757-2765.
- Osborne C, Wilson P y Tripathy D. 2004. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 9, 361-377.
- Okamoto T, Fujimoto N, Gotoh T y Ito A. 1995. Effect of retinoic acid RA in MNU-induced rat mammary tumors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 768, 223-226.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J y Pisani P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* 55, 74-108.
- Pfahl M y Chytil F. 1996. Regulation of metabolism by retinoic acid and its nuclear receptors. *Ann. Rev. Nutr.* 16, 257-283.
- Pisarev M y Gärtner R. 2000. Autoregulatory actions of iodine. En: E Braverman y R Utiger (Eds.), *Werner and Ingbar's The Thyroid. A fundamental and Clinical Text.* (pp. 85-90). Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins.
- Ray G, Batra S, Shukla NK, Deo S, Raina V, Ashok S y Husain SA. 2000. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 59, 163-170.

- Rillema JA y Hill MA. 2003. Prolactin regulation of the pendrin-iodide transporter in the mammary gland. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284: E25-E28.
- Romieu I, Lazcano-Ponce E, Sánchez-Zamaorano LM, Willet W y Hernández-Ávila M. 2004. Carbohydrates and the risk of breast cancer among Mexican women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13, 1283-1289.
- Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR y van Zwieten MJ. 1990. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest.* 62, 244-278.
- Russo J y Russo IH. 2000. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 5, 187-200.
- Russo J y Russo IH. 2004. Genotoxicity of steroidal estrogens. *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 211-214.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Recursos Naturales y Pesca. 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y usos de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación.* Estados Unidos Mexicanos. 22 de agosto.
- Shen Q y Brown PH. 2003. Novel agents for the prevention of breast cancer: targeting transcription factors and signal transduction pathways. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 8, 45-73.
- Shennan DB. 2001. Iodide transport in lactating rat mammary tissue via a pathway independent from the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> cotransporter: evidence for sulfate/iodide exchange. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 1359-1363.
- Sherer T, Tharll K y Bull R. 1991. Comparison of toxicity induced by iodine and iodide in male and female rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 32, 89-101.
- Smyth PP. 2003. Role of iodine in antioxidant defence in thyroid and breast in thyroid and breast disease. *BioFactors* 19, 121-130.
- Song S, Wientjes MG, Walsh C y Au JL. 2001. Nontoxic doses of suramin enhance activity of paclitaxel against lung metastases. *Cancer Res.* 61, 6145-6150.
- Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL y Smith JM. 1976. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed. Proc.* 35, 1332-1338.
- Sporn MB, Suh N y Mangelsdorf DJ. 2001. Prospects for prevention and treatment of cancer with selective PPAR-gamma modulators (SPARMs). *Trends Mol. Med.* 7, 395-400.
- Satrk A, Kossoy G, Zusman I, Yarde G y Madar Z. 2003. Olive oil consumption during pregnancy and lactation in rat influences mammary cancer development in female offspring. *Nutr. Cancer* 46, 59-65.
- Strasser-Weippl K y Goss PE. 2003. Prevention of breast cancer using SERMs and aromatase inhibitors. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 8, 5-18.
- Strum JM. 1978. Site of iodination in rat mammary gland. *Anat. Rec.* 192: 235-244.
- Szyf M, Pakneshan P y Rabbani SA. 2004. DNA methylation and breast cancer. *Biochem. Pharmacol.* 68, 1187-1197.

- Taurog A. 2000. Hormone synthesis: Thyroid iodine metabolism. En E Braverman y R Utiger (Eds.), *Werner and Ingbar's The Thyroid. A fundamental and Clinical Text.* (pp. 61-85). Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins.
- Tazebay U, Wapnir I, Levy O, Dohan O, Zuckier L, Hua-Zhao Q, Deng H, Amenta P, Fineberg S, Pestell R y Carrasco N. 2000. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nature Med.* 6, 871-877.
- Teas J, Harbison M y Gelman R. 1984. Dietary seaweed (*Laminaria*) and mammary carcinogenesis in rats. *Cancer Res.* 44, 2758-2761.
- Teelmann K, Tsukaguchi T, Klaus M y Eliason JF. 1993. Comparison of the therapeutic effects of a new arotinoid, Ro 40-8757, and all-*trans* and 13-*cis* retinoic acids on rat breast cancer. *Cancer Res.* 53, 2319-2325.
- Teplitzky SR, Kiefer TL, Cheng Q, Dwivedi PD, Moroz K, Myers L, Anderson MB, Collins A, Dai J, Yuan L, Springgs LL, Blask DE y Hill SM. 2001. Chemoprevention of NMU-induced rat mammary carcinoma with the combination of melatonin and 9-*cis* retinoic acid. *Cancer Lett.* 168, 155-163.
- Thompson HJ. 2000 Methods for the induction of mammary carcinogenesis in the rat using either 7,12-dimethylbenz[a]anthracene or 1-methyl-1-nitrosourea. En: Ip, M., Asch, B.B. (Eds.), *Methods in mammary gland biology and breast cancer research*, 8th. (pp 19-29). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Thompson H y Sporn MB. 2002. Mammary cancer in rats. En: Teicher BA (Ed.), *Tumor models in cancer research.* (pp. 173-181). Totowa, NJ: Humana Press.
- Thrall, K.D, Sauer, R.L y Bull R.J. 1992. Evidence of thyroxine formation following iodine administration in Sprague-Dawley rats. *J. Toxicol. Environ. Health.* 37, 535-548.
- Valverde-R C y Aceves C. 1989. Circulating thyronines and peripheral monodeiodination in lactating rats. *Endocrinology* 124, 1340-1344.
- Valverde-R C, Aceves C y Navarro L. 1993. Hormonas a la medida y para toda ocasión. *Ciencia y Desarrollo* 111, 22-33.
- Venturi S, Donati FM, Venturi M y Venturi A. 2000. Role of iodine in evolution and cacinogenesis of thyroid, breast and stomach. *Adv. Clin. Pathol.* 4, 11-17.
- Vitale M, Matola D, D'Ascoli F, Salzano S, Bogazzi F, Fenzi G, Martino E y Rossi G. 2000. Iodine excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress. *Endocrinology* 141, 598-605.
- Yamamoto I, Maruyama H y Moriguchi M. 1987. The effect of dietary seaweeds on 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Lett.* 35, 109-118.
- Yang L, Tin-U C, Wu K y Brown P. 1999. Role of retinoids receptors in the prevention and treatment of breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 4, 377-388.

- WCRF/AICR. 1997. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective (Summary).  
World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research: Washington, DC.  
Pp.1-16.
- Williams K, Schwartz A, Corey S, Orandle M, Kennedy W, Thompson B, Alvarez X, Brown C, Garther S, Lackner A. 2002. Proliferating cellular nuclear antigen expression as a marker of perivascular macrophages in Simian immunodeficiency virus encephalitis. *Am. J. Path.* 161, 575-585.
- Wynne-Edwards KE. 2001. Breast cancer and prevention from an evolutionary perspective. En: The Canadian Breast Cancer Initiative (Eds.), Workshop on the primary prevention of breast cancer. Review of lifestyle and environmental risk factors of breast cancer, Vol. 3. (pp 1-31). Ottawa: The Canadian Breast Cancer Initiative.
- Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM y West DW. 1993. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 1819-1827.
- Zhang L, Sharma S, Zhu LX, Kogai T, Hershman JM, Brent GA, Dubinett SM y Huang M. 2003. Nonradioactive iodide effectively induces apoptosis in genetically modified lung cancer cells. *Cancer Res.* 63, 5067-5072.

# **ANEXOS**

**ANEXO 1. Factores de riesgo de cáncer mamario.**

## **ANEXO 1.** Factores de riesgo de cáncer mamario.

Herencia.

La historia familiar constituye el más fuerte y conocido factor de riesgo para el desarrollo de cáncer mamario. Las mujeres que tienen un árbol familiar en donde varios de sus parientes consanguíneos tuvieron cáncer mamario tienen una mayor probabilidad de padecerlo con respecto a la población general. Gracias a una intensa investigación en familias con historial de cáncer mamario se han logrado identificar algunos genes que involucrados en la susceptibilidad para el desarrollo de cáncer. Sin embargo, las investigaciones realizadas muestran que solo un 5-10% de la incidencia de cáncer mamario se debe a la herencia (Arver et al., 2000; Charpentier y Aldaz, 2002).

Los análisis genéticos de las familias con cáncer mamario sugieren la existencia de varios tipos de cáncer mamario familiar los cuales se pueden clasificar en: 1) Cáncer mamario específico, este tipo es el más frecuente y ocurre en familias en ausencia de cualquier otra neoplasia; 2) Síndrome de cáncer mamario y de ovario, que se caracteriza por una aparición en edades tempranas de la vida y alto grado de bilateralidad; 3) Síndrome de Li-Fraumeni, que se caracteriza por una aparición temprana de los tumores, bilateralidad, y asociado con otros tipos de cáncer en la familia como leucemia, sarcomas, tumores cerebrales, y carcinoma adrenocorticales; 4) La enfermedad de Cowden, la cual es una enfermedad autosómica dominante muy rara también conocida como síndrome de múltiples hamartomas, tanto benignos como malignos. 5) Adicionalmente existen otras formas más raras como son el síndrome Peutz-Jeghers, la ataxia talangectasia y el síndrome Muir Torre que es una variante del síndrome Lynch II. Este último es causado por mutaciones en genes de reparación del DNA y se ha asociado con la inestabilidad en secuencias de microsatélites (Arver et al., 2000; Charpentier y Aldaz, 2002).

Los tipos de cáncer mamario hereditario o familiar más importantes son tanto el específico como el síndrome de cáncer mamario y de ovario cuyos genes involucrados se les conoce como *BCRA1* y *BCRA2* (Arver et al., 2000; Charpentier



y Aldaz, 2002). Las mutaciones en el *BRCA1* se encuentran un 40-45% de los casos de cáncer familiar mientras que el *BRCA2* se encuentra en un 30-35%. El gen *BRCA1* se localiza en el brazo largo del cromosoma 17q21 y codifica para una fosfo-proteína nuclear de 1, 863 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 220-kDa. En el extremo amino terminal se ubica el dominio llamado RING donde interactúa con la proteína asociada al dominio ring de BRCA (BARD1). En el carboxilo terminal se encuentran un dominio de activación transcripcional que contiene un tándem repetido de 95 residuos de aminoácidos denominado repetido BCR. El BCR es similar a los dominios que se encuentra proteínas de reparación del DNA y de proteínas de puntos de control del ciclo celular como son *p53*, *53BP1*, *RAD9*, *RAD4*, *Crb2* y *RAP1*. Entre las funciones descritas del *BRCA1* se encuentra la reparación del DNA, inhibición de la proliferación celular y regulación de la transcripción. En lo que respecta al gen *BRCA2* este se ubica en el cromosoma 13q12 y codifica para una proteína de 3, 418 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 384-kDa, que participa en la reparación del DNA (Arver et al., 2000; Charpentier y Aldaz, 2002; Rosen et al., 2003).

Por otra parte, en el síndrome Li-Fraumeni se ha encontrado que al menos un 50% de los casos el gen de *p53* se encuentra mutado desde la línea germinal y recientemente se ha señalado otro gen denominado *CHK2* (Cinasa de puntos de control del ciclo celular) del que está mutado en la línea germinal de las familias con el síndrome de Li-Fraumeni. Por otra parte, en la enfermedad de Cowden se ha señalado que el gen relacionado con esta enfermedad es el denominado *PTEN*, *MMAC1* o *TEP1*. El gen *PTEN* se conforma de 9 exones que codifican para un polipéptido de 404 residuos de aminoácidos, que contiene un dominio de proteína tirosina fosfatasa. La actividad que se predice para este gen implica la habilidad de modular las cascadas de señalización de proliferación celular mediadas por fosfatos (Arver et al., 2000; Osborne et al., 2004).

Otro síndrome asociado al cáncer mamario familiar es el síndrome Peutz-Jeghers, el cual se caracteriza por maculas melanocíticas en los labios, múltiples pólipos de tipo hamartoma en el tracto gastro-intestinal y un riesgo mayor de desarrollar cáncer mamario y gastro-intestinal. El riesgo de desarrollar varios tipos

de neoplasias en los pacientes Peutz-Jeghers es de 18 a 20 veces mayor con respecto a la población general. El gen mutado relacionado con el síndrome Peutz-Jeghers se le denominó *STK1/LKB1* y codifica para una proteína de 433 residuos de aminoácidos con actividad de serina-treonina cinasa (Arver et al., 2000).

**Tabla I. Mutaciones en genes de cáncer mamario familiar**

	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA1-2</i>	<i>BRCA2</i>	<i>p53</i>	<i>PTEN</i>	<i>STK11</i>	<i>ATM</i>
Mutaciones somáticas en cáncer mamario esporádico	Raro		Raro	20-40%	Raro	Raro	Raro
Familias de cáncer mamario y de ovario	10-40 %		5-15 %	Raro			
Familias de cáncer mamario	1-11 %		5-15 %	Raro	Raro	Raro	Raro
Cáncer mamario de aparición temprana	3-13 %		1-2 %	Raro		Raro	Raro
Mutaciones fundadoras:							
Judíos Ashkenazi familias con cáncer mamario y de ovario ( <i>BRCA1-BRCA2</i> )		40%					
Judíos Ashkenazi, mujeres con cáncer mamario temprano	20%	23-48%					
Judíos Ashkenazi, mujeres con cáncer mamario y de ovario	12%		3-8%				
Judíos Ashkenazi, mujeres con cáncer de ovario		40%					
Judíos Ashkenazi, población		2%					
Islandia, población		0.5%					
Islandia, pacientes con cáncer mamario			8%				
Islandia, pacientes con cáncer de ovario			8%				
Islandia, pacientes hombres con cáncer mamario			40%				
Familias con síndrome de Li-Fraumeni				50%			
Familias con enfermedad de Cowden					30-50%		
Familias con enfermedad de Peutz-Jeghers						70%	
Familias AT							30-40%

Modificado de Arver et al., 2000.

Finalmente, otro gen relacionado con el cáncer mamario familiar es el gen *ATM*. Este gen se encuentra mutado en las familias con ataxia talangiectasia, esta enfermedad se caracteriza por ataxia cerebelosa, talangiectasia oculo-cutánea, inmunodeficiencia, hipersensibilidad a la radiación y predisposición al desarrollo de neoplasias. Las personas con ataxia talangiectasia tienen 100 veces mayor riesgo que la población general de desarrollar neoplasias, en particular la leucemia y el linfoma. El riesgo relativo de cáncer mamario en las familias con ataxia talangiectasia es de 3.9. El gen *ATM* se encuentra localizado en cromosoma 11q22-33 y codifica para una proteína de 3056 residuos de aminoácidos y que en su carboxilo terminal presenta un dominio catalítico de fosfatidil-inositol-3'-cinasa. El papel de *ATM* en el cáncer mamario no se ha dilucidado totalmente pero se

sugiere que participa interactuando con *BCRA1*. El *BCRA1* es fosforilado en la fase S del ciclo celular en respuesta a daño en el DNA y se sugiere que dicha fosforilación depende de *ATM* (Arver et al., 2000). En la Tabla I se presenta un resumen de los genes involucrados en el cáncer mamario familiar.

Endocrinos y reproductivos.

Los estrógenos tienen un papel esencial, junto con otras hormonas, en el desarrollo de los órganos sexuales femeninos, y características sexuales secundarias, la regulación del ciclo menstrual y la reproducción. Se ha propuesto que muchos de los factores de riesgo de tipo reproductivo asociados al cáncer mamario se deben a mecanismos hormonales donde los estrógenos están especialmente involucrados (Travis y Key, 2003). Además como ya se comentó, los estrógenos participan de manera muy importante en los mecanismos patogénicos del cáncer mamario.

La observación de la asociación de cáncer de mama con factores reproductivos fue una de las primeras evidencias en la descripción de factores de riesgo. Ya en 1770, Ramazzini (citado en Lazcano-Ponce et al., 1996) documentó que las monjas dada su condición de nubilidad presentaban una frecuencia mayor en el riesgo de padecer cáncer mamario. Más tarde Rigoni-Stern en 1844 quien con el registro de cáncer de Verona de 1760 1839 documentó que las mujeres solteras tenían una frecuencia mayor de cáncer de mama que las casadas (citado en Lazcano-Ponce et al., 1996). En efecto, rasgos reproductivos en las mujeres como la nulíparidad, la menarca temprana, la menopausia tardía y una edad avanzada para el primer embarazo se relacionan con un mayor riesgo de cáncer mamario (Tabla II). Por otra parte el embarazo antes de los 20 años, la menarca tardía, la menopausia temprana y la ovariectomía en las mujeres menores de 35 años de edad y se cuentan como factores que protegen contra el cáncer mamario (Tabla II). Estudios realizados en México muestran una asociación negativa entre la disminución de la fertilidad debido al control de la natalidad y el aumento de la mortalidad de cáncer mamario (López-Ríos et al., 1997). Este conjunto de datos

ha dado lugar a la hipótesis de que el periodo entre el inicio de la menstruación y la edad del primer embarazo es una ventana crítica en la iniciación del desarrollo de cáncer mamario. Se sabe que el 75% de los casos de cáncer mamario ocurre en mujeres posmenopáusicas sin embargo entre los 45 y 50 años el parénquima mamario anatómica y funcionalmente ya se encuentra atrofiado. Esto sugiere que la iniciación del tumor puede ocurrir muchos años antes de que ocurra la manifestación clínica como sería en la ventana de la menarca al primer embarazo, que es cuando existe un ambiente hormonal más fluctuante y un epitelio mamario más abundante y altamente responsivo (Marchant, 1997).

**Tabla II. Determinantes endocrino-reproductivos y familiares de cáncer mamario.**

<b>Factor</b>	<b>Riesgo relativo</b>
<b>Historia reproductiva</b>	
Menarca antes de los 12 años	1.7-3.4
Menarca después de los 17 años	0.3
Menopausia antes de los 45 años	0.5-0.7
Menopausia de los 45 a los 54 años	1.0
Menopausia después de los 55 años	1.5
Ovariectomía antes de los 35 años	0.4
Ciclos menstruales anovulatorios	2.0-4.0
Embarazo a término antes de los 20 años	0.4
Primer embarazo a término entre los 20 y 34 años	1.0
Primer embarazo a término antes después de los 35 años	1-5-4.0
Nuliparidad	1.3-4.0
<b>Historia de cáncer mamario en la familia</b>	
Pariente de primer grado con cáncer mamario	1.8
Pariente de primer grado con cáncer mamario en posmenopausia	1.5
Pariente de primer grado con cáncer mamario en premenopausia	3.0
Pariente de primer grado con cáncer mamario bilateral en posmenopausia	4.0-5.4
Pariente de primer grado con cáncer mamario bilateral en premenopausia	9.0

Modificada de Marchant 1997.

Por otra parte, otro factor reproductivo muy importante que ha sido estudiado como posible factor de riesgo es el uso de anticonceptivos hormonales. El uso de anticonceptivos hormonales a base de estrógenos y progestágenos es la

forma de anticoncepción más utilizada en el mundo bajo diferentes modalidades, dosis y combinaciones de esteroides (Travis y Key, 2003). En diversos estudios epidemiológicos no se ha encontrado una asociación consistente entre el uso de anticonceptivos orales y el riesgo de cáncer mamario. Algunos estudios sin embargo, han identificado que dicho riesgo se incrementa en mujeres que inician el consumo de anticonceptivos orales antes de los 25 años y por un periodo mayor a veinte años, y que tiene factores de riesgo asociados tales como antecedente de enfermedad benigna de mama, nuliparidad, edad temprana de la menarca y con historia familiar de cáncer de mama (Lazcano-Ponce et al., 1996). En un estudio de meta-análisis se documentó que las mujeres que habían consumido en los últimos 10 años anticonceptivos o que estaban consumiendo en este momento anticonceptivos orales a base de un estrógeno y un progestágeno mostraron un incremento leve de riesgo de cáncer (riesgo relativo [Intervalo de confianza de 95%] las mujeres que estaban consumiendo en ese momento, 1.24 [1.15-1.33]; mujeres que dejaron de consumirlos desde hace 1 y hasta 4 años, 1.6 [1.08-1.23]; mujeres que dejaron de consumirlos desde hace 5 y hasta 9 años, 1.07 [1.02-1.13]; y mujeres con más de 10 años que dejaron de consumirlos, 1.01 [0.96-1.05] (Collaborative group on hormonal factors in breast cancer (CBC), 1996). Los datos generados en la actualidad apuntan a la misma dirección, sin embargo, las formulaciones de los anticonceptivos siguen cambiando y nueva investigación será necesaria (Travis y Key, 2003).

Otro punto importante a considerar es el de la terapia hormonal de reemplazo, que se practica en las mujeres menopáusicas para la prevención de osteoporosis y enfermedades coronarias. En un estudio de meta-análisis se documentó que las mujeres que fueron tratadas con el reemplazo hormonal por más de 5 años presentaron un aumento del 35% en el riesgo de cáncer mamario mientras que las mujeres que estaban recibiendo en ese momento o que dejaron la terapia de reemplazo de 1 y hasta 4 años, presentaron un incremento en el riesgo de cáncer mamario de un 2.3% por cada año que estuvieron bajo terapia (CBC, 1997). Los resultados de estos estudios no discriminan entre el tipo de terapia hormonal de reemplazo, sin embargo estudios recientes muestran que el

uso de combinaciones de estrógenos y progestinas por 5 años, se ha asociado con un 26-30 % de aumento en el riesgo de cáncer mamario. Por otra parte el uso de la terapia hormonal de reemplazo con estrógenos y progestinas también se ha asociado a un aumento en la incidencia de carcinomas lobulares invasores (ILC) (Li et al., 2003), El ILC por lo regular es dependiente de hormonas y tienen mejor pronóstico que el IDC, sin embargo, debido a su tipo de crecimiento en hojas en lugar de una masa sólida el ILC es más difícil de detectar tanto por examen físico como por mamografía que el IDC y esto hace que se diagnostique tardíamente (Li et al, 2003).

Ambientales.

a. Radiación.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la exposición a dosis de radiación ionizante se asocia con un mayor riesgo de cáncer de mama. Las mujeres japonesas sobrevivientes de las bombas atómicas en Hiroshima y Nagasaki desarrollaron más cáncer mamario que una población control pareada por edad. El riesgo de desarrollar cáncer mamario por esta condición parece estar relacionada con la dosis recibida y a la edad de exposición a la radiación. De este modo, las mujeres expuestas durante la pubertad y hasta antes de los 30 años, fueron más susceptibles a desarrollar cáncer mamario. Otros estudios muestran que las mujeres tratadas con altas dosis de rayos-X por mastopatía o que recibieron múltiples fluoroscopias en el pecho como parte del proceso de evaluación de tratamientos contra la tuberculosis también tuvieron mayor riesgo de desarrollar cáncer mamario (Miller, 1994; Marchant, 1997).

b. Carcinógenos químicos.

Frecuentemente se ha postulado que algunos contaminantes ambientales están asociados al desarrollo de cáncer mamario. Uno de este tipo de factores es la exposición a agentes plaguicidas organoclorados y compuestos relacionados

como el DDT (bis(4-cloro-fenil)-1,1,1-tricloroetano) y su principal metabolito el DDE (bis(4-clorofenil)-1,1,dicloroetano) (DeBruin y Josephy, 2002). Este tipo de compuestos tienen vidas medias muy largas y se acumulan en el tejido adiposo. De hecho, este tipo de compuestos se han encontrado en la leche y tejido adiposo de mama en concentraciones 200 a 300 veces mayores en las que se encuentran en suero. A este respecto varios hidrocarburos halogenados han sido encontrados en tejido graso de mujeres con cáncer mamario con niveles comparativamente mayores a mujeres con enfermedad benigna de mama. Sin embargo, seis estudios de casos y controles que han examinado la relación entre la exposición con agentes organoclorados y cáncer de mama tienen resultados inconsistentes (DeBruin y Josephy, 2002; Lazcano-Ponce et al., 1996).

## Referencias.

- Arver B, Du Q, Chen J, Luo L y Lindblom A. 2000. Hereditary breast cancer: a review. *Semin. Cancer Biol.* 10, 271-288.
- Charpentier A y Aldaz CM. 2002. The molecular basis of breast cancer. En: WB Coleman y GJ Tsongalis (Eds.), *The molecular basis of human cancer.* (pp. 347-363). New Jersey: Humana Press.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 1996. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet.* 347, 1713-27.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 1997. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet* 350, 1047-59.
- DeBruin LS y Josephy PD. 2002. Perspectives on the chemical etiology of breast cancer. *Environ. Health Perspect.* 110 (Suppl 1), 119-28.
- Lazcano-Ponce EC, Tovar-Guzmán V, Alonso-De Ruiz P, Romieu I y López-Carrillo L. 1996. Cáncer de mama. Un hilo conductor histórico, presente y futuro. *Salud Pública Mex.* 38,139-152.
- López-Ríos O, Lazcano-Ponce EC, Tovar-Guzmán V y Hernández-Ávila M. 1997. La epidemia de cáncer de mama en México. ¿Consecuencia de la transición demográfica? *Salud Pública Mex.* 39, 259-265.
- Li CI, Anderson BO, Daling JR y Moe RE. 2003. Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. *JAMA* 289, 1421-1424.
- Marchant DJ. 1997. Risk Factors. En: DJ Marchant (Ed). *Breast disease.* (pp. 115-133). Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders Company.
- Miller WR. 1994. *Medical Intelligence Unit: Estrogen and breast cancer.* Austin Texas. R. G. Landers Company.
- Osborne C, Wilson P y Tripathy D. 2004. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 9, 361-377.
- Rosen EM, Fan S, Pestell RG y Goldberg ID. 2003. BRCA1 in hormone-responsive cancers. *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 378-385.
- Travis RC y Key TK. 2003. Oestrogen exposure and breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* 5, 239-247.

**ANEXO 2.** García-Solís P, Alfaro Y, Delgado G, Anguiano B, Guzmán R, Nandi S, Vázquez-Martínez O, Díaz-Muñoz M, Aceves C. 2005. **Inhibition of MNU-induced mammary carcinogenesis by molecular iodine (I<sub>2</sub>) but not by iodide (I<sup>-</sup>) treatment. Evidence that I<sub>2</sub> prevents cancer promotion.** *Molecular and Cellular Endocrinology* 236 (1-2), 49-57.



# Inhibition of *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis by molecular iodine (I<sub>2</sub>) but not by iodide (I<sup>-</sup>) treatment Evidence that I<sub>2</sub> prevents cancer promotion

Pablo García-Solís<sup>a</sup>, Yunuen Alfaro<sup>a</sup>, Brenda Anguiano<sup>a</sup>, Guadalupe Delgado<sup>a</sup>,  
Raphael C. Guzman<sup>b</sup>, Satyabrata Nandi<sup>b</sup>, Mauricio Díaz-Muñoz<sup>a</sup>,  
Olivia Vázquez-Martínez<sup>a</sup>, Carmen Aceves<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Km 15 Carretera Qro-SLP, Juriquilla, Querétaro 76230, Mexico  
<sup>b</sup> Cancer Research Laboratory, University of California, Berkeley, CA 94720, USA

Received 15 September 2004; received in revised form 23 February 2005; accepted 2 March 2005

## Abstract

We analyzed the effect of molecular iodine (I<sub>2</sub>), potassium iodide (KI) and a subclinical concentration of thyroxine (T4) on the induction and promotion of mammary cancer induced by *N*-methyl-*N*-nitrosourea. Virgin Sprague-Dawley rats received short or continuous treatment. Continuous I<sub>2</sub> treated rats exhibited a strong and persistent reduction in mammary cancer incidence (30%) compared to controls (72.7%). Interruption of short or long term treatments resulted in a higher incidence in mammary cancer compared to the control groups. The protective effect of I<sub>2</sub> was correlated with the highest expression of the I<sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> transporter pendrin and with the lowest levels of lipoperoxidation expression in mammary glands. Triiodothyronine serum levels and Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter, lactoperoxidase, or p53 expression did not show any changes. In conclusion continuous I<sub>2</sub> treatment has a potent antineoplastic effect on the progression of mammary cancer and its effect may be related to a decrease in the oxidative cell environment.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Iodine; Lipoperoxidation; Mammary cancer; MNU; Rats

## 1. Introduction

Reproductive history has a consistent effect on increasing or decreasing the risk of developing breast cancer. Early age at menarche, late age at menopause, and nulliparity increase the risk of a woman for developing breast cancer. Conversely, late age at menarche, early age at menopause, and early age at first pregnancy decrease this risk. However, a majority of women that develop breast cancer do not have any of these risk factors (Seidman et al., 1982). There is compelling evidence showing that endocrine systems other than the reproductive one may play a role in breast carcinogenesis. Earlier studies and sev-

eral recent ones support the notion of a possible link between breast cancer and thyroid function or iodine intake (Cann et al., 2000). Although the evidence that abnormal thyroid function increases the risk of breast cancer remains controversial, subclinical hypo- or hyper-thyroidism have been associated with an increase in MNU-induced mammary cancers or with a reduction in the tumor size, respectively (Jull and Huggins, 1960; Milmore et al., 1982). The mechanisms by which thyroid hormones (TH) exert these effects are not clear. It is well established that TH alters the secretion of gonadotropins, as well as the metabolism and receptor binding of steroid hormones. Thyronines also play an important regulatory role in both growth hormone and prolactin secretion (Anderson et al., 2000). Another possible mechanism may involve iodine per se. Iodine is a well-known micronutrient essential for TH synthesis in all vertebrates, as well as a promoter of metamor-

\* Corresponding author. Tel.: +52 4422381067; fax: +52 4422381038.  
E-mail address: caracev@servidor.unam.mx (C. Aceves).

phosis or transformation of life stages (pupa to larvae, larvae to adult, sessile to free life, etc) in several invertebrates. Recently several authors have proposed that iodine acts as a powerful antioxidant agent or even binds to lipids to regulate cellular proliferation (Pisarev and Gartner, 2000; Venturi et al., 2000; Smyth, 2003). Moreover, it has been well demonstrated that the gastrointestinal tract is able to uptake iodine as both molecular iodine ( $I_2$ ) and iodide ( $I^-$ ). The distribution of these two species in blood, stomach, skin and thyroid gland is different (Thrall and Bull, 1990).  $I^-$  appears more efficient than  $I_2$  in restoring the thyroid gland to its normal state from the goitrous condition found in iodine deficiency. However, the opposite seems to occur in the mammary gland. Iodine deficiency has been shown to alter the structure and function of the mammary glands of rats, especially alveolar cells.  $I_2$  is distinctly more effective than  $I^-$  in diminishing ductal hyperplasia and perilobular fibrosis in mammary glands, using the same total iodine doses in both treatments (Eskin et al., 1995).

The importance of  $I_2$  in the treatments for mammary glands dysfunctions has been corroborated in human and animal models. Seaweeds, widely consumed in Asian countries such as *wakame*, *nori* or *mekabu* (used in sushi, soup, salads, and in powdered form as a condiment), contain high quantities of iodine in several chemical forms, i.e. iodine,  $I_2$  and organified to proteins. They have been associated with the low incidence of benign and malignant breast disease in Japanese women (iodine average consumption in the Japanese population is 5280  $\mu\text{g}/\text{day}$  versus 166–209  $\mu\text{g}/\text{day}$  in Occidental populations, UK and USA, respectively) (Cann et al., 2000). Traditional Eastern breast cancer medicine has long used iodine-rich seaweeds as a cancer treatment to “soften” tumors and “reduce” nodulation. In 7,12 dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene (DMBA)-induced mammary carcinoma in rats, Lugol’s solution (mixture of  $I^-$  and  $I_2$ ) supplementation exerts a suppressive effect on the development of mammary neoplasia (Kato et al., 1994). In subjects with iodine-deficient goiter, it is well known that Lugol’s solution administration effectively reduces thyroid size. Similarly,  $I_2$  treatment of patients with benign breast disease is accompanied by a significant bilateral reduction in breast size, in addition to causing a remission of disease symptoms, which is not observed when  $I^-$  or protein-bound iodide was administrated (Ghent et al., 1993).

Several investigators have identified and characterized two different  $I^-$  active transports, the  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  symporter (NIS) and  $\text{Cl}^-/\text{I}^-$  transporter identified as pendrin (PEN) in several organs including thyroid and mammary gland (Carrasco, 2000; Soleimani et al., 2001; Rillema and Hill, 2003). It has been observed that sera from breast cancer patients with positive thyroid-peroxidase (TPO) antibodies exhibit a potent inhibitor effect on  $I^-$  uptake in their own breast cancer tissue as well as in positive-NIS cells cultured (Kilbane et al., 2000), however, no studies in relation to  $I_2$  uptake are available.

In relation to a possible generation of intracellular  $I_2$ , recent data show that the mammary gland of pubertal, pregnant and lactating rats express a rapid deiodinase enzyme called type 1 (Dio1), which locally converts the prohormone T4 into the active thyroid hormone, T3. This conversion also results in high intracellular concentrations of iodine (Aceves et al., 1999). Although the chemical form of the iodine that results from deiodination has not been determined, it possibly corresponds to a different and perhaps more reactive form than  $I^-$ . This notion is supported by preliminary observations by our group showing that the  $\text{Na}^{125}\text{I}$  uptake from serum exhibits a different compartmental profile than that observed for  $^{125}\text{I}$  generated by deiodination of  $^{125}\text{I}$ -T4 in lactating mammary gland (Aceves et al., 2005). In addition, we have found that in human breast cancer (Gallardo de la O et al., 2000), rat MNU-induced mammary cancer (Aceves et al., 2002), or in immortalized cell lines (García-Solís and Aceves, 2003), the expression of Dio1 is reduced. Deiodinase is increased in response to retinoic acid treatment only in tumors arising during the first 4–6 months or in the positive ovarian-hormone receptors human breast cancer cell line MCF-7, suggesting that cancer progression is accompanied by an impairment of iodine generation in the mammary epithelium (Aceves et al., 2002; García-Solís and Aceves, 2003).

The present experiments were designed to analyze the effect of  $I_2$ , potassium iodide (KI) and a subclinical concentration of thyroxine (T4) on the induction and promotion of mammary cancer induced by *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU). We also analyzed the expression of Dio1, NIS, PEN, tumor suppressor gene p53 and the oxidative cell status present in mammary glands and tumors in the different treatments.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Virgin, female Sprague-Dawley rats, 4 weeks of age, were obtained from the vivarium of Instituto de Neurobiología, UNAM-Juriquilla. Rats were housed in a temperature-controlled room ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) with a 12-h light/dark schedule. They were fed food (Purina rat chow; Ralston Purina Co., St. Louis, MO) and water ad libitum. All of the procedures followed UNAM and University of California Animal Care and Use Committee guidelines.

### 2.2. Carcinogen treatment

At 7 weeks of age, rats were anesthetized with a ketamine and xylazine (Aveco, Fort Dodge, IA) mixture (30 mg and 6 mg, respectively, per kg body weight) and treated with a single intraperitoneal injection of 50 mg/kg body weight MNU (Sigma St. Louis, MO). MNU was dissolved in 0.9% saline, pH 5.0, and heated to 50–60  $^\circ\text{C}$  (Thompson, 2000).

### 2.3. Radioiodine uptake assay

The uptake analysis of both  $I^-$  and  $I_2$  by thyroid, mammary gland and tumors was assessed by using  $^{125}I$  as NaI (NEN Life Science Products, Boston, MA). Oxidation of  $^{125}I^-$  to  $^{125}I_2$  was achieved by reacting  $Na^{125}I$  with  $H_2O_2$  and HCl according to the method described by McAlpine (1945) and Thrall et al. (1992a) in which the oxidation of  $I^-$  to  $I_2$  is 100%. The  $I_2$  production was corroborated by the turning of color of the solution toward red. Normal female rats and MNU-treated rats with tumors arising in the first 3 months received i.p. doses of 50  $\mu Ci$ /rat of either  $^{125}I^-$  or  $^{125}I_2$ . In a parallel group of rats, 6 mg of perchlorate ( $ClO_4^-$ ) was i.p. administered 2 h before  $^{125}I$  injection. All animals were sacrificed 1 h posterior to  $^{125}I$  administration. Thyroid, inguinal mammary glands, liver and blood were collected and their radiolabel was measured in a  $\gamma$ -counter (Packard, Palo Alto, CA). Only animals with similar blood radiolabel readings (>5% of differences) were included. Data were normalized as radioactivity uptake compared to liver (non-uptake organ), by the following formula: (cpm/mg for thyroid, mammary gland or tumor)/(cpm/mg for liver).

### 2.4. Effects of iodine treatments on mammary carcinogenesis

#### 2.4.1. Short-term treatments with KI and $I_2$

At 5 weeks old, rats were sorted into three experimental groups using a randomization process and iodine treatments were started. The experimental groups were: (a) control; (b) 0.05% KI in drinking water (KI), and (c) 0.05%  $I_2$  in drinking water ( $I_2$ ). The drinking water and the water used for solutions were always distilled. 0.05%  $I_2$  solution was made considering iodine solubility ( $1.33 \times 10^{-3}$  M) and the concentration was corroborated by titration with sodium thiosulfate (Kenkel, 1994). After 2 weeks, MNU was administered as described above to a subgroup of rats of each experimental group. Dietary treatments were continued for 1 week after carcinogen injection. At the end of iodine treatments, four or five rats from each experimental group were sacrificed by decapitation. Mammary tissues were collected and stored frozen for RNA extraction. Remaining rats were used to evaluate mammary gland tumorigenesis. At the end of the experiment (16 weeks), animals were sacrificed and tissues were collected as described below.

#### 2.4.2. Long-term treatments with KI, $I_2$ and T4

At the age of 5 weeks, rats were randomly allocated into four experimental groups: (a) control, (b) 0.05% KI in drinking water (KI); (c) 0.05%  $I_2$  in drinking water ( $I_2$ ), and (d) thyroxine in drinking water (T4, 3  $\mu g/mL$ ). Treatments in this experiment were started 2 weeks before MNU administration and continued for 26 weeks after carcinogen injection. Sixteen weeks after MNU injection, five rats from each experimental group were sacrificed by decapitation and blood and

tissue were collected for T3 serum level and lipoperoxidation determinations, respectively.

### 2.5. Lipoperoxidation measurement in normal and neoplastic mammary gland

The concentration of metabolites related to lipoperoxidation were quantified in normal and neoplastic mammary gland tissue by thiobarbituric acid reaction and expressed as nanomoles of malondialdehyde (MDA)/mg protein (Ottolenghi, 1959). Tumor samples were obtained from control MNU-treated rats when the neoplastic tissue grew to sizes larger than 2 cm in diameter. All manipulations were made rapidly on ice to avoid peroxidation. Some modifications to the original method were introduced. To determine basal measurements a sample of homogenate (0.5–1 mg protein) was incubated for 30 min at 37 °C in a 1 mL volume 150 mM Tris buffer, pH 7.4; incubation was ended by adding 1.5 mL 20% acetic acid (adjusted to pH 3.5 with KOH) and 1.5 mL 0.8% thiobarbituric acid. Parallel samples were incubated in presence of 100  $\mu L$  50  $\mu M$   $FeSO_4$  (+Fe) to increase lipid oxidation in order to quantify total lipoperoxidation. Samples were kept for 45 min in a boiling water bath, 1 mL 2% KCl was added to each sample at the end of the incubation. The colored complex formed was extracted with butanol–pyrimidin (1:1%, v/v) and detected at 532 nm. The extraction coefficient of the MDA color complex was  $0.0156 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Protein quantification was determined by the Lowry method (Hernández-Muñoz et al., 1984).

### 2.6. T3 circulating levels

Serum T3 levels were measured by the homologous RIA method previously standardized with intra- and interassay variation coefficients of 9% and 12.8%, respectively (Valverde-R and Aceves, 1989).

### 2.7. Mammary gland carcinogenesis

Rats were weighed and palpated for tumors every week beginning 1 month after carcinogen exposure during 16 or 26 weeks. A tumor was defined as a discrete palpable mass recorded for at least two consecutive weeks. Tumor incidence was calculated as the percentage of animals with one or more palpable tumors per treatment. Tumor multiplicity was calculated as the average number of tumors per animal in each treatment group. The mean latency of tumor onset for each treatment group was calculated as the mean time interval (in weeks) from MNU injection to the appearance of the first palpable tumor. When the tumors had grown to 1.5–2.0 cm in diameter, rats were anesthetized with a ketamine and xylazine mixture (30 mg/6 mg/kg body weight, respectively) and the tumors were surgically removed and processed for the different biochemical analyses. Tumor sizes were measured using calipers and the volumes were calculated by the ellipsoid formula (Thompson, 2000). Mammary tumor samples were

fixed, embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological classification.

## 2.8. RT-PCR

Messenger RNAs were identified by a standardized semi-quantitative PCR procedure in which an amplicon of the structural protein cyclophilin (Cyc) was used as a control for mRNA quantity and integrity (Aceves et al., 1999). Briefly, total RNA was extracted using TRIzol reagent (Life Technologies, Inc) eluted in RNAase free water (50  $\mu$ L) and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . The extracted RNA (0.5–2  $\mu$ g) was reverse transcribed using oligo(deoxythymidine) and a specific NIS antisense primer (Table 1). PCR was carried out in a final 50  $\mu$ L volume containing: 1  $\mu$ L 10 dNTP Mix (Invitrogen Life-Technologies), 5  $\mu$ L 10 $\times$  Buffer (KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.3 100 mM, gelatin 10  $\mu$ g/mL), 2.5  $\mu$ L 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ L 10 pM oligonucleotide primers and 5 U Taq DNA polymerase and 1–2  $\mu$ L cDNA. Each PCR cycle consisted of a denaturation step, 94  $^{\circ}\text{C}$  for 45 s, an annealing step—55  $^{\circ}\text{C}$  for Cyc, Dio1 and NIS, 60  $^{\circ}\text{C}$  for p53, 58  $^{\circ}\text{C}$  for PEN, 61  $^{\circ}\text{C}$  for lactoperoxidase (LPO)—during 45 s, and an extension step, 72  $^{\circ}\text{C}$  for 45 s. As controls, two different reaction mixtures were used, one containing a RT mixture without RNA and with all PCR reagents, and the second containing a sample with appropriate reactants but with water instead of cDNA. Both controls were included in every experiment. Primers used are shown in Table 1. Resultant PCR fragments were 521 bp for Cyc, 251 bp for Dio1, 377 bp for NIS; 291 bp for p53; 488 bp for PEN and 298 for LPO. Five microliters of the PCR product were electrophoresed through a 2% agarose gel containing ethidium bromide on TAE buffer. Gels were viewed under UV light, photographed, and analyzed by a computer-assisted densitometric scanning of these images. The relative abundance of different mRNAs was calculated using the values of densitometric scanning of all specific amplicons and normalized by the Cyc mRNA amplicon.

## 2.9. Statistical analysis

The effects of dietary treatments on mammary cancer incidence were analyzed using 2  $\times$  2 contingency tables and a chi-square test. The effects of treatments on tumor multiplicity, tumor latency, tumor size, mRNA expression, and T3 circulating levels were analyzed using one-way ANOVA

and Tukey's honest significant difference tests. Values with  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Histological analysis

Mammary glands were evaluated both macro- and microscopically for the presence of cancer. Various combinations of papillary, cribriform or comedo mammary carcinomas were detected. No correlation between histological type of mammary cancer and treatments was observed. Fig. 1 shows representative H&E sections of normal virgin mammary gland and MNU-induced mammary carcinomas. In addition, all animals subjected to the different experimental protocols showed the same increase in body weight and normal reproductive cycles.

### 3.2. Radioiodine uptake

To corroborate that virgin normal and tumoral mammary glands are capable of taking up iodine, groups of animals were injected with  $^{125}\text{I}^-$  or  $^{125}\text{I}_2$ . Fig. 2 shows that both normal and tumoral mammary glands exhibit similar label quantities independently of the chemical form of iodine injected. Also, it is observed that only the radiolabeled capture from  $^{125}\text{I}^-$  injected animals was partially inhibited by perchlorate, suggesting that in  $^{125}\text{I}_2$  injected animals, the mammary gland and tumors labeled capture may not depend on the NaI symporter (NIS). In contrast, thyroid gland exhibits significant differences either in the amount of labeled capture as in its perchlorate inhibition, in relation with the chemical form of iodine injection. It is evident that in  $^{125}\text{I}_2$  injected animals a significantly lower labeled capture is exhibited; this capture is less sensitive to perchlorate.

### 3.3. Effect of short-term iodine treatments on mammary cancer induced by MNU

In this experiment we studied whether acute KI or I<sub>2</sub> treatments could act at the initiation step of mammary carcinogenesis induced by MNU. Table 2 shows overall cancer development in short-term (3 weeks) iodine treatments 16 weeks after MNU injection. No significant differences were

Table 1  
RT-PCR primer sequences

MRNA	GenBank accession no.	Sense/antisense primer sequence (5' $\rightarrow$ 3')
Cyc, nt 7–526	M19533	AGA CGC CGC TGT CTC TTT TCG/CCA CAC AGT CCG AGA TGG TGA TC
Dio1, nt 377–627	X57999	GCA CCT GAC CTT CAT TTC TT/CTG GCT GCT CTG GTT CTG
NIS, nt 790–809	U60282	CCG GAT CAA CCT GAT GGA CT/CCT GAG GGT GCC ACT GTA AG
PEN, nt 1491–1978	AF167412	CAT TCT GGG GCT GGA CCT C/CCT TCG GGA CAT TCA CTT TCA
LPO, nt 1042–1339	XM.220831	AAA GCC CAG TGT GAC GAG CA/GCC GTC CAT GGT CTG AGA CT
p53, nt 287–578	X13058	CTG GCC TCT GTC ATC TTC CG/CCG TCA CCA TCA GAG CAA CG

CyC: cyclophilin; Dio1: deiodinase type I; NIS: sodium/iodide symporter; PEN: pendrin; LPO: lactoperoxidase.

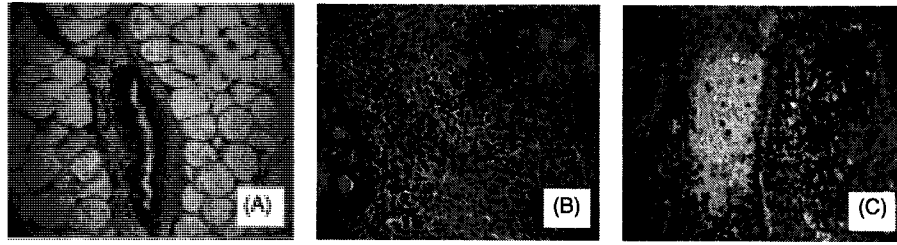


Fig. 1. H&E paraffin sections of normal and neoplastic mammary gland. (A) Mammary gland of an untreated 19-week old virgin rat, (B and C) MNU-induced mammary gland carcinomas (magnification  $\times 40$ ).

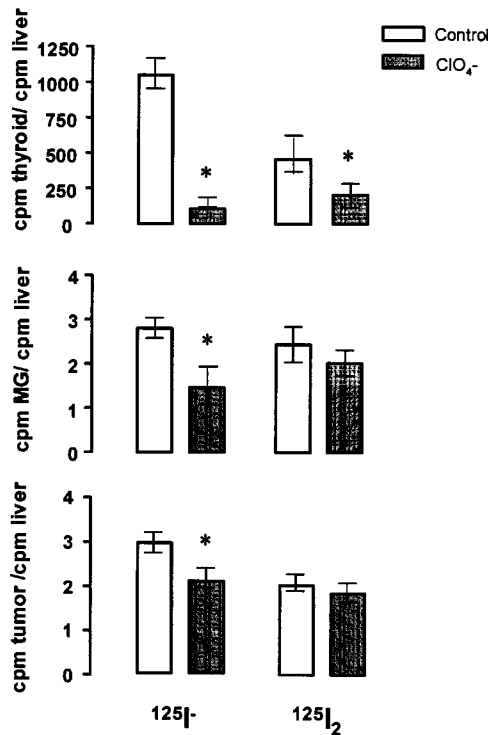


Fig. 2. <sup>125</sup>I<sup>-</sup> and <sup>125</sup>I<sub>2</sub> uptake in control and perchlorate (ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>) treated rats. Virgin normal and tumoral MNU-treated rats were i.p. injected with 6 mg of ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 2 h before i.p. administration of 50  $\mu$ Ci of <sup>125</sup>I<sup>-</sup> or <sup>125</sup>I<sub>2</sub>. Data were normalized as radioactivity uptake compared to liver (non-uptake organ). Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Asterisk (\*) indicates significant differences ( $p < 0.05$ ). Abbreviation: MG, mammary gland.

found in incidence, multiplicity and tumor latency between control and iodine treatments. However, as it is shown in Fig. 3, onset of mammary carcinomas occurred earlier in those animals where I<sub>2</sub> treatment was discontinued. After 8 weeks post-MNU short-term I<sub>2</sub> treated rats presented

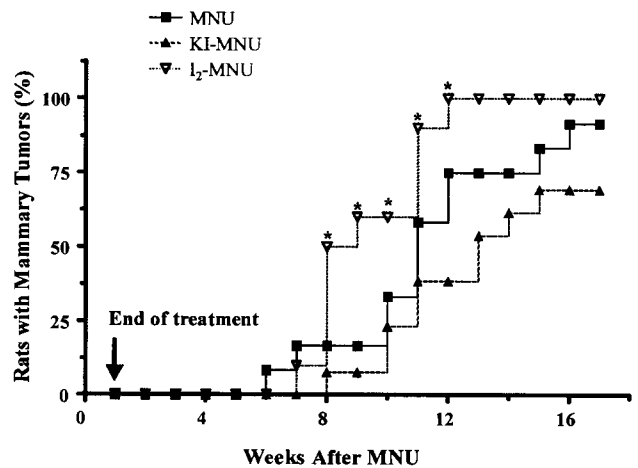


Fig. 3. Effect of short-term iodine treatments on mammary cancer incidence. Five weeks old rats were treated with 0.05% of either KI or I<sub>2</sub> in drinking water for 3 weeks. At 7 weeks of age MNU was administered (50 mg/kg body weight). Solid arrow indicates the end of iodine treatments. Asterisk (\*) represents  $p < 0.05$  compared to MNU.

50% incidence, whereas control and KI presented a less than 20% incidence. At week 12th post-MNU, short-term I<sub>2</sub> treated rats reached 100% mammary cancer incidence, whereas the control and KI treated animals presented only 50% and 37% incidence, respectively. These results suggest that the interruption of I<sub>2</sub> treatment is accompanied by an accelerated mammary tumor development.

### 3.4. Effect of long-term iodine and T4 treatments on mammary cancer induced by MNU

Table 3 summarizes the effect of long-term KI, I<sub>2</sub> and T4 treatments on mammary carcinogenesis. I<sub>2</sub> administration for 16 weeks after MNU was the only effective antineoplastic treatment. Fig. 4 shows the time-course of mammary cancer

Table 2  
Effect of short-term KI and I<sub>2</sub> treatments on mammary carcinogenesis after 16 weeks of MNU administration

Treatment	No. of rats with cancer	%	Cancer latency (weeks) <sup>a</sup>	Carcinomas per rat <sup>a</sup>
MNU	11/12	91.7	11.0 $\pm$ 2.9	2.3 $\pm$ 1.4
KI-MNU	9/13	69.2	11.6 $\pm$ 2.2	1.8 $\pm$ 0.7
I <sub>2</sub> -MNU	10/10	100	9.3 $\pm$ 1.8	1.9 $\pm$ 0.6

Five weeks old rats were treated with 0.05% of either KI or I<sub>2</sub> in drinking water for 3 weeks. At 7 weeks of age, rats received a single i.p. injection of MNU (50 mg/kg body weight).

<sup>a</sup> Mean  $\pm$  S.D.

Table 3  
Effect of long-term KI, I<sub>2</sub> and T4 treatments on mammary carcinogenesis after 16 weeks of MNU administration

Treatment	No. of rats with cancer	%	Cancer latency (weeks) <sup>a</sup>	Carcinomas per rat <sup>a</sup>
MNU	8/11	72.7	10.8 ± 0.9	1.5 ± 0.7
KI-MNU	10/11	93.7	9.8 ± 1.2	1.8 ± 0.6
I <sub>2</sub> -MNU	3/10*	30.0*	12.7 ± 0.6	1.0 ± 0.0
T4-MNU	9/11	81.8	9.9 ± 2.9	2.5 ± 1.7

At 5 weeks of age, rats received KI (0.05%), I<sub>2</sub> (0.05%) or T4 (3 µg/mL) treatments in the drinking water. Two weeks later, rats received a single i.p. injection of MNU (50 mg/kg body weight) and the treatments were continued until 16 weeks elapsed.

<sup>a</sup> Mean ± S.D.

\* Represents  $p < 0.05$  compared to MNU.

incidence. On week 12th post-MNU administration, the I<sub>2</sub> group presented only 10% incidence of mammary cancer, whereas in both control and T4 groups the incidence was 72% and in KI 90%. On week 13th post-MNU administration, I<sub>2</sub> treated rats reached a 30% incidence of mammary cancer and remained that way until week 16th. The incidence in the rest of the groups rose to more than 72%. Moreover, the development of the first tumor was also delayed in I<sub>2</sub> treated animals compared to the other groups (12th week versus 10th week, respectively). After 16 weeks post MNU injection, the I<sub>2</sub> group was divided; one-half was maintained with their treatments, whereas the second half was changed to drinking water only. After 8 weeks, interrupted I<sub>2</sub> treatment animals reached 100% cancer incidence. This result indicates that the continuous presence of I<sub>2</sub> is necessary to sustain its antineoplastic effect.

### 3.5. Biochemical analysis

In order to establish if MNU treatments affect the uptake and/or local generation of iodine we analyzed the mRNA

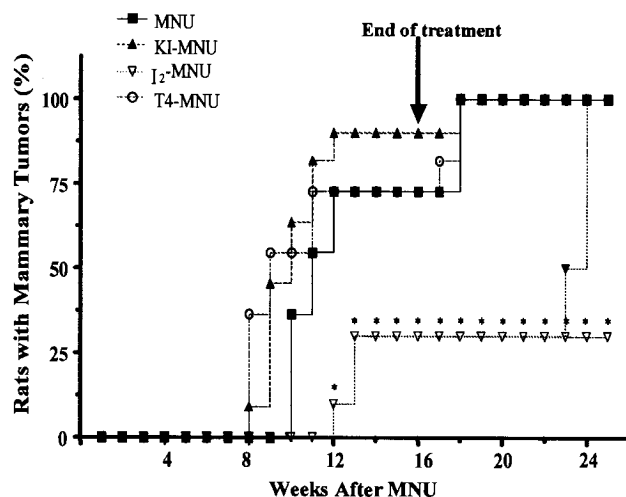


Fig. 4. Effect of long-term iodine and T4 treatments on mammary cancer incidence. Five weeks old rats received KI (0.05%), I<sub>2</sub> (0.05%) or T4 (3 µg/mL) treatments in the drinking water. Two weeks later animals were injected with MNU (50 mg/kg body weight), and the treatments were continued until 16 weeks. At this time, I<sub>2</sub> treated animals were divided; one-half maintained their treatments while the other half received only drinking water (dark inverted triangles). Asterisk (\*) represents  $p < 0.05$  compared to MNU.

expression of Dio1, NIS, PEN and LPO. We also studied p53 mRNA expression to know if the protective effect of I<sub>2</sub> was related to an apoptotic pathway. Fig. 5 summarizes the expression of these genes in the different groups after 3 weeks of continuous treatment. Data showed that Dio1 expression is increased with I<sub>2</sub> treatment in normal tissue, but it is impaired in MNU treated animals. In contrast, PEN expression increased in I<sub>2</sub> treatment with MNU. NIS and p53 showed no changes. LPO mRNA analysis showed that this enzyme was not present in any of the groups (data not shown).

To determine if iodine treatments affected thyroid status we measured T3 circulating levels. Fig. 6 summarizes the circulating T3 levels of all groups after 16 weeks of treatment.

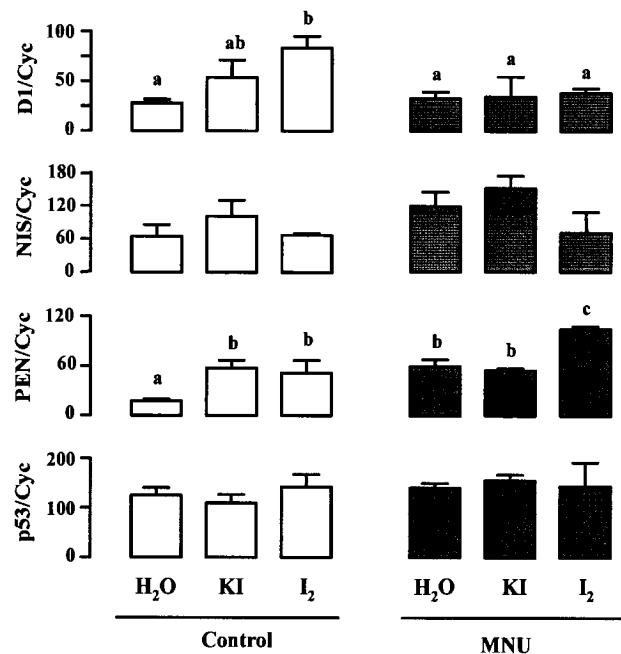


Fig. 5. Dio1, NIS, PEN and p53 mRNAs expression in mammary gland of iodine treated rats. After 3 weeks of treatment and 1 week post-MNU injection rats were sacrificed. Messenger RNA quantification was performed by semi-quantitative RT-PCR as described in Section 2. The structural protein cyclophilin (Cyc) was amplified to check for RNA quantity and integrity. The relative abundance of the different mRNAs was calculated using the values of densitometric scanning of all specific amplicons and normalized by the Cyc mRNA amplicon. Values are expressed as mean ± S.D.; the experiments were repeated three times with independent RNA samples. Different superscripts represent significant differences ( $p < 0.05$ ).

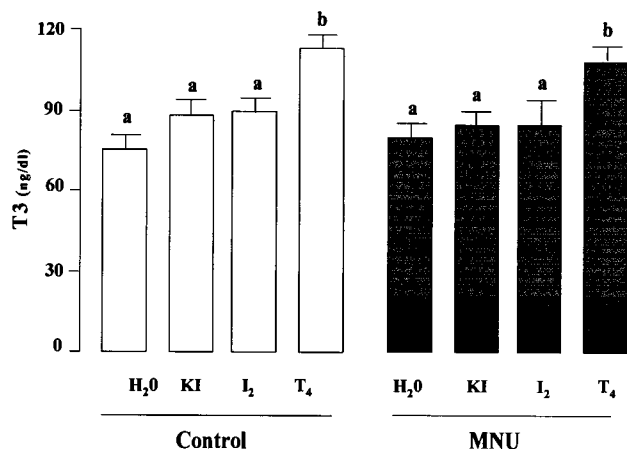


Fig. 6. Circulating T3 levels in long-term treated animals. The results represent the mean  $\pm$  S.D. ( $n=5$  rats). Sixteen weeks after MNU injection rats were sacrificed. Different superscripts represent significant differences ( $p < 0.05$ ).

Data showed that only T<sub>4</sub> treated groups increased their circulating T3 levels.

### 3.6. Lipoperoxidation in normal and neoplastic mammary gland

In order to determine if iodine treatments involved an antioxidant effect, lipoperoxidation in mammary gland of rats treated with I<sub>2</sub> and KI with and without MNU after 16 weeks of treatment was measured. Also we include the measurement of MDA in several tumors from the control MNU-treated group which arose during the first 12 weeks after MNU-injection. Fig. 7 shows that MNU-treated glands express a higher basal lipoperoxidation than controls. It is also clear

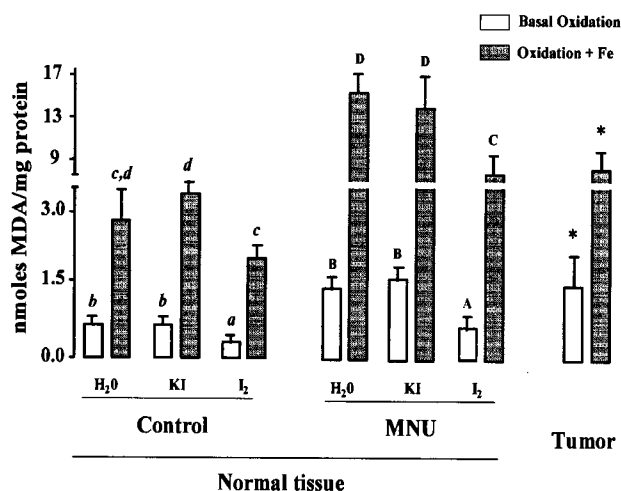


Fig. 7. Lipoperoxidation in long-term treated normal and neoplastic mammary glands. Normal and MNU treated animals were sacrificed 16 weeks after MNU injection. Tumors correspond to control animals and to those arising within the first 12 weeks after MNU injection. Values represent mean  $\pm$  S.D. Different superscripts represent significant differences ( $p < 0.05$ ). Asterisk (\*) indicates significant differences when compared with H<sub>2</sub>O control group.

that animals with I<sub>2</sub> treatment, with and without MNU, have a significant reduction in both basal and Fe<sup>2+</sup>-induced lipoperoxidation in comparison with the other treatments. MNU-induced tumors exhibited the highest basal lipoperoxidation.

## 4. Discussion

This is the first report showing that I<sub>2</sub> is a potent protective agent against MNU-induced mammary cancer. These data agree with several other studies showing that treatments with iodine-rich seaweeds or Lugol's solution (I<sub>2</sub>, KI mixture) have a protective effect on chemical-induced mammary carcinogenesis (Kato et al., 1994; Funahashi et al., 1999). The finding in our study that high and continuous I<sub>2</sub> concentrations are necessary to prevent mammary cancer incidence, indicates that its effect is achieved at the promotion level. It also corroborates epidemiological findings regarding the relative low rate of breast cancer reported in Japanese women whose normal diet is seaweed rich, as well as increasing breast cancer rates in Japanese women who immigrate or consume a Western style diet (Le Marchand et al., 1985). Besides, our data confirm that I<sub>2</sub> but not the I<sup>-</sup> treatment, contribute to the maintenance of the normal integrity of mammary gland. Eskin et al. (1995) have shown that iodine deficiency alters the structure and function of rat mammary gland, especially alveolar cells, and that I<sub>2</sub> is distinctly more effective in diminishing ductal hyperplasia and perilobular fibrosis in the mammary glands of both rats and humans (Ghent et al., 1993; Eskin et al., 1995). Our data also show that I<sub>2</sub> treatment increases PEN expression suggesting a positive uptake mechanism for I<sub>2</sub>. This proposal is reinforced by our data showing that virgin mammary glands are capable of capturing radiolabeled iodine in several forms even when the NIS has been blocked. This evidence is in agreement with previous reports showing PEN expression and the presence of the sulfate/iodide exchanger in mammary glands (Shennan, 2001; Rillema and Hill, 2003).

Another remarkable result from the present work is that MNU administration is accompanied by an impaired expression of Dio1 enzyme. This enzyme is present only during puberty, pregnancy and lactation (Aceves et al., 1995), and may represent another source of I<sub>2</sub> in the mammary gland. Effectively, the conversion of T<sub>4</sub> to T<sub>3</sub> is accompanied by the local generation of a high iodine concentration. Moreover, cancer processes in thyroid or mammary glands from animals and humans is generally accompanied by the loss of Dio1 expression (Gallardo de la O et al., 2000; Aceves et al., 2002; García-Solís and Aceves, 2003). It is possible that carcinogenetic mechanisms involve the turning off of genes related to iodine uptake or local generation.

Recently several authors have proposed that iodine acts as an antioxidant agent (Venturi et al., 2000; Smyth, 2003). In cells capable of concentrating iodine as I<sup>-</sup>, this acts as an electron donor in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and peroxidases. Tseng and Latham (1984) have shown that TH reduces in

vitro lipoperoxidation of linoleic acid, even more effectively than Vitamin E, glutathione and ascorbic acid. Furthermore, it has been shown that KI is a specific scavenger of hydroxyl radicals (Murata et al., 1986), and that NaI increases more efficiently than ascorbic acid the total antioxidant status in serum of healthy donors (Winkler et al., 2000). The lack of effect evinced in the KI treatment in the present work may be explained by the absence of LPO activity in mammary glands from pubertal and virgin rats, being only present during pregnancy and lactation (Strum, 1978). LPO is a homologue protein of TPO; both enzymes are able to oxidize  $I^-$  to bind iodine to proteins or lipids. A specific iodination species has not yet been identified but several candidates exist, such as  $I^+$  (iodinium),  $I^0$  (iodine free radical),  $IO^-$  (hypoiodite), and  $I_2$  (Smyth, 2003). Moreover, it has been shown that a KI excess can induce apoptosis in thyroid and cancer cells only if full TPO activity is present. In this respect, Vitale et al. (2000) show that an excess of KI induces apoptosis in thyroid cells, but if TPO activity is blocked with propylthiouracil the apoptotic effect of KI is cancelled. Besides, Zhang et al. (2003), using lung cancer cells transfected with NIS or NIS/TPO, observed that only in NIS/TPO transfected cells did a KI excess induce apoptosis.

All these data indicate that  $I^-$  from KI needs to be oxidized to have a cytotoxic effect. The possible mechanism of iodine ability to induce apoptosis is the formation of iodinated compounds such as iodolactones. The iodolactones of arachidonic acid are capable of inhibiting *in vitro* thyroid cell proliferation and induce apoptosis (Pisarev and Gartner, 2000; Langer et al., 2003). In the present study we did not find mRNA expression of LPO in control and MNU iodine treated rats, but *in vitro* experiments have shown that  $I_2$  is able to form T4 in absence of TPO (Thrall et al., 1992b). This evidence suggests that  $I_2$ , an oxidized form of iodine, seems not to need LPO activity to be incorporated into lipids or proteins. This notion is reinforced by our findings that only the  $I_2$  treatment was capable of diminishing basal lipoperoxidation in mammary glands. Experimental evidence reveals that free radicals like reactive oxygen species are involved in initiation and promotion of carcinogenesis, where specific mutations of certain genes like tumor suppressor gene *p53* or oncogene *ras* family occur (Ray et al., 2000). Indeed, we found in this work that the apparently “normal” cells from MNU-treated rats or the frank mammary tumors present high levels of lipoperoxidation. The exact mechanism by which  $I_2$  prevents mammary carcinogenesis is unknown; however, it is feasible for  $I_2$  to exhibit a dual effect. Firstly,  $I_2$  exerts a competition with free radicals for membrane lipids and DNA to help stabilize the cells, and secondly, it induces apoptotic mechanisms through the formation of iodolactones. In this respect, we found no differences in *p53* expression in any of our treatments. It is possible that  $I_2$  treatment, besides diminishing cellular oxidative status, also participates in proliferation or apoptotic mechanisms unrelated to *p53*, like peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR).

Although this study does not show a direct protective effect of  $I_2$ , our findings clearly indicate that if  $I_2$  needs to be transformed, the resultant components are not TH or  $I^-$ . Further investigations will be necessary to elucidate the biochemical pathways involved in  $I_2$  uptake, metabolism, and signaling.

In summary, our data show that continuous  $I_2$  treatment is an effective inhibitor in MNU-induced mammary carcinogenesis. Its action is at the promotional level and the protective mechanisms may involve the regulation of the cell oxidative environment. Chronic  $I_2$  treatment is not accompanied by any harmful secondary effect on the health of the animals (body weight, thyroid economy, reproductive cycle). Thus, we propose that  $I_2$  treatment must be considered a candidate to be used in clinical trials as an adjuvant of breast cancer therapy.

### Acknowledgments

The authors are grateful to Pilar Galarza for bibliographic support, Lourdes Palma Tirado for her advice in histological techniques, Felipe Ortiz and Martín García-Servín for the animal care. We also thank Leopoldo González, Lourdes Lara and Nydia Hernández for image advice, Alberto Lara and Omar González for computer assistance, Leonor Casanova for academic support and Marcela Sánchez-Alvarez for proof-reading this manuscript. P. García-Solís and Y. Alfaro were supported by graduate fellowships from CONACYT and DGEP-UNAM. This work was partially supported by grants: UNAM/DGAPA IN224602 PAPIIT, UC-MEXUS CN-02-98 and CONACYT 44976-M.

### References

- Aceves, C., Pineda, O., Ramírez, I., Navarro, M., de la, Luz., Valverde-R, C., 1999. Mammary type I deiodinase is dependent on the suckling stimulus: differential role of norepinephrine and prolactin. *Endocrinology* 140, 2948–2953.
- Aceves, C., Gopainathrao, G., Rajkumar, L., Guzman, R., Yang, J., Nandi, S., 2002. Deiodinase type 1 (D1) in *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced rat mammary carcinomas: differential expression in early and late arising tumors. In: 84th Annual Meeting of the Endocrine Society, San Francisco, CA, p. 299 (Abstract).
- Aceves, C., Rodon, C., Ramirez-C, I., Wilson, S., Pineda-C, O., Lopez-B, L., Mancilla, R., Valverde-R, C., 1995. Mammary 5′deiodinase (5′D) during the breeding cycle of the rat: indirect evidence that 5′D type I is specific to the alveolar epithelium. *Endocrine* 3, 95–99.
- Aceves, C., Anguiano, B., Delgado, G., 2005. Is Iodine a gatekeeper of the integrity of the mammary gland? *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, in press.
- Anderson, G.A., Mariash, C.N., Oppenheimer, J.H., 2000. Molecular actions of thyroid hormone. In: Braverman, L.E., Utiger, R. (Eds.), *Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*, eighth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 174–195.
- Cann, S.A., van Netten, J.P., van Netten, C., 2000. Hypothesis: iodine, selenium and the development of breast cancer. *Cancer Causes Control* 11, 121–127.
- Carrasco, N., 2000. Thyroid iodide transport: the  $Na^+/I^-$  symporter (NIS). In: Braverman, L.E., Utiger, R. (Eds.), *Werner & Ingbar's The Thy-*



- roid: A Fundamental and Clinical Text, eighth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 52–61.
- Eskin, B.A., Grotkowski, C.E., Connolly, C.P., Ghent, W.R., 1995. Different tissue responses for iodine and iodide in rat thyroid and mammary glands. *Biol. Trace Elem. Res.* 49, 9–19.
- Funahashi, H., Imai, T., Tanaka, Y., Tsukamura, K., Hayakawa, Y., Kikumori, T., Mase, T., Itoh, T., Nishikawa, M., Hayashi, H., 1999. Wakame seaweed suppresses the proliferation of 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene-induced mammary tumors in rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 90, 922–927.
- Gallardo de la O, E., Rojas-Huidobro, R., Solorio, M.C., Aceves, C., 2000. Análisis de la desyodación en tejido mamario humano normal y neoplásico. In: XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Acapulco, Guerrero, México, p. C-115 (Abstract).
- García-Solís, P., Aceves, C., 2003. 5'Deiodinase in two breast cancer cell lines: effect of triiodothyronine, isoproterenol and retinoids. *Mol. Cell. Endocrinol.* 201, 25–31.
- Ghent, W.R., Eskin, B.A., Low, D.A., Hill, L.P., 1993. Iodine replacement in fibrocystic disease of the breast. *Can. J. Surg.* 36, 453–460.
- Hernández-Muñoz, R., Glender, W., Díaz Muñoz, M., Adolfo, J., García-Sainz, J.A., Chagoya de Sánchez, V., 1984. Effects of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem. Pharmacol.* 33, 2599–2604.
- Jull, J.W., Huggins, C., 1960. Influence of hyperthyroidism and of thyroidectomy on induced mammary cancer. *Nature* 188, 73.
- Kato, N., Funahashi, H., Ando, K., Takagi, H., 1994. Suppressive effect of iodine preparations on proliferation of DMBA-induced breast cancer in rat. *J. Jpn. Soc. Cancer Ther.* 29, 582–588.
- Kenkel, J., 1994. *Analytical Chemistry for Technicians*, second ed. CRC press LLC, Boca Raton, FL, pp 164–166.
- Kilbane, M.T., Ajjan, R.A., Weetman, A.P., Dwyer, R., McDermontt, E.W.M., O'Higgins, N.J., Smyth, P.P., 2000. Tissue iodine content and serum mediated  $^{125}\text{I}$  uptake blocking activity in breast cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 1245–1250.
- Langer, R., Burzler, C., Bechtner, G., Gartner, R., 2003. Influence of iodide and iodolactones on thyroid apoptosis. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 111, 325–329.
- Le Marchand, L., Kolonel, L.N., Nomura, A.M., 1985. Breast cancer survival among Hawaiian Japanese and Caucasian women. Ten year rates and survival by place of birth. *Am. J. Epidemiol.* 122, 571–578.
- McAlpine, R.K., 1945. The rate of the of oxidation of iodide ion by hydrogen peroxide. *J. Chem. Educ.* 22, 387–390.
- Milmore, J.E., Chandrasekaran, V., Weisburger, J.H., 1982. Effects of hypothyroidism on development of nitrosomethylurea-induced tumors of the mammary gland, thyroid gland, and other tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 169, 487–493.
- Murata, A., Suenaga, H., Hideshima, S., Tanaka, Y., Kato, F., 1986. Hydroxyl radical as the reactive species in the inactivation of phages by ascorbic acid. *Agric. Biol. Chem.* 50, 1481–1487.
- Ottolenghi, A., 1959. Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* 79, 355–363.
- Pisarev, M.A., Gartner, R., 2000. Autoregulatory actions of iodine. In: Braverman, L.E., Utiger, R. (Eds.), *Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*, eighth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 85–90.
- Ray, G., Batra, S., Shukla, N.K., Deo, S., Raina, V., Ashok, S., Husain, S.A., 2000. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 59, 163–170.
- Rillema, J.A., Hill, M.A., 2003. Prolactin regulation of the pendrin-iodide transporter in the mammary gland. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284, E25–E28.
- Seidman, H., Stellman, S.D., Mushinski, M.H., 1982. A different perspective on breast cancer risk factors: some implications of the non attributable risk. *CA. Cancer J. Clin.* 32, 301–313.
- Shennan, D.B., 2001. Iodide transport in lactating rat mammary tissue via a pathway independent from the  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  cotransporter: evidence for sulfate/iodide exchange. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 1359–1363.
- Soleimani, M., Greeley, T., Petrovic, S., Wang, Z., Amlal, H., Kopp, P., Burnham, C.E., 2001. Pendrin: an apical  $\text{Cl}^-/\text{OH}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger in the kidney cortex. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280, F356–F364.
- Smyth, P.P., 2003. Role of iodine in antioxidant defense in thyroid and breast disease. *Biofactors* 19, 121–130.
- Strum, J.M., 1978. Site of iodination in rat mammary gland. *Anat. Rec.* 192, 235–244.
- Thompson, H.J., 2000. Methods for the induction of mammary carcinogenesis in the rat using either 7,12-dimethylbenz[a]anthracene or 1-methyl-1-nitrosourea. In: Ip, M., Asch, B.B. (Eds.), *Methods in Mammary Gland Biology and Breast Cancer Research*, eighth ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 19–29.
- Thrall, K.D., Bull, R.J., 1990. Differences in the distribution of iodine and iodide in the Sprague-Dawley rat. *Fundam. Appl. Toxicol.* 15, 75–81.
- Thrall, K.D., Bull, R.J., Sauer, R.L., 1992a. Distribution of iodine into blood components of the Sprague-Dawley rat differs with the chemical form administered. *J. Toxicol. Environ. Health* 37, 442–449.
- Thrall, K.D., Sauer, R.L., Bull, R.J., 1992b. Evidence of thyroxine formation following iodine administration in Sprague-Dawley rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 37, 535–548.
- Tseng, Y.L., Latham, K.R., 1984. Iodothyronines: oxidative deiodination by hemoglobin and inhibition of lipid peroxidation. *Lipids* 19, 96–102.
- Valverde-R, C., Aceves, C., 1989. Circulating thyronines and peripheral monodeiodination in lactating rats. *Endocrinology* 124, 1340–1344.
- Venturi, S., Donati, F.M., Venturi, A., Venturi, M., Grossi, L., Guidi, A., 2000. Role of iodine in evolution and carcinogenesis of thyroid, breast and stomach. *Adv. Clin. Path.* 4, 11–17.
- Vitale, M., Di Matola, T., D'Ascoli, F., Salzano, S., Bogazzi, F., Fenzi, G., Martino, E., Rossi, G., 2000. Iodide excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress. *Endocrinology* 141, 598–605.
- Winkler, R., Griebenow, S., Wonisch, W., 2000. Effect of iodide on total antioxidant status of human serum. *Cell Biochem. Funct.* 18, 143–146.
- Zhang, L., Sharma, S., Zhu, L.X., Kogai, T., Hershman, J.M., Brent, G.A., Dubinett, S.M., Huang, M., 2003. Nonradioactive iodide effectively induces apoptosis in genetically modified lung cancer cells. *Cancer Res.* 63, 5065–5072.

**ANEXO 3.** García-Solís P, Aceves C. 2005. **Estudio de factores nutricionales asociados a la prevención del cáncer mamario. Importancia de los modelos animales.** *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 55(3), 211-225.

# Estudio de factores nutricionales asociados a la prevención de cáncer mamario. Importancia de los modelos animales

*Pablo García-Solís y Carmen Aceves*

Departamento de Neurobiología Celular y Molecular. Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Querétaro, México

**RESUMEN.** El cáncer mamario es la neoplasia más común en la mujer a nivel mundial y debido a que no se conoce su etiología no se ha logrado establecer una estrategia efectiva de prevención. Los principales factores de riesgo asociados al cáncer mamario se clasifican en: hereditarios, endocrino-reproductivos y factores ambientales; entre los que se incluye la dieta. Los modelos animales de inducción química de cáncer mamario con los carcinógenos 7, 12-dimetilbenzo[a]antraceno y N-metil-N-nitrosourea han sido de gran utilidad para el estudio de la biología del cáncer mamario así como de su tratamiento y prevención. En esta revisión presentamos la utilidad y ventajas de dichos modelos animales en el estudio de factores nutricionales asociados al cáncer mamario para la generación de estrategias de prevención. Se revisa brevemente diferentes estrategias y abordajes experimentales así como efectos fisiológicos y mecanismo de acción de algunos de los factores nutricionales estudiados con estos modelos de carcinogénesis mamaria. Los factores nutricionales que abordamos son: a) la restricción dietaria de energía y el exceso de grasa, b) la soya y los fitoestrógenos, c) los retinoides y carotenoides, d) el ácido linoleico conjugado, y e) las algas marinas y el yodo.

**Palabras clave:** Cáncer mamario, 7, 12-Dimetilbenzo[a]antraceno, N-metil-N-nitrosourea, nutrición, modelos animales.

**SUMMARY.** Study of nutritional factors related to breast cancer prevention. Importance of animal models approaches. Breast cancer is the most common worldwide neoplasia in women. The totality of etiology factors of breast cancer is unknown and thus an effective preventive strategy has not been developed. Risk factors associated to breast cancer can be grouped into three broad categories: a) family history (hereditary) factors, b) endocrine and reproductive factors and c) environmental and life-style factors including diet. Animal models of chemical induced mammary carcinogenesis with 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene and N-methyl-N-nitrosourea have been useful in the study of biology, treatment and prevention of breast cancer. In this review we show the usefulness and advantages of animal models in the study of nutritional factors associated with breast cancer in order to propose new prevention strategies. We review briefly different experimental approaches as well as some physiologic effects and mechanisms of some nutritional factors studied with animal models of mammary carcinogenesis. Nutritional factors reviewed were: a) energy restriction and high-fat intake, b) soy and phytoestrogens, c) retinoids and carotenoids, d) conjugated linoleic acid, and e) brown seaweed and iodine.

**Key words:** Animal models, mammary cancer, 7, 12-Dimethylbenzanthracene, N-methyl-N-nitrosourea, nutrition.

## INTRODUCCION

El cáncer mamario es la principal neoplasia que se presenta en la mujer tanto en los países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo (1). En la actualidad a pesar de los esfuerzos encaminados para conocer la etiología del cáncer mamario aún no se conoce la totalidad de los factores de riesgo y por lo tanto no se ha logrado establecer una estrategia sólida de prevención (1,2). Los factores de riesgo asociados al cáncer mamario se han agrupado en tres grandes determinantes que son: a) la historia familiar (herencia), b) factores endocrinos y reproductivos y c) factores ambientales donde se incluye el estilo de vida y la dieta (1-3). Los factores hereditarios solo explican del 5 al 10% de la incidencia mundial del cáncer mamario y se han identificado genes involucrados en la susceptibilidad a padecer esta enfermedad, como son el *BCRA1*, el *BCRA2*, *p53* y *PTEN* (3). Entre los factores de

riesgo de tipo endocrino y reproductivo se encuentran la menarca temprana, la menopausia tardía, la nuliparidad, el uso de terapia estrogénica de reemplazo y el uso de anticonceptivos hormonales. En contraste, la menarca tardía, la menopausia temprana y el embarazo antes de los 20 años están asociados a un menor riesgo padecer esta enfermedad (1,4). En relación a los factores ambientales, el más importante que ha sido señalado en la etiología del cáncer mamario es la dieta (5). Estudios epidemiológicos en migrantes mostraron la primera evidencia sólida de que los factores ambientales son los principales responsables de la diferencia de incidencia de cáncer mamario presente en las diversas poblaciones del mundo (1). Se ha observado en poblaciones de mujeres asiáticas, que comúnmente presentan una baja incidencia de cáncer mamario en sus países de origen, cuando inmigran a Estados Unidos, incrementan el riesgo y la incidencia de esta enfermedad en las generaciones sucesivas (6). Adicionalmente

también se ha observado un incremento en el riesgo y la incidencia de cáncer mamario en los países en vías de desarrollo asociados a cambios en el estilo de vida que tienden a semejar el perfil de riesgo que se presenta en los países desarrollados (1). En base a los diversos estudios epidemiológicos se han señalado varios factores nutricionales asociados al cáncer mamario, algunos de ellos como componentes de los alimentos y otros que corresponden a la dieta en su conjunto (5). Algunos de los factores nutricionales señalados que aumentan el riesgo de cáncer mamario son: 1) la obesidad, 2) el alto consumo de grasa total y grasa saturada, 3) el consumo de carne al carbón quemada o muy cocida, y 4) la ingesta de alcohol (5,7). En contraste, los factores que reducen el riesgo son: 1) el consumo de frutas y verduras, 2) el consumo de carotenoides, 3) el consumo de soya y algas marinas, 4) el consumo de fibra y 5) el aumento de la actividad física (5, 7-9). El objetivo de la presente revisión es presentar un panorama general de la utilidad de los modelos animales en el estudio de los factores nutricionales asociados al cáncer mamario para generar estrategias de prevención de esta enfermedad. Se hace énfasis en las diferentes estrategias y abordajes experimentales así como en la descripción de los efectos fisiológicos y mecanismos de acción de los factores nutricionales con la idea de resaltar la utilidad y potencial del modelo animal. Los factores nutricionales que abordamos en esta revisión son: a) la restricción dietaria de energía y el consumo de grasa, b) la soya y los fitoestrógenos, c) los retinoides y carotenoides, d) el ácido linoleico conjugado; y e) las algas marinas y el yodo. Existen otros muchos factores nutricionales asociados al cáncer mamario que no se tratan en esta revisión pero que podemos mencionar como son: los monoterpenos, la vitamina E, el 3-indol-carbinol, el selenio, ácidos grasos n-3, proteínas de la fracción ácida de la leche y el aislado de proteína de soya (10-16).

### **Modelos animales utilizados en el estudio del cáncer mamario**

El cáncer mamario humano se caracteriza por una heterogeneidad morfológica, genética y molecular. De hecho las lesiones premalignas e invasivas que pueden ocurrir en la glándula mamaria humana presentan diferentes características bioquímicas y moleculares, por lo que se considera al cáncer mamario como un conjunto de enfermedades (17). Por esto, no se puede considerar que un solo modelo animal pueda abarcar todo el espectro de características presentes en los tipos de cáncer mamario humano. Afortunadamente existen modelos animales de inducción de cáncer mamario que reúnen ciertas características que los hacen de gran utilidad en el estudio de diversos aspectos de esta enfermedad como son: a) desarrollo en corto tiempo de los tumores, b) los tumores se desarrollan principalmente en la glándula mamaria, c) el carcinógeno causa un pobre o nulo efecto tóxico sistémico; y d) los tumores

mamarios tienen un origen histológico y de características patológicas similares a las que se presentan en la mayoría de los casos de cáncer mamario humano (17). Las especies utilizadas en los modelos animales de cáncer mamario son el ratón y la rata. En esta revisión nos ocuparemos principalmente de los modelos de inducción química de cáncer mamario en rata donde se utilizan los carcinógenos *N*-metil-*N*-nitrosourea (MNU) o el 7, 12-Dimetilbenzo[*a*]antraceno (DMBA).

Tanto el MNU como el DMBA han sido ampliamente utilizados para el estudio de factores tanto preventivos como terapéuticos, los resultados son altamente reproducibles y reúnen las características anteriormente señaladas para un buen modelo animal de cáncer mamario (17,18). En estos modelos de inducción química de cáncer mamario en ratas, se utilizan hembras preferentemente de 50 días de edad y de la cepa Sprague Dawley. En el modelo del MNU se utiliza una sola dosis intraperitoneal de 50 mg de MNU por kg de peso corporal y en el caso del DMBA se aplica una sola dosis intragástrica con 20 mg por rata (18). Existen diferencias importantes entre el MNU y DMBA que vale la pena destacar. Por un lado el MNU es un agente alquilante que actúa directamente en el DNA generando mutaciones. Por su parte el DMBA requiere ser activado por las enzimas de detoxificación de fase I y fase II para adquirir su capacidad genotóxica. El modelo de DMBA es muy útil para identificar agentes que inhiban la activación de los carcinógenos, como sería la inhibición de la citocromo p-450. Otra diferencia importante es que mientras que los tumores generados por el MNU son principalmente adenocarcinomas con limitado potencial metastático, los tumores inducidos por DMBA son de dos tipos, el 60% de tipo adenocarcinoma y el 40% de tipo fibroma que son encapsulados y no invasivos (19,20).

Con estos modelos animales se pueden desarrollar protocolos tanto de tipo terapéutico como preventivo. Los protocolos de tipo terapéutico se caracterizan por aplicar los carcinógenos y esperar a que los tumores se desarrollen y alcancen un tamaño determinado. Posteriormente, la eficacia del agente terapéutico se evalúa observando su impacto sobre el crecimiento y/o tamaño final de los tumores. Por otra parte, en un experimento típico de prevención, se contrastan los efectos sobre la respuesta al carcinógeno de un potencial agente preventivo con un grupo control que recibe un tratamiento placebo. La respuesta al carcinógeno se evalúa midiendo cuantos animales desarrollaron tumores (incidencia), el número de tumores por rata, la latencia de aparición del primer tumor, el crecimiento de los tumores y el tamaño final de los mismos. Este tipo de experimentos arrojan los resultados en un periodo de 4 meses después de aplicado el carcinógeno y son especialmente útiles para evaluar el efecto de factores nutricionales involucrados en el desarrollo de cáncer mamario (19,20).

Sporn et al. (21) a través de una serie de estudios con

retinoides acuñó el término de la quimioprevención del cáncer. Este término se define como la prevención de cáncer en la población humana por la ingestión de agentes químicos que previenen la carcinogénesis (22). Estos agentes pueden prevenir la iniciación de la transformación o retrasar la promoción y el progreso de las células premalignas. Para que el agente preventivo realice su papel debe aumentar los procesos fisiológicos que protegen al organismo contra el crecimiento de las células anormales con potencial para desarrollar un cáncer invasivo. Los esfuerzos encaminados hacia una prevención del cáncer mamario han visto recompensas parciales como el uso clínico de prevención con el antiestrógeno; tamoxifeno. El uso de este compuesto reduce la incidencia de cáncer mamario en mujeres de alto riesgo pero lamentablemente aumenta la incidencia de cáncer de endometrio (23). Actualmente se está probando otro antiestrógeno denominado raloxifeno, así como muchos otros fármacos que buscan mayor efectividad y menos efectos colaterales (24). Una estrategia alternativa de prevención de cáncer mamario, generada a partir de los estudios de los factores nutricionales, que puede ser muy útil es el uso de los llamados "alimentos funcionales". Los alimentos funcionales se pueden definir como alimentos semejantes en apariencia al alimento convencional, que se consume como parte de una alimentación normal y que es capaz de producir efectos metabólicos o fisiológicos comprobados, que proporcionan una buena salud y/o la reducción de riesgos de enfermedades crónico-degenerativas, además de sus funciones nutricionales básicas (25). Uno de ejemplo de este tipo de alimentos es la leche adicionada con probióticos (lactobacilos y bifidobacterias) que ayudan a mantener el balance de la flora intestinal (25). El uso de esta estrategia tiene el potencial de proveer de manera relativamente económica un agente preventivo no tóxico que se mantenga en el suero y tejidos en cantidades efectivas para reducir la incidencia de cáncer mamario y de otros tipos.

### **Restricción dietaria de energía y exceso de grasa**

La restricción dietaria de energía (RDE) y el alto consumo de grasa son dos de los factores nutricionales asociados al cáncer mamario más estudiados con los modelos animales. Mientras que la RDE es un potente inhibidor de la carcinogénesis, el alto consumo de grasa (20-25% del peso total del alimento) hace lo opuesto (26-28). Los primeros estudios que abordaron estos temas no diferenciaban plenamente el efecto del consumo total de energía y el consumo de la energía proveniente de la grasa (28-30). Fay y Freedman (26) con el uso de la técnica de meta-análisis mostraron que el alto consumo de grasa aumenta la incidencia de cáncer mamario independientemente del aumento en el consumo total de energía pero también el exceso del consumo total de energía per se aumenta la incidencia tumoral. Otro

aspecto importante a considerar es que este efecto promotor de la grasa no se aplica a todas las familias de ácidos grasos. Los ácidos grasos poliinsaturados n-6 y los saturados se asocian fuertemente a una mayor carcinogénesis mamaria mientras que los monosaturados no tienen efecto y los poliinsaturados n-3 la disminuyen (26,28). Los mecanismos por los cuales el exceso de grasa en la dieta aumenta la carcinogénesis mamaria no se conocen a pesar de que se han investigado varios aspectos cuyos resultados más relevantes son los siguientes: a) Los niveles circulantes de estrógenos y progesterona no se modifican; b) No hay alteraciones en los ciclos estrales; c) las ratas ovariectomizadas presentan la misma respuesta que las ratas control; d) El contenido de prolactina en suero e hipófisis no sufre cambios; y e) La proliferación celular en el epitelio mamario no se altera (28).

En general se acepta que las dietas altas en grasa aumentan la carcinogénesis mamaria en los modelos animales sin embargo los resultados arrojados por estudios epidemiológicos no permiten concluir que esto mismo ocurra en el humano (26,28,29).

Carroll y Kohr (31) mostraron una correlación directa entre en la disponibilidad nacional per capita de fuentes dietarias de grasa y los índices de mortalidad e incidencia de cáncer mamario. Este tipo de estudios ecológicos no permiten hacer inferencias causales porque hay muchos otros factores diferentes entre las poblaciones que podrían contribuir al riesgo de cáncer y el consumo de grasa. Por su parte los estudios de casos y controles realizados han arrojado resultados contradictorios debido en parte al tamaño de la muestra y al método de recolección de la información dietaria (32). Los estudios de cohorte han concluido que el alto consumo de grasa no contribuye de manera significativa en el riesgo de cáncer mamario (32). Este tipo de discrepancias tan contrastantes entre los hallazgos obtenidos experimentalmente y los estudios epidemiológicos deben propiciar un mayor acercamiento entre los estudiosos de este tema para desarrollar nuevas hipótesis y proponer soluciones utilizando tanto los modelos animales como las técnicas epidemiológicas (29).

Por otra parte, la RDE se considera uno de los más potentes factores fisiológicos conocidos para la prevención de cáncer mamario inducido experimentalmente. Sin embargo, los mecanismos por los que la RDE ejerce sus efectos apenas se empiezan a dilucidar (27). La RDE en los modelos animales de cáncer mamario por lo general indica una reducción del consumo de energía de la dieta suponiendo que el gasto energético permanece constante. En algunas ocasiones el término de RDE es referido como restricción de calorías, restricción energética, restricción de alimento o restricción dietaria. La restricción de alimento y la restricción dietaria no forzosamente son sinónimos de la RDE, ya que aquellos suponen una reducción del consumo de energía a través de limitar el consumo total de alimento afectando el consumo de

otros nutrimentos no energéticos. En cambio la RDE supone solo la reducción en el consumo total de energía sin afectar el consumo de los demás nutrimentos (27). Los protocolos de RDE están diseñados por lo general en una reducción del contenido de hidratos de carbono en el alimento con horarios controlados de alimentación y los animales están separados en jaulas individuales. La cantidad total de alimento ofrecida a los animales con RDE se calcula cada dos días basados en la cantidad consumida de alimento los dos días previos por grupo alimentado ad libitum (33). Cabe señalar además que la RDE no implica forzosamente una reducción en la ganancia de peso de hecho se considera que los animales del laboratorio alimentados ad libitum están sobrealimentados.

La RDE reduce la carcinogénesis mamaria tanto en la fase de iniciación como en la de promoción tendiendo un mayor impacto cuando se aplica continuamente, es decir antes y después de aplicar el carcinógeno (27, 30). El hecho de la RDE actúa a nivel de la iniciación sugiere que hay efectos a nivel de reparación del DNA o cambios en el metabolismo del carcinógeno (27). En cuanto a la promoción tumoral se ha mostrado que la RDE reduce la proliferación de las células epiteliales premalignas y malignas además de que aumenta la apoptosis (33). Se ha reportado una reducción en la expresión de las proteínas anti apoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL y un aumento de las pro-apoptóticas Bax y Apaf-1 (27). El Efecto antitumoral de la RDE parece estar mediado al menos en parte por cambios en el sistema endocrino, donde hay un aumento en los corticosteroides y una disminución en los niveles circulantes de insulina y del factor de crecimiento similar a la insulina del tipo 1 (IGF-1) (27, 30). El estudio del efecto antitumoral de la RDE puede generar nuevas estrategias de prevención basadas en los efectos fisiológicos que produce.

### Soya y fitoestrogénos

Se ha sugerido que el consumo de soya es uno de los principales factores que contribuyen en la baja incidencia de cáncer mamario observada en los países asiáticos (34). Las poblaciones asiáticas consumen diariamente entre 10-50g de soya, mientras que en Estados Unidos el consumo es solo de 1 a 3 g (8). La soya es una leguminosa con un alto contenido de fitoestrogénos los cuales han recibido mucha atención como posibles protectores de cáncer mamario. Los fitoestrogénos son en su mayoría compuestos difenólicos con estructuras similares a los estrógenos y antiestrógenos naturales y sintéticos (Figura 1) (35,36). Se ha hecho una lista de al menos 300 plantas con componentes activos capaces inducir el estro en animales de laboratorio (36). Estos compuestos se clasifican en dos clases principales: los isoflavonoides y los lignanos (35). Los isoflavonoides se dividen en isoflavonas y coumenstanos, los cuales tienen actividad estrogénica intrínseca. Contrariamente, los lignanos adquieren su actividad estrogénica al metabolizarlos en el tracto gastrointestinal por

acción de la microflora. De este modo los principales lignanos dietarios; el secoisolariciresinol y el matairesinol, son los precursores de los lignanos activos el enterodiol y la enterolactona (36). Las principales fuentes dietarias de isoflavonas son la soya y sus derivados; de los coumenstanos, la alfalfa y de lignanos son las semillas oleaginosas como la linaza. La soya y sus derivados son la principal fuente de las isoflavonas genisteína y daidzeína, las cuales presentan la mayor actividad estrogénica de todos los fitoestrogénos. La genisteína y la daidzeína son capaces de unirse a los dos tipos de receptores a estrógenos (ER), el  $\alpha$  y el  $\beta$ . La genisteína tiene una afinidad relativa de unión del 5% al ER $\alpha$  y de un 36% para el ER $\beta$  con respecto al 17 $\beta$ -estradiol (35). Con el uso de sistemas in vitro se ha descrito que los fitoestrogénos tienen actividad antiestrogénica cuando se dan en altas concentraciones (35,36). Además de su actividad estrogénica y antiestrogénica se ha reportado que los fitoestrogénos tienen otros efectos biológicos. La genisteína inhibe a la enzima topoisomerasa II, una enzima nuclear indispensable implicada en la replicación del DNA. También se ha descrito que la genisteína inhibe la actividad de las proteínas tirosinacinasas (PTKs) en líneas celulares cancerosas. Las PTKs catalizan la fosforilación de sus propios residuos de tirosina y de algunas otras proteínas implicadas en la trasducción de señales mitogénicas (35,36). Por otra parte se ha reportado que las isoflavonas de la soya tienen actividad antioxidante (37). La genisteína y la daidzeína inhiben la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la células humanas de promieloblasto HL-60 activadas con 12-O-tetradecanonilforbol-13-acetato, siendo la genisteína la más potente, (IC<sub>50</sub> = 25  $\mu$ M versus IC<sub>50</sub> = 150  $\mu$ M.). Así mismo, la genisteína y la daidzeína inhiben la producción del anión súperoxido a través de la inhibición de la actividad de la xantina/xantina oxidasa. La genisteína también aumenta la actividad de las enzimas catalasa, súperoxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa de un 10% a un 30% en la piel y en el intestino delgado (37).

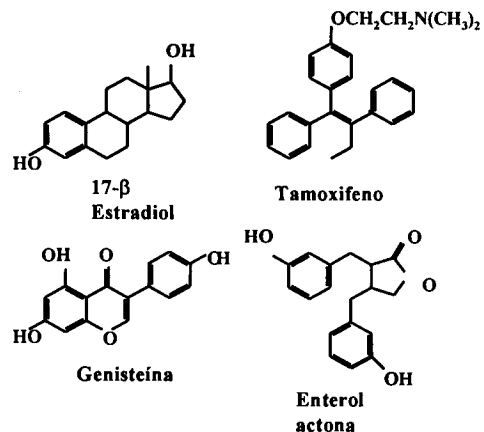
Por otra parte, estudios epidemiológicos han mostrado que el factor reproductivo con mayor efecto anticancerígeno es el embarazo antes de los 20 años. Este efecto es universal y reduce hasta en un 50% el riesgo de padecer cáncer mamario (4,38). Estudios en modelos animales utilizando MNU y DMBA han confirmado este efecto protector del embarazo (38,39). Utilizando estos mismos modelos animales se ha mostrado que mimetizando las concentraciones circulantes de estrógenos y progestagenos presentes durante la gestación producen el efecto protector del embarazo contra el cáncer mamario en animales vírgenes (40-42). Se han propuesto dos hipótesis que explican por que el embarazo protege contra el cáncer mamario. La primera sugiere que durante el embarazo ocurre una diferenciación del tejido epitelial mamario aumentando las estructuras lobulares que a la postre formaran el

tejido secretor de la leche, reduciendo el número de células indiferenciadas de los pies terminales susceptibles a los carcinógenos (38). La otra hipótesis plantea que las concentraciones elevadas y constantes de estrógenos y progesterona presentes durante el embarazo provocan cambios permanentes tanto en la sensibilidad como en la secreción hipofisiaria de hormonas mamotrópicas como la hormona de crecimiento y la prolactina. Estos cambios modifican el ambiente endocrino de las células mamarias confiriéndoles una menor susceptibilidad a los procesos cancerosos (43, 44). De hecho, se ha mostrado que la glándula mamaria después de la gestación y lactancia presenta un patrón de expresión génica diferente al de ratas vírgenes de la misma edad (45). De este modo se ha postulado que el consumo crónico de fitoestrógenos pudiera ofrecer el mismo efecto protector contra el cáncer que tiene el embarazo (34). Estudios experimentales avalan esta proposición, Lamartiniere et al. (46) mostraron que la administración continua de dosis farmacológicas de genisteína subcutánea (5 mg) en ratas hembras neonatas tenía un efecto protector contra la inducción química de cáncer por DMBA. La genisteína aumentó la latencia de aparición de tumores y además redujo tanto la incidencia como el número de tumores por rata. El análisis histológico de la glándula mamaria mostró una reducción significativa en el número de pies terminales y un aumento en el número de estructuras alveolares similar a lo observado en el embarazo. Aunado a lo anterior, los animales tratados con genisteína presentaron alteraciones en el desarrollo del aparato reproductor como fueron una apertura temprana de la vagina, menor tamaño de ovarios y útero así como alteraciones en el ciclo estral. Tratamientos con mayor cantidad de genisteína subcutánea (500 mg/kg peso corporal) aplicada los días 16, 18 y 20 del posparto mantuvieron la efectividad contra la inducción de cáncer y no provocaron los efectos deletreos sobre el aparato reproductor (47, 48). Posteriormente, Fritz et al. (49) administraron en la dieta de ratas hembras 0, 0.0025% ó 0.025% de genisteína 2 semanas antes de ser apareadas y hasta 21 días después del parto de tal forma que las crías estuvieran expuestas a la genisteína durante la gestación y lactancia. A los 50 días de edad a las crías hembra se les administró el DMBA. Los resultados mostraron un efecto dosis dependiente de la genisteína sobre la carcinogénesis mamaria de tal forma que la dosis de 0.025% redujo un 50% el número de tumores por rata con respecto al control mientras que la dosis de 0.0025% la redujo en un 20%. Posteriormente se probó si solo la administración prenatal de la genisteína (0.025%) era suficiente para proteger contra la inducción de cáncer mamario por DMBA pero no tuvo ningún efecto (50). Sin embargo la suplementación dietaria de genisteína a las madres durante la etapa perinatal (gestación y lactancia) mantiene el efecto antitumoral sin provocar alteraciones en el ciclo estral y en el desarrollo del aparato reproductor de las crías tanto en hembras como en machos

(edad de apertura vaginal, edad de descenso testicular, distancia ano-genital, peso de ovarios y útero e histología ovárica) (49,50).

FIGURA 1

Comparación de las estructuras del 17- $\beta$ -estradiol (estrógeno), el tamoxifeno (antiestrógeno) y los fitoestrógenos genisteína (isoflavona) y enterolactona (lignano)



Por otra parte, también se ha estudiado el segundo fitoestrógeno más abundante de la soya, la daidzeína, la cuál administrada en la dieta de la madre (0.025%) durante la lactancia no tiene ningún efecto sobre la inducción de cáncer mamario con DMBA en las crías hembras y tampoco afecta el desarrollo del aparato reproductor de las crías independientemente de su sexo (51).

Otra fuente de fitoestrógenos que se ha probado en los modelos animales de inducción química de cáncer mamario, es la linaza. Dietas con un 10% de linaza o de la cantidad equivalente de su fitoestrógeno principal el coumestano secoisolariciresinol diglucósido, inhiben la incidencia tumoral hasta en un 31.3% y 42% respectivamente y el número de tumores se inhibe en alrededor de un 45% por ambos tratamientos. La linaza y el secoisolariciresinol diglucósido en la dieta no provocan daños en el desarrollo de los órganos sexuales de las crías cuando se administran durante la lactancia pero si lo hacen cuando se administran en la etapa prenatal (52, 53).

En términos generales este conjunto de estudios demuestra que la magnitud de los efectos de los fitoestrógenos sobre el desarrollo de la cáncer mamario y de otras estructuras como son el aparato reproductor dependen del compuesto utilizado, de la etapa del desarrollo en la cual se aplica y la vía de administración utilizada.

Los mecanismos por los cuales actúan los fitoestrógenos parecen ser mediados en su mayor parte por su efecto

estrogénico (50,54,55). Cuando se aplican en la etapa perinatal inducen una diferenciación más temprana del epitelio mamario. Aumentan precozmente (21 día postnatal) la proliferación de las células epiteliales de los pies terminales, y posteriormente (50 día postnatal) inducen la diferenciación de los complejos lóbulo alveolares (50,54,55). Estos cambios morfológicos correlacionan además con cambios funcionales. Se ha observado un aumento en la expresión de la  $\beta$ -caseína, principal proteína de la leche, e incrementos en la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (50,54,55). El EGF y su receptor son dos factores que juegan papeles muy importantes en la fisiopatología del cáncer mamario. El EGF estimula el crecimiento de las células tumorales y su receptor ya sea por mutaciones o por sobreexpresión puede aumentar la transducción de señales mitogénicas aún en ausencia de su ligando (56).

Una preocupación constante acerca del efecto estrogénico de los fitoestrógenos es si este tipo de compuestos es capaz de estimular el crecimiento de los tumores mamarios dependientes de estrógenos en las mujeres. Estudios utilizando modelos de trasplante de líneas celulares de cáncer de mama dependiente de estrógenos (MCF-7) en ratones inmunosuprimidos y ovariectomizados mostraron que dietas enriquecidas con genisteína, y aislados de proteínas de soya con genisteína estimulaban el crecimiento tumoral (57). Sin embargo utilizando este mismo modelo animal pero con animales sin ovariectomizar se mostró que la genisteína inhibía el crecimiento de los tumores (57,58). Más aún se ha mostrado, utilizando el modelo de DMBA en ratas, que los animales alimentados con genisteína (0.025%) durante su etapa prenatal así como después de que se les aplicó el cancerígeno desarrollan un menor número de tumores con respecto a los que solo recibieron la genisteína en su etapa prenatal (50). Adicionalmente, estudios *in vitro* han mostrado que en las células mamaria MCF-7 la genisteína estimula la proliferación celular y la expresión del gen responsivo a estrógenos *pS2* cuando se utiliza medio de cultivo libre de estrógenos (57). Sin embargo cuando se utilizan medios de cultivo con estrógenos la genisteína tiene un efecto opuesto (57,58). Más aún se ha establecido que los fitoestrógenos ejercen un efecto bifásico sobre el crecimiento celular de las células tumorales, estimulando el crecimiento cuando se utilizan concentraciones menores de 5  $\mu\text{M}$  e inhiben el crecimiento a concentraciones elevadas (8, 58). Una explicación a estos resultados aparentemente contradictorios podría darse a partir de un estudio más detallado de las interacciones entre los dos tipos de receptores a estrógenos, el ER $\alpha$  y el ER $\beta$ . Mientras que el 17 $\beta$ -estradiol se une con afinidad similar a sus dos receptores, los isoflavonas de la soya se unen con mayor afinidad al receptor ER $\beta$  (8). Los estudios de unión muestran que la genisteína, la daizeína y la biocanina A tienen entre 8 a 16 veces más afinidad por el ER $\beta$  que por el ER $\alpha$  (8). Estudios *in vitro* utilizando células cancerosas no

responsivas a estrógenos transfectadas con el ER $\alpha$  mostraron que la genisteína estimulaba pobremente la transcripción de los genes reporteros. En contraste cuando las células expresaban exclusivamente el ER $\beta$  la genisteína promovía una mayor transcripción y reclutamiento de proteínas coactivadoras como el factor de iniciación de la traducción del tipo 2 y el coactivador de receptores a esteroides del tipo 1 (SRC-1) (8). Adicionalmente se encontró una mayor actividad transcripcional cuando se cotransfectaron ambos tipos de receptores a estrógenos lo que sugiere que la presencia del ER $\alpha$  puede aumentar la transducción de la señal del ER $\beta$  a través de la formación de heterodímeros ER $\alpha$ / $\beta$  (8). Estas observaciones implican que los efectos de las isoflavonas de la soya dependen del coeficiente de expresión ER $\alpha$ /ER $\beta$ . Más aún, dichos efectos también dependerán de las proteínas coactivadoras y corepresoras presentes en cada tejido (8). En base a lo anterior se ha postulado que los modelos para el estudio de los fitoestrógenos que pueden aportar información clínicamente relevante son aquellos en los cuales los animales tengan la presencia de los estrógenos (57).

En resumen, los estudios en animales junto con los estudios epidemiológicos muestran que hay una asociación entre el consumo de soya y sus fitoestrógenos la reducción del riesgo de cáncer mamario aunque persiste la preocupación de que puedan tener efectos de estimulación sobre la proliferación celular de los tumores dependientes de estrógenos.

### Retinoides y carotenoides

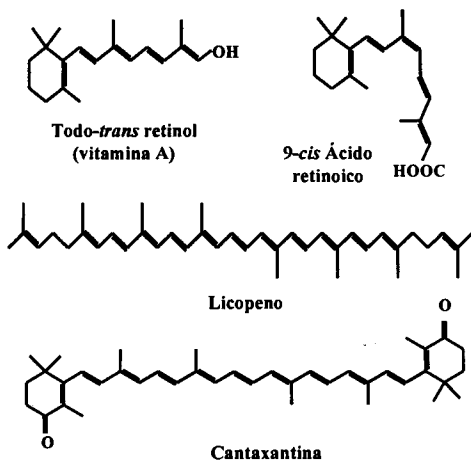
Los retinoides están formados por un anillo  $\beta$ -ionona (ciclohexinilo) conjugado a una cadena de unidades isopreno que tiene un grupo funcional de naturaleza variable (alcohol, aldehído, ácido orgánico) en el carbono 15 de la cadena (Figura 2). Los retinoides fisiológicamente más relevantes en los mamíferos son el retinol (vitamina A), el retinal y el ácido retinoico (AR) (59). El AR es un derivado del retinol con alta actividad biológica el cual participa en múltiples procesos celulares como son el desarrollo, crecimiento y la diferenciación celular (60). El AR ejerce la mayoría de sus efectos fisiológicos a través de sus receptores, los cuales pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares (61). Esta superfamilia de receptores nucleares esta formada por factores de transcripción dependientes de ligando y a la cual también pertenecen los receptores a vitamina D, hormonas tiroideas, hormonas esteroides y receptores activadores de la proliferación de los peroxisomas (PPAR) (61). En lo que respecta a los receptores a AR se han descrito dos subfamilias que son los RAR y los RXR (62). Cada una de estas subfamilias consiste de tres subtipos ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). La subfamilia RAR se activa por los isómeros del AR, todo-*trans*, 9-*cis* y 13-*cis*, mientras que la familia RXR se activa exclusivamente por el 9-*cis* (62). Dado que los retinoides participan en el mantenimiento y regulación de la diferenciación celular, y



que el cáncer es un proceso en el que ocurre la pérdida de la diferenciación, los retinoides han sido considerados como potenciales agentes preventivos del cáncer (63).

FIGURA 2

Estructura de los retinoides todo-*trans* retinol y 9-*cis* ácido retinoico y los carotenoides, licopeno y cantaxantina



El efecto antitumoral del AR en sus diferentes isómeros así como una gran diversidad de retinoides sintéticos ha sido objeto de diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* en diferentes tipos de neoplasias (64). El AR inhibe la señalización del factor de transcripción AP-1, el cual está compuesto de heterodímeros de las proto-oncoproteínas Jun y Fos o de homodímeros de Jun (65). Estos complejos son activados en las células mamarias por factores que estimulan el crecimiento celular como son los estrógenos, el EGF, el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) y los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs), transduciendo señales mitogénicas en éstas células. El AR también induce la expresión de inhibidores del crecimiento como el TGF $\beta$  y la proteína que une al factor de crecimiento similar a la insulina del tipo 3 (IGFBP-3) y el propio receptor  $\beta$  del AR (RAR $\beta$ ) (60). Por otra parte se ha demostrado en estudios *in vitro* que el todo-*trans* AR induce apoptosis mediada al menos en parte por regular a la baja a la proteína anti-apoptótica Bcl2. El todo-*trans* AR induce la expresión de las citoqueratinas 8 y 18, marcadores de la diferenciación epitelial ductal, en las células de cáncer mamario humano T47D (60).

La mayoría de los estudios anteriores se han realizado *in vitro*, ya que la administración elevada y crónica del AR *in vivo* se acompaña de una elevada toxicidad. En su lugar han sido estudiados retinoides sintéticos menos tóxicos, destacándose la todo-*trans* N-(4-hidroxifenil) retinamida (4HPR; fenretinida) la cual es altamente efectiva para prevenir la carcinogénesis mamaria inducida tanto con MNU como con

DMBA (63,66). La 4HPR se acumula principalmente en la glándula mamaria y sus mecanismos de acción no han sido dilucidados totalmente. Estudios *in vitro* muestran que la 4HPR tiene poca afinidad por la subfamilia RAR y activa mínimamente los elementos de respuesta a RAR y RXR (63, 66). Lo anterior pone de manifiesto que parte de los mecanismos de acción de la 4HPR son diferentes de los retinoides naturales. La 4HPR es uno de los compuestos que al igual que el tamoxifeno ya se usan en la práctica clínica con relativo éxito y que previamente fueron probados con los modelos animales (19). En la actualidad existen más de 1000 retinoides sintéticos que están a la espera de la evaluación de su potencial papel preventivo en el cáncer mamario. En lo que respecta a los retinoides naturales, se ha documentado que mientras el todo-*trans* AR no tiene ningún efecto sobre la carcinogénesis mamaria inducida con MNU el 9-*cis* AR reduce de manera significativa la incidencia, el número de tumores por ratas y el tamaño del tumor (67). Paradójicamente se ha descrito en estudios *in vitro* que ambos isómeros tienen los mismos efectos biológicos, incluso en algunos casos suele ser más potente el todo-*trans* AR, indicando posibles e importantes diferencias farmacocinéticas entre ambos compuestos (67, 68). Anzano et al. (67) también mostraron que tanto el 9-*cis* AR como el todo-*trans* AR tienen un efecto sinérgico con el tamoxifeno reduciendo el tamaño y número de tumores por rata.

Los carotenoides, compuestos de naturaleza isoprenoide, también han sido estudiados como potenciales agentes preventivos de cáncer mamario. El  $\beta$ -caroteno, carotenoide con actividad de pro-vitamina A, no tiene ningún efecto sobre la carcinogénesis mamaria en modelos animales (63). Por su parte los carotenoides sin actividad de pro-vitamina A, la cantaxantina y el licopeno (Figura 2) si tienen algunos efectos sobre la carcinogénesis mamaria (63, 69). La cantaxantina administrada en la dieta (0.34% y 0.11%) 3 semanas antes de aplicar el DMBA redujo en un 65% el número de tumores mamarios mientras que cuando se administró después de aplicar MNU no tuvo ningún efecto sobre la carcinogénesis (70). Esto sugiere fuertemente que la cantaxantina actúa a nivel de la iniciación de la carcinogénesis y que lo hace inhibiendo la activación del carcinógeno. En lo que respecta al licopeno se mostró que la aplicación intraperitoneal (10 mg/kg de peso) dos veces a la semana 2 semanas antes de aplicar el DMBA redujo el número de tumores por rata, pero no tuvo ningún efecto sobre la incidencia, latencia o volumen de los tumores. Contrariamente, utilizando el modelo de MNU no se encontró ningún efecto sobre la carcinogénesis cuando el licopeno se administró en la dieta en forma pura o de oleoresina (71). Resulta importante detectar que las diferentes formas y vías de administración de los compuestos con potencial preventivo así como el tipo de carcinógeno utilizado permiten explicar los aparentes resultados contradictorios. También se debe

remarcar que el estudio de los carotenoides como factores preventivos de cáncer mamario ha sido muy escaso y todavía no se puede concluir sobre su valor en esta materia.

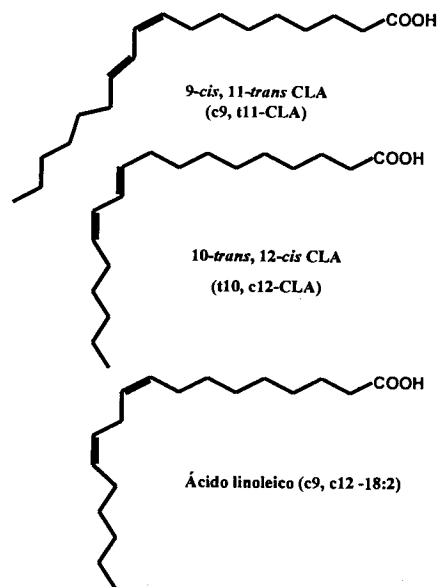
### Ácido graso linoleico conjugado

El término ácido linoleico conjugado (CLA) agrupa a una serie de ácidos grasos polinsaturados que son isómeros de posición y configuración geométrica del ácido linoleico (Todos *cis* 9-12 octadecadienoico; c9, c12-18:2) con dobles enlaces conjugados (Figura 3) (72). Los dobles enlaces del CLA se pueden localizar en las siguientes las posiciones 7, 9; 8, 10; 9, 11; 10, 12 ó 11, 13 y además puede haber combinaciones de las configuraciones geométricas, *cis* y *trans*. El isomero del CLA más abundante es el c9t11-CLA también llamado ácido ruménico. El CLA se encuentra en los derivados cárnicos de res y cordero así como en los productos lácteos derivados de estas especies de rumiantes. Adicionalmente a estas fuentes dietarias el CLA puede ser sintetizado a partir del ácido vaccénico (t11-18:1) por acción de la enzima  $\Delta 9$ -desaturasa que se encuentra abundantemente en la glándula mamaria y el tejido adiposo (73). Experimentalmente se ha descrito que el CLA tiene una serie de efectos biológicos entre los que destacan el efecto antidiabetogénico, el antiaterosclerótico, el antiadipogénico y el anticarcinogénico (72). En la mayoría de los estudios con CLA se ha utilizado una mezcla de isómeros sintetizados químicamente a partir de una reacción alcalina que utiliza como sustrato al ácido linoleico (72, 73). Los productos de dicha síntesis química son c9,t11-CLA (~42%), t10,c12-CLA (~43%), otros isómeros del CLA (c9,c11-CLA, c10,t12-CLA, t9, t11/t10, t12-CLA, c7,c9-CLA, c8,c10-CLA, c11,c13-CLA) (~5%), ácido linoleico (~0.5%), ácido oleico (~4.0 %) y otros ácidos grasos no determinados (~5.5%) (72, 73). Existen muy pocos trabajos en los que se hayan utilizados isómeros purificados del CLA esto a tenido como consecuencia que los efectos biológicos observados con la mezcla de CLA se atribuyan principalmente al c9,t11-CLA y al t10,c12-CLA (72, 73). En los trabajos que a continuación revisamos, a menos que se indique lo contrario, se utiliza la mezcla de isómeros de CLA que mencionamos anteriormente.

En modelos animales de carcinogénesis química se ha visto que el CLA inhibe la formación de papilomas de piel, cáncer de estómago, cáncer de colón y tumores mamarios (74-79). Ip et al. (77) mostraron que el CLA inhibió el desarrollo tumores mamarios inducidos con DMBA. Las ratas fueron alimentadas con la dieta basal AIN-76A o adicionada con 0.5%, 1% ó 1.5% de CLA. Los tratamientos se iniciaron 2 semanas antes de aplicar el cancerígeno y continuaron hasta el final del experimento. El número total de adenocarcinomas mamarios por rata en los grupos adicionados con CLA al 0.5%, 1%, y 1.5% CLA se redujeron en un 32%, 56%, y 60%, respectivamente. De igual manera la incidencia y el tamaño del tumor se redujeron en los animales tratados con el CLA. En general se

encontró un efecto dosis-dependiente desde 0 hasta 1% de adición del CLA, y sin beneficios adicionales por el uso de 1.5% de CLA. El consumo crónico de CLA al 1.5% no produjo consecuencias adversas en los animales. Posteriormente se mostró que el efecto anticancerígeno del CLA se daba tanto en animales tratados con DMBA como con MNU lo que sugiere que el CLA no actúa en la activación del cancerígeno (78).

FIGURA 3  
Comparación de los isómeros más estudiados del ácido linoleico conjugado (CLA) y el ácido linoleico



Estudios subsecuentes mostraron que el efecto del CLA era independiente de la forma de administración ya fuera en forma de ácidos grasos libres o como triglicéridos (80). También se ha determinado que ni la cantidad (10%, 13.3%, 16.7% ó 20%) ni el tipo de lípidos (manteca ó aceite de maíz) presentes en la dieta influyen sobre el efecto anticancerígeno del CLA (81). Igualmente se demostró que la administración de una dieta rica en CLA (1%) iniciada después del destete (21 días posparto) y hasta los 42 días de edad es suficiente para inhibir la carcinogénesis mamaria cuando el cancerígeno se aplica al día 50 de edad. En contraste, si la dieta rica en CLA se inicia posterior a la aplicación del cancerígeno su administración debe ser continua para mantener la inhibición de la carcinogénesis (80). Más recientemente, Ip et al. (82) encontraron que la adición a la dieta de una manteca enriquecida con el c9,t11-CLA y el ácido vaccénico (precursor del c9,t11-CLA) inhibía efectivamente la carcinogénesis mamaria. La concentración de CLA en la manteca enriquecida con CLA fue de 8.2 veces más en la control y la concentración total de CLA en la dieta fue de 0.8%. Es importante señalar

que la elaboración de esta mantequilla rica en CLA no consistió de la adición de CLA sintetizado químicamente sino que partió desde la alimentación que se dio a las vacas para producir una leche rica en CLA. Esto muestra que es posible enriquecer la leche y sus derivados con el CLA y hace más probable su utilización en forma de "alimento funcional". Recientemente se ha encontrado que el ácido vaccénico, presente en la leche, también inhibe la carcinogénesis mamaria (83). El efecto anticancerígeno del ácido vaccénico parece depender de su transformación a c9, t11-CLA vía la  $\Delta 9$ -desaturasa (84, 85).

A lo largo de más de una década de investigación sobre el papel del CLA en la carcinogénesis mamaria con modelos animales se han demostrado que este compuesto tiene efectos biológicos tanto el epitelio como en el estroma mamarios. Estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han mostrado que el CLA inhibe la proliferación y aumenta la apoptosis en el epitelio mamario (79,82,86,87). En lo referente al efecto sobre la proliferación celular los estudios *in vivo* muestran que el CLA inhibe la densidad del epitelio mamario en un 20% a un 30%, acompañado de una reducción en el número de pies terminales, así como una reducción de la proliferación celular en estas estructuras asociado a una reducción de la expresión de las ciclinas D1 y A (73, 82, 88). Ambas ciclinas participan en la promoción de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Estudios *in vitro* con cultivos primarios confirman que el CLA inhibe directamente la proliferación celular del epitelio mamario (79). De este modo se ha postulado que se reduce el número de las células más susceptibles a los cancerígenos (73,82). Por otra parte se ha mostrado que los animales alimentados con CLA hay un aumento en la apoptosis en las lesiones preneoplásicas generadas por los cancerígenos. La apoptosis observada en estos estudios se acompaña de una reducción de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 pero sin cambios en las proteínas pro-apoptóticas Bak y Bax (86). El efecto proapoptótico del CLA se ha observado tanto en cultivos primarios de epitelio normal como en la líneas celulares de cáncer mamario de rata inducido con MNU (79, 86).

En la glándula mamaria además del componente epitelial existe el componente estromal que forma el cojinete graso que es donde el epitelio se desarrolla, alimenta y funciona. El estroma esta compuesto principalmente por vasos sanguíneos, fibroblastos, adipocitos y abundante matriz extracelular. Existe una muy estrecha y poco estudiada comunicación celular entre el estroma y epitelio mamarios. El CLA se almacena de manera dosis dependiente en los adipocitos principalmente en forma de lípidos neutros y otro tanto en forma de fosfolípidos. La acumulación del CLA es mayor en la glándula mamaria que en el hígado o suero pero menor que en el tejido adiposo peritoneal (82, 87). Todo esto sugiere que los triglicéridos en los adipocitos mamarios pudieran representar un reservorio de CLA el cual sería transportado al epitelio

adyacente. El CLA inhibe el metabolismo del ácido linoleico hacia ácido araquidónico en un 50%, sugiriendo que uno de los mecanismos por los cuales el CLA ejerce sus efectos es a través de una alteración de la síntesis de los eicosanoides (87). También se ha demostrado que el CLA inhibe la angiogénesis en el modelo *in vivo* de ratón con reto angiogénico (89). Este modelo de angiogénesis consiste en aplicar en la glándula mamaria una inyección subcutánea de un sustrato angiogénico (células de sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm en un gel junto con el factor de crecimiento básico de los fibroblastos). De este modo los ratones alimentados con una dieta con 1% o 2% de CLA por 6 semanas previos al reto angiogénico presentaron una menor vascularización (89). Esto se acompaña de una menor presencia del factor de crecimiento vascular endotelial (VGEF) así como de su receptor la cinasa hepática fetal tipo 1 (FLK-1) y también una menor concentración en suero del VGEF (89). Existe todavía muy pocos estudios donde se distingan claramente los efectos individuales de cada uno de los isómeros del CLA.

Adicionalmente a estos efectos se ha demostrado que el CLA tiene un modesto efecto antioxidante reduciendo la lipoperoxidación tanto en la glándula mamaria normal como en la de los animales tratados con DMBA (77).

En cuanto a los mecanismos de acción del CLA no han sido firmemente establecidos (73). Se ha sugerido que los efectos del CLA podrían estar mediados en parte por un mecanismo dependiente de la activación de los PPAR (90). Los PPAR al igual que los receptores al AR son receptores que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Los PPAR forman heterodímeros con los RXR y regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos, señalización de la insulina, diferenciación adiposa y apoptosis (59, 91). En la actualidad se han descrito tres tipos de PPAR que son el  $\alpha$ ,  $\beta$  (también denominado  $\delta$ ) y  $\gamma$ , los cuales se expresan en la glándula mamaria y pueden ser activados por el CLA (73,90-93). En particular, el PPAR $\gamma$  es el que llama más la atención debido a que este tipo de receptor se encuentra poco expresado en los tumores mamarios y a que su expresión es inducida por el propio CLA (90, 91, 93). Más aún, evidencia indirecta señala que metabolitos  $\Delta 6$ -desaturados del CLA activan al PPAR $\gamma$  (93). También se ha observado que activadores específicos del PPAR $\gamma$  como la tiazolidinediona inhiben el crecimiento de células cancerosas de mama, colon y próstata (91). Además, se ha demostrado en modelos murinos que la tiazolidinediona y el GW7845, otro ligando del PPAR $\gamma$ , tienen un efecto protector contra el desarrollo de cáncer mamario (91, 94).

Probablemente uno de los mayores retos que tiene en frente el estudio de los efectos antineoplásicos del CLA sea el de distinguir los efectos de cada uno de los isómeros que se han utilizado en los diferentes bioensayos. Por ejemplo, se ha observado que tanto el c9,t11-CLA, el isómero más abundante

en la grasa de la leche, y el t10,c12-CLA, un isomero menos abundante, inhiben la angiogénesis en el modelo *in vivo* de ratón con reto angiogénico, pero tienen un claro efecto diferencial en el tejido adiposo blanco y café presente en la glándula mamaria. Ambos isomeros reducen el tamaño de los adipositos blancos pero solo el t10,c12-CLA induce apoptosis tanto en el tejido adiposo blanco como en el café (95). En contraste, el c9,t11-CLA presenta mayor afinidad que el t10,c12-CLA a los PPAR  $\alpha$  y  $\gamma$  (92, 93), poniendo en evidencia la posibilidad de mecanismos acción diferentes a los propuestos actualmente. Otro aspecto importante que tendrá que sortear la investigación en CLA es el estudio en poblaciones humanas mostrando su valor como agente preventivo de cáncer mamario seguro y eficaz. Por el momento, los estudios epidemiológicos no han encontrado una asociación de reducción del riesgo de cáncer mamario con consumo del CLA (96). Esto se puede deber en parte a la cantidad de CLA que se consume de manera habitual en la dieta, se estima que el consumo de CLA es de ~150-200 mg/día mientras que el consumo de CLA en los animales de experimentación es de 12 mg/día, lo que equivaldría a un consumo de 2.8 g/día en un individuo de 70 kg (96). Esto presupone una limitante del CLA como agente preventivo del cáncer mamario pero dado su potencial como agente coadyuvante de varias patologías humanas se están buscando alternativas para enriquecer la dieta con este tipo de ácidos grasos y también generar con menor costo los diferentes isomeros de CLA.

### Algas marinas y yodo

El consumo de las algas marinas *wakame* (*Undaria*), *nori* (*Porphyra*) y *kombu* (*Laminaria*) ha sido señalado como otro de los componentes clave de la dieta oriental que pudiera brindar la protección contra el riesgo de desarrollar cáncer mamario (9,97). Experimentalmente se ha mostrado que tratamientos a base de algas inhiben la carcinogénesis mamaria inducida químicamente. Teas et al. (97), mostraron que la adición a la dieta de un 5% del alga *Laminaria angustata* retrasa significativamente la aparición de tumores en ratas tratadas con el cancerígeno DMBA. Yamamoto et al. (98), encontraron que la adición de un 2% a la dieta de las algas *Porphyra tenera*, *Laminaria religiosa* y *Laminaria japonica var ochotensis* inhibían la incidencia de tumores mamarios inducidos con DMBA. El grupo control tuvo una incidencia tumoral del 69% mientras que las ratas tratadas con los diferentes tipos de algas tuvieron incidencias del 35% para la *P. tenera*, 35% para la *L. religiosa* y de 50% para *L. japonica var ochotensis*. Más recientemente Funahashi et al. (99) reportaron que la adición de 1 y 5 % del alga *wakame* en la dieta de ratas con tumores mamario inducidos con DMBA presentaban una reducción del tamaño tumoral. El consumo de la dieta adicionada con el alga aumento significativamente los valores de yodo en el suero pero no modifico los valores de la

hormona tiroidea tiroxina (T4). Adicionalmente se mostró que en los tumores mamarios de las ratas suplementadas con el alga se redujo la proliferación y aumento la muerte celular. También se encontró un aumento en la expresión de TGF- $\beta$  en las ratas tratadas con el alga marina. Se ha demostrado que el TGF- $\beta$  induce apoptosis en células tumorales y que actúa paracrinamente en las células endoteliales inhibiendo la angiogénesis. Posteriormente en la misma línea de investigación, Funahashi et al. (100), con el argumento de que las dosis utilizadas del alga *wakame* fueron muy altas, probaron extractos del alga marina *mekabu*. El alga marina *mekabu* al igual que la *wakame* también es rica en yodo (5.7 vs 5.9 mg/100 g) pero tiene la ventaja de ser más barata y de más fácil procesamiento. Una semana después de que aplicaron el DMBA se administro como bebida una solución a base de los extractos del alga *mekabu* durante 32 semanas. Los resultados obtenidos mostraron que el alga *mekabu* inhibía la incidencia tumoral en un 80%. Así mismo se observó un aumento en el tiempo de aparición de los tumores en las ratas tratadas con el alga *mekabu* (24-32 semanas post-DMBA) con respecto al grupo control (5-12 semanas post-DMBA). El número de tumores por rata y el tamaño de los tumores también se redujo significativamente. En el mismo trabajo Funahashi et al. (100) con experimentos *in vitro* mostraron que el tratamiento a base del alga *mekabu* indujo apoptosis en las líneas celulares de cáncer mamario MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D de manera más efectiva que el medicamento antineoplásico 5-fluorouracil.

Se han señalado varios componentes de las algas que pudieran estar mediando su efecto anticancerígeno como son el ester sulfato, el polisacárido sulfatado fucoidan y el yodo (9, 97, 98). De estos el que más se ha estudiado en cáncer mamario es el yodo. Se estima que gracias al consumo de algas el consumo de yodo en Japón alcanza los 5000  $\mu\text{g}/\text{día}$  mientras que en Estados Unidos y Reino Unido es solo de 200  $\mu\text{g}/\text{día}$  (9). Desde hace más de 30 años se ha sospechado que el yodo participa en la fisiología y patología mamaria (101). Eskin et al. (102) mostró que la deficiencia de yodo en ratas hembras producía lesiones atípicas y displásicas en la glándula mamaria. Posteriormente, Eskin et al. (103) demostró que la hiperplasia mamaria por deficiencia de yodo se reducía con la suplementación de yodo molecular ( $\text{I}_2$ ) pero no se modificaba al utilizar yoduro ( $\text{I}^-$ ). Posteriormente, Funahashi et al. (104) mostraron que la administración continua por 4 semanas de solución de Lugol (solución a base de KI y  $\text{I}_2$ ) con acetato de medroxiprogesterona inhibía el crecimiento de tumores mamarios inducidos con el cancerígeno DMBA. Este efecto de inhibición del crecimiento tumoral mamario permaneció hasta 4 semanas después de retirar los tratamientos de solución de Lugol y acetato de medroxiprogesterona. Cabe señalar que el contenido de yodo en los tumores tuvo un incremento significativo después de 4 semanas de aplicar los

tratamientos. En resultados obtenidos en nuestro laboratorio utilizando el modelo de carcinogénesis mamaria con MNU se observó que cuando se administraban crónicamente (hasta 4 meses post-MNU) en el agua de bebida  $I_2$  (0.05%), KI (0.05%) y T4 (3µg/mL) solo el tratamiento de  $I_2$  inhibió el desarrollo de tumores mamarios. El KI no redujo la incidencia tumoral con respecto al control, 93.7% vs 72.7% respectivamente, y tampoco retrasó la semana de aparición del primer tumor con respecto al control, 10.8 semanas vs 9.8 semanas. Por su parte el  $I_2$  redujo significativamente la incidencia tumoral (al 30%) y se observó una tendencia a aumentar la latencia de aparición del primer tumor (10.8 vs 12.7 semanas). Más aún, solo el tratamiento con T4 pero no con  $I_2$  y KI modificó los niveles circulantes de la hormona tiroidea, triiodotironina (T3). Estos datos indican que el efecto antitumoral del  $I_2$  no es mediado por su conversión a  $I^-$  o por su incorporación a las hormonas tiroideas. Además se encontró que si el tratamiento de  $I_2$  se suspende tanto una semana después de aplicado el MNU o después de 4 meses, la incidencia tumoral aumenta significativamente sugiriendo que el efecto protector del  $I_2$  incide en la promoción tumoral (105).

Los mecanismos por los cuales el yodo es capaz de inhibir la carcinogénesis mamaria están aún por dilucidarse. Venturi et al., (106) y Symth (107) proponen que el yodo, en todas las células que son capaces de concentrarlo, tiene una acción antioxidante. El  $I^-$  en presencia de  $H_2O_2$  y peroxidases se oxida y se pueden yodar residuos de tirosina, histidina o lípidos específicos y como consecuencia neutralizar su propio poder oxidante. Además se conoce que el KI es un quelante específico del  $OH^-$  (108). Estudios *in vitro* muestran que el NaI (15 µM) es tan efectivo como el ácido ascórbico (50 µM) para prevenir el efecto oxidativo del  $H_2O_2$  a las muestras de suero de sujetos humanos (109). Esto sugiere que el  $I^-$  puede estar actuando directamente neutralizando al  $OH^-$  o indirectamente compitiendo con los radicales libres por los sitios susceptibles de oxidación de moléculas como lípidos, proteínas o DNA. A este respecto se ha demostrado que se conoce que la deficiencia de yodo aumenta la lipoperoxidación en tiroides (107). Más aún, Katamine et al. (110) encontró que ratas con un consumo crónico (19 meses) de una dieta rica en yodo tienen una disminución en la lipoperoxidación basal en el cerebro. Estudios en nuestro laboratorio muestran que los tratamientos con  $I_2$  en el agua de bebida de ratas tratadas con y sin MNU se acompañan de una reducción en la lipoperoxidación en la glándula mamaria (105).

Otro de los efectos que pudiera estar provocando el yodo en la glándula mamaria es inhibir la proliferación celular e inducir apoptosis. La glándula tiroides con bocio (hiperplásica) reduce su tamaño después de la aplicación de KI y el análisis histológico de la glándula muestra la presencia de muerte celular (111). En estudios *in vitro* se ha observado que la administración de KI inhibe la proliferación celular e induce

apoptosis en los tirocitos (112). Más aún, se ha demostrado que el KI induce apoptosis en tirocitos y células cancerosas solo si hay la presencia de la actividad de la enzima tiroperoxidasa (TPO) (94,95). Vitale et al. (113) mostró en tirocitos que el exceso de KI induce apoptosis pero si TPO es inhibida con propiltiouracilo su efecto se cancela. Zhang et al., (114) usando células cancerosas de pulmón transfectadas con el transportador de  $Na^+/I^-$  (NIS) o con NIS+TPO juntos, la inducción de apoptosis con KI solo se presenta en las células transfectadas con NIS+TPO. Todo esto indica que el  $I^-$  que viene del KI requiere ser oxidado por la TPO para ejercer sus efectos, implicando también que el yodo actúa unido a proteínas y/o a lípidos (112). A la fecha no se ha identificado el intermediario oxidado del yodo que se genera por acción de la TPO pero existen varios candidatos como el yodinio ( $I^+$ ), el radical libre de yodo ( $I^0$ ) y el  $I_2$  (107). Las principales componentes que se yodan son la tiroglobulina, proteína indispensable para la formación de las hormonas tiroideas y lípidos derivados del ácido araquidónico (112). Entre los lípidos yodados se encuentra la  $\delta$ -yodolactona (6-yodo 8, 11, 14-eicosatrienoica- $\delta$ -lactona) la cual inhibe la proliferación celular, la captura de yodo y la producción de  $H_2O_2$  en los tirocitos (112). Nosotros proponemos que estos lípidos yodados al tratarse de derivados del ácido araquidónico podrían actuar a través de receptores nucleares tipo PPAR regulando la transcripción de genes (105, 115).

En el caso de nuestros resultados donde encontramos que el  $I_2$  y pero no el KI tiene efectos sobre la carcinogénesis nos sugiere que el  $I_2$  al tratarse de una forma oxidada no requiere de la mediación enzimática para unirse a los lípidos (105, 115). De hecho se ha mostrado síntesis *in vitro* de T4 en ausencia de TPO utilizando como precursor al  $I_2$  (116). Cabe mencionar que solo durante la gestación y lactancia la glándula mamaria expresa una enzima homóloga a TPO, la lactoperoxidasa (LPO), la cual oxida al  $I^-$  que viene de la circulación y lo une a las proteínas de la leche (117).

Finalmente, en estudios en mujeres con enfermedad fibrocística mamaria el tratamiento con  $I_2$  en dosis entre 3 y 6 mg administrado por más de 4 meses reduce la nodularidad mamaria y el dolor característicos de esta enfermedad sin tener efectos tóxicos sobre la función tiroidea y (118,119). Estos datos junto con los reportes en animales de laboratorio colocan al  $I_2$  como un candidato viable para ser utilizado en estudios clínicos de terapia contra el cáncer mamario.

## CONCLUSIONES

Como se ha podido observar los modelos animales son necesarios para la búsqueda de nuevas modalidades de terapia y prevención de cáncer mamario. Su uso representa varias ventajas para el estudio del cáncer mamario entre las que podemos destacar las siguientes: a) permite la evaluación inte-

gral de los efectos sobre el metabolismo, la defensa del huésped y el sistema endocrino de los nuevos esquemas terapéuticos y de prevención; b) dan la oportunidad de examinar relaciones causa-efecto en un ambiente *in situ* influenciado por todos los otros factores presentes en el sistema; c) reduce la variabilidad genética presente naturalmente en las poblaciones humanas; d) permiten manipulaciones genéticas y se puede determinar el papel que desempeñan dichas manipulaciones en el curso de la enfermedad; e) se prestan para el diseño de experimentos que semejen los patrones de consumo de componentes de la dieta humana; y finalmente f) son económicos, ahorran tiempo, y son ideales para abordar aquellas interrogantes que por razones éticas no se pueden contestar con la investigación en sujetos humanos.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la revisión crítica de este manuscrito al Dr. Mauro Valencia y a la Dra. Silvia Moya-Camarena del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (Hermosillo, Sonora México). También agradecemos a los servicios de información y recuperación de documentos de la biblioteca del Instituto de Neurobiología de la UNAM a cargo de la Lic. Pilar Galarza. Así mismo agradecemos los servicios de la Biblioteca Virtual de Biotecnología para las Américas del Instituto de Biotecnología de la UNAM y del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Parcialmente apoyado por CONACYT 25598-M y DGAPA-UNAM PAPIIT IN224602. P García-Solís recibe apoyo económico para estudios de posgrado por parte del CONACYT (153808) y de la DGEP-UNAM (500119785).

### REFERENCIAS

- Bray F, McCarron P, Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res* 2004; 6: 229-39.
- DeBruin LS, Joseph PD. Perspectives on the chemical etiology of breast cancer. *Environ Health Perspect* 2002; 110 Suppl 1: 119-28.
- Charpenter A, Aldaz M. The molecular basis of breast carcinogenesis. En: Tsongalis GJ, editor. *The molecular basis of human cancer*. Totowa, NJ: Humana Press; 2002. p. 347-363.
- MacMahon P, Cole T, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B, et al. Age at first birth and breast cancer risk. *Bull Wld Hlth Org* 1970; 43: 209-221.
- Gerber B, Muller H, Reimer T, Krause A, Friese K. Nutrition and lifestyle factors on the risk of developing breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 79: 265-76.
- Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, et al. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1819-27.
- WCR/AICR. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research; 1997.
- Limer JL, Speirs V. Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res* 2004; 6: 119-27.
- Cann SA, van Netten JP, van Netten C. Hypothesis: iodine, selenium and the development of breast cancer. *Cancer Causes Control* 2000; 11: 121-7.
- Crowell PL. Monoterpenes in breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 46: 191-7.
- Kline K, Lawson KA, Yu W, Sanders BG. Vitamin E and breast cancer prevention: current status and future potential. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003; 8: 91-102.
- El-Bayoumy K, Sinha R. Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds. *Mutat Res* 2004; 551: 181-97.
- Cave WT, Jr. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in rodent models of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 46: 239-46.
- Hakkak R, Korourian S, Shelnett SR, Lensing S, Ronis MJ, Badger TM. Diets containing whey proteins or soy protein isolate protect against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in female rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 113-7.
- Rowlands JC, He L, Hakkak R, Ronis MJ, Badger TM. Soy and whey proteins downregulate DMBA-induced liver and mammary gland CYP1 expression in female rats. *J Nutr* 2001; 131: 3281-7.
- Malejka-Giganti D, Niehans GA, Reichert MA, Bliss RL. Post-initiation treatment of rats with indole-3-carbinol or beta-naphthoflavone does not suppress 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary gland carcinogenesis. *Cancer Lett* 2000; 160: 209-18.
- Medina D, Thompson HJ. A comparison of the salient features of mouse, rat, and human mammary tumorigenesis. En: Asch BB, editor. *Methods in mammary gland biology and breast cancer research*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2000. p. 31-36.
- Thompson HJ. Methods for the induction of mammary carcinogenesis in the rat using either 7,12-dimethylbenz[a]anthracene or 1-methyl-1-nitrosourea. En: Asch BB, editor. *Methods in mammary gland biology and breast cancer research*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2000. p. 19-29.
- Thompson H, Sporn MB. Mammary cancer in rats. En: Teicher BA, editor. *Tumor models in cancer research*. Totowa, NJ: Humana Press; 2002. p. 173-181.
- Clarke R. Animal models of breast cancer: experimental design and their use in nutrition and psychosocial research. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 46: 117-33.
- Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc* 1976; 35: 1332-8.
- Sporn MB, Newton DL. Chemoprevention of cancer with retinoids. *Fed Proc* 1979; 38: 2528-34.
- Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1371-88.

24. Strasser-Weippl K, Goss PE. Prevention of breast cancer using SERMs and aromatase inhibitors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003; 8: 5-18.
25. Lajolo FM. Functional foods: Latin American perspectives. *Br J Nutr* 2002; 88 Suppl 2: S145-50.
26. Fay MP, Freedman LS. Meta-analyses of dietary fats and mammary neoplasms in rodent experiments. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 46: 215-23.
27. Thompson HJ, Zhu Z, Jiang W. Dietary energy restriction in breast cancer prevention. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003; 8: 133-42.
28. Rogers AE. Diet and breast cancer: studies in laboratory animals. *J Nutr* 1997; 127: 933S-935S.
29. Clinton SK. Diet, anthropometry and breast cancer: integration of experimental and epidemiologic approaches. *J Nutr* 1997; 127: 916S-920S.
30. Kritchevsky D. Caloric restriction and experimental mammary carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 46: 161-7.
31. Carroll KK, Kohr HT. Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Prog Biochem Pharmacol* 1975; 10: 308-353.
32. Willett WC. Fat, energy and breast cancer. *J Nutr* 1997; 127: 921S-923S.
33. Zhu Z, Jiang W, Thompson HJ. Mechanisms by which energy restriction inhibits rat mammary carcinogenesis: in vivo effects of corticosterone on cell cycle machinery in mammary carcinomas. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1225-31.
34. Lamartiniere CA. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1705S-7S; discussion 1708S-9S.
35. Davis SR, Dalais FS, Simpson ER, Murkies AL. Phytoestrogens in health and disease. *Recent Prog Horm Res* 1999; 54: 185-210; discussion 210-1.
36. Kurzer MS, Xu X. Dietary phytoestrogens. *Annu Rev Nutr* 1997; 17: 353-81.
37. Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S, Wang Y. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 208: 124-130.
38. Russo IH, Russo J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998; 3: 49-61.
39. Yang J, Yoshizawa K, Nandi S, Tsubura A. Protective effects of pregnancy and lactation against N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinomas in female Lewis rats. *Carcinogenesis* 1999; 20: 623-8.
40. Guzman RC, Yang J, Rajkumar L, Thordarson G, Chen X, Nandi S. Hormonal prevention of breast cancer: mimicking the protective effect of pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2520-5.
41. Rajkumar L, Guzman RC, Yang J, Thordarson G, Talamantes F, Nandi S. Short-term exposure to pregnancy levels of estrogen prevents mammary carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 11755-9.
42. Rajkumar L, Guzman RC, Yang J, Thordarson G, Talamantes F, Nandi S. Prevention of mammary carcinogenesis by short-term estrogen and progestin treatments. *Breast Cancer Res* 2004; 6: R31-7.
43. Abrams TJ, Guzman RC, Swanson SM, Thordarson G, Talamantes F, Nandi S. Changes in the parous rat mammary gland environment are involved in parity-associated protection against mammary carcinogenesis. *Anticancer Res* 1998; 18: 4115-21.
44. Thordarson G, Van Horn K, Guzman RC, Nandi S, Talamantes F. Parous rats regain high susceptibility to chemically induced mammary cancer after treatment with various mammotropic hormones. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1027-33.
45. D'Cruz CM, Moody SE, Master SR, Hartman JL, Keiper EA, Imielinski MB, et al. Persistent parity-induced changes in growth factors, TGF-beta3, and differentiation in the rodent mammary gland. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 2034-51.
46. Lamartiniere CA, Moore J, Holland M, Barnes S. Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 208: 120-3.
47. Murrill WB, Brown NM, Zhang JX, Manzollillo PA, Barnes S, Lamartiniere CA. Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1451-7.
48. Lamartiniere CA, Murrill WB, Manzollillo PA, Zhang JX, Barnes S, Zhang X, et al. Genistein alters the ontogeny of mammary gland development and protects against chemically-induced mammary cancer in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217: 358-64.
49. Fritz WA, Coward L, Wang J, Lamartiniere CA. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis* 1998; 19: 2151-8.
50. Lamartiniere CA, Cotroneo MS, Fritz WA, Wang J, Mentor-Marcel R, Elgavish A. Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *J Nutr* 2002; 132: 552S-558S.
51. Lamartiniere CA, Wang J, Smith-Johnson M, Eltoum IE. Daidzein: bioavailability, potential for reproductive toxicity, and breast cancer chemoprevention in female rats. *Toxicol Sci* 2002; 65: 228-38.
52. Chen J, Tan KP, Ward WE, Thompson LU. Exposure to flaxseed or its purified lignan during suckling inhibits chemically induced rat mammary tumorigenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228: 951-8.
53. Tou JC, Chen J, Thompson LU. Flaxseed and its lignan precursor, secoisolariciresinol diglycoside, affect pregnancy outcome and reproductive development in rats. *J Nutr* 1998; 128: 1861-8.
54. Tan KP, Chen J, Ward WE, Thompson LU. Mammary gland morphogenesis is enhanced by exposure to flaxseed or its major lignan during suckling in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229: 147-57.
55. Cotroneo MS, Wang J, Fritz WA, Eltoum IE, Lamartiniere CA. Genistein action in the prepubertal mammary gland in a chemoprevention model. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1467-74.
56. Nahta R, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Growth factor receptors in breast cancer: potential for therapeutic intervention. *Oncologist* 2003; 8: 5-17.
57. Zhou J-R, Erdman Jr., JW. Soy Consumption and cancer prevention. En: Bendich A y Deckelbaum RJ, eds. *Preventive nutrition: the comprehensive guide for health professionals*, third edition. Totowa, NJ: Humana Press; 2005. p. 123-155.
58. Constantinou AI, Krygier AE, Metha RR. Genistein induces maturation of cultured human breast cancer cell and prevents

- tumor growth in nude mice. *Am J Clin Nutr* 1998; 68(suppl): 1426S-30S.
59. Blaner WS. Biochemistry and pharmacology of retinoids. En: Lotan R, editor. *Retinoids in oncology*. New York: Marcel Dekker; 1993. p. 1-41.
  60. Yang LM, Tin UC, Wu K, Brown P. Role of retinoid receptors in the prevention and treatment of breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999; 4: 377-88.
  61. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83: 835-9.
  62. Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* 1996; 10: 940-54.
  63. Moon RC, Constantinou AI. Dietary retinoids and carotenoids in rodent models of mammary tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 46: 181-9.
  64. Lotan R. Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J* 1996; 10: 1031-9.
  65. Pfahl M, Chytil F. Regulation of metabolism by retinoic acid and its nuclear receptors. *Annu Rev Nutr* 1996; 16: 257-83.
  66. Formelli F, Barua AB, Olson JA. Bioactivities of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and retinoyl beta-glucuronide. *FASEB J* 1996; 10: 1014-24.
  67. Anzano MA, Byers SW, Smith JM, Peer CW, Mullen LT, Brown CC, et al. Prevention of breast cancer in the rat with 9-cis-retinoic acid as a single agent and in combination with tamoxifen. *Cancer Res* 1994; 54: 4614-7.
  68. Garcia-Solis P, Aceves C. 5'Deiodinase in two breast cancer cell lines: effect of triiodothyronine, isoproterenol and retinoids. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 201: 25-31.
  69. Cohen LA. A review of animal model studies of tomato carotenoids, lycopene, and cancer chemoprevention. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227: 864-8.
  70. Grubbs CJ, Eto I, Juliana MM, Whitaker LM. Effect of canthaxanthin on chemically induced mammary carcinogenesis. *Oncology* 1991; 48: 239-45.
  71. Cohen LA, Zhao Z, Pittman B, Khachik F. Effect of dietary lycopene on N-methylnitrosourea-induced mammary tumorigenesis. *Nutr Cancer* 1999; 34: 153-9.
  72. Belury MA. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Nutr* 2002; 22: 505-31.
  73. Ip MM, Masso-Welch PA, Ip C. Prevention of mammary cancer with conjugated linoleic acid: role of the stroma and the epithelium. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003; 8: 103-18.
  74. Belury MA, Nickel KP, Bird CE, Wu Y. Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion. *Nutr Cancer* 1996; 26: 149-57.
  75. Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 1987; 8: 1881-7.
  76. Park HS, Ryu JH, Ha YL, Park JH. Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Br J Nutr* 2001; 86: 549-55.
  77. Ip C, Chin SF, Scimeca JA, Pariza MW. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res* 1991; 51: 6118-24.
  78. Ip C, Singh M, Thompson HJ, Scimeca JA. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res* 1994; 54: 1212-5.
  79. Ip MM, Masso-Welch PA, Shoemaker SF, Shea-Eaton WK, Ip C. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of normal rat mammary epithelial cells in primary culture. *Exp Cell Res* 1999; 250: 22-34.
  80. Ip C, Scimeca JA, Thompson H. Effect of timing and duration of dietary conjugated linoleic acid on mammary cancer prevention. *Nutr Cancer* 1995; 24: 241-7.
  81. Ip C, Briggs SP, Haegele AD, Thompson HJ, Storkson J, Scimeca JA. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1045-50.
  82. Ip C, Banni S, Angioni E, Carta G, McGinley J, Thompson HJ, et al. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J Nutr* 1999; 129: 2135-42.
  83. Banni S, Angioni E, Murru E, Carta G, Melis MP, Bauman D, et al. Vaccenic acid feeding increases tissue levels of conjugated linoleic acid and suppresses development of premalignant lesions in rat mammary gland. *Nutr Cancer* 2001; 41: 91-7.
  84. Corl BA, Barbano DM, Bauman DE, Ip C. cis-9, trans-11 CLA derived endogenously from trans-11 18:1 reduces cancer risk in rats. *J Nutr* 2003; 133: 2893-900.
  85. Lock AL, Corl BA, Barbano DM, Bauman DE, Ip C. The anticarcinogenic effect of trans-11 18:1 is dependent on its conversion to cis-9, trans-11 CLA by delta9-desaturase in rats. *J Nutr* 2004; 134: 2698-704.
  86. Ip C, Ip MM, Loftus T, Shoemaker S, Shea-Eaton W. Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesions of the rat mammary gland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 689-96.
  87. Banni S, Angioni E, Casu V, Melis MP, Carta G, Corongiu FP, et al. Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1019-24.
  88. Ip C, Dong Y, Thompson HJ, Bauman DE, Ip MM. Control of rat mammary epithelium proliferation by conjugated linoleic acid. *Nutr Cancer* 2001; 39: 233-8.
  89. Masso-Welch PA, Zangani D, Ip C, Vaughan MM, Shoemaker S, Ramirez RA, et al. Inhibition of angiogenesis by the cancer chemopreventive agent conjugated linoleic acid [se publica una fe de erratas en *Cancer Res* 2002; 62:5624]. *Cancer Res* 2002; 62: 4383-9.
  90. Belury MA. Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. *J Nutr* 2002; 132: 2995-8.
  91. Shen Q, Brown PH. Novel agents for the prevention of breast cancer: targeting transcription factors and signal transduction pathways. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003; 8: 45-73.
  92. Moya-Camarena SY, Vanden Heuvel JP, Blanchard SG, Leesnitzer LA, Belury MA. Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR-alpha. *J Lipid Res* 1999; 40: 1426-33.



93. **Belury MA, Moya-Camarena SY, Lu M, Shi L, Leesnitzer LM, Blanchard SG.** Conjugated linoleic acid is an activator and ligand for peroxime proliferators-activated receptor-gamma. *Nutr Res* 2002; 22: 817-824.
94. **Sporn MB, Suh N, Mangelsdorf DJ.** Prospects for prevention and treatment of cancer with selective PPAR-gamma modulators (SPARMs). *Trends Mol Med* 2001; 7: 395-400.
95. **Masso-Welch P, Zangani D, Ip C, Vaughan MM, Shoemaker SF, McGee SO, Ip MM.** Isomers of conjugated linoleic acid differ in their effects on angiogenesis and survival of mouse mammary adipose vasculature. *J Nutr* 2004; 134: 299-307.
96. **McCann SE, Ip C, Ip MM, McGuire MK, Muti P, Edge SB, Trevisan M, Freudenheim JL.** Dietary Intake of conjugated Linoleic acids and risk of premenopausal and postmenopausal breast cancer, western NewYork exposures and breast cancer study (Web study). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1480-4.
97. **Teas J, Harbison ML, Gelman RS.** Dietary seaweed (Laminaria) and mammary carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 1984; 44: 2758-61.
98. **Yamamoto I, Maruyama H, Moriguchi M.** The effect of dietary seaweeds on 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene-induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Lett* 1987; 35: 109-18.
99. **Funahashi H, Imai T, Tanaka Y, Tsukamura K, Hayakawa Y, Kikumori T, et al.** Wakame seaweed suppresses the proliferation of 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene-induced mammary tumors in rats. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 922-7.
100. **Funahashi H, Imai T, Mase T, Sekiya M, Yokoi K, Hayashi H, et al.** Seaweed prevents breast cancer? *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 483-7.
101. **Eskin BA.** Iodine metabolism and breast cancer. *Trans N Y Acad Sci* 1970; 32: 911-47.
102. **Eskin BA, Shuman R, Krouse T, Merion JA.** Rat mammary gland atypia produced by iodine blockade with perchlorate. *Cancer Res* 1975; 35: 2332-9.
103. **Eskin BA, Grotkowski CE, Connolly CP, Ghent WR.** Different tissue responses for iodine and iodide in rat thyroid and mammary glands. *Biol Trace Elem Res* 1995; 49: 9-19.
104. **Funahashi H, Imai T, Tanaka Y, Tobinaga J, Wada M, Morita T, et al.** Suppressive effect of iodine on DMBA-induced breast tumor growth in the rat. *J Surg Oncol* 1996; 61: 209-13.
105. **Garcia-Solis P, Alfaro Y, Anguiano B, Delgado G, Guzman RC, Nandi S, Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Aceves C.** Inhibition of *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis by molecular iodine (I<sub>2</sub>) but not by iodide (I<sup>-</sup>) treatment. Evidence that I<sub>2</sub> prevents cancer promotion. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 236:49-57.
106. **Venturi S, Donati FM, Venturi A, Venturi M.** Environmental iodine deficiency: A challenge to the evolution of terrestrial life? *Thyroid* 2000; 10: 727-9.
107. **Smyth PP.** Role of iodine in antioxidant defence in thyroid and breast disease. *Biofactors* 2003; 19: 121-30.
108. **Murata A, Suenaga H, Hideshima S, Tanaka Y, Kato F.** Hydroxyl radical as the reactive species in the inactivation of phages by ascorbic acid. *Agric Biol Chem* 1986; 50: 1481-7.
109. **Winkler R, Griebenow S, Wonisch W.** Effect of iodide on total antioxidant status of human serum. *Cell Biochem Funct* 2000; 18: 143-6.
110. **Katamine S, Hoshino N, Totsuka K, Suzuki M.** Effects of the long-term (17-19 months) feeding of high-iodine eggs on lipid metabolism and thyroid function in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1985; 31: 339-53.
111. **Mutaku JF, Poma JF, Many MC, Denef JF, van Den Hove MF.** Cell necrosis and apoptosis are differentially regulated during goitre development and iodine-induced involution. *J Endocrinol* 2002; 172: 375-86.
112. **Pisarev MA, Gartner R.** Autoregulatory actions of iodine. En: Utiger R, editor. *Werner & Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p. 85-90.
113. **Vitale M, Di Matola T, D'Ascoli F, Salzano S, Bogazzi F, Fenzi G, et al.** Iodide excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress. *Endocrinology* 2000; 141: 598-605.
114. **Zhang L, Sharma S, Zhu LX, Kogai T, Hershman JM, Brent GA, et al.** Nonradioactive iodide effectively induces apoptosis in genetically modified lung cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 5065-72.
115. **Aceves C, Anguiano B, Delgado G.** Is iodine a gatekeeper of the integrity of the mammary gland? *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005; 10:189-95.
116. **Thrall KD, Sauer RL, Bull RJ.** Evidence of thyroxine formation following iodine administration in Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Environ Health* 1992; 37: 535-48.
117. **Strum JM.** Site of iodination in rat mammary gland. *Anat Rec* 1978; 192: 235-44.
118. **Ghent WR, Eskin BA, Low DA, Hill LP.** Iodine replacement in fibrocystic disease of the breast. *Can J Surg* 1993; 36: 453-460.
119. **Kessler JH.** The effect of supraphysiologic levels of iodine on patients with cyclic mastalgia. *Breast J* 2004; 10: 238-336.

Recibido: 04-02-2005

Aceptado:26-09-2005