

UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Polifenoles de la Dieta frente al Cáncer de Mama: Estudios Metabólicos y Moleculares en Pacientes, Animales y Modelos Celulares. (Estudio Polysen)

Dª María de los Ángeles Ávila Gálvez

2020

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Universidad de Murcia

Polifenoles de la dieta frente al cáncer de mama: estudios metabólicos y moleculares en pacientes, animales y modelos celulares. (Estudio Polysen)

Memoria realizada para optar al título de Doctora por la Universidad de Murcia

María de los Ángeles Ávila Gálvez

2020

Juan Carlos Espín de Gea, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) de Murcia

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: **"Polifenoles de la dieta frente al cáncer de mama: estudios metabólicos y moleculares en pacientes, animales y modelos celulares. (Estudio Polysen)"**, realizada por **Dña. María Ángeles Ávila Gálvez**, bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), y que presenta para la obtención de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia a 1 de Septiembre de 2020

ESPIN DE GEA JUAN CARLOS - DNI 34785457G

Firmado digitalmente por ESPIN DE GEA JUAN CARLOS - DNI 34785457G
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, o=CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS, ou=CERTIFICADO ELECTRONICO DE EMPLEADO PUBLICO, ou=CENTRO DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA APLICADA DEL SEGURA, ou=34785457, serialNumber=IDCES-34785457G, sn=ESPIN DE GEA, givenName=JUAN CARLOS, cn=ESPIN DE GEA JUAN CARLOS - DNI 34785457G
Fecha: 2020.08.17 09:58:57 +02'00'

Dr. Juan Carlos Espín de Gea
Dep. Ciencia y Tec. Alimentos
CEBAS-CSIC
30100 Campus de Espinardo, Murcia
Tel: 968 396200; Ext: 6344
e-mail: jcespin@cebas.csic.es

Antonio González Sarrías, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) de Murcia

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: **"Polifenoles de la dieta frente al cáncer de mama: estudios metabólicos y moleculares en pacientes, animales y modelos celulares. (Estudio Polysen)"**, realizada por **Dña. María Ángeles Ávila Gálvez**, bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), y que presenta para la obtención de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia a 1 de Septiembre de 2020

GONZALEZ SARRIAS, ANTONIO (AUTENTICACIÓN)

Firmado digitalmente por GONZALEZ SARRIAS, ANTONIO (AUTENTICACIÓN)

Dr. Antonio González Sarrías
Dep. Ciencia y Tec. Alimentos
CEBAS-CSIC
30100 Campus de Espinardo, Murcia
Tel: 968 396200; Ext: 6114
e-mail: agsarrias@cebas.csic.es

Juan Carlos Espín de Gea, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) de Murcia

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: **"Polifenoles de la dieta frente al cáncer de mama: estudios metabólicos y moleculares en pacientes, animales y modelos celulares. (Estudio Polysen)"**, realizada por **Dña. María Ángeles Ávila Gálvez**, bajo mi inmediata tutela, dentro del Programa de Doctorado: Tecnología de alimentos, Nutrición y Bromatología (Fac. Veterinaria, Universidad de Murcia), y que presenta para la obtención de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia a 1 de Septiembre de 2020

ESPIN DE GEA JUAN CARLOS - DNI 34785457G

Firmado digitalmente por ESPIN DE GEA JUAN CARLOS - DNI 34785457G
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, o=CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS, ou=CERTIFICADO ELECTRONICO DE EMPLEADO PUBLICO, ou=CENTRO DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA APLICADA DEL SEGURA, ou=34785457, serialNumber=IDCES-34785457G, sn=ESPIN DE GEA, givenName=JUAN CARLOS, cn=ESPIN DE GEA JUAN CARLOS - DNI 34785457G
Fecha: 2020.08.18 12:52:32 +02'00'

Dr. Juan Carlos Espín de Gea
Dep. Ciencia y Tec. Alimentos
CEBAS-CSIC
30100 Campus de Espinardo, Murcia
Tel: 968 396200; Ext: 6344
e-mail: jcespin@cebas.csic.es

La autora de esta Memoria ha disfrutado de un contrato pre-doctoral financiado por el Proyecto Intramural Especial del CSIC (**201770E081**): **Polifenoles de la dieta frente al cáncer de mama: Estudios metabólicos y moleculares. (Estudio POLYSEN).**

También ha contribuido parcialmente la financiación de los siguientes proyectos:

-**AGL2015-94124-R** (Plan Nacional I+D+i Retos).

-**201870I028** (CSIC)

-**19900/GERM/15** (Ayudas a grupos y unidades de excelencia científica de la Región de Murcia; Fundación Séneca).

Esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Ávila-Gálvez, M.A.; González-Sarrías, A.; Espín, J.C. (2018). *In vitro* research on dietary polyphenols and health: a call of caution and a guide on how to proceed. *J. Agric. Food Chem.* 66, 7857-7858.

Ávila-Gálvez, M.A.; Espín, J.C. González-Sarrías, A. (2018). The physiological relevance of the antiproliferative and estrogenic effects of dietary polyphenol aglycones versus their phase-II metabolites on breast cancer cells: A call of caution. *J. Agric. Food Chem.* 66, 8547-8555.

Ávila-Gálvez, M.A.; García-Villalba, R.; Martínez-Díaz, F.; Ocaña-Castillo, B.; Monedero-Saiz, T.; Torrecillas-Sánchez, A.; Abellán, B.; González-Sarrías, A.; Espín, J.C. (2019). Metabolic profiling of dietary polyphenols and methylxanthines in normal and malignant mammary tissues from breast cancer patients. *Mol Nutr. Food Res.* e1801239.

Ávila-Gálvez, M.A.; Romo-Vaquero, M.; González-Sarrías, A.; Espín, J.C. (2019). Kinetic disposition of dietary polyphenols and methylxanthines in the rat mammary tissue. *J. Funct. Foods,* 61, 1035162.

Giménez-Bastida, J.A.; **Ávila-Gálvez, M.A.**; Espín, J.C.; González-Sarrías, A. (2019). Conjugated physiological resveratrol metabolites induce senescence in breast cancer cells: role of p53/p21 and p16/rb pathways, and ABC transporters. *Mol. Nutr. Food Res.* e1900629.

Ávila-Gálvez, M.A.; Giménez-Bastida, J.A.; Espín, J.C.; González-Sarrías, A. (2020). Dietary phenolics against breast cancer. A critical evidence-based review and future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* Int. J. Mol. Sci. 21, 5718.

Otras publicaciones donde la autora de la Tesis ha colaborado activamente durante su etapa predoctoral:

Álvarez-Sala, A.; **Ávila-Gálvez, A.**; Cilla, A.; Barberá, R.; Garcia-Llatas, G.; Espín, J.C.; González-Sarrías, A. (2018). Physiological concentrations of phytosterols enhance the apoptotic effects of 5-fluorouracil in colon cancer cells. *J. Funct. Foods* 49, 52-60.

González-Sarrías, A.; Núñez-Sánchez, M.A.; **Ávila-Gálvez, M.A.**; Monedero-Saiz, T., Rodríguez-Gil, F.J.; Martínez-Díaz, F.; Selma, M.V.; Espín, J.C. (2018). Consumption

of pomegranate decreases plasma lipopolysaccharide-binding protein levels, a marker of metabolic endotoxemia, in patients with newly diagnosed colorectal cancer: a randomized controlled clinical trial. *Food & Funct.* 9, 2617-2622.

Ávila-Gálvez, M.A.; Giménez-Bastida, J.A.; González-Sarrías, A.; Espín, J.C. (2019). Tissue deconjugation of urolithin A glucuronide to free urolithin A in systemic inflammation. *Food & Function*. 10, 3135-3141.

Giménez-Bastida, J.A.; **Ávila-Gálvez, M.A.**; Espín, J.C.; González-Sarrías, A. (2020). The gut microbiota metabolite Urolithin A, but not other relevant urolithins, induces p53-dependent cellular senescence in human colon cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 139, 111260.

AGRADECIMIENTOS

En muchas ocasiones he imaginado como sería escribir esta página y la principal razón de que haya sido un pensamiento recurrente estos últimos años ha sido porque significaría que he llegado al final, que lo he conseguido y que por fin estaría delante del resultado de interminables horas de trabajo, considerables quebraderos de cabeza y un sinfín de dificultades en el camino.

Aunque sea mi nombre el que aparece como autora de esta Tesis Doctoral, sería injusto considerarla como solo mía, ya que tengo que dar las gracias a cada una de las personas que directa o indirectamente habéis participado en que se haya hecho realidad.

En primer lugar, gracias a mis directores Juan Carlos Espín y Antonio González por haber apostado por mí y hacerme llegar hasta aquí, ha sido un verdadero orgullo y aprendizaje teneros como directores.

Juan Carlos, gracias por tus sabios consejos y por tu claridad desde el primer día que aparecí en tu despacho. Gracias por tu perfección en cómo hacer las cosas, por guiarme, por estar siempre dispuesto a resolver cualquiera de mis dudas y en definitiva, enseñarme tantísimo durante estos años. Mi admiración por ti es infinita.

Antonio, no tengo palabras para darte las gracias por tanto que me has enseñado y dado durante estos años. Gracias por estar siempre ahí, por tu dedicación, tu preocupación y buscar siempre lo mejor para mí. Tus consejos, escuchar mis lamentos, tu ayuda…Eres una persona increíble.

Gracias a mi compañero Adrián. Iniciamos esta aventura casi de la mano y la verdad, no se me ocurre haberla compartido con nadie mejor que contigo. Estoy segura de que llegarás donde te propongas.

A mi querido Juan, trabajar a tú lado es una de las experiencias más gratificantes que me llevo de esta etapa. Gracias por tu incondicional ayuda siempre que la he necesitado. Por supuesto que gran parte de esta Tesis también te la debo a ti.

Gracias a mi compañera Rocío que ha conseguido que tenga hasta cariño por el mundo de la cromatografía. Desde el primer momento me has ayudado, gracias por todo lo que me has enseñado y qué me ha permitido llegar hasta aquí.

Gracias a mis compañeros de batalla en esta etapa: Lola, Sofía, David, Carlos, y más recientes incorporaciones como Franck o mi otro Carlos "más internacional", habéis sido un verdadero apoyo diario y un fantástico equipo durante todo este tiempo. De cada uno de vosotros me llevo algo.

Gracias a las personas que habéis aparecido durante esta etapa, aunque haya sido de manera breve en muchos casos intensa. Pocos meses han sido suficientes para aprender y descubrir a personas extraordinarias como Silvia. Tampoco me olvido de las chicas del "pasillo de enfrente" Cristina y Pilar, sois un verdadero encanto.

Gracias al resto de compañeros que el CEBAS me ha permitido conocer este tiempo (Fernando Vallejo, Pachi, Victoria, Maka, Yolanda, Natalie, María, etc.) y qué por supuesto me llevo buenos recuerdos de cada uno.

En la parte personal, gracias a mis CGS por comprender mis ausencias y estar siempre a mi lado por kilómetros que nos separen.

Gracias a "mis toledanas", Miriam y Noelia, por vuestro apoyo desde el primer día, vuestros ánimos, y por no tenerme en cuenta mi vida "asocial" de los últimos años.

Gracias a mi familia que, aunque algo atípica, os quiero de manera sobrenatural.

A mi madre, por creerme capaz de todo y querer siempre lo mejor para mí, aunque significara renunciar a cualquier cosa para que yo pudiera conseguirlo.

A mi tío Joaquín, por ser como un padre para mí en todos los sentidos. Gracias por tus consejos y por animarme siempre a perseguir mis sueños.

A mi padre, gracias por tus palabras de ánimo y por estar siempre dispuesto para cualquier cosa que necesito.

A mi pequeña "Tea" porque, aunque quizás seas pequeña para entenderlo, sólo el hecho de tenerte a mi lado y qué "te interese lo que hago de trabajo" es mucha más ayuda y motivación de la que puedas imaginar.

Y por supuesto, gracias a ti yaya, no te imaginas lo que te echo de menos cada día… El llamarte al salir del CEBAS y escuchar, ¿terminas ahora?, vaya horas hija a ver cuándo terminas "eso". Pues tu nieta por fin "ha terminado", sé que estarás orgullosa allá donde estés, va por ti yaya.

Gracias Leo, mi pequeño compañero silencioso (aunque a veces no tanto) que ha estado a mi lado durante innumerables horas delante del ordenador de casa.

José María, a ti tengo que darte las gracias y pedirte perdón a partes iguales. Gracias por aguantar mis infinitas comeduras de cabeza y por apoyarme en cada una de mis decisiones, sin incluso entender el porqué de ellas, sin tu apoyo no hubiera podido conseguirlo. Perdón porque sé que esas decisiones han hecho que cambies tus pasos para que yo pueda seguir los míos, pero prometo que intentaré recompensártelo.

Gracias de corazón a cada uno de los que me habéis apoyado y habéis hecho posible que mi sueño sea una realidad.

LA CONSTANCIA ES LA CLAVE DEL ÉXITO

ABREVIATURAS

ABC: "*ATP-binding cassette*"

ACN: Acetonitrilo

ACO: Anticonceptivos orales

ACS: "*American Cancer Society*"

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AECC: Asociación Española Contra el cáncer

Akt: Proteína quinasa B

Apaf-1: Factor activador de proteasas apoptóticas-1

Areg: Anfirregulina

ARN: Ácido ribonucleico

AUC: Área bajo la curva

Bax: Proteína X asociada a Bcl-2

Bcl-2: "*B-cell lymphoma* 2"

BCRP: Proteína de resistencia a cáncer de mama

BRCA: Gen cáncer de mama

BSA: Albúmina sérica bovina

BSGC: Biopsia selectiva del ganglio centinela

CDK: Quinasa dependiente de ciclina

CKI: Proteína inhibidora de CDK

C_{max}: Concentración máxima detectada

COMT: Catecol-*O*-metil transferasa

CV: Cristal violeta

CYPs: Enzimas del citocromo P450

DAD: Detector de barrido de diodos UV

DE: Desviación estándar

ABREVIATURAS

DER: Desviación estándar relativa

DHC: Dihidroxicumarina

DHFV: 5-(3',4'-Dihidroxifenil)-ɣ-valerolactona

DHFV 3'-sulf: 5-(3',4'-Dihidroxifenil)-ɣ-valerolactona-3'-*O*-sulfato

DH-RSV: Dihidroresveratrol

DH-RSV 3-glur: Dihidroresveratrol 3-*O*-glucurónido

DMBA: 7,12-dimetilbenzantraceno

DMSO: Dimetilsulfóxido

E2: 17β-estradiol

EA: Ácido elágico

EGCG: Epigalocatequina 3-galato

EGFR: Factor de crecimiento epidérmico

EICs: "*Extracted ion chromatograms*"

EM: Efecto matriz

EMT: Transición epitelial-mesenquimal

ENT: Enfermedades no transmisibles

ESI: Electrospray

FDG: 5-Dodecanoilaminofluorescein di-β-D-galactósido

FOXO: "*Forkhead transcription factors of the O subgroup*"

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

HED: Dosis equivalente a humanos

HER2: Factor de crecimiento epidérmico tipo 2

HP: Hesperetina

HP 3'-glur: Hesperetina 3'-*O*-glucurónido

HP 7-glur: Hesperetina 7-*O*-glucurónido

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HP 3'-sulf: Hesperetina 3'-*O*-sulfato

HP 7-sulf: Hesperetina 7-*O*-sulfato

Hytyr: Hidroxitirosol

Hytyr-glur: Hidroxitirosol glucurónido

IGF: Factor de crecimiento insulínico

IP: Yoduro de propidio

IsoUro-A: Isourolitina A

IsoUro-A 3-glur: Isourolitina A 3-*O*-glucurónido

IsoUro-A 9-glur: Isourolitina A 9-*O*-glucurónido

IT: Trampa de iones

JAK: Janus quinasas

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MeOH: Metanol

MET: Transición mesenquimal-epitelial

MRT: Tiempo medio de residencia

MS: Espectrómetro de masas

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

m/z: Relación masa carga

nM: Nanomolar

nm: Nanometros

nmol: Nanomol

ABREVIATURAS

NF-kB: Factor Nuclear kappa B

ODMA: *O*-desmetilangolensina

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Tampón fosfato salino

PI3K: Fosfatidil-Inositol-3-Quinasa

PIP: Fosfatidil inositol

pmol: Picomol

p/p: Relación peso/peso

ppm: Partes por millón

pRb: Proteína de retinoblastoma fosforilada

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

QTOF: Cuadrupolo-tiempo de vuelo

Rb: Retinoblastoma

RC: Celulosa regenerada

RE: Receptor estrógenos

RPg: Receptor progesterona

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RSV: *trans*-Resveratrol

RSV 3-glur: Resveratrol 3-*O*-glucurónido

RSV 3-sulf: Resveratrol 3-*O*-sulfato

RSV 4'-sulf: Resveratrol 4'-*O*-sulfato

SA-β-Gal: β-galactosidasa asociada a senescencia celular

SAHP: *"Senescence associated heterochromatic foci"*

SASP: *"Senescence associated secretory phenotype"*

SBF: Suero bovino fetal

SDG: Secoisolariciresinol diglucósido

s.f.: Sin fecha

SMEDDS: "*Loaded self-microemulsifying drug delivery system*"

SNEDDS: "*Self-nanoemulsifying drug delivery system*"

STAT: Transductor de Señales y Activador de la Transcripción

SULTs: Enzimas sulfotransferasas

$T_{1/2}$: Semivida de eliminación

TEB: "*Terminal end buds*"

TGF-β: Factor de crecimiento transformante-β

THS: Terapia hormonal sustitutiva

T_{last}: Tiempo de la última concentración detectada

T_{max}: Tiempo de la máxima concentración detectada

TP53: Gen supresor de tumores p53

TR: Tiempo de retención

tRb: Proteína de retinoblastoma total

TSM: Tejido sano mamario

TTM: Tejido tumoral mamario

UGTs: Enzimas UDP-glucuronil transferasas

UPLC: Cromatografía líquida de ultra alta resolución

Uro-A: Urolitina A

Uro-A 3-glur: Urolitina A 3-*O*-glucurónido

Uro-A 8-glur: Urolitina A 8-*O*-glucurónido

Uro-A sulf: Urolitina A sulfato

Uro-B: Urolitina B

Uro-B 3-glur: Urolitina B 3-*O*-glucurónido

ABREVIATURAS

Uro-B 3-sulf: Urolitina B 3-*O*-sulfato

UV-Vis: Ultravioleta-Visible

v/v: Relación volumen/volumen

WCRF: "*World Cancer Research Fund*"

Wnt: Proteínas "*wingless*" e Integrasa-1

x g: Fuerza centrifuga

X-gal: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactósido

XTT: 2,3-Bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida

6-PN: 6-Prenilnaringenina

8-PN: 8-Prenilnaringenina

µg: Microgramo

µL: Microlitro

µM: Micromolar

ÍNDICE

GENERAL

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN 1

1. ALIMENTACIÓN Y SALUD 3

2. CÁNCER DE MAMA 6

2.1. Epidemiología 6

2.2. Factores de riesgo en el desarrollo del cáncer de mama 9

2.2.1 Factores de riesgo no modificables 9

2.2.2 Factores de riesgo modificables 10

2.3. Fisiopatología del cáncer 11

2.3.1. Papel del estrés oxidativo en el cáncer 14

2.3.2. Mecanismos de supervivencia y proliferación celular 15

2.3.2.1. Ciclo celular 16

2.3.2.2. Apoptosis 20

2.3.2.3. Senescencia celular 23

2.3.3. Rutas de señalización implicadas en el cáncer de mama 25

2.3.3.1. Relación entre las diferentes rutas de señalización y el cáncer de mama 32

2.4. Diagnóstico del cáncer de mama 34

2.4.1. Pruebas de cribado 35

2.4.2. Pruebas de análisis de imagen 36

2.4.3. Pruebas de punción diagnóstica 38

2.4.4. Afectación ganglionar. Biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) 39

2.4.5. Autoexploración 41

2.5. Clasificación del cáncer de mama 42

2.5.1. Clasificación histológica del cáncer de mama 43

2.5.2. Clasificación molecular o inmunohistoquímica del cáncer de mama 46

2.5.3. Clasificación TNM. Estadificación del cáncer de mama 49

2.6. Tratamiento del cáncer de mama 51

2.6.1. Tratamientos locales 52

2.6.1.1. Cirugía 52

2.6.1.2. Radioterapia 54

2.6.2. Tratamientos sistémicos 56

2.6.2.1. Quimioterapia 56
2.6.2.2. Hormonoterapia o tratamiento hormonal 57
2.6.2.3. Terapia biológica o inmunoterapia 59
2.7. Papel de la dieta frente al cáncer de mama 60
3. COMPUESTOS FENÓLICOS 63
3.1. Clasificación de compuestos fenólicos y sus fuentes en la dieta 64
3.2. Biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos 66
3.3. Actividad quimiopreventiva de los compuestos fenólicos frente al cáncer de mama 79
3.3.1. Evidencia preclínica de diferentes familias de compuestos fenólicos frente al cáncer de mama 88
3.3.1.1. Antocianinas 90
3.3.1.2. Flavonoles, flavonas y flavanonas 95
3.3.1.3. Isoflavonas 96
3.3.1.4. Procianidinas y flavan-3-oles 98
3.3.1.5. Ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos) y fenoles simples 100
3.3.1.6. Estilbenos 101
3.3.1.7. Taninos hidrolizables 103
3.3.1.8. Cumarinas 104
3.3.1.9. Lignanos 105
3.3.2. Evidencia clínica de diferentes familias de compuestos fenólicos frente al cáncer de mama 106
4. METILXANTINAS 116
4.1. Clasificación de metilxantinas y sus fuentes en la dieta 116
4.2. Biodisponibilidad y metabolismo de las metilxantinas 118
4.3. Actividad quimiopreventiva de las metilxantinas frente al cáncer de mama 120
4.3.1. Evidencia preclínica de metilxantinas frente al cáncer de mama 121
4.3.2. Evidencia clínica de metilxantinas frente al cáncer de mama 123
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS 153
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS 161
1. PATRONES 163

1.1. Otros reactivos 164
2. EXTRACTOS VEGETALES 164
2.1. Composición de las cápsulas 165
2.2. Análisis del contenido de las cápsulas 166
2.2.1. Análisis de proantocianidinas mediante floroglucinolisis 167
3. ESTUDIO CLÍNICO POLYSEN 168
3.1. Diseño del estudio y reclutamiento de pacientes 168
3.2. Muestras de tejido mamario, plasma y orina 174
3.3. Protección de datos y privacidad 175
3.4. Extracción de metabolitos en las muestras de tejido mamario, plasma y orina 176
3.4.1. Extracción de metabolitos en tejido mamario 176
3.4.2. Extracción de metabolitos en plasma 178
3.4.3. Análisis de metabolitos en orina 178
4. MODELOS ANIMALES 179
4.1. Diseño del estudio animal 180
4.2. Administración de los extractos vegetales 181
4.3. Extracción de muestras. Sangre y tejido mamario 182
5. CULTIVOS CELULARES 183
5.1. Condiciones generales de mantenimiento de las líneas celulares 184
5.1.1. Línea celular MCF-7 185
5.1.2. Línea celular MDA-MB-231 185
5.1.3. Línea celular MCF-10A 186
5.2. Ensayos de proliferación y viabilidad celular 186
5.2.1. Ensayo de MTT 186
5.2.2. Ensayo de XTT 188
5.2.3. Ensayo de E-SCREEN 188
5.2.4. Ensayo de clonogenicidad 190
5.2.5. Tinción con cristal violeta 191
5.3. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo 192
5.4. Evaluación de apoptosis 194
5.4.1. Ensayo Anexina V/IP. Citometría de flujo 194
5.4.2. Tinción de Hoechst. Microscopía de fluorescencia 196

5.5. Medida de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-Gal) 197
5.5.1. Ensayo X-gal 198
5.5.2. Ensayo FDG 199
5.6. Análisis de proteínas 200
5.6.1. Extracción de proteínas 200
5.6.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida y análisis por Western-Blot 201
5.6.2.1. Preparación de los geles de poliacrilamida 201
5.6.2.2. Electroforesis y Western-Blot 202
5.7. Procesado de medios de cultivo para evaluar metabolismo celular 204
6. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS 204
6.1. HPLC-DAD-ESI-IT (MS/MS) 205
6.1.1. Análisis de proantocianidinas 207
6.2. UPLC-ESI-QTOF-MS/MS 208
6.2.1. Validación del método 212
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 213
CAPÍTULO 4: Perfil metabólico de fenólicos y metilxantinas de la dieta en tejido mamario sano y tumoral de pacientes con cáncer de mama: Estudio clínico POLYSEN 215
1. INTRODUCCIÓN 219
2. MATERIAL Y MÉTODOS 220
3. RESULTADOS 228
4. DISCUSIÓN 253
CAPÍTULO 5: Farmacocinética de compuestos fenólicos y metilxantinas de la dieta en plasma y tejido mamario de la rata 259
1. INTRODUCCIÓN 262
2. MATERIAL Y MÉTODOS 263
3. RESULTADOS 267
4. DISCUSIÓN 277
CAPÍTULO 6: Actividad antiproliferativa y estrogénica/antiestrogénica de metabolitos fenólicos derivados de la dieta y de sus conjugados de Fase-II en células tumorales de mama 283
1. INTRODUCCIÓN 287

2. MATERIAL Y MÉTODOS 289
3. RESULTADOS 292
4. DISCUSIÓN 301

CAPÍTULO 7: Metabolitos de Fase-II de resveratrol inducen senescencia en células tumorales de mama mediante las rutas de p53/p21 y p16/Rb, precisando de transportadores ABC 309

1. INTRODUCCIÓN 313
2. MATERIAL Y MÉTODOS 315
3. RESULTADOS 321
4. DISCUSIÓN 344

CAPÍTULO 8: DISCUSIÓN GENERAL 351

CONCLUSIONES GENERALES 379

REFERENCIAS 385

RESUMEN 441

ABSTRACT 447

APÉNDICE (Publicaciones) 451

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. ALIMENTACIÓN Y SALUD

Aunque en los últimos años el número de personas que se interesan por llevar una alimentación saludable está creciendo considerablemente, las enfermedades crónicas asociadas a malos hábitos, como la pandemia de la obesidad, se han triplicado en las últimas décadas (OMS, 2020). En este sentido, se han lanzado numerosas campañas destinadas a la población mundial para que mantengan un adecuado estilo de vida que incluya unos hábitos saludables, como la práctica de actividad física, una dieta equilibrada, cese de tabaquismo y consumo abusivo de alcohol, etc.

Durante las últimas décadas, numerosos estudios han puesto de manifiesto la estrecha relación existente entre la alimentación y la salud, evidenciando de manera creciente que una alimentación sana previene el riesgo de padecer diversas enfermedades no transmisibles (ENT), tales como cardiovasculares (Rothwell et al., 2017), neurodegenerativas (McGrattan et al., 2019), obesidad (D'Innocenzo et al., 2019), y diversos tipos de cáncer (Bradbury et al., 2014; Mayne et al., 2016). Las ENT suponen la muerte de 41 millones de personas cada año (OMS, 2013) y son responsables de elevadas tasas de incapacidad entre la población mundial (Lozano et al., 2012). Cada vez son más los estudios epidemiológicos y de intervención que correlacionan directamente a ciertos hábitos alimentarios, incluyendo la ingesta de grasas saturadas, sal, azúcar y bebidas azucaradas, como causantes de estas enfermedades (Billingsley et al., 2018; Phillips et al., 2019), mientras que un alto consumo de frutas y verduras se ha relacionado con un efecto protector (Chiavaroli et al., 2019; Lapuente et al., 2019). En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece en su informe para la prevención y control de las ENT que un menor consumo de grasas saturadas, azúcar y sal, junto con un

mayor consumo de frutas y verduras e incremento de la actividad física, son los pilares fundamentales para prevenir enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y obesidad (OMS, 2013). El beneficio del consumo de frutas y verduras no solo se debe a su relativamente bajo aporte calórico y a que proporcionan fibra y un alto contenido de micronutrientes esenciales como vitaminas y minerales, sino que también aportan otros compuestos no-nutrientes denominados de forma genérica fitoquímicos y a los que se le atribuyen diferentes actividades biológicas frente a enfermedades crónico-degenerativas. Entre los fitoquímicos presentes en los alimentos vegetales se encuentran los compuestos fenólicos, glucosinolatos, terpenoides, esteroles, etc. (Rein et al., 2012).

Respecto a los compuestos fenólicos, aunque clásicamente se han considerado como los "antioxidantes más abundantes de la dieta", destacan por muchas otras actividades biológicas que les confieren su potencial papel beneficioso para la salud y hacen que su consumo regular se relacione con la prevención de ENT. Durante las últimas décadas, un amplio abanico de estudios preclínicos, tanto en modelos animales como celulares, han descrito numerosos mecanismos de acción para un gran número de compuestos fenólicos, por los que pueden ejercer diferentes actividades biológicas como antiinflamatorios, antimicrobianos, anticancerígenos, etc. (Rothwell et al., 2017; Espín et al., 2017).

Debido a que la prevención de ENT constituye la mejor estrategia para su tratamiento, sumado a la creciente demanda por parte de los consumidores de alimentos con más propiedades saludables, ha originado que muchos constituyentes bioactivos de los alimentos, entre los que se encuentran los compuestos fenólicos, se utilicen en el desarrollo de alimentos funcionales y nutracéuticos. Así pues, el consumo de alimentos funcionales y/o nutracéuticos de acuerdo con sus potenciales compuestos bioactivos, en mayores concentraciones que en el alimento *per se*, tendrían un efecto favorable para la salud (Shahidi, 2009; Martirosyan y Singhi, 2015) y su consumo reduciría el riesgo de

padecer diversas ENT. Sin embargo, a día de hoy, la evidencia clínica sobre los efectos beneficiosos del consumo de compuestos fenólicos frente a ENT, como las enfermedades cardiovasculares o el cáncer, sigue siendo insuficiente. Hasta el momento, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, "*European Food Safety Authority*") ha avalado a muy pocos compuestos fenólicos con una alegación de ejercer un efecto beneficioso para la salud. Este hecho se debe a la disparidad sobre la evidencia que se encuentra en literatura científica para los compuestos fenólicos, principalmente por la escasez de estudios de intervención en humanos y la falta de extrapolación de estudios *in vitro* a *in vivo* para poder correlacionar sus efectos (Hollman, 2014; Espín et al., 2017). Según el Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo del 20/12/2006 se establece que cualquier efecto beneficioso debe estar demostrado científicamente. Para ello, resulta esencial establecer qué moléculas y/o derivados metabólicos y en qué concentraciones llegan a los tejidos sistémicos tras el consumo de alimentos ricos en compuestos fenólicos, para así correlacionar su papel beneficioso en la salud humana y realizar estudios *in vitro* en condiciones fisiológicamente relevantes que permitan identificar los mecanismos de acción implicados en sus efectos beneficiosos (Manach et al, 2004; D'Archivio et al., 2007; González-Sarrías et al., 2017a; Espín et al., 2017).

Con este objetivo prioritario, la presente Tesis Doctoral pretende contribuir al conocimiento sobre los efectos anticancerígenos de compuestos fenólicos de la dieta y sus metabolitos derivados, frente al cáncer de mama.

2. CÁNCER DE MAMA

2.1. Epidemiología

El cáncer de mama representa el tipo de cáncer más frecuente entre mujeres de todo el mundo (**Figura 1.1A**). En 2018, se diagnosticaron 2,1 millones de nuevos casos de cáncer de mama en todo el mundo, representando uno de cada cuatro de los nuevos casos de cáncer diagnosticados (Bray et al., 2018). A nivel mundial, la mayoría de los casos de cáncer de mama se diagnostican en mujeres con edades comprendidas entre 45 y 74 años, detectándose la mayor mortalidad entre los 65 y 84 años (Howlader et al., 2019).

La tasa de mortalidad depende del país, pero a nivel global, el cáncer de mama representa la segunda causa de muerte por cáncer entre ambos sexos después del cáncer de pulmón. Además, es la primera causa de muerte por cáncer entre la población femenina (15%), seguido del cáncer de pulmón (13,8%), colon (9,5%) y cuello uterino (7,5%) (Bray et al., 2018) (**Figura 1.1B**).

Aunque las tasas de incidencia difieren entre países desarrollados y en vías de desarrollo, en los últimos años se han ido igualando. Las altas tasas de incidencia de cáncer de mama registradas en los países desarrollados se atribuyen principalmente a la alta prevalencia de factores de riesgo modificables (nuliparidad, consumo de alcohol, terapias hormonales, etc.). Una explicación por la que países en vías de desarrollo estén incrementando sus tasas en las últimas décadas, puede deberse al creciente desarrollo social y económico que han ido ganando en los últimos años estos países.

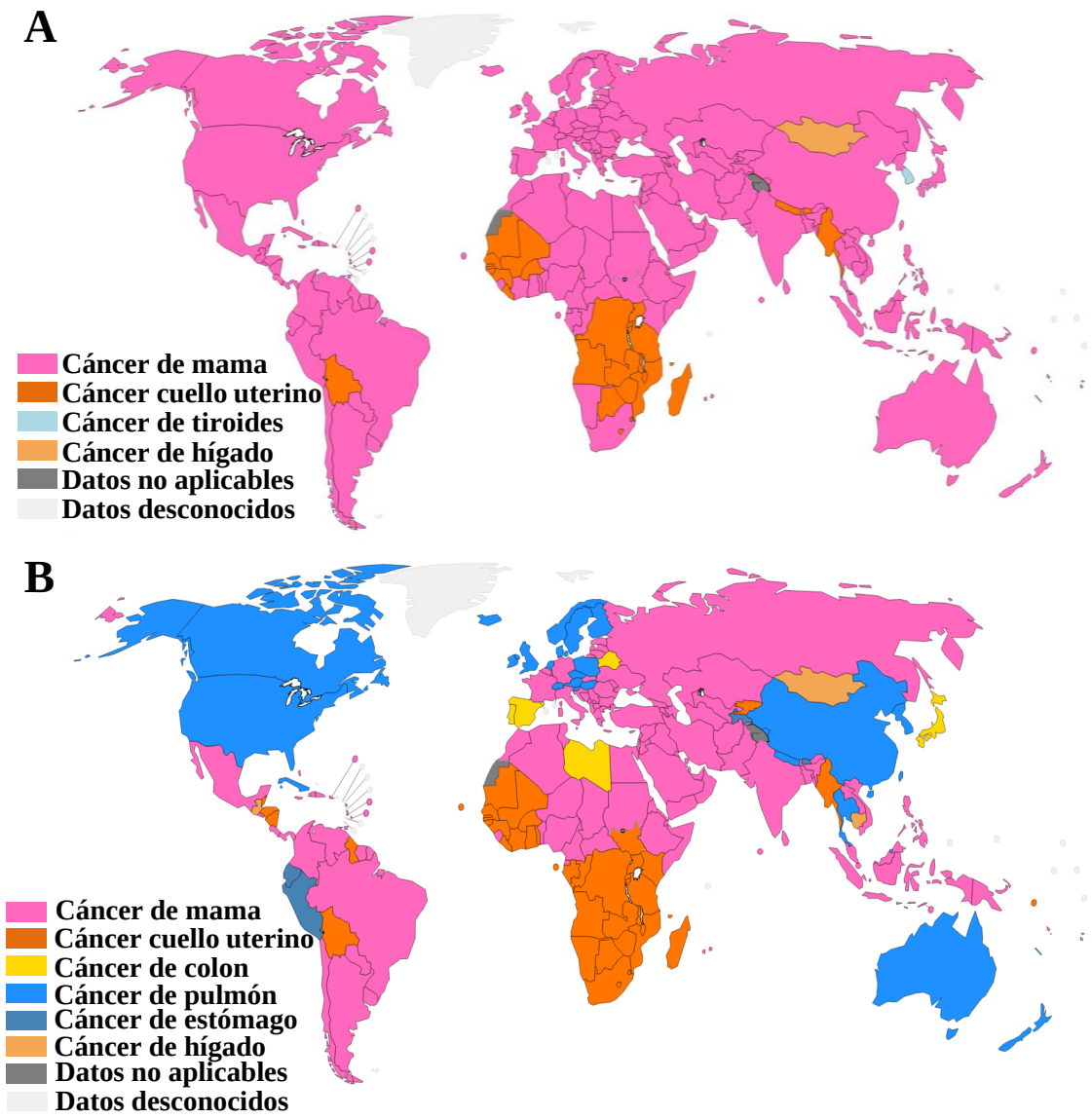


Figura 1.1. Distribución por países de la incidencia (**A**) y mortalidad (**B**) del principal tipo de cáncer entre la población femenina. (Fuente: GLOBOCAN 2018).

Según el último informe del centro internacional de investigaciones sobre el cáncer (CIIC) de la OMS, en España la incidencia anual en mujeres es de más de 30.000 casos anuales, representando casi el 29% de todos los cánceres en mujeres (GLOBOCAN, 2018). No obstante, también puede afectar a varones, aunque la incidencia es menor al 1%. En España, el cáncer de mama tiene una tasa de supervivencia a 5 años superior a un 90%, estando por encima de la media europea. La muerte por cáncer de mama ha pasado de ser la primera causa de mortalidad por cáncer entre mujeres en 2012, a ser la cuarta

causa en 2018. Sin embargo, esto no se debe a una reducción, sino a que otros tipos de cáncer como el de pulmón o el de colon han incrementado su tasa de mortalidad, puesto que el número de fallecimientos en mujeres por cáncer de mama fue de 6.075 y 6.421 en 2012 y 2018, respectivamente (Torre et al., 2012; Bray et al., 2018). Así mismo, en España, de 2012 a 2018, el incremento en la incidencia de cáncer de mama ha sido de un 30%. Esto también está unido a la cada vez más creciente concienciación de la mujer ante la aparición de signos sospechosos, junto con una mejora del diagnóstico y el incremento de campañas de mamografías preventivas.

En el caso específico de los datos en España, hay que destacar una mayor mortalidad en provincias del norte como León, Palencia o Álava, mientras que la Región de Murcia se sitúa entre las comunidades con una mayor supervivencia (**Figura 1.2**). En general, tanto la incidencia como la mortalidad del cáncer de mama en la Región de Murcia se ajustan a la media de España que son 26% y 15,3%, respectivamente (GLOBOCAN, 2018).

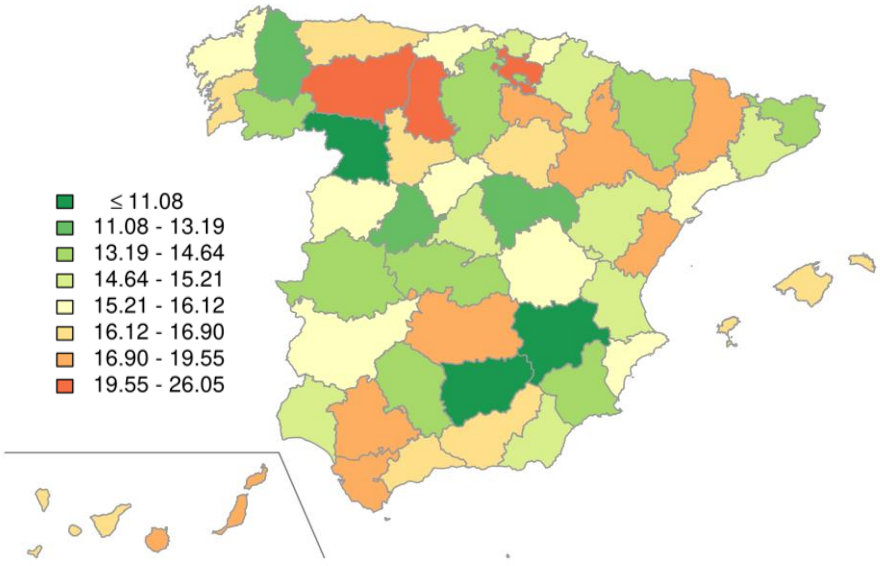


Figura 1.2. Tasas de mortalidad ajustadas a la población europea del cáncer de mama en España entre la población femenina. (Fuente: Centro Nacional de Epidemiología; Instituto de Salud Carlos III).

2.2. Factores de riesgo en el desarrollo del cáncer de mama

Son todos aquellos que aumentan la probabilidad de que una persona desarrolle un cáncer. La etiología del cáncer de mama es multifactorial, pero se han identificado de manera clara diferentes factores de riesgo asociados a esta enfermedad. Entre ellos se encuentran aquellos que son propios de cada individuo, en los que no podemos intervenir (intrínsecos, no modificables), pero también se encuentran otros factores que sí podemos cambiar (extrínsecos, modificables).

2.2.1. Factores de riesgo no modificables

Sobre estos factores no podemos actuar y son inherentes a cada individuo. Entre ellos se incluyen:

- **La edad**. El riesgo de padecer cáncer de mama aumenta de manera clara con la edad. No obstante, el incremento es más evidente en el grupo de mujeres con edades comprendidas entre 45-55 años (alrededor de la menopausia), ya que después se observa una estabilización, incluso una ligera disminución (en algunos países) en la postmenopausia (Howlader et al., 2019).
- **Ser mujer**. Claramente es una patología que afecta mucho más a la mujer. Es 100 veces más frecuente en mujeres que en hombres.
- **Raza**. Existen diferencias en las cifras de incidencia dependiendo de la raza de la mujer. Las mujeres caucásicas tienen un mayor riesgo de padecer cáncer de mama que mujeres afroamericanas (DeSantis et al., 2016).
- **Menarquía precoz y menopausia tardía**. El riesgo de padecer cáncer de mama se puede ver incrementando con la duración e intensidad a la que el tejido mamario está expuesto a los estrógenos y prolactina (McDermott, 1991). Por ello, cuanto menor sea la

edad de la menarquía en una mujer y/o más tarde la edad de su menopausia, tendrá un mayor riesgo de padecer cáncer de mama.

- **Densidad mamaria**. Una mayor proporción de tejido glandular y fibroso mamario, respecto al tejido adiposo, se atribuye a una mayor densidad mamaria. Las mujeres con una mama densa tienen mayor riesgo de padecer cáncer de mama (Boyd et al., 2011).

- **Antecedentes familiares**. Las personas con antecedentes de cáncer de mama en un familiar directo (madre o hermanas) tienen el doble de probabilidad de padecer cáncer de mama. Además, este riesgo aumenta al disminuir la edad en el momento del diagnóstico en el familiar (Barnard et al., 2015), así como al aumentar el número de familiares directos afectados (Brewer et al., 2017).

- **Mutaciones genéticas hereditarias**. Solo entre el 5-10% de los cánceres de mama son hereditarios. En el porcentaje restante intervienen claramente factores genéticos, pero son esporádicos y no heredados. Los genes más ampliamente descritos que están relacionados con el cáncer de mama hereditario son *BRCA1* y *BRCA2* (Begg, 2002).

2.2.2. Factores de riesgo modificables

Son todos aquellos sobre los que podemos actuar y, por tanto, su control es una estrategia clave para prevenir la enfermedad.

- **Estilo de vida y hábitos dietéticos**. El sedentarismo, la obesidad y el consumo de alcohol se consideran factores de riesgo ampliamente descritos que incrementan el riesgo de padecer esta enfermedad (Maas et al., 2016). Sin embargo, hábitos como el consumo de alimentos vegetales se ha asociado como un posible factor preventivo a padecer la enfermedad (Li et al., 2017).

- **Nuliparidad o edad tardía en el primer embarazo**. Se ha descrito que las mujeres que tienen su primer embarazo antes de los 30 años tienen menor riesgo de padecer cáncer de mama (McPherson et al., 2000). Por otro lado, se ha relacionado que las mujeres que no tienen hijos tienen mayor riesgo de padecer este tipo de cáncer (Opdahl et al., 2011). Además, la lactancia materna se ha asociado con un efecto protector, particularmente la de larga duración (Zhou et al., 2015).

- **Exposición a radiaciones ionizantes**. Las dosis moderadas o altas de radiaciones (como por ejemplo rayos X) antes de los 40 años, se han asociado con un mayor riesgo de padecer cáncer de mama y además incrementa cuanto mayor es la dosis de la radiación (John y Kelsey, 1993).

- **Tratamientos hormonales**. El consumo de tratamientos hormonales como son el consumo de anticonceptivos orales (ACO), o la terapia hormonal sustitutiva (THS) para aliviar los síntomas de la menopausia, se han relacionado con un incremento en la incidencia del cáncer de mama. Sin embargo, es un incremento ligero que en el caso de los ACO solo se ha relacionado con tratamientos de más de 10 años (Washbrook, 2006); y en el caso de la THS, el riesgo disminuye por completo a los dos años de haber terminado con el tratamiento (Narod, 2011).

2.3. Fisiopatología del cáncer

En términos generales, el cáncer engloba a más de doscientas enfermedades (entre tipos y subtipos) que se pueden desarrollar en las distintas partes del cuerpo (mama, pulmón, próstata, colon, útero, etc.) con una característica común, el crecimiento descontrolado a partir de una única célula. En condiciones normales, las células siguen un "proceso ordenado" de crecimiento y división, con el objetivo de formar nuevas

células y reemplazar aquellas que envejecen o están dañadas. En cambio, cuando el proceso se descontrola aparece un tumor (hiperplasia). Si el tumor presenta limitación en crecimiento y queda circunscrito a una zona específica (no invasivo) se denomina "tumor benigno". Pero el verdadero problema surge cuando aparecen células displásicas, con alteración en su fisiología y forma. Estas células suelen acumular mutaciones y derivar en células malignas o cancerosas, las cuales sobreviven dando lugar a nuevas células con estos mismos daños. Este carcinoma *in situ*, con el tiempo (de meses a décadas), puede invadir el tejido circundante y a menudo diseminarse (metástasis) a otras zonas del cuerpo, fundamentalmente por vía linfática o sanguínea.

El término carcinogénesis hace referencia al proceso multifactorial donde intervienen diferentes mecanismos por los cuales se produce el cáncer. Como se ha mencionado, el desarrollo de un cáncer comienza cuando una célula normal sufre una alteración (mutación) en uno o varios genes que controlan el crecimiento y la diferenciación celular, así como la muerte celular. Estas mutaciones provocan que las células ignoren las señales que detienen su división, lo que promueve un crecimiento celular descontrolado, evadiendo mecanismos de control presentes en células normales, como es la muerte celular programada (apoptosis) o mecanismos de reparación del material genético y que darán lugar a la transformación de células normales en cancerosas (Patterson et al., 2018). Los cambios genéticos producidos en el cáncer afectan a tres tipos diferentes de genes, y según el tipo o número de mutaciones aumentará la probabilidad de desarrollar carcinogénesis:

1) Proto-oncogenes: Son responsables del crecimiento y división celular. Sin embargo, cuando estos genes se alteran o son más activos de lo normal pueden convertirse en genes causantes de cáncer (oncogenes), permitiendo que las células sigan creciendo y dividiéndose sin control.

2) Genes supresores de tumores: Participan en la apoptosis y en la detención de la división celular. Las células con alteraciones en los genes supresores de tumores pueden dividirse sin control.

3) Genes reparadores del ADN: Son los encargados de reparar el material genético dañado. Las células con mutaciones en estos genes tienden a formar mutaciones en otros genes. Estas mutaciones se irán acumulando con cada replicación, pudiendo generar células cancerosas.

Las mutaciones en estos tipos de genes pueden encontrarse juntas en los distintos tipos de cáncer. La mayoría de los cánceres no se clasifican solo por la localización donde se forman o por su histopatología, sino que también se hace atendiendo a las alteraciones genéticas que se cree que son las causantes.

El cáncer tiene un importante componente genético. Los cambios genéticos que causan cáncer pueden heredarse de los padres, pero también pueden suceder en la vida de una persona como resultado de errores que ocurren al dividirse las células o por el daño del ADN causado por algunas exposiciones del ambiente. Estas exposiciones ambientales pueden ser a sustancias como los compuestos químicos en el humo de tabaco y la radiación, incluida la ultravioleta del sol. Por tanto, la implicación de tantos y diversos factores genéticos nos permite considerar varios puntos de intervención con el fin de prevenir, disminuir o revertir la carcinogénesis (Vinay et al., 2015).

En general, las células cancerosas tienen más alteraciones genéticas que las células normales. Algunos de estos cambios pueden no estar relacionados con el inicio del cáncer y ser simplemente resultado de la enfermedad, pero no su causa.

2.3.1. Papel del estrés oxidativo en el cáncer

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, *"Reactive Oxygen Species"*) son moléculas producidas de manera habitual por el metabolismo normal de una célula. Sin embargo, cuando hay un desequilibrio en el balance de su producción-eliminación se puede producir un estado de estrés oxidativo que puede inducir daños en el ADN y otros componentes celulares. Esto causa alteraciones genéticas, disfunción de proteínas o alteraciones en la membrana plasmática que favorecerían el inicio del proceso de carcinogénesis (Valko et al., 2006).

En este sentido, el incremento de la producción de ROS puede provocar una situación pro-oncogénica donde exista una disfunción mitocondrial y que desencadene la formación de diferentes productos oxidados o que directamente cause un daño en el ADN. Así, una de las estrategias más efectivas frente a la carcinogénesis consiste en bloquear o eliminar estos compuestos oxidados. De manera natural, las células tienen varios mecanismos a través de los cuales pueden transformar y eliminar las ROS. Estos sistemas son por un lado sistemas enzimáticos, en el que intervienen enzimas como glutatión peroxidasa, catalasa o superóxido dismutasa. Por otro lado, también se encuentran los sistemas no enzimáticos de defensa que son compuestos que actúan como antioxidantes, como el glutatión o vitaminas que por su estructura son capaces de reaccionar con las ROS permitiendo neutralizar su efecto tóxico para las células. En este último punto, cobran especial interés los compuestos fenólicos que por su estructura son capaces de neutralizar radicales libres participando efectivamente en el sistema de defensa no enzimático, previniendo el posible daño celular asociado.

También hay que destacar que cuando el tumor ya está instaurado el aumento de la presencia de ROS inducirá la muerte de las células tumorales, siendo este uno de los mecanismos de acción descrito para diferentes fármacos empleados como

quimioterapéuticos. Por tanto, de acuerdo con estas dos situaciones, la producción de ROS puede actuar a favor o en contra del desarrollo del cáncer.

2.3.2. Mecanismos de supervivencia y proliferación celular

Para comprender el efecto que pueden tener las mutaciones sobre el ADN y como afectan al crecimiento, proliferación y muerte celular, es indispensable conocer estos mecanismos. A continuación, se detallan procesos fundamentales que suceden en las células humanas para mantener su equilibrio: el ciclo celular, la muerte programada (apoptosis) y la senescencia celular.

Los mecanismos celulares implicados en la formación de un tumor son reversibles (**Figura 1.3**), por lo que pueden ser modulables o subsanables mediante diferentes vías. Así, si la célula que sufre una mutación se está dividiendo en ese momento, diferentes mecanismos pueden bloquear el ciclo celular para reparar el daño y después, continuar la división. Sin embargo, en otros casos donde ciertos daños del ADN son irreparables, la célula debe iniciar su muerte programada o apoptosis y así, poder eliminar la célula afectada evitando continuar replicando el daño originado.

Otro mecanismo relacionado es la senescencia celular, el cual puede prevenir la propagación de células dañadas. Este proceso consiste en un bloqueo irreversible del ciclo celular, lo cual limita la proliferación celular y la replicación de las células dañadas.

En definitiva, si alguno de estos mecanismos falla, las células con su material genético dañado proliferarían y podrían dar lugar a la formación de un tumor.

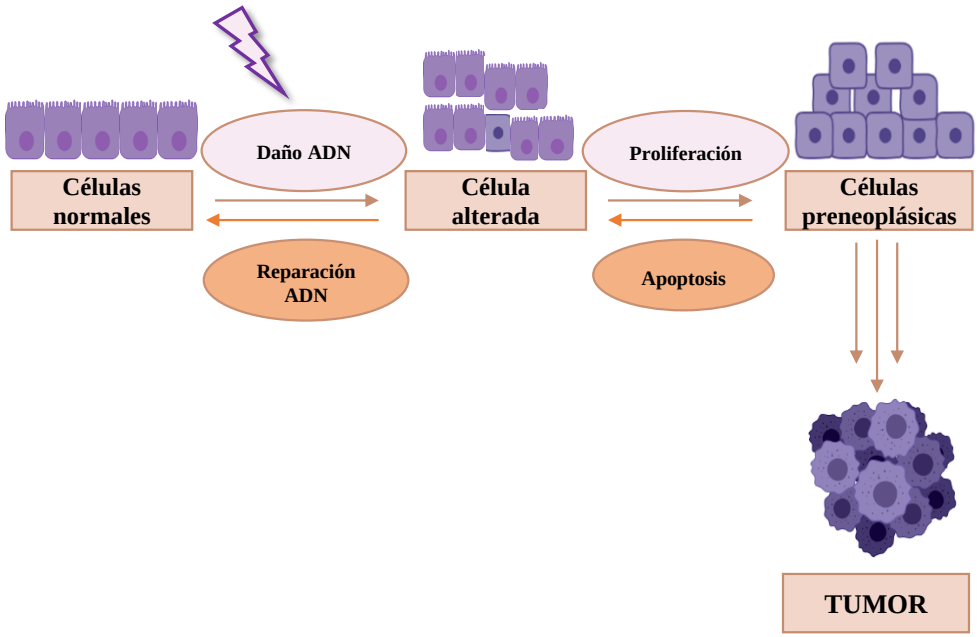


Figura 1.3. Eventos que suceden durante el proceso de tumorogénesis.

2.3.2.1. Ciclo celular

Como se ha comentado, el ciclo celular es un proceso celular básico para el crecimiento y proliferación normal de una célula. El ciclo celular es un proceso ordenado que se compone fundamentalmente de 4 etapas (**Figura 1.4**). Dentro de estas 4 etapas encontramos dos estados muy diferenciados que son: la interfase o no división y la mitosis o división (fase M).

La interfase es el periodo más largo del ciclo celular y es el estado previo en el que está la célula antes de entrar en mitosis. La interfase comprende a su vez 3 fases distintas:

-Fase G_1: En esta fase las células sintetizan material citoplasmático (principalmente ARN y proteínas). La célula aumenta su tamaño debido a la síntesis de todos sus componentes.

-Fase S: Es la fase de síntesis del ADN. Cada cromosoma se duplica pasando a tener dos cromátidas idénticas. Así, al finalizar esta fase, el núcleo pasa a tener el doble de contenido y la dotación cromosómica pasa de 2n a 4n.

-Fase G_2: Es la fase previa a la mitosis o división celular. Las células siguen sintetizando ARN y proteínas que formarán parte de cada una de las células hijas.

Al finalizar la interfase, la cromatina comienza a condensarse y la célula pasará entonces a la fase de división celular o mitosis:

La fase M es la fase de división celular o mitosis. La célula progenitora pasará a dividirse en dos células hijas. En esta fase están implicadas numerosas proteínas, las cuales son diferentes para los dos eventos que tienen lugar durante la mitosis: división del núcleo y división del citoplasma o citoquinesis.

Existe otra fase conocida como Fase G_0 cuando las células han dejado de dividirse, conocido como estado de quiescencia, bien de forma temporal o bien de forma permanente, como en el caso de las neuronas.

La duración de las distintas fases del ciclo celular varía considerablemente entre los diferentes tipos celulares, aunque está descrito que una célula humana tarda en realizar las diferentes fases del ciclo aproximadamente 24 horas (Cooper, 2000).

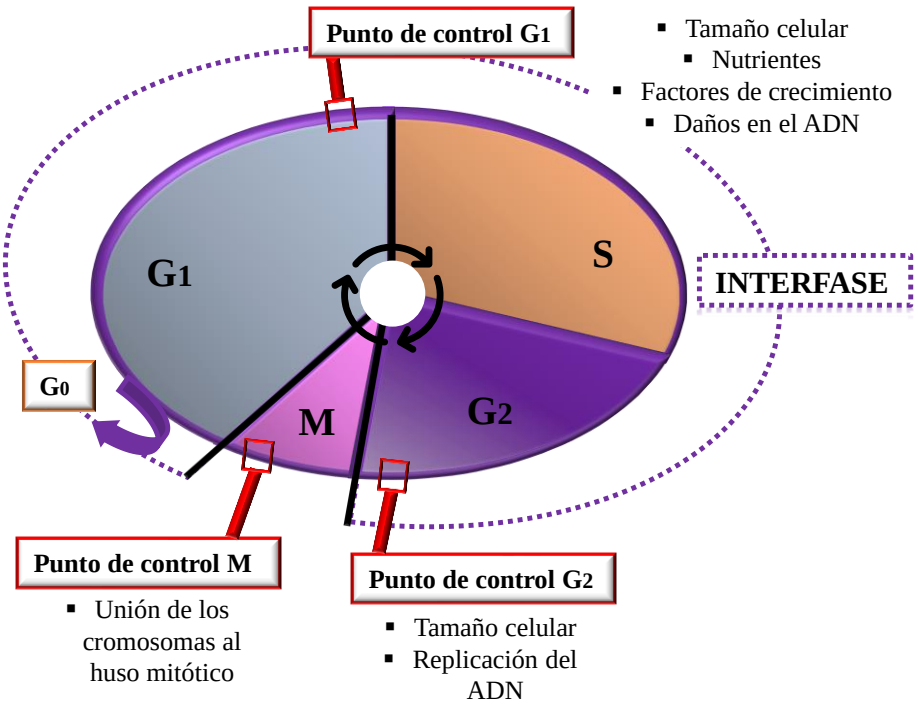


Figura 1.4. Fases del ciclo celular y comprobaciones que tienen lugar en cada punto de control.

La progresión de una fase a otra del ciclo celular es un proceso complejo y controlado en el que intervienen diversas proteínas entre las que se encuentran diferentes ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, *"Cyclin Dependent Kinases"*), que se unen y son activadas, dependiendo de la fase del ciclo celular. En la **Tabla 1.1**, se muestran las principales CDKs que participan en el ciclo celular, la ciclina con la que se unen y el punto del ciclo en el cual intervienen. En general, CDK1 y CDK2 pueden unirse con ciclinas de diferentes tipos (A, B, D y E) mientras que, CDK4 y CDK6 solo con ciclinas tipo D (Hydbring et al., 2016). Los complejos CDK-ciclina son reguladores fundamentales para la progresión del ciclo celular ya que permiten la transducción de señales extracelulares de factores de crecimiento y la incorporación de nutrientes a la célula, entre otros procesos (Malumbres, 2014).

Tabla 1.1. Principales CDKs y ciclinas que intervienen en el ciclo celular.

CDKs	Unión con ciclinas	Fase del ciclo
CDK1	Ciclina B Ciclina A	Mitosis Fase G_2
CDK2	Ciclina A Ciclina E	Fase S Transición G_1/S
CDK3	Ciclina C	Fase G_1 Transición G_1/G_0
CDK4	Ciclinas D1, D2, D3	Fase G_1
CDK6	Ciclinas D1, D2, D3	Fase G_1

Además, también puede existir una regulación negativa de la actividad quinasa mediada por otras proteínas que son inhibidoras de CDKs (CKIs) (Bai et al., 2017). Las dos principales familias de CKIs son: INK4 y Cip/Kip (Chim et al., 2006). Concretamente, p16 (INK4a), p15 (INK4b), p18 (INK4c), y p19 (INK4d) inactivan

CDK4 y CDK6, mientras que p21 (Cip1), p27 (Kip1) y p57 (Kip2) impiden la formación de los complejos con las ciclinas D, E, y A (Quereda et al., 2016).

Por otro lado, en diferentes momentos del ciclo celular existen unos puntos de control, donde el ciclo puede detenerse si existe daño en el ADN o las condiciones para la división de la célula no son las adecuadas (Deritei et al., 2019). Los principales puntos de control son:

1) Punto de control G_1: El bloqueo en G_1 ocurre si hay daño en el ADN. En este punto de control interviene la proteína supresora de tumores p53 que induce la transcripción de la proteína 21 (p21), un inhibidor de las CDKs y que conlleva la detención del ciclo en este punto, evitando la replicación del ADN dañado (Engeland, 2018). Al mismo tiempo, este punto puede controlarse por CKI p16 inhibiendo la formación del complejo CDK4/6 con la ciclina D1. La formación de este complejo induce la fosforilación (p) de la proteína del retinoblastoma (Rb), el cual libera el factor de transcripción E2F favoreciendo la expresión de ciclina E que se unirá con CDK2, permitiendo el paso a la fase S. Por tanto, existe una convergencia de p53 y pRb en la regulación de los complejos CDK (Manning et al., 2014).

2) Punto de control G_2: Detiene el paso de la célula a la fase de mitosis si existe algún fallo en la replicación del ADN. La enzima Cdc25 es la responsable de activar el complejo ciclina B/CDK1 mediante fosforilación, permitiendo a la célula entrar en mitosis (Hiraoka et al., 2019). Si hay fallo en la replicación del ADN la quinasa Wee1 inhibe la acción de Cdc25 (Do et al., 2013).

3) Punto de control M: Se comprueba el correcto ensamblaje del huso mitótico, corroborando que todos los cromosomas estén correctamente asociados a dicho huso. Si existen fallos en el alineamiento de algún cromosoma se producen diferentes proteínas que inducirán la apoptosis de la célula para evitar la formación una célula aneuploide.

Por tanto, acumulaciones de alteraciones en los genes implicados que codifican proteínas que interviene en el ciclo celular como las ciclinas, CDKs, CKIs, o en los distintos puntos de control del ciclo celular, incrementan el riesgo de que aparezca un cáncer (Basu, 2018).

Por otro lado, bloquear el ciclo celular en células cancerosas, mediante la modulación de la expresión o actividad de proteínas implicadas, es un mecanismo de gran interés para controlar la proliferación del tumor.

2.3.2.2. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es otro proceso fundamental por el cual se controla el crecimiento y proliferación celular. Mediante este proceso se consigue un equilibrio, permitiendo un proceso de renovación celular si las están células dañadas o envejecidas. Las fases de la apoptosis son:

1) Fase de activación: En esta primera fase el estímulo apoptótico activa los componentes involucrados en el proceso de apoptosis.

2) Fase de propagación: En esta fase se altera la permeabilidad de la membrana mitocondrial debido a la formación de un complejo compuesto por diferentes proteínas que conduce a la liberación del contenido proteolítico de la mitocondria al citoplasma.

3) Fase de degradación: En esta última fase se produce la degradación de proteínas y de la cromatina. Finalmente, se formarán los restos celulares conocidos como "cuerpos apoptóticos", evitando la liberación al medio extracelular de componentes celulares que podrían producir fenómenos de inflamación perjudiciales para el organismo, siendo los macrófagos las células encargadas de eliminarlos.

La apoptosis es un proceso que se produce de manera habitual en todas las células del organismo, pero también puede ser inducido por diferentes agentes que causen daño en

el ADN o estrés celular (Hassan et al., 2014). La inducción de apoptosis en células cancerosas es un mecanismo de gran interés, ya que representa una herramienta útil para la eliminación de estas células.

La apoptosis es un proceso altamente regulado y eficiente en el que participan numerosas proteínas llamadas caspasas (Ponder y Boise, 2019). Las caspasas son cisteín proteasas que degradan componentes vitales de la célula y que conducen a la célula a la muerte por apoptosis, aunque estas proteínas son sintetizadas como procaspasas y permanecen inactivas hasta recibir un estímulo externo o interno. A continuación, como resultado de una cascada de activación, estas procaspasas se activan por otras caspasas denominadas caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9, y 10) y por último, las denominadas caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7) ejecutan el proceso apoptótico (Tang et al., 2019).

Se han descrito dos rutas diferentes por las cuales se puede desencadenar el proceso apoptótico: la ruta intrínseca o mitocondrial (independiente de receptores de membrana), y la ruta extrínseca (mediada por la señalización a través de receptores de membrana) (**Figura 1.5**).

En la ruta intrínseca o mitocondrial pueden converger diversos estímulos apoptóticos que originan un cambio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, lo que conduce a la activación de la proteína iniciadora de esta ruta, que es la caspasa-9. La caspasa-9 inicia entonces la liberación de péptidos desde el espacio intermembrana de la mitocondria hacia el citoplasma, como es el componente de la cadena de transporte de electrones, denominado citocromo c. Seguidamente, el citocromo c se une con Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas-1), uniéndose a su vez a la procaspasa-9 y formando un complejo denominado apoptosoma (Singh et al., 2019). El apoptosoma induce la activación de la enzima proteolítica o efectora, caspasa-3, iniciando el desensamblaje celular y promoviendo el proceso de apoptosis. Los miembros de la

familia Bcl-2 son las principales moléculas de la vía intrínseca que dependiendo de su función serán moléculas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL o BAG) o proapoptóticas (Bax, Bak, Bik, Bim, PUMA, etc.) (Warren et al., 2019). El aumento de los niveles de expresión de los miembros proapoptóticos determinaran la liberación del citocromo c al citoplasma iniciando la activación de caspasas (Berger et al., 2009).

La ruta extrínseca comienza con la unión de ligandos (Fas-L, TNF-α, TRAIL, etc.) a sus correspondientes receptores de membrana e iniciando así la activación de la ruta de señalización de caspasas. El complejo formado por las diferentes proteínas en cada caso conduce a la activación de caspasa-8 o caspasa-10, promoviendo la actividad proteolítica de las caspasas efectoras (caspasa 3 y/o caspasa-7) (Ghavami et al., 2014). Entre otros factores involucrados en esta ruta están las proteínas de la familia Bcl-2, calpaína y Ca^{2+}, y proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) (Fan et al., 2005).

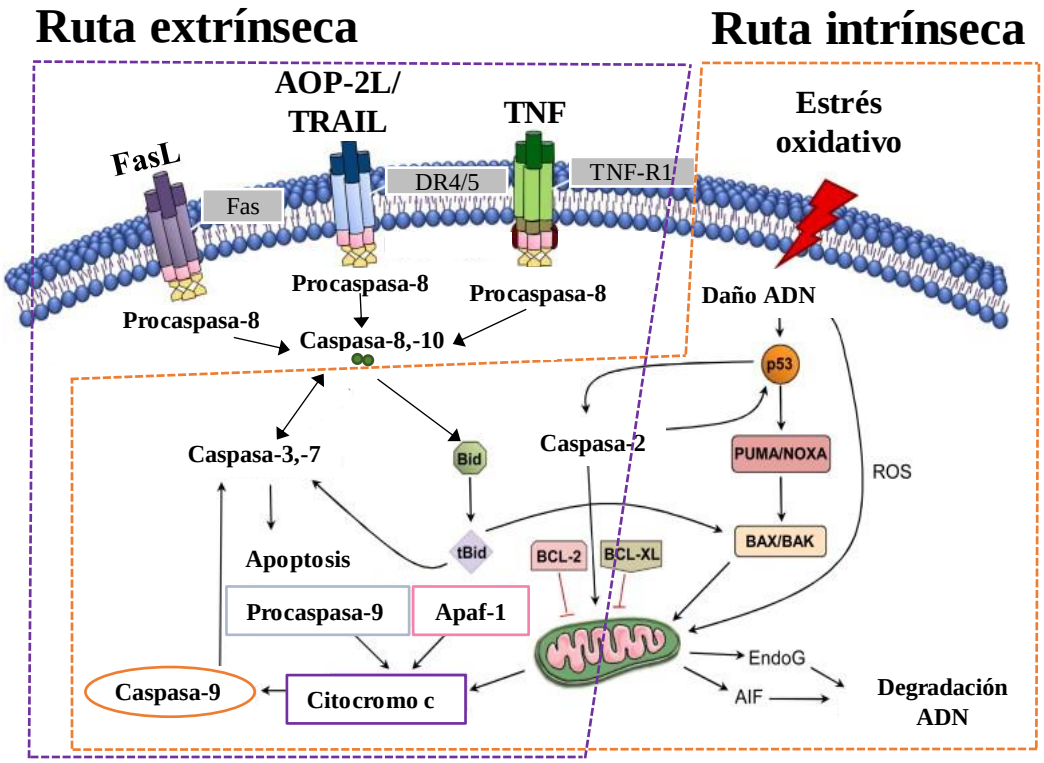


Figura 1.5. Ruta intrínseca y extrínseca de apoptosis con los principales componentes involucrados en ellas. (Adaptada de Ghavami et al., 2014).

La capacidad de evadir la apoptosis es uno de los fenómenos por los cuales se puede iniciar el proceso de carcinogénesis. Existen diferentes mecanismos para que las células tumorales puedan evadir la apoptosis. Por ejemplo, las células tumorales pueden perder su capacidad de inducir apoptosis debido a una disminución de la expresión de *BCL-2* o por mutaciones en genes que codifican proteínas pro-apoptóticas, como la proteína Bax. La expresión de *BAX* y *BCL-2* están regulada por el gen supresor de tumores *TP53*, el cual se estima que está mutado en un 30-35% de todos los cánceres de mama y en el 80% de los cánceres de mama triple negativo (Duffy et al., 2018).

2.3.2.3. Senescencia celular

Este mecanismo se describió por primera vez como una pérdida en la capacidad de replicación de células normales en cultivo, asociándose con un proceso de envejecimiento celular (Hayflick y Moorhead, 1961). Aunque la senescencia celular se ha considerado como un proceso irreversible en el cual las células permanecen vivas pero son incapaces de dividirse (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007), a día de hoy, existen diferentes estudios que apuntan a que es un proceso dinámico y no necesariamente terminal, incluso se ha descrito que células senescentes con fenotipo canceroso tras un proceso de reprogramación celular son capaces de causar recidivas (Lee y Schmitt, 2019).

Diversas investigaciones han permitido conocer que la senescencia juega un papel fundamental en la reparación de tejidos e inflamación como también en procesos asociados a la supresión y formación de tumores. Por ejemplo, una vez se origina un daño en una célula (acortamiento de telómeros, daño en el ADN, estrés oxidativo, etc.) se puede desencadenar el proceso de senescencia celular, provocando un bloqueo permanente del ciclo celular y evitando que la célula siga replicándose. Además, y dado que este proceso puede iniciarse como respuesta al estrés o a un daño ocurrido en una célula, constituye

una ruta alternativa de activación a la apoptosis. Por tanto, estos eventos son vitales a la hora de considerar a la senescencia como un mecanismo supresor de tumores (Lee y Schmitt, 2019).

Las células senescentes experimentan cambios fenotípicos como son una morfología más larga y aplanada, así como tener una mayor capacidad metabólica. Este metabolismo aumentado se relaciona directamente con el incremento de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-Gal) debido a un mayor número de lisosomas (Cai et al., 2020). SA-β-Gal es un marcador ampliamente descrito para identificar las células senescentes. Además de estas características, el proceso de senescencia celular se acompaña de un incremento de secreción de múltiples moléculas pro-inflamatorias (citoquinas, factores de crecimiento, proteasas, etc.) conocidas por ser las responsables del fenotipo asociado a senescencia (SASP, *"senescence associated secretory phenotype"*) (van Deursen, 2014). Otro aspecto característico de las células senescentes es la modificación en la estructura de la cromatina formando focos de heterocromatina (SAHF, *"senescence associated heterochromatic foci"*) (Gorgoulis et al., 2019). Así pues, la caracterización de las células senescentes se basa en la identificación de sus características bioquímicas y morfológicas (marcadores de senescencia) que permiten diferenciarlas. A diferencia de las células quiescentes (fase G_0, **Figura 1.4**), las células senescentes no responden a estímulos mitogénicos o de factores de crecimiento.

En resumen, la senescencia celular es un proceso que aparece como respuesta al estrés y daño ocurrido en una célula (**Figura 1.6**). El inicio de la senescencia produce una alteración en la estructura de la cromatina y en la secreción de diversas citoquinas pro-inflamatorias y proteínas. Ante la respuesta al daño, estos estímulos convergen, provocando la detención permanente del ciclo celular. Este bloqueo irreversible del ciclo celular se controla principalmente por la activación de las rutas p53/$p21^{Cip1/Waf1}$ y

p16^{INK4a}/Rb donde participan distintos genes supresores de tumores (Sreekumar et al., 2020).

La activación de p53 induce la transcripción de *p21$^{Cip1/Waf1}$* (p21) bloqueando la actividad de quinasas dependientes de ciclina (CDK2) (**Figura 1.6**), impidiendo la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (Rb). La inhibición de la activación de retinoblastoma (estado fosforilado) también puede ocurrir por la activación de p16^{INK4a} (p16) (**Figura 1.6**). La activación de ambas rutas tendrá como resultado final células senescentes y con una salida permanente del ciclo celular (d'Adda di Fagagna, 2008).

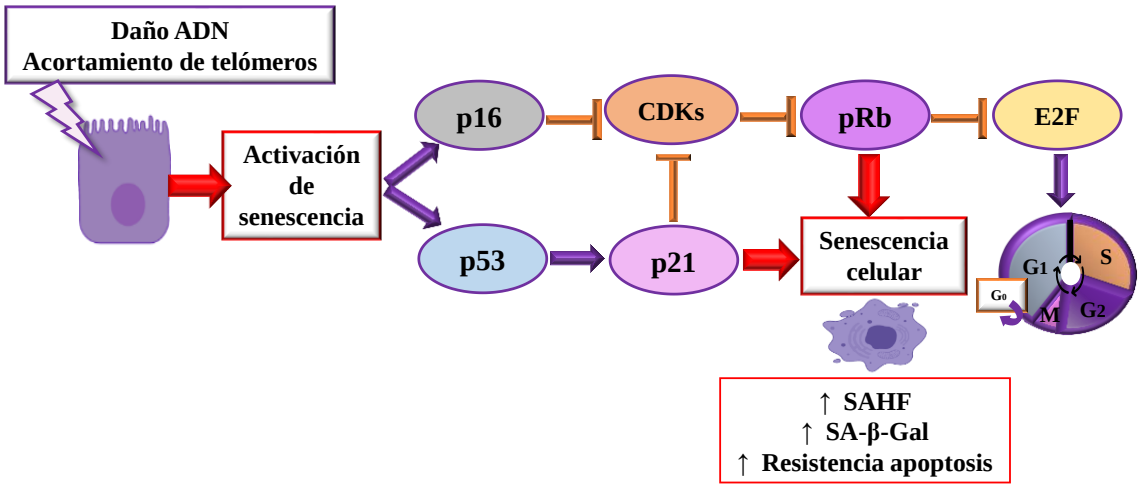


Figura 1.6. Activación de las principales rutas implicadas en la senescencia celular.

2.3.3. Rutas de señalización implicadas en el cáncer de mama

Como se ha descrito, existen numerosas rutas de señalización implicadas en la regulación de los distintos procesos celulares (proliferación celular, apoptosis, etc.). En consecuencia, si en alguna de estas rutas se produce alguna alteración se puede desencadenar la carcinogénesis. Las principales rutas de señalización que están involucradas en el proceso de carcinogénesis del cáncer de mama son:

1) **RE** (Receptores estrogénicos)
2) **PI3K/Akt** (Fosfatidil-Inositol 3-Quinasa/Proteína Quinasa B)

3) **MAPKs** (Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos)

4) **JAK-STAT** (Janus Quinasas-Transductor de Señales y Activador de la Transcripción)

5) **Wnt** (Proteínas "*Wingless"* e Int-1)

6) **TGF-β** (Factor de Crecimiento Transformante-β)

7) **NF-kB** (Factor Nuclear kappa B)

1) Los estrógenos son hormonas involucradas en el desarrollo y mantenimiento del estado reproductivo, cardiovascular y formación ósea, así como del sistema inmune y sistema nervioso central. Los receptores estrogénicos (**RE**) se activan por su unión con estrógenos, principalmente la hormona estradiol. Se han descrito dos tipos de RE, los de la familia de receptores nucleares (REα y REβ) y el receptor de estrógeno acoplado a proteínas G que se encuentra en la membrana celular. Los receptores nucleares son los responsables de regular transcripción de diferentes genes implicados en el crecimiento y proliferación celular, la activación de RE nucleares se conoce como actividad genómica (Osborne y Schiff, 2011). Además de estos RE nucleares, existen los RE que se localizan en la membrana celular (actividad no genómica) y su señalización implica la activación de rutas como PI3K/Akt o de MAPKs (Haque y Desai, 2019). Tanto los RE nucleares como los de membrana están implicados en la adquisición de resistencia a la terapia hormonal utilizada para tratar el cáncer de mama hormonosensible (Haque y Desai, 2019; Niwa et al., 2020).

Existen dos tipos principales de RE nucleares: REα y REβ, aunque el REα es el más relevante en el cáncer de mama. En la mayoría de los cánceres de mama las células tumorales expresan REα (RE+). El aumento de expresión de REα se identifica como un factor causante de la progresión y transformación de las células tumorales.

Además, se ha descrito que un aumento de la expresión de REα con Areg (Anfirregulina, proteína codificada por un gen de la familia del factor de crecimiento epidérmico) pueden iniciar el proceso de carcinogénesis (Lee et al., 2007). Otro fenómeno relacionado con el cáncer de mama y el REα es el que ocurre durante la menopausia, donde disminuyen los niveles de estrógenos y, por tanto, disminuye la actividad de este receptor. Esta disminución de estrógenos y menor actividad del REα puede traducirse en una expresión de diferentes factores de crecimiento epidérmico que activan distintas quinasas, ocasionando que la célula pierda sus mecanismos de regulación normales (Massarweh y Schiff, 2006). Por ejemplo, la expresión del factor de crecimiento epidérmico (HER2, *"human epidermal growth factor receptor 2"*) se ha visto incrementada hasta en un 20% en los cánceres de mama (Rakha et al., 2015).

Por otro lado, el RE de la membrana celular puede activarse por la unión con un ligando específico o mediante su fosforilación. Su activación promueve la transcripción de genes implicados en diferentes rutas de señalización (Ras/Raf, PI3K/Akt, etc.). En diferentes tipos de cáncer con RE+ se han identificado mutaciones en genes relacionados con estas rutas, lo cual afectaría al resultado de la señalización de fenómenos como la adhesión celular, supervivencia, proliferación, etc. Algunas de las mutaciones más frecuentes son en *PIK3CA*, *MAP3K1* y *GATA3* en cánceres de mama del subtipo luminal A, y en *TP53* y *PIK3CA* en el subtipo luminal B (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

2) La ruta **PI3K/Akt** está implicada en procesos celulares de proliferación, migración, angiogénesis, supervivencia y apoptosis. Las PI3Ks son una familia de quinasas que se clasifican y dividen en diferentes clases dependiendo de la afinidad a un sustrato. Se ha descrito que la ruta PI3K está relacionada con la transformación de células mamarias sanas a tumorales (Sharma et al., 2017). Sin embargo, solo la PI3K de la clase

IA, cuya función se asocia a la transducción de receptores tirosina-quinasa, se ha relacionado con el proceso de carcinogénesis en humanos (Smith et al., 2007).

La activación de PI3K induce la fosforilación de PIP_2 (fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato) para generar PIP_3 (fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato). Una de las principales dianas de PIP_3 es Akt y la unión de ambas provoca la activación de quinasas dependientes de fosfatidilinositol (PDKs) (Serini y Calviello, 2017). Akt (existen 3 isoformas: Akt1, Akt2 y Akt3) es responsable de modular diferentes factores de transcripción que dan lugar a proteínas que intervienen en el inicio del ciclo celular, así como en fenómenos de supervivencia, crecimiento y apoptosis celular. En el cáncer de mama se han descrito diferentes mutaciones en miembros de la familia de *PI3K*, que generan un impacto negativo en la regulación de proteínas implicadas en esta ruta.

Se ha descrito en el caso concreto del cáncer de mama que Akt1 promueve la proliferación celular motivado por un aumento de ciclina D1, mientras que Akt2 promueve la invasión y migración celular a través de la inducción de actina F y vimentina (Vanhaesebroeck et al., 2010). Akt3, aunque está menos estudiada, se relaciona con la agresividad y capacidad metastásica del cáncer de mama triple negativo (Chin et al., 2014). Las mutaciones en el gen *PIK3CA* se encuentran en un 25 % de los cánceres de mama. Otras mutaciones relacionadas con la ruta PI3K están descritas en el gen supresor de tumores PTEN y en Akt1 (Lee et al., 2015).

Por último, hay que destacar que una de las principales dianas implicadas en esta ruta de señalización es la proteína mTOR o diana de rapamicina en células de mamífero (*"mammalian target of rapamycin"*). A su vez, mTOR se subdivide en dos complejos diferentes mTORC1 y mTORC2. mTORC1 está implicado en la autofagia celular (Velloso et al., 2017), mientras que mTORC2 regula la síntesis de actina del citoesqueleto y regula la fosforilación de Akt (Lee et al., 2015). La búsqueda y desarrollo de inhibidores

de mTOR como agentes terapéuticos frente al cáncer de mama ha suscitado un creciente interés durante los últimos años (Butt et al., 2019).

Otra de las estrategias terapéuticas del cáncer de mama consiste en la combinación inhibidores de PI3K con inhibidores de HER2 ya que las mutaciones en *PIK3CA* están relacionadas con una resistencia a inhibidores de HER2 (Rexer et al., 2014).

3) Las alteraciones en la ruta de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (**MAPKs**) también están relacionadas con el proceso de carcinogénesis. Las MAPKs están implicadas en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis.

Esta ruta se activa por diferentes estímulos, como estrés oxidativo o un daño en el ADN, pero principalmente por la activación de factores de crecimiento. La activación de esta ruta se desencadena normalmente por la unión de una molécula con afinidad por el receptor de membrana (generalmente un receptor del factor de crecimiento epidérmico, (EGFR)), lo cual activa la proteína RAS. La activación de RAS desencadena una cascada de diferentes quinasas que inducen la fosforilación de proteínas que activan ERK en el núcleo, donde se modula la expresión de los genes implicados en el crecimiento, diferenciación, mitosis y angiogénesis (Burotto et al., 2014).

En diferentes tipos de cáncer de mama se han descrito mutaciones en *RAS* (Hobbs et al., 2016). La mayoría de estas mutaciones se relacionan con la activación de ERK1/2 que promueve la proliferación de las células tumorales. La alteración de la señalización de la ruta MAPKs está ampliamente relacionada con el desarrollo de numerosos tipos de tumores. En concreto, se ha descrito que las células tumorales de mama tienen un incremento de proteínas implicadas en esta ruta (Santen et al., 2002). Sin embargo, este aumento se ha descrito en cánceres con buen pronóstico y alta supervivencia de las pacientes (Ahmad et al., 2016). El incremento de la actividad MAPKs parece ser

independiente del RE ya que se ha descrito el incremento de esta actividad tanto en tumores RE+ como en RE- (Santen et al., 2002).

4) Otra ruta es **JAK/STAT**, que está implicada directamente en el desarrollo de la glándula mamaria. Las moléculas relacionadas con la activación de esta ruta son diferentes citoquinas (como interferones o interleuquinas) y factores de crecimiento (hormonas). Esta ruta está implicada en eventos celulares como la proliferación, diferenciación, migración o apoptosis celular y participa en procesos como la hematopoyesis, desarrollo de la glándula mamaria y la producción de leche (O'Shea et al., 2002). También se ha descrito la relación de JAK/STAT en la promoción de un cáncer más o menos invasivo (Christy y Priyadharshini, 2018).

Las JAK son proteínas tirosín quinasas intracelulares que se asocian a las porciones citoplasmáticas de los receptores de las citoquinas. Las JAK se fosforilan creando puntos de unión para las proteínas STAT. La familia de factores de transcripción STAT juega un papel fundamental en la proliferación y apoptosis de las células mamarias. Diferentes miembros de la familia STAT participan en funciones importantes de la glándula mamaria, como por ejemplo la producción de leche.

Existe una gran evidencia que relaciona STAT1, STAT3, STAT5 y STAT6 con la formación, progresión y pronóstico del cáncer de mama (Haricharan y Li, 2014). En concreto, la activación de STAT3 constituye un fenómeno frecuentemente asociado a diferentes cánceres de mama como, por ejemplo, el subtipo de cáncer de mama HER2-enriquecido (Sirkisoon et al., 2018). El estudio y búsqueda de agentes terapéuticos que actúen como inhibidores de JAK o STAT, es el objetivo de muchos estudios clínicos que se están realizando en pacientes con cáncer de mama (Sirkisoon et al., 2018).

5) La ruta de señalización **Wnt** está implicada en procesos de desarrollo, mantenimiento y proliferación celular. Se pueden diferenciar 2 tipos: canónica y no

canónica, pero ambas son activadas mediante la unión de la proteína Wnt con un receptor acoplado a proteínas G. La relación con la carcinogénesis del cáncer de mama se ha relacionado con alteraciones en la ruta canónica dependiente de β-catenina. Mutaciones en β-catenina, axina u otros componentes de la ruta Wnt dan lugar a un aumento de la expresión de β-catenina. La acumulación de β-catenina se ha descrito en diferentes tumores de mama (Wang et al., 2015). Una acumulación de β-catenina conlleva una constante activación de la ruta. El resultado de esta activación constante es un crecimiento ilimitado y descontrolado de las células.

El incremento de la actividad en esta ruta se ha descrito en alrededor un 50% de los cánceres de mama diagnosticados y además, estudios clínicos han relacionado un mejor pronóstico de la enfermedad en pacientes con bajos niveles de β-catenina (Zhan et al., 2017).

6) La vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (**TGF-β**) afecta a procesos celulares como el crecimiento y diferenciación celular, apoptosis y la homeostasis celular. TGF-β es un potente inductor del fenómeno de la transición mesenquimal-epitelial (MET, "*Mesenchymal-Epithelial Transition*"). En este sentido, se han encontrado altos niveles de proteína TGF-β en cánceres de mama ductales infiltrantes, especialmente en estadios avanzados y/o con afectación ganglionar (Xie et al., 2002). El fenómeno de la MET está relacionado con la formación de metástasis, por lo que a nivel clínico la búsqueda de agentes que reduzcan los ligandos de TGF-β o que reduzcan su activación, constituye un gran interés para usarlos en terapias combinadas frente al cáncer de mama.

7) Por último, el factor de transcripción **NF-kB** es un marcador altamente relacionado con la inflamación crónica, la cual es un factor de riesgo en numerosas patologías crónico-degenerativas, incluido el cáncer (Shostak y Chariot, 2011).

El factor NF-kB puede actuar como gen supresor o promotor dependiendo del tipo de cáncer (Xia et al., 2018). Sin embargo, en estudios animales donde se han inducido tumores en la glándula mamaria se ha visto el aumento previo de NF-kB, antes de la formación del tumor (Kim et al., 2000). El incremento de este factor se ha observado en diferentes líneas tumorales mamarias acompañado de un incremento de proteínas como cRel, p65, p50 y p52 (Zhou et al., 2005) y se ha correlacionado con la activación del receptor HER2 (Zhou et al., 2005). Además, su incremento se ha observado en cánceres de mama RE- y RE-/HER2+ (Biswas et al., 2004). El control de la activación de NF-kB ha sido objeto de numerosos estudios clínicos ya que se ha visto que el uso de agentes que actúen sobre este factor podría ser especialmente útil para evitar la quimiorresistencia frente a ciertos fármacos (Godwin et al., 2013).

2.3.3.1. Relación entre las diferentes rutas de señalización y el cáncer de mama

La naturaleza del cáncer de mama es muy heterogénea. Diferentes mutaciones genéticas afectan en distintos niveles moleculares, viéndose comprometidas a la vez varias vías de señalización celular. Muchas de estas vías convergen, por lo que una mutación en un único componente puede desencadenar alteraciones en varias rutas implicadas en diferentes procesos celulares.

Un ejemplo de esta convergencia es lo que ocurre con la vía de los RE. Estos receptores se fosforilan por acción de ERK1/2, tras activarse HER2. Además, diferentes cofactores de los RE acoplados a proteínas G se activan por quinasas, pudiendo afectar la señalización de estas proteínas indirectamente a la actividad de estos receptores (Prossnitz y Barton, 2011).

Esta intercomunicación o convergencia también se ilustra en la influencia que tiene la señalización del REα con el fenómeno de la MET. La activación de REα estimula diferentes factores que favorecen la aparición de MET (Li et al., 2015).

La activación de RE puede afectar a estabilización de E-caderina y a la reorganización del citoesqueleto vía ER-Src-PELP1-PI3K-ILK1, favoreciendo el fenómeno de MET. Este hecho da lugar a la aparición de un fenotipo de células tumorales de mama más invasivo (Chakravarty et al., 2010).

La activación de la ruta de señalización de PI3K puede reprimir factores de transcripción como FOXO ("*forkhead transcription factors of the O subgroup*") (Santo et al., 2013). Como se ha dicho previamente, las mutaciones en el gen *PIK3CA* son frecuentes en tumores de mama y se relacionan con fallos en: la regulación del ciclo celular, apoptosis, reparación de ADN o los mecanismos de protección frente al estrés oxidativo por la disminución de proteínas FOXO. Estos fallos propiciarán la transformación de las células mamarias sanas a células tumorales.

Por otro lado, la activación de las rutas JNK, ERK1/ERK2 y p38, promueven la activación de AP-1. La proteína activadora AP-1 se ha relacionado con el desarrollo de tumores mamarios puesto que induce factores de crecimiento como son EGF, RE, TFG-α e IGFs (factores de crecimiento insulínico). Por tanto, el bloqueo de AP-1 inactiva las señales de proliferación y transformación de las células mamarias (Shen et al., 2008).

Otro mecanismo que se ha descrito en el cáncer de mama es que la activación de RE puede inhibir el factor de transcripción TGF-β, y en consecuencia inhibir la migración celular. En este sentido, distintos estudios muestran que el RE es un modulador de TGF-β, lo que sugiere la importancia del RE frente al cáncer de mama metastásico (Band y Laiho, 2011).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se observa que un gran número de eventos moleculares están implicados en la formación y desarrollo del cáncer de mama. Los RE juegan un papel fundamental en el equilibrio de diferentes rutas que afectan a la supervivencia y muerte de las células mamarias. En definitiva, conocer el estado y la expresión de estos receptores es clave para diseñar estrategias terapéuticas frente a la enfermedad.

2.4. Diagnóstico del cáncer de mama

Antes de pasar a detallar las diferentes pruebas diagnósticas empleadas para la detección del cáncer de mama, se describen a continuación aspectos básicos sobre la anatomía de la glándula mamaria.

La glándula mamaria o mama está formada por tres tipos de tejidos: conjuntivo, adiposo y glandular. La anatomía básica de la mama femenina se muestra en la **Figura 1.7**. La glándula mamaria femenina está formada principalmente por los lóbulos y los conductos (o ductos) galactóforos. Estos conectan con el pequeño abultamiento externo llamado pezón por donde se secreta la leche materna. Respecto a la anatomía de la glándula mamaria masculina difiere con la femenina, en los lóbulos y los conductos o ductos. En el varón, estas estructuras están reducidas o son prácticamente inexistentes ya que no están preparadas para la lactancia materna.

A nivel inmunitario, la mama se encuentra rodeada de una cadena de ganglios linfáticos que la protegen de sustancias extrañas y/o nocivas.

El cáncer de mama se puede formar por una producción maligna de células tanto en los lóbulos, como en los conductos o ductos de la mama (Lippman, 2016). Aunque de forma muy poco habitual, el cáncer de mama también puede originarse en las zonas de tejido graso y fibroso de la mama.

Independientemente del lugar donde se inicie el tumor mamario, las células cancerígenas de la mama pueden invadir el tejido sano circulante hasta llegar a los ganglios linfáticos de las axilas, donde después tendrían acceso a diferentes partes del cuerpo (metástasis).

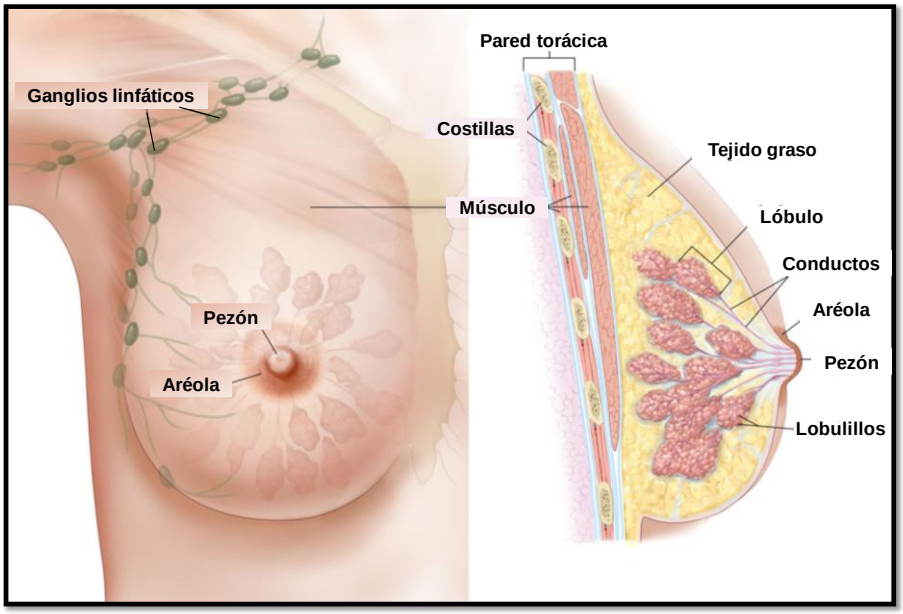


Figura 1.7. Anatomía básica de la mama femenina. Adaptado de *"National Cancer Institute"* por Terese Winslow LLC, 2011.

2.4.1. Pruebas de cribado

Sin duda alguna, el principal objetivo en el diagnóstico del cáncer de mama es su detección temprana (OMS, 2007). Identificar esta patología antes de que se detecte ningún síntoma, elevará las posibilidades de curación a prácticamente el 100%.

En la actualidad, existen los programas de cribado o campañas de "*screening*" para la detección precoz del cáncer de mama. Estas campañas están dirigidas a mujeres entre 45 y 69 años, ya que es la población más propensa a padecer la enfermedad.

La prueba que se realiza en estas campañas de cribado es la mamografía. Esta técnica es capaz de detectar lesiones hasta dos años antes de que sean palpables y sin que se hayan extendido (Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), s.f.). La mamografía consiste

en la realización de radiografías de los tejidos mamarios mediante radiaciones ionizantes de baja energía. Para realizar la mamografía se utiliza el mamógrafo que consiste en dos placas que comprimen el pecho para así disminuir el espesor del tejido. Se toman dos radiografías en cada una de las mamas, una cefalo-caudal (el rayo incide de arriba abajo) y la otra es medio-lateral-oblicua (el rayo incide de lado a lado y con una inclinación de 45 grados). Estas dos radiografías son las que se toman en un estudio de cribado, pero cuando se tienen sospechas de un posible tumor, las mamografías suelen incluir más imágenes adicionales.

En la actualidad, existen también las mamografías 3D o tomosíntesis del seno que capturan imágenes de la mama desde diferentes ángulos, reproduciendo una imagen en tres dimensiones y, por tanto, reduciendo el efecto de la superposición del tejido que puede hacer que en algunos casos no se detecten los tumores en una mamografía clásica.

De manera periódica a partir de los 40 años, se recomienda que se haga la primera mamografía y se repita cada 1 o 2 años (AECC, s.f.). Por debajo de esta edad, solo se suele recomendar si existen antecedentes familiares (Lee et al., 2010). A partir de los 50 años, la periodicidad con la que se realice la prueba debe ser anual.

2.4.2. Pruebas de análisis de imagen

La prueba principal y más eficaz de análisis de imagen para el diagnóstico o cribado del cáncer de mama es la mamografía (Duffy et al., 2012), la cual se ha detallado en el apartado anterior. Sin embargo, existen otras pruebas de imagen que son complementarias que pueden utilizarse como cribado, o incluso diagnóstico, cuando existe sospecha de cáncer de mama. Estas pruebas son:

- **Ecografía mamaria**. Se realiza con transductores de alta frecuencia y es la técnica de elección para pacientes sintomáticas menores de 40 años (Evans et al., 2018). Además,

esta técnica permite discriminar nódulos, calcificaciones, quistes complicados, etc., por lo que es una técnica complementaria a la mamografía y/o a la resonancia magnética. La ecografía mamaria también incluye el análisis de las regiones axilares donde se buscan adenopatías en pacientes con diagnóstico instaurado de cáncer de mama sospechosas, o incluso en pacientes ya intervenidas del tumor. La información aportada por la ecografía a nivel axilar es esencial sobre la existencia de signos de afectación metastásica.

- **Resonancia magnética**. Se basa en la utilización de un campo magnético junto con energía de radiofrecuencia que permite obtener imágenes de todo el cuerpo. Hasta ahora es la tercera técnica de imagen utilizada en la patología mamaria, pero su uso se está incrementando cada vez más debido a su elevada sensibilidad para detectar carcinomas infiltrantes (Gómez Hernández et al., 2018).

Además de las técnicas anteriores, pueden emplearse otras técnicas de imagen adicionales en situaciones clínicas en las que exista una alta sospecha de afectación metastásica en la paciente (Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria, 2015). Estas técnicas son:

- Radiografía de tórax
- Ecografía abdominal
- Gammagrafía ósea
- Tomografía Axial Computarizada (TAC)
- Tomografía por Emisión de Positrones (PET)

Respecto a la última técnica, los equipos más modernos suelen asociar además un TAC (PET-TAC), fusionando imágenes y sumando las ventajas de ambas técnicas.

En patología mamaria, los estudios de diagnóstico por análisis de imagen deben clasificarse con el sistema BI-RADS® ("*Breast Imaging Reporting and Data System*"),

cuya última actualización se publicó en 2013 (D'Orsi et al., 2013). Este sistema es una herramienta fundamental para estandarizar y categorizar las lesiones. De este modo se establecen recomendaciones específicas para cada categoría que facilitan la unificación de criterios entre el personal médico.

2.4.3. Pruebas de punción diagnóstica

Las técnicas de punción diagnóstica permiten realizar una biopsia para confirmar si lesiones, clínicamente palpables o que han sido diagnosticadas mediante análisis de imagen, son cancerosas o no (Dahabreh et al., 2014). Estas técnicas son fundamentales a la hora de planificar la cirugía, pero son procedimientos invasivos que suponen mayor morbilidad y estrés para la paciente. Las técnicas más utilizadas son:

- **Punción aspirativa con aguja fina (PAAF)**. Es una técnica ampliamente utilizada por su alta sensibilidad demostrada en lesiones palpables (Rosa et al., 2010), donde se obtiene una muestra de células para su análisis citológico. Consiste en la aspiración mediante vacío con una jeringa que tiene una aguja de 20G-25G. No requiere hospitalización y suele durar entre unos pocos minutos a media hora.
- **Punción biopsia con aguja gruesa (BAG)**. Es la técnica de elección tanto en las lesiones palpables como no palpables debido a la gran sensibilidad demostrada en numerosos estudios (Brancato et al., 2012). Es una técnica muy segura, rápida, sin complicaciones y de bajo coste sanitario. Se emplea anestesia local y para realizarla se utilizan dispositivos automáticos o semiautomáticos con agujas de 12G-14G, con los que se extrae una pequeña muestra de tejido de la lesión.
- **Biopsia asistida por vacío (BAV)**. Esta técnica se utiliza como alternativa a la PAAF en los casos donde se necesita un volumen mayor de muestra (Preibsch et al., 2015). También se utiliza en casos donde el estudio de análisis de imagen no concuerda

con lo obtenido con la BAG. La técnica consiste en la obtención de muestras mediante corte y vacío. El corte se realiza mediante un bisturí rotatorio contenido en la aguja de biopsia que suele tener un calibre de 7G-11G.

A todas estas técnicas se añaden las analíticas de sangre para medir marcadores tumorales. Los marcadores tumorales son proteínas producidas por las células cancerosas, pero también por células sanas, como respuesta al cáncer o a ciertas afecciones benignas. Aunque se pueden producir en células sanas y tumorales, en general se producen en concentraciones más altas cuando existe una patología tumoral. No obstante, la literatura médica indica que por sí solos no permiten confirmar o descartar un diagnóstico de cáncer, por dos razones principales: 1) el nivel de un marcador tumoral puede elevarse en personas con tumores benignos y, 2) el nivel de un marcador tumoral no se eleva en todas las personas con cáncer, especialmente si se encuentran en la etapa temprana de la enfermedad (Bates, 1991).

En cuanto al cáncer de mama, no se recomiendan las pruebas de marcadores tumorales en estadio temprano porque los marcadores no son generalmente altos, aunque pueden ser útiles para controlar el crecimiento de la enfermedad recurrente o metastásica, junto con los síntomas y las pruebas por imágenes (Sturgeon et al., 2008). Los marcadores más usados para el seguimiento y control del cáncer de mama son los antígenos carbohidrato (CA): CA 15-3 y CA 27-29.

2.4.4. Afectación ganglionar. Biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC)

La biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) se aplicó por primera vez en el cáncer de mama en los años 90 (Krag et al., 1993). La técnica de la BSGC se basa en analizar el estado del primer ganglio de drenaje del tumor y es fiable para predecir la afectación del resto de los ganglios axilares. Pueden existir uno o más ganglios centinela.

Esta técnica consiste en la inyección de azul de metileno o una sustancia radioactiva (generalmente Tecnecio-99) en el tumor o en la zona peritumoral. Por consiguiente, el ganglio linfático (o ganglios) que se tiñen de azul o retienen el marcador, son los denominados ganglios centinela. Una vez localizado/s, se extirpa/n durante la cirugía para ser analizado/s en ese instante. El análisis se lleva a cabo por los anatomopatólogos mientras que dura la cirugía, siempre que sea posible, porque de esta manera se evitaran dos intervenciones.

El estudio del ganglio centinela se hace mediante la técnica OSNA ("*One step nucleic acid amplification*") que permite detectar mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la presencia de ARNm de citoqueratina 19 (CK-19). La CK-19 está presente en las células epiteliales, pero no en el tejido de los ganglios linfáticos. Por tanto, su presencia en ellos indicará que las células tumorales han invadido el ganglio (Vieites et al., 2016).

Un ganglio centinela se considera positivo cuando presenta más de 100 copias de ARNm. Además, dependiendo del número de copias detectadas se clasificará en macrometástasis si son más de 5.000 copias, micrometástasis cuando hay entre 250 y 5.000 copias, y células tumorales aisladas cuando aparecen menos entre 100 y 200 copias (Bernet et al., 2014).

Si no hay afectación tumoral en el ganglio centinela, no será necesaria la disección de ganglios adicionales. En cambio, si se encuentran células cancerosas en estos primeros ganglios, se deben extirpar más ganglios linfáticos por lo que se informará al cirujano para que continúe la intervención.

La técnica de la BSGC permite una intervención menos invasiva y con menor morbilidad que la disección linfática axilar, que era la técnica que se empleaba anteriormente en la cirugía axilar. La disección linfática axilar suponía en la mayoría de

los casos dolor, parestesias, alteración de la movilidad del brazo y linfedema. La recidiva axilar en pacientes sometidas BSGC es menor del 1%, porcentaje similar a la de las pacientes tratadas con disección linfática axilar. La BSGC está considerada, hoy en día, como el estándar en el abordaje de la axila clínicamente negativa (ausencia de ganglios palpables), pero hay que tener en cuenta situaciones especiales en las que no se puede usar de rutina, como la enfermedad localmente avanzada, el cáncer inflamatorio, el embarazo, el cáncer de mama en el varón, enfermedad multicéntrica o cirugía previa axilar (Bernet et al., 2014).

2.4.5. Autoexploración

Otro método complementario y que se recomienda hacer periódicamente para detectar una patología mamaria es la autoexploración física (**Figura 1.8**). Este método nunca debe utilizarse como método exclusivo de diagnóstico, ya que mientras con la mamografía se estima que se detectan un 90% de los tumores, con la autoexploración física este porcentaje es menor a un 50% (AECC, s.f.).

Los signos más evidentes a los que se debe prestar atención en un examen de autoexploración son:

- Presencia de algún bulto o nódulo en la mama que puede ser doloroso o no al tacto.

- Cambios en la piel que pueden aparecer como pequeñas ulceraciones, retracciones, cambios de color, rugosidades (“piel de naranja”), enrojecimiento e incluso cambios en la silueta de la mama.

- Cambios en el pezón. En algunos casos el pezón puede retraerse hacia dentro y aparecer como hundido. En algunos casos, incluso se forman úlceras o aparecen secreciones con sangre.

- Presencia de bultos en las axilas. En muchos casos, este signo se acompaña de una disminución de la movilidad al levantar el brazo.

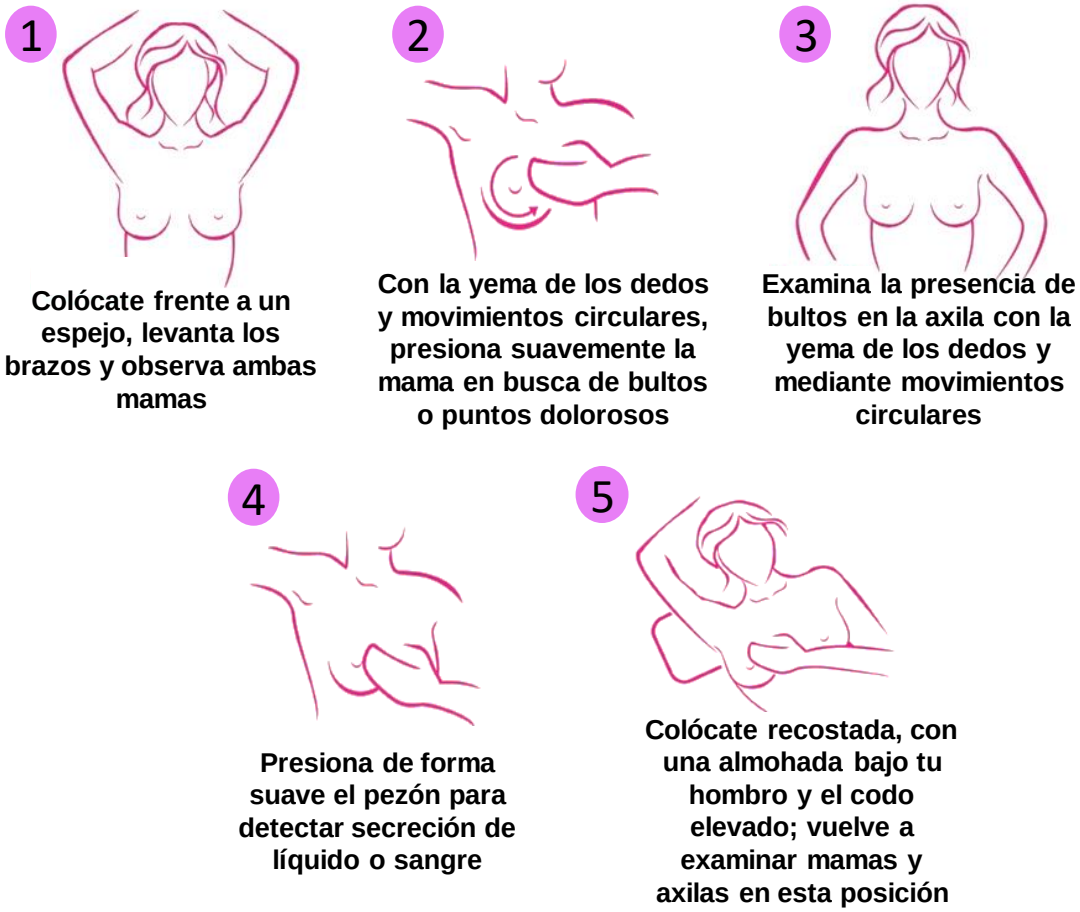


Figura 1.8. Pautas que se deben seguir para hacer una adecuada autoexploración mamaria. Adaptada del Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama (GEICAM).

2.5. Clasificación del cáncer de mama

El diagnóstico definitivo de un cáncer de mama se realiza en el servicio de Anatomía Patológica del hospital. Se analizan diferentes aspectos de la muestra que se recibe tras la punción diagnóstica (BAG, PAAF, etc.), con el fin de definir el tumor y poder establecer factores decisivos a la hora de elegir el tratamiento.

La clasificación del cáncer de mama se realiza tanto a nivel histológico, la cual da información del patrón de crecimiento del tumor, como a nivel molecular o

inmunohistoquímico, que permite catalogar el tumor en diferentes subtipos con pronósticos clínicos diferentes.

2.5.1. Clasificación histológica del cáncer de mama

Tras el diagnóstico de un tumor mamario, la lesión tumoral se analiza mediante técnicas histológicas que permiten clasificar el tipo de lesión y establecer cuál es el pronóstico de la enfermedad (Rakha et al., 2010).

La inmensa mayoría de los cánceres de mama son carcinomas. Este tipo de cáncer se origina en células epiteliales, que en el caso de la mama son las células que tapizan las glándulas. A este tipo de cáncer que se desarrolla en estas células epiteliales también se conoce como adenocarcinoma.

La principal clasificación a nivel histológico de los carcinomas de mama atiende a si infiltran en el estroma (carcinoma infiltrante) o no (carcinoma *in situ*) (**Tabla 1.2**). Además, dentro de estos dos grupos encontramos que los carcinomas pueden dividirse según se originen en el conducto galactóforo (carcinoma ductal), o en los lóbulos donde se produce la leche (carcinoma lobular). Tanto los conductos galactóforos como las glándulas productoras de leche están recubiertas por una membrana basal y sostenidos por el estroma mamario. El estroma mamario está formado por tejido adiposo, vasos sanguíneos y vasos linfáticos. Los vasos linfáticos son los encargados de transportar las sustancias de desecho hasta los ganglios linfáticos axilares.

En la **Figura 1.9** se puede ver el proceso que siguen las células epiteliales mamarias en el desarrollo de un cáncer, donde inicialmente comienzan con una pérdida de su organización, tras experimentar diferentes cambios bioquímicos y genéticos. Todos estos cambios les confiere una capacidad migratoria aumentada y mayor capacidad invasiva (Lamouille et al., 2014). El fenómeno que se produce entonces es conocido como

transición epitelial-mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés), donde las células epiteliales adquieren un fenotipo mesenquimal. Este fenotipo les confiere la capacidad de invadir tejidos adyacentes (paso de un carcinoma *in situ* a un carcinoma infiltrante) e incluso les permite diseminarse a otras zonas más distantes a través de la circulación (como por ejemplo, los ganglios axilares).

En este último punto (formación de metástasis), sucede el fenómeno contrario a la EMT. Aquí las células mesenquimales recuperan sus propiedades epiteliales (fenómeno MET) y tendrán entonces la capacidad de establecer y estabilizar la formación de metástasis (**Figura 1.9**).

Como se ha comentado anteriormente, los carcinomas (o adenocarcinomas) son los cánceres de mama más frecuentes (>90% de los cánceres de mama diagnosticados). Según la última clasificación de la OMS hay hasta 40 tipos de cáncer de mama descritos según sus características histopatológicas, aunque un gran número son muy inusuales (Lakhani et al., 2012). En la **Tabla 1.2** se recogen los cánceres de mama más relevantes según su clasificación histológica.

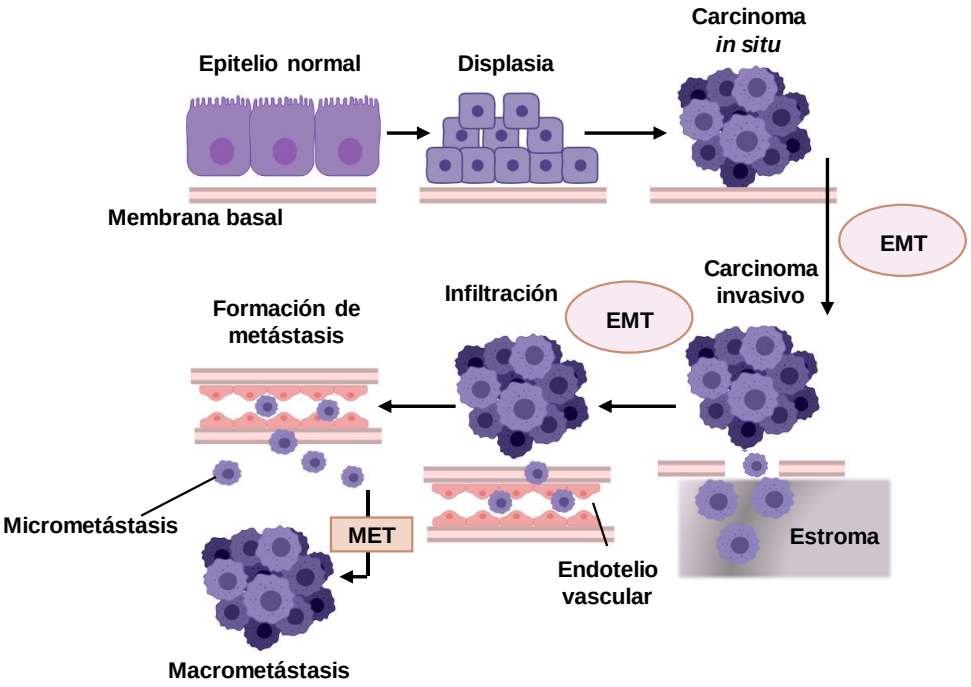


Figura 1.9. Etapas de un cáncer de mama que traspasa la frontera natural del ducto o del lóbulo, invadiendo el tejido circundante mediante la transición epitelial-mesenquimal (EMT), hasta la formación de metástasis donde puede ocurrir el proceso inverso (transición mesenquimal-epitelial (MET)) por el cual las células comienzan a establecerse con las características fenotípicas de sus progenitoras en un sitio distante del tumor primario.

Haciendo referencia a la tabla que aparece a continuación, se detallan los cinco tipos de cáncer de mama más diagnosticados:

- **Carcinoma ductal *in situ* (CDIS)**. Es el tipo de cáncer de mama no invasivo más común. También puede ser intraductal si es dentro de un ducto.

- **Carcinoma lobular *in situ* (CLIS)**. Se le conoce como neoplasia lobulillar y este tipo de cáncer suele conllevar mayor riesgo de desarrollar un nuevo cáncer de mama en el futuro. Las células tumorales comienzan a crecer en las glándulas productoras de leche (lóbulos) pudiendo estar varios lóbulos afectados. Además, este tipo de tumor está relacionado con un riesgo mayor de que el cáncer sea invasivo.

- **Carcinoma ductal invasivo (o infiltrante) (CDI)**. Es el más común de todos los tipos de cáncer de mama infiltrantes, representando aproximadamente un 80% de todos

los casos de cáncer de mama. El tumor comienza en un conducto galactóforo y a partir de ahí, invade la pared del conducto pudiendo empezar a crecer en otros tejidos mamarios colindantes.

- **Carcinoma lobulillar invasivo (CLI)**. Es el segundo tipo de cáncer de mama infiltrante más frecuente (5-15%). Comienza en los lobulillos y al igual que el CDI, puede propagarse a tejidos cercanos.

- **Carcinoma inflamatorio**. En este tipo de carcinoma las células tumorales infiltran los vasos linfáticos y la piel. La mama está globalmente enrojecida y caliente, como si estuviese inflamada, puesto que las células tumorales bloquean los vasos linfáticos de la piel. La incidencia es baja, del 1 al 3% de todos los cánceres de mama.

Tabla 1.2. Clasificación de los cánceres de mama más frecuentes según su histopatología, atendiendo a la clasificación de la OMS.

TIPOS DE CÁNCER DE MAMA	***In situ***	**Carcinoma ductal (intraductal)** **Carcinoma lobular**
	Infiltrantes	**Carcinoma ductal invasivo** **Carcinoma ductal invasivo con predominio de componente intraductal** **Carcinoma lobular invasivo** **Carcinoma mucinoso** **Carcinoma medular** **Carcinoma papilar** **Carcinoma tubular** **Carcinoma adenoide quístico** **Carcinoma secretorio (juvenil)** **Carcinoma apocrino** **Carcinoma con metaplasia** **Carcinoma inflamatorio** **Angiosarcoma**
	Otros tipos	**Enfermedad de Paget del pezón**

2.5.2. Clasificación molecular o inmunohistoquímica del cáncer de mama

El avance en los últimos años de las técnicas genómicas ha permitido un conocimiento exhaustivo a nivel molecular del cáncer de mama. En el año 2000 fue cuando se publicó el primer estudio de "*microarrays*" de expresión génica que permitió dividir el cáncer de

mama en diferentes subtipos, debido a las diferencias que se observaron en distintas entidades moleculares (Perou et al., 2000). La identificación de biomarcadores moleculares en el cáncer de mama es fundamental para conocer el pronóstico de la enfermedad. Estos marcadores son evaluados de manera rutinaria, y conocerlos contribuye a predecir el comportamiento del tumor y asignar un adecuado tratamiento para la paciente (Tao et al., 2015; Waks y Winer, 2019). Las técnicas inmunohistoquímicas que se utilizan en los laboratorios de Anatomía Patológica permiten conocer los diferentes marcadores mediante el uso de anticuerpos específicos en una biopsia del tumor. Los biomarcadores específicos que se estudian para clasificar a nivel molecular un cáncer de mama son:

- **Receptores hormonales**. Hacen referencia a los RE y receptores de progesterona (RPg). De cada tres cánceres de mama, dos expresan receptores hormonales. La expresión de ambos se relaciona con un buen pronóstico de la enfermedad (altas tasas de supervivencia y bajas tasas de recidivas) (Metzger-Filho et al., 2013).

- **Gen *HER2/neu***. *HER2* (también conocido como *ERBB2*) expresa un receptor transmembrana tirosín-quinasa que presenta homología con miembros de los receptores del factor de crecimiento epidérmico. La expresión de *HER2* está incrementada en un 15-20% de los cánceres de mama. Este incremento se relaciona con una mayor agresividad de la enfermedad y peor pronóstico (Burstein, 2005). Sin embargo, en los últimos años los nuevos tratamientos farmacológicos que tienen como mecanismo de acción controlar la expresión de *HER2* han aumentado significativamente las tasas de supervivencia (Cadoo et al., 2013; Waks y Winer, 2019)

- **Ki-67**. Es una proteína que se encuentra en el núcleo de las células que están en fase de división, por lo cual es útil para conocer la tasa de proliferación del tumor. Los

tumores con altas tasas de proliferación (Ki-67 >15%) suelen tener un peor pronóstico (Luporsi et al., 2012).

En función de la combinación de estos tres biomarcadores, el cáncer de mama se clasifica en 4 subtipos diferentes (**Tabla 1.3**). En función de esta categorización, la expresión de receptores hormonales (RE y RPg) se detecta en aproximadamente un 70% de los casos de cáncer de mama diagnosticados. Teniendo en cuenta la presencia de receptores hormonales y si la expresión de *HER2* está incrementada o no, existen dos tipos diferentes de cáncer de mama: luminal A (RE+ RPg+ HER2-) y luminal B (RE+ RPg-/+ HER2-/+).

Por otro lado, se encuentra el cáncer de mama HER2-enriquecido, en el cual las células no expresan receptores estrogénicos (o si lo hacen, en porcentajes muy bajos), pero existe un incremento de HER2.

Finalmente, cuando no existe expresión de RE ni RPg ni tampoco aumento de HER2, el cáncer se define como triple negativo. En este tipo de cáncer el porcentaje de Ki-67 suele ser elevado. El cáncer de mama triple negativo representa un 15% de los casos diagnosticados, y se caracteriza por tener un mal pronóstico, altas tasas de recidivas y por presentar metástasis en otros órganos (Marotti et al., 2017; Waks y Winer, 2019). Del cáncer de mama triple negativo se han descrito hasta 6 subtipos diferentes en función de la expresión de diferentes genes involucrados en el ciclo celular, receptores androgénicos, factores de crecimiento epidérmico, etc. (Lehmann et al., 2011).

Tabla 1.3. Clasificación de los cánceres de mama según los distintos marcadores moleculares.

Subtipo	RE/RPg	HER2	Ki-67	Tratamiento	Pronóstico
Luminal A	+/+	-	<15%	Hormonal	Bueno
Luminal B	+/+ o -	+ o -	>15%	Hormonal	Intermedio
HER2-enriquecido	-/-	+	>15%	Anticuerpos monoclonales	Malo
Triple negativo	-/-	-	>15%	Quimioterapia	Muy malo

Atendiendo a un subtipo concreto, puede existir una gran variedad en la expresión génica (Lehmann et al., 2011). En este sentido, actualmente existen diferentes pruebas de paneles multigénicos que permiten estudiar una gran cantidad de genes en el tumor. Estas pruebas ayudan a predecir si es posible o no que haya recidiva de la enfermedad, así como cuál es su pronóstico. La utilidad de esta técnica es establecer de manera individualizada el mejor tratamiento posible para la paciente, evitando la posibilidad de recaídas tras un cierto tiempo. Las pruebas más conocidas son Oncotype DX, Prosigna y MammaPrint que permiten determinar 21, 50 y 70 genes, respectivamente (Vieira y Schmitt, 2018).

2.5.3. Clasificación TNM. Estadificación del cáncer de mama

El poder estadificar un cáncer es de vital importancia a la hora de hacer un diagnóstico y tratar de manera precisa la enfermedad. El sistema de estadificación más ampliamente utilizado en oncología es la clasificación TNM. Esta nomenclatura hace referencia al tamaño del tumor (T), afectación de ganglios ((N), "*node*") y la presencia-grado de metástasis (M). A cada letra de esta clasificación se le añade un número o letra para indicar el tamaño o extensión del tumor y el grado de diseminación del cáncer. Determinar la etapa de un cáncer es un objetivo fundamental para determinar como de propagado se

encuentra en el momento del diagnóstico, y así poder tratarlo de la manera más eficaz posible.

La clasificación TNM fue publicada por primera vez en 1959 por el "*American Joint Committee on Cancer*" (AJCC) como un recurso para que los médicos pudieran determinar la etapa de diferentes cánceres atendiendo a unos mismos criterios predeterminados. La **Figura 1.10** muestra los principales valores asignados para T, N y M en el cáncer de mama (Hortobagyi et al., 2017).



Figura 1.10. Diferentes categorías con los principales valores asignados para el cáncer de mama en el sistema TNM según la última actualización de cáncer de mama publicada en la 8ª edición del Manuel de Estadiaje del AJCC (2017).

Cuando T, N y M están establecidos (generalmente después de la cirugía), se combinan para establecer la etapa o estadio (**Figura 1.11**). Según esta clasificación, el cáncer de mama en la etapa más temprana es un cáncer en estadio 0 y se corresponde con un carcinoma *in situ*, prosiguiendo hasta la etapa o estadio IV, que corresponde a un cáncer avanzado con metástasis.

T	***N***	***M***	***Estadio clínico***
Tis	**N0**	**M0**	**0**
T1	**N0**	**M0**	**IA**
T0	**N1**	**M0**	**IB**
T1	**N1**	**M0**	**IB**
T0	**N1**	**M0**	**IIA**
T1	**N1**	**M0**	**IIA**
T2	**N0**	**M0**	**IIA**
T2	**N1**	**M0**	**IIB**
T3	**N0**	**M0**	**IIB**
T0	**N2**	**M0**	**IIIA**
T1	**N2**	**M0**	**IIIA**
T2	**N2**	**M0**	**IIIA**
T3	**N1**	**M0**	**IIIA**
T3	**N2**	**M0**	**IIIA**
T4	**N0**	**M0**	**IIIB**
T4	**N1**	**M0**	**IIIB**
T4	**N2**	**M0**	**IIIB**
Cualquier T	**N3**	**M0**	**IIIC**
Cualquier T	**Cualquier N**	**M1**	**IV**

Figura 1.11. Diferentes etapas o estadios según los valores del sistema TNM.

2.6. Tratamiento del cáncer de mama

El tratamiento del cáncer de mama dependerá de diferentes factores que se deben establecer tras el estudio de cada caso concreto. Los elementos que se deben analizar antes de pautar el tratamiento son:

- Edad del paciente.

- Estado general.

- Estado hormonal (premenopausia, menopausia).

- Localización del tumor (clasificación histológica).

- Estadificación del cáncer (clasificación TNM y estadio clínico).

- Estado de marcadores moleculares (receptores hormonales, expresión elevada de *HER2*, etc.).

Una vez establecidos estos factores, el protocolo del tratamiento se aborda de manera multidisciplinar ya que para tomar la decisión intervienen cirujanos, oncólogos, ginecólogos, anatomopatólogos, etc.

El tratamiento del cáncer de mama se puede dividir en dos grandes grupos: tratamientos locales (cirugía y radioterapia) y tratamientos sistémicos (quimioterapia, hormonoterapia y terapias biológicas).

2.6.1. Tratamientos locales

Son tratamientos que irán dirigidos al lugar del tumor primario o a una localización concreta. Entre estos tratamientos se encuentran la cirugía y la radioterapia.

2.6.1.1. Cirugía

En la mayoría de los cánceres de mama se emplea la cirugía como parte del tratamiento ("*American Cancer Society"* (ACS), s.f.). La cirugía mamaria persigue siempre la extirpación total del tumor, con un buen resultado estético y mínimo impacto psicológico para la paciente. Dentro de las posibles cirugías para el cáncer de mama se encuentran:

- **Cirugía conservadora (CC)**. Consiste en la extirpación del tumor con un mínimo margen del tejido sano mamario (TSM), para asegurar que estos márgenes están libres de enfermedad, y así mantener el resto de la mama intacta. Esta intervención puede ser una

tumorectomía (extirpación del tumor y un margen sano); una segmentectomía (se extirpa el tumor y un segmento mamario amplio que no incluye extirpación de piel); o una cuadrantectomía (se extirpa el tumor y el cuadrante de tejido adyacente al tumor que suele incluir la piel).

La CC es la cirugía de elección en todos los casos que es posible por su eficacia demostrada frente a otras cirugías más invasivas (Murugappan et al., 2018). Sin embargo, en mamas pequeñas, cuando el tumor es mayor de 3 cm o cuando coexisten varios focos tumorales, suele acompañarse de radioterapia como tratamiento adyuvante.

- **Mastectomía**. Supone la extirpación total de la mama. Existen varios tipos:

- Mastectomía simple. Se extirpa el seno completo incluyendo pezón, areola y la piel.

- Mastectomía con conservación de piel. Es una variante de la mastectomía simple, solo difiere en que se deja la mayor parte de la piel del seno intacta. De esta forma, la cicatriz quirúrgica es menor y además, permite una reconstrucción del seno más natural. Sin embargo, no es adecuada para tumores grandes o cercanos a la piel.

- Mastectomía con conservación del pezón. Se extirpa el tejido mamario completo, pero se mantiene la piel y el pezón. Es una técnica que solo se aplica en casos muy concretos ya que, aunque permite una reconstrucción del seno de una manera natural, presenta complicaciones como la atrofia del pezón, por falta de riego sanguíneo tras la cirugía. También presenta tasas más altas de recidivas porque se mantiene más tejido mamario que con otras formas de mastectomía.

- Mastectomía radical modificada. Al igual que en la mastectomía simple se extirpa el seno completo (con pezón, areola y piel), pero además se extirpan los ganglios linfáticos axilares.

- Mastectomía radical (también denominada de Halsted). Consiste en la extirpación de la mama completa, ganglios axilares y de los músculos pectorales que se encuentran

debajo del seno. En la actualidad, prácticamente no se utiliza ya que causa una grave alteración en la paciente (imagen corporal, dificultad de movilidad del miembro superior, edemas, etc.).

- Mastectomía doble. Se extirpan ambas mamas. Esta intervención suele realizarse en pacientes con mutaciones en los genes *BCRA1*/*BCRA2* con la que se ha demostrado una mejora de su supervivencia (Heemskerk-Gerritsen et al., 2013).

Tras cualquier tipo de mastectomía también es posible que se requiera radioterapia como tratamiento adyuvante.

Por último, entre las técnicas de cirugía para eliminar el cáncer de mama, por su relevancia, hay que mencionar la cirugía axilar. Independientemente del tipo de cirugía aplicada para eliminar el tumor primario, se debe valorar siempre el estado de los ganglios axilares. Para ello, se realiza la técnica de la BSGC (la cual se ha descrito en el **apartado 2.4.4**), y si hubiese afectación del ganglio centinela, se valoraría una linfadenectomía o disección linfática axilar. Actualmente, la disección linfática axilar solo se realiza si se ha confirmado la infiltración tumoral en diferentes ganglios. En este tipo de intervención se extirpan gran cantidad de ganglios linfáticos (entre 10 y 40), y es una cirugía que implica gran cantidad de riesgos (edemas, infecciones, alteraciones de sensibilidad y movilidad, entre otras).

2.6.1.2. Radioterapia

La radioterapia consiste en aplicar alta energía (rayos X, gamma, neutrones, protones, etc.) para destruir las células cancerosas, y así reducir el tamaño del tumor. En el caso concreto del cáncer de mama, se aplican radiaciones ionizantes a la mama, en la pared torácica y, en ocasiones, en las cadenas ganglionares a las que drena el tejido mamario.

El tratamiento con radioterapia el cáncer de mama es un pilar básico ya que puede indicarse en cualquier fase de la enfermedad (breastcancer.org, s.f.). Principalmente se usa como complemento a la cirugía (tratamiento adyuvante), consiguiendo reducir las recidivas y mejorando los índices de supervivencia. El tratamiento con radioterapia suele ser de 5 a 7 semanas, con una duración por sesión de unos pocos minutos, siendo necesarias de 20 a 30 sesiones, dependiendo de la clínica de la paciente.

Los principales tipos de radioterapia que se utilizan en el cáncer de mama son la radioterapia de haz externo y la braquiterapia:

- **Radioterapia de haz externo**. Es el tipo más común usado en el cáncer de mama. Es un tratamiento local en el cual se dirige la radiación a la parte específica donde se encuentra el tumor. Existen diferentes tipos de radioterapia de haz externo, pero todos ellos aplican la máxima dosis de radiación posible sin afectar al tejido sano colindante.
- **Braquiterapia**. Consiste en una radioterapia interna en la cual se emplean semillas, listones o cápsulas que emiten radiación. En este tratamiento local, se colocan cualquiera de los elementos anteriores (semillas, listones o cápsulas) en forma de implante mediante un catéter en la zona a tratar. Los implantes pueden ser de dosis baja (se retiran tras 1 o 7 días); de dosis alta (se retira tras 10-20 minutos) o; implantes permanentes (que se quedarán para toda la vida, pero la radiación irá debilitándose tras el transcurso de varias semanas).

2.6.2. Tratamientos sistémicos

En este grupo se engloban los tratamientos que actúan sobre todo el organismo y pueden afectar a las células de todo el cuerpo. En el cáncer de mama, estos tratamientos son la quimioterapia, la hormonoterapia o tratamiento hormonal y la terapia biológica o inmunoterapia.

2.6.2.1. Quimioterapia

Consiste en la aplicación de diferentes fármacos que actúan generalmente sobre células en crecimiento con el fin de destruirlas y acabar con el tumor. La vía de administración más habitual es la intravenosa, aunque también puede ser oral.

La quimioterapia se puede emplear como complemento (quimioterapia adyuvante) tras la cirugía por si existieran aún células tumorales, o antes de la cirugía (quimioterapia neoadyuvante) con el fin de reducir el tumor y actuar precozmente sobre micrometástasis que pudieran existir (ACS, s.f.).

El tratamiento de quimioterapia se suele hacer a nivel ambulatorio (no es necesario el ingreso de la paciente), y aunque dependerá de la combinación de fármacos empleada, en el cáncer de mama se suele administrar cada 7 o 21 días. La cantidad de ciclos irá en función de cada paciente.

La quimioterapia, al ser un tratamiento sistémico, destruye células tumorales, pero también afecta a células sanas. Este tratamiento suele tener efectos secundarios muy frecuentes como vómitos, alteración del sabor, cansancio, caída del cabello, estreñimiento o diarrea y úlceras en la boca, entre otros.

Existen multitud de fármacos y combinaciones posibles de tratamientos quimioterapéuticos (Waks y Winer, 2019). En el cáncer de mama, las familias de fármacos que se emplean de forma más habitual son:

- **Taxanos**. Inhiben el crecimiento celular bloqueando la mitosis. Estos fármacos actúan a nivel de los microtúbulos, impidiendo que la célula se divida (Fauzee, 2011). Los más utilizados son paclitaxel y docetaxel (Teven et al., 2017).

- **Antraciclinas**. Son una familia de antibióticos y su mecanismo de acción es intercalarse con el ADN celular interfiriendo en su replicación (Corremans et al., 2019). El fármaco más utilizado de esta familia en el cáncer de mama es la doxorrubicina y, en menor medida, epirrubicina por su mayor cardiotoxicidad (Khasraw et al., 2012).

- **Antimetabolitos análogos de pirimidina**. Son fármacos con una estructura similar a componentes intermedios del metabolismo celular y que interfieren bloqueando la síntesis de ácidos nucleicos. Los más representativos utilizados en el cáncer de mama son 5-fluorouracilo (5-FU) y capecitabina (vía oral), que es un precursor del 5-FU (Abotaleb et al., 2018).

- **Agentes alquilantes**. Se unen a las bases nitrogenadas del ADN mediante enlaces covalentes; bloqueando su replicación, transcripción del ARN, división celular, así como la síntesis de proteínas. Actúan bloqueando cualquier fase del ciclo celular. El agente alquilante utilizado en el cáncer de mama es la ciclofosfamida (Teven et al., 2017), y se puede usar vía oral o intravenosa.

- **Derivados del platino**. Los iones platino de la estructura de estos fármacos forman enlaces inter- e intracatenarios con el ADN, de manera que alteran su estructura e imposibilitan su transcripción (Johnstone et al., 2016). Los más utilizados son el cisplatino y carboplatino.

2.6.2.2. Hormonoterapia o tratamiento hormonal

Como se ha descrito anteriormente, en ciertos tipos de cáncer de mama las células tumorales expresan receptores hormonales (RE y/o RPg). El crecimiento de estas células

tumorales se ve estimulado por la presencia de hormonas sexuales, como son estrógenos y progesterona. Cuando las células del tumor presentan esta característica es posible la aplicación de un tratamiento hormonal, ya que estos fármacos disminuyen los niveles de estrógenos (inhibidores de la aromatasa) o bien, evitan que las hormonas activen los receptores hormonales estimulando la proliferación de las células tumorales (moduladores selectivos de receptores estrogénicos y antagonistas del receptor de estrógeno).

Este tipo de cáncer de mama se conoce como hormonosensible, por su respuesta positiva frente a estos tratamientos. La terapia hormonal se puede emplear como neoadyuvante, adyuvante e incluso de forma exclusiva.

La mayoría de los tratamientos hormonales se administran vía oral y la duración suele ser desde 5 a 10 años tras el diagnóstico de la enfermedad. El tipo de tratamiento hormonal se elige en función de si la paciente es premenopáusica o postmenopáusica (Waks y Winer, 2019). A continuación, se describen los tratamientos hormonales más utilizados en el cáncer de mama:

- **Moduladores selectivos del receptor de estrógeno (MSRE)**. Actúan uniéndose a los receptores estrogénicos impidiendo que el estrógeno natural se una y estimule la proliferación celular. Aunque otras células del cuerpo también poseen receptores estrogénicos (hueso, útero, etc.), estos fármacos se consideran selectivos porque bloquean la acción del estrógeno en los receptores de las células mamarias. El fármaco más representativo es tamoxifeno y se utiliza en mujeres antes y después de la menopausia (Teven et al., 2017).

- **Antagonistas del receptor de estrógeno**. Actúan bloqueando los receptores estrogénicos en todas las células del cuerpo, por lo que sus efectos secundarios suelen ser más frecuentes y notorios que el de los MSRE. El fármaco más utilizado es fulvestrant, y

su uso se reserva a mujeres postmenopáusicas. Este fármaco se suele usar cuando otros tratamientos hormonales han fracasado o el cáncer está en un estadio avanzado (Ciruelos et al., 2014). Se administra mediante inyección cutánea de manera mensual, aunque las 3 primeras dosis se realizan cada 15 días.

- **Inhibidores de la aromatasa**. Estos fármacos tienen un mecanismo de acción diferente a las dos familias anteriores. Los inhibidores de aromatasa detienen la producción de estrógenos mediante el bloqueo de la enzima aromatasa que es la responsable de transformar los andrógenos en estrógenos (Joshi y Press, 2018). El bloqueo de la producción de estrógenos con estos fármacos no ocurre a nivel ovárico, por lo que su uso está indicado en mujeres postmenopáusicas, en las cuales sus ovarios ya no están produciendo estrógenos. Los dos fármacos más utilizados son anastrozol y exemestano. Los efectos secundarios son menos frecuentes que con los antagonistas de receptores estrogénicos, aunque hay que destacar la osteoporosis como reacción adversa frecuente. Las pacientes en tratamiento con inhibidores de la aromatasa son bastante más propensas a sufrir fracturas de huesos (Amir et al., 2011).

2.6.2.3. Terapia biológica o inmunoterapia

Este tipo de terapia implica el uso de sustancias elaboradas a partir de organismos vivos que estimulan el sistema inmunitario para que actúe contra las células cancerosas. En el caso concreto del cáncer de mama, su administración se refiere a anticuerpos monoclonales dirigidos a tratar los cánceres de mama con un incremento de la expresión de *HER2* (Ahmed et al., 2015).

Los anticuerpos monoclonales anti-HER2 trastuzumab o pertuzumab son los fármacos más estudiados. Además, la combinación de ambos, dados sus mecanismos de acción complementarios, se ha descrito como una estrategia útil para combatir el cáncer de mama

HER2-enriquecido (Ishii et al., 2019). Estos tratamientos ejercen su acción preferentemente las células tumorales, las cuales tiene un incremento de la expresión de HER2, uniéndose de manera específica al receptor del factor de crecimiento epidérmico HER2 e impidiendo la señalización de rutas implicadas en la proliferación y supervivencia celular (Hudis, 2007).

Los anticuerpos monoclonales se pueden usar en monoterapia o en combinación con quimioterapia u hormonoterapia. De la misma manera, su uso puede ser como adyuvante o neoadyuvante. Estos tratamientos se administran vía intravenosa cada tres semanas, durante aproximadamente un año.

Aunque no se trata de un anticuerpo monoclonal, hay que destacar el uso del fármaco lapatinib en el cáncer de mama HER2-enriquecido. Este fármaco es un inhibidor de los dominios intracelulares tirosín kinasa de los receptores EGFR y HER2, por lo que disminuye la proliferación de células que tengan estos receptores. Este fármaco se administra vía oral y se suele asociar con el tratamiento de anticuerpos monoclonales, obteniendo mecanismos de acción complementarios (Xu et al., 2017). La terapia combinada entre anticuerpos monoclonales y el inhibidor específico de HER2 ha demostrado mejorar la supervivencia en pacientes con cáncer de mama HER2-enriquecido que presentan un estadio avanzado y metástasis (Blackwell et al., 2012; Hayashi et al., 2015).

2.7. Papel de la dieta frente al cáncer de mama

Como se ha comentado al inicio de la introducción, solo alrededor del 10% de los casos de cáncer de mama son hereditarios, lo que significa que la gran mayoría son causados por factores de riesgo modificables. En términos generales, se ha estimado que aproximadamente un 40% de todos los casos de cáncer diagnosticados podrían prevenirse

con unos hábitos saludables, incluyendo el abandono del tabaquismo, evitando el sobrepeso, restringiendo el consumo de alcohol y la exposición solar, y por supuesto, aumentando el consumo de frutas y hortalizas (Irigaray et al., 2007; Catsburg et al., 2015).

En el contexto de la dieta, las pautas recomendadas incluyen: un consumo energético que garantice un peso corporal adecuado; limitar el consumo de grasas; aumentar el consumo de frutas, verduras, legumbres, cereales integrales y frutos secos; limitar la ingesta de azúcares refinados y limitar el consumo de sal (sodio) (OMS, 2004).

Estas recomendaciones establecidas por la OMS son esenciales para el control y prevención de las ENT, como por ejemplo el cáncer de mama.

Si bien es cierto que en el pasado primaban las dietas tradicionales donde se consumía principalmente alimentos de origen vegetal, hoy en día, estas han sido desplazadas por consumos altos de alimentos procesados, dietas con contenidos elevados en grasa y muy energéticas, un elevado consumo de carnes rojas, etc. (Anand et al., 2008; Janssen et al., 2018; Godfray et al., 2018).

Esta creciente situación, debida entre otros factores a la potente industrialización y al cambio de estilo de vida de los ciudadanos, ha hecho que la población haya ido implementando unos hábitos insanos en general, y alimenticios en particular, de efectos nocivos para la salud y que contribuyen (entre muchas otras ENT) al incremento de la incidencia del cáncer de mama (Tamimi et al., 2016). El consumo de este tipo de dietas está asociado, al menos en parte, con las diferentes tasas de incidencia de cáncer de mama entre países desarrollados y no desarrollados. Una diferencia que se va acortando conforme los países no desarrollados van adquiriendo “patrones de desarrollo occidental”, algo que pareciendo paradójico, no lo es tanto, pues entre otros, esos patrones incluyen la dieta poco saludable.

Respecto al consumo de frutas y verduras, los alimentos de origen vegetal han demostrado ser una excelente fuente de fitoquímicos. El consumo de estos compuestos tiene numerosos beneficios para la salud humana. Entre las distintas actividades biológicas que se han descrito para los fitoquímicos se encuentra la actividad anticancerígena (Anantharaju et al., 2016; Das et al., 2019).

De los diferentes fitoquímicos que se conocen destacan los compuestos fenólicos por su amplia distribución en frutas, verduras, cereales, té, vino tinto, café, etc. Los compuestos fenólicos han demostrado actuar sobre distintas dianas moleculares implicadas en el proceso de carcinogénesis a través de numerosos mecanismos de acción (Zhou et al., 2016). Esta gran cantidad de mecanismos de acción ha hecho que en las últimas décadas la investigación sobre los compuestos fenólicos cobre importancia, especialmente sobre su posible uso como agentes preventivos en patologías como el cáncer de mama (Li et al., 2017).

Sin embargo, los efectos beneficiosos del consumo de alimentos vegetales frente al cáncer de mama son todavía controvertidos e inconsistentes (Emaus et al., 2016; Heath et al., 2020). En este sentido, en varios estudios epidemiológicos y meta-análisis se ha descrito la relación inversa que existe entre el consumo de frutas y verduras con el menor riesgo de padecer cáncer de mama (Aune et al., 2012; Grosso et al., 2017; Farvid et al., 2019), incluso con el consumo ciertos alimentos vegetales concretos frente al riesgo de cáncer de mama hormonosensible (Jung et al., 2013; Emaus et al., 2016). Por otro lado, esta asociación inversa entre el consumo de frutas y verduras y la incidencia del cáncer de mama no se ha podido establecer en el estudio observacional publicado donde han participado más de 10 países Europeos durante 15 años (*"European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*" EPIC) (Karavasiloglou et al., 2019; Heath et al., 2020). Esta controversia tiene su lado lógico si se considera la amplísima variabilidad en

el contenido de fitoquímicos dentro de frutas y hortalizas (entre alimentos, entre variedades dentro de un mismo alimento, diferentes procesados, matriz del alimento, etc.) (Tomás-Barberán y Espín, 2019). Por ello, todos los estudios observacionales, basados en estimaciones y cuestionarios propios de los participantes, son cuestionables y presentan serias limitaciones.

Por tanto, la necesidad de estudios clínicos donde se estudie el beneficio del consumo de alimentos vegetales, y que permitan identificar qué compuestos son los responsables del efecto, son indispensables para establecer de manera clara la posible actividad quimiopreventiva frente al cáncer de mama asociada al consumo de alimentos vegetales.

3. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más grandes y amplios de metabolitos secundarios en el Reino Vegetal. Estos compuestos se encuentran en plantas superiores y se localizan principalmente en los frutos, lo cual hace que se consuman de manera habitual en la dieta en cantidades significativas, aunque las cantidades que se consumen según el país varían de manera sustancial (Taguchi et al., 2015).

Los compuestos fenólicos se producen como resultado del metabolismo secundario de las plantas. Todos tienen como intermediario común la fenilalanina, y su precursor inmediato es el ácido shikímico. Los compuestos fenólicos son fundamentales en la fisiología de las plantas por diversos motivos: están implicados en el crecimiento y en la reproducción, contribuyen a la resistencia frente a patógenos y depredadores y las protegen de ciertas enfermedades (Bravo, 1998; Tomás-Barberán y Espín, 2001). Además, son los responsables de diversas características organolépticas (aroma, sabor, color, etc.) de frutas y hortalizas, y también de sus derivados.

Sin embargo, la característica que hace que estos compuestos sean tan relevantes en el campo de la investigación es su potencial bioactividad frente a diversas patologías, dentro de un consumo habitual en nuestra dieta. Tradicionalmente se les ha denominado como "antioxidantes", capacidad que les confiere el grupo hidroxilo (o más de uno) presente en su estructura (Wang y Jiao, 2000), aunque no es la única actividad biológica que les hace compuestos de interés, puesto que poseen muchas otras actividades como antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria, anticancerígena, etc. (Li et al., 2014; Yahfoufi 2018; Othman et., 2019).

3.1. Clasificación de compuestos fenólicos y sus fuentes en la dieta

Los compuestos fenólicos presentan como característica común la presencia de al menos un grupo fenol (anillo bencénico con un grupo hidroxilo). La mayoría de estos compuestos presentan más de un grupo fenólico por lo que en la literatura científica se les suele denominar "polifenoles".

Existe una variedad amplia de estructuras químicas dentro de los compuestos fenólicos, desde una simple molécula con un solo anillo fenólico (el fenol), hasta complejos polímeros macromoleculares. Se han descrito más de 10.000 compuestos fenólicos diferentes y pueden clasificarse en diferentes familias (Bravo, 1998).

La clasificación más ampliamente aceptada de los compuestos fenólicos es la que atiende a su estructura básica (Bravo, 1998; Manach et al., 2004). En esta clasificación, los compuestos fenólicos se dividen en dos grandes grupos (que a su vez se subdividen en distintos subgrupos): flavonoides y no flavonoides (**Figura 1.12** y **Figura 1.13**, respectivamente).

- El grupo de los **flavonoides** es el mayor grupo de compuestos fenólicos conocidos. Es un grupo de compuestos que presenta una gran variabilidad. Además, los

compuestos de este grupo se pueden encontrar en prácticamente todos los alimentos de origen vegetal. Los flavonoides se caracterizan por su estructura específica de quince carbonos (C_6-C_3-C_6) divididos en tres anillos, dos de ellos aromáticos y un tercero, tipo pirano (**Figura 1.12**). Están implicados en las propiedades organolépticas de frutas y hortalizas, tales como el sabor y color (Tomás-Barberán y Espín, 2001). Los flavonoides se pueden encontrar en frutas (cítricos, manzana, uva, frutos rojos, etc.), hortalizas (brócoli, cebolla, espinacas, pimiento, etc.) y en bebidas obtenidas de fuentes vegetales como son el té o vino tinto (Beecher, 2003). Es importante destacar que las fuentes, la cantidad ingerida e incluso la biodisponibilidad de los flavonoides están muy influenciadas por la estación del año, la luz, el grado de madurez, la preparación y el procesado del alimento (Aherne y O´Brien, 2002).

- El otro grupo de compuestos fenólicos corresponde a los **no flavonoides**. Generalmente, presentan una estructura más simple que los flavonoides. Los principales compuestos fenólicos no flavonoides engloban a los ácidos fenólicos simples (ácidos hidroxicinámicos y ácidos hidroxibenzoicos), los estilbenos y el subgrupo más complejo a nivel estructural que serían los taninos hidrolizables (**Figura 1.13**). Al igual que los anteriores están ampliamente distribuidos en el Reino Vegetal. Los principales ácidos hidroxicinámicos son el ácido cafeico y ácido sinápico, y los podemos encontrar en fuentes como cerezas, espinacas, lechuga o en el café (Stalmach et al., 2012). La amplia diversidad de fuentes donde se encuentran los ácidos hidroxicinámicos hace que su consumo entre la población sea muy variable (Tomás-Barberán y Clifford, 2000). Dentro del grupo de no flavonoides también se encuentran las cumarinas, que son benzopironas que derivan de la lactonización de ácidos hidroxicinámicos. Son compuestos con gran actividad biológica pero que su presencia en alimentos es prácticamente nula (Matos et al., 2015). Los ácidos hidroxibenzoicos se encuentra en frutas como fresas y melón, y

también en ciertas especies como el pimentón (Cetó et al., 2018). Los estilbenos como el resveratrol se encuentran en el vino tinto, uvas y cacahuetes, siendo su presencia en la dieta mucho más ocasional que la de otros compuestos fenólicos (Tomé-Carneiro et al., 2013). Otro grupo dentro de los no flavonoides son los lignanos que se encuentran en fuentes de alimentos muy concretas como son las semillas de lino o sésamo (Del Rio et al., 2013). Por último, el grupo de los taninos hidrolizables corresponden a complejas estructuras que se pueden encontrar en fuentes como la granada, la nuez o en vinos "envejecidos" en barricas (Crozier et al., 2009).

3.2. Biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos

La biodisponibilidad de un compuesto puede definirse como la fracción de este que alcanza la circulación sistémica y el sitio específico donde puede ejercer su acción biológica (Porrini y Riso, 2008).

La biodisponibilidad de los compuestos fenólicos de la dieta es un factor importante que considerar ya que puede aumentar o limitar sus efectos sistémicos, incluido el efecto anticancerígeno contra el cáncer de mama. Del mismo modo, comprender las formas metabólicas o moleculares y los niveles o concentraciones de esos compuestos fenólicos que pueden alcanzar el tejido mamario humano es crucial para sugerir su posible papel en los efectos beneficiosos *in vivo*, así como para diseñar estudios *in vitro* fisiológicamente relevantes que aumenten el conocimiento sobre sus posibles mecanismos de acción quimiopreventivos.

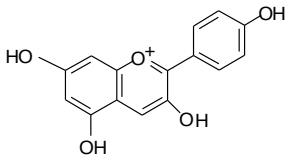
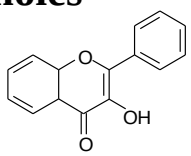
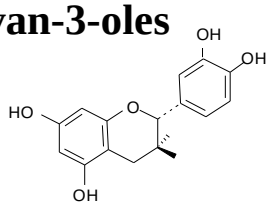
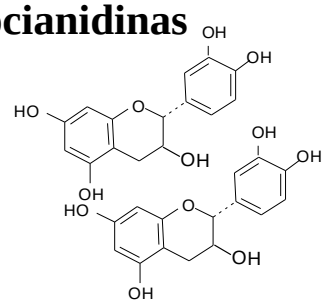
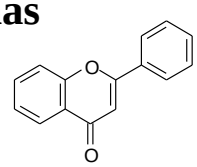
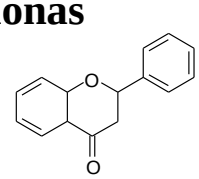
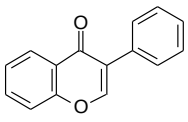
Flavonoides	Compuestos	Alimentos
Antocianinas 	Cianidina Peonidina Delfinidina	Cerezas Arándanos Uvas Fresas
Flavonoles 	Quercetina Kaempferol Isoramnetina	Manzanas Té verde Cebollas Tomates
Flavan-3-oles 	Catequina Epicatequina Galocatequina	Cacao Melocotón Moras Té verde
Procianidinas 	Procianidina B1 Procianidina B1	Cacao Uva Vino Té verde
Flavonas 	Apigenina Luteolina Crisina	Apio Perejil Brócoli Alcachofa
Flavanonas 	Narigenina Hesperetina Eriocitrina	Limón Naranja Pomelo Pimientos
Isoflavonas 	Daidzeína Genisteína Formononetina	Soja Tofú Guisantes Garbanzos

Figura 1.12. Clasificación de compuestos fenólicos (**flavonoides**), compuestos representativos de cada familia y, fuentes dietéticas donde encontrarlos.

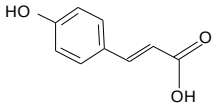
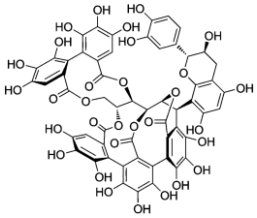
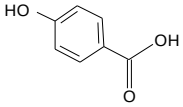
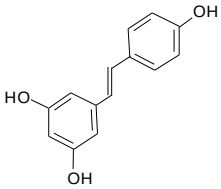
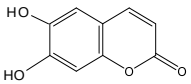
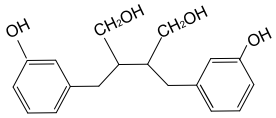
No flavonoides	Compuestos	Alimentos
Ácidos hidroxicinámicos		
	Ácido cafeico Ácido ferúlico Ácido sinápico	Piña Frambuesa Uva Limón
Taninos hidrolizables		
	Elagitaninos Galotaninos	Granada Fresas Nueces Castañas
Ácidos hidroxibenzoicos		
	Ácido gálico Hidroxitirosol Ácido siríngico	Melón Aceite de oliva Cerezas Mango
Estilbenos		
	Resveratrol Piceatanol Viniferina	Uva Vino tinto Pistachos Cacahuetes
Cumarinas		
	Esculetina Umbeliferona Escoparona	Perejil Apio Cítricos
Lignanos		
	Secoisolariciresinol Pinoresinol Matairesinol	Sésamo Lino

Figura 1.13. Clasificación de compuestos fenólicos (**no flavonoides**), compuestos representativos de cada familia y, fuentes dietéticas donde encontrarlos.

Existen diferentes factores que pueden afectar directa o indirectamente a la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos, y son:

1) Factores relacionados con el alimento: la matriz del alimento y su composición, el procesado (almacenamiento, cocinado, tratamiento térmico, etc.) o interacciones con otras moléculas presentes en el alimento (por ejemplo, proteínas).

2) Factores relacionados con el compuesto: su estructura química, solubilidad, estabilidad, etc.

3) Factores del individuo que los consume: microbiota intestinal, capacidad enzimática, edad, sexo, polimorfismos genéticos de enzimas de Fase-II y transportadores, etc.

Así pues, atendiendo a estos factores, los compuestos fenólicos más abundantes en un alimento no tienen por qué ser los más biológicamente activos, debido a que pueden tener una baja actividad intrínseca o bien, porque son pobremente absorbidos, altamente metabolizados y/o rápidamente excretados. Del mismo modo, también puede ocurrir que compuestos o metabolitos biodisponibles que provengan de compuestos fenólicos de la dieta pudieran podrían llegar a ejercer mayor actividad biológica que los compuestos de los que provienen.

En general, la gran mayoría de compuestos fenólicos se caracterizan por su escasa biodisponibilidad que les impide llegar a los tejidos sistémicos en su forma nativa (D'Archivio et al., 2010). Los compuestos fenólicos se encuentran en los alimentos principalmente en forma glicosilada, aunque también pueden estar presentes en forma de polímeros (taninos hidrolizables, procianidinas) o esterificados (ácidos hidroxicinámicos).

La estructura que presentan los compuestos fenólicos imposibilita que puedan ser absorbidos si no se hidrolizan previamente, aunque algunos de ellos pueden absorberse

en su forma nativa en el estómago o intestino delgado (Williamson y Clifford, 2017). Esta hidrólisis tiene lugar mediante enzimas intestinales y/o por acción de la microbiota. La hidrólisis da lugar a monómeros a partir de polímeros y a las formas libres (agliconas, sin grupos azúcares), las cuales se absorben a través del epitelio intestinal y/o metabolizan en el enterocito, dando lugar a metabolitos Fase-II (principalmente glucurónidos y sulfatos) (**Figura 1.14**). Por lo tanto, a diferencia de sus moléculas precursoras que raramente aparecen inalteradas en la circulación sistémica, se pueden detectar concentraciones significativas de metabolitos conjugados derivados de fenólicos en plasma y tejidos sistémicos donde podrían desencadenar efectos biológicos, incluidos los anticancerígenos (Del Rio et al., 2013; Espín et al., 2017).

A su vez, la microbiota intestinal es capaz de metabolizar extensamente las agliconas, produciendo otros metabolitos más simples (Cortés-Martín et al., 2020). La microbiota intestinal es capaz de transformar estas formas libres mediante reacciones de desmetilación, como es la reacción que ocurre con la isoflavona daidzeína para dar lugar a *O*-desmetilangolensina (ODMA) (Braune y Blaut, 2016), mediante reacciones de deshidroxilación, como la que sufre el ácido elágico (EA) para dar lugar a las urolitinas (Tomás-Barberán et al., 2017), o hidrogenación, como en el resveratrol, a partir del cual se forma su metabolito microbiano dihidroresveratrol (Bode et al., 2013). Posteriormente, los metabolitos formados son absorbidos y se metabolizan mediante reacciones de Fase-I o Fase-II, principalmente en el enterocito y el hígado.

Dada la importancia de estas reacciones enzimáticas en el metabolismo de los compuestos fenólicos, se detallan a continuación:

Reacciones de Fase-I

Agrupan a un conjunto de reacciones catalizadas por un sistema complejo de enzimas (citocromos P450, CYPs) que convierten los xenobióticos, y en general compuestos no

polares, en compuestos más solubles en agua introduciendo o exponiendo un grupo funcional hidrofílico del sustrato (Ioannides y Lewis, 2004). Estas reacciones pueden ser de oxidación, reducción, hidrólisis, hidratación o isomerización. Se han descrito 57 genes y 29 pseudogenes que codifican a las enzimas CYPs. En humanos se han identificado 18 familias de *CYP* y 43 subfamilias (Danielson, 2002).

Diversos estudios sugieren que las diferencias en los niveles basales de CYPs entre individuos constituyen una de las principales fuentes de variabilidad interindividual en la respuesta a xenobióticos (Zanger y Schwab, 2013). Las enzimas CYPs pueden encontrarse en diferentes tejidos, pero son mayoritarias en hígado.

Reacciones de Fase-II

Consisten en reacciones de conjugación, catalizadas por diferentes enzimas transferasas. Mediante las reacciones de conjugación se agregan moléculas endógenas a compuestos resultantes de las reacciones de Fase-I o a compuestos originales que contienen grupos funcionales apropiados para ser sustratos. Si catalizan la adición de grupos polares grandes se obtienen moléculas mucho más solubles en agua que los compuestos absorbidos. Por otro lado, también pueden catalizar la adición de otros residuos más pequeños no-polares para bloquear grupos especialmente reactivos. En general, los metabolitos conjugados son más fáciles de excretar del organismo, especialmente por la presencia de grupos más polares, pero son menos activos que sus correspondientes formas no conjugadas (Kaeferstein, 2009).

La capacidad de los tejidos para llevar a cabo transformaciones metabólicas de Fase-II depende de la afinidad de las enzimas por los sustratos, así como de la cantidad disponible de los cofactores necesarios para que se desarrolle la reacción. Las principales reacciones de conjugación son:

- **Glucuronidación**. Esta reacción consiste en agregar un grupo glucuronil a un grupo hidroxilo, carboxilo, amino o sulfhidrilo del compuesto original. Las responsables de catalizar esta reacción son las enzimas UDP-glucuronil transferasas (UGTs), y el donador del grupo polar es el ácido UDP glucurónico. Estas enzimas se localizan en el retículo endoplasmático, a diferencia de otras enzimas de Fase-II que se localizan en el citosol. De todos los tejidos, el hígado es el que tiene una mayor capacidad para la glucuronidación (Rowland et al., 2013). En humanos, hay identificadas 22 isoformas de estas enzimas, las cuales tienen unas amplias especificidades para el sustrato y diferentes distribuciones en los tejidos (Meech et al., 2019). La subfamilia UGT1A juega un papel fundamental en las reacciones metabólicas de los compuestos fenólicos (Wu et al., 2011). Hay diferentes polimorfismos descritos en el gen que codifica esta subfamilia, lo que contribuye a la variabilidad entre individuos en la glucuronidación de compuestos fenólicos.

- **Sulfatación**: La reacción consiste en la transferencia de un grupo sulfato desde el cofactor PAPS (3´-fosfoadenosil-5´-fosfosulfato) a un grupo hidroxilo o amino del sustrato (Suiko et al., 2017). La reacción es catalizada por una familia de enzimas denominadas sulfotransferasas (SULTs), que se localizan en el citosol. El producto de la reacción es un sulfato orgánico ionizado muy soluble en agua y que se excreta con facilidad. La sulfatación ocurre principalmente en el hígado, aunque también existen sulfotransferasas en otros órganos o tejidos extrahepáticos (por ejemplo, en riñones o en tejido mamario) (Marto et al., 2017).

- **Metilación**: La reacción consiste en la transferencia de un grupo metilo a un grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo y es catalizada por una familia de enzimas denominadas metiltransferasas. La enzima catecol-*O*-metil transferasa (COMT) es la más común. Esta enzima se encarga de catalizar la transferencia de un grupo metilo desde *S*-adenosil-

metionina (SAM) a los compuestos que contienen una agrupación *orto*-dihidroxílica, como es el caso del catecol (Tsao et al., 2011). Generalmente, la metilación tiene lugar en la posición 3 del compuesto fenólico o en la posición 4, aunque esta última es minoritaria (en flavonoides, posiciones 3' y 4' en el anillo B). Esta enzima está presente en un gran número de tejidos, siendo su actividad muy alta en el hígado, seguida en orden decreciente de la detectada en riñones y cerebro (Bastos et al., 2017). La metilación también es importante en la transformación de compuestos endógenos. Entre sus funciones destaca la participación en la biosíntesis de varios aminoácidos y esteroides, en la metilación del ADN y en la inhibición de la transcripción de ciertos genes.

Otras reacciones de conjugación importantes, aunque menos comunes en los compuestos fenólicos son: la aminoacidación, que consiste en la formación de una unión peptídica entre el grupo amino de un aminoácido, normalmente glicina, y un carboxilo de otro compuesto; y la glutationización, donde la acetiltransferasa cataliza la reacción de transferencia de un grupo acetilo a partir de acetil-coenzima A.

La eficiencia de estas reacciones de conjugación, dentro de cada isoenzima específica, depende de la naturaleza del sustrato, de la dosis ingerida, de la especie considerada, de la ingesta simultánea de otros alimentos (también del tipo de alimento, matriz y procesado de estos), así como del tejido o biofluido considerado (Jancova et al., 2010; DeKeyser y Shou, 2012). En general, la sulfatación es una ruta de mayor afinidad y más fácilmente saturable que la glucuronidación. Así, cuando la dosis ingerida aumenta, se da un cambio de la sulfatación hacia la glucuronidación.

Los metabolitos resultantes de estas reacciones de conjugación son altamente solubles pudiendo volver por vía biliar (ruta enterohepática) al intestino delgado o ser eliminados del organismo a través de la orina. Por otro lado, los compuestos fenólicos y sus agliconas que no se hayan absorbido y/o metabolizado, se excretan a través de las heces.

Por lo tanto, averiguar si los compuestos fenólicos de la dieta pueden proteger contra la progresión del cáncer de mama, debido a su baja biodisponibilidad y el alto metabolismo de estos compuestos, aún plantea poder resolver varias cuestiones sobre su mecanismo de acción. Por ejemplo, se ha observado que los metabolitos derivados de compuestos fenólicos de Fase-II y/o los metabolitos microbianos, los más abundantes en circulación, muestran efectos anticancerígenos más bajos o incluso nulos en comparación con la correspondiente forma libre (Aires et al., 2013; González-Sarrías et al., 2014). En este sentido, se están investigando nuevos enfoques para confirmar o revaluar su posible efecto, incluido nuevos mecanismos de acción implicados contra el cáncer, como la inducción de la senescencia celular, efectos a largo plazo, efecto indirecto a través de la interacción con la microbiota intestinal, o la desconjugación sistémica en condiciones fisiológicas específicas como la inflamación.

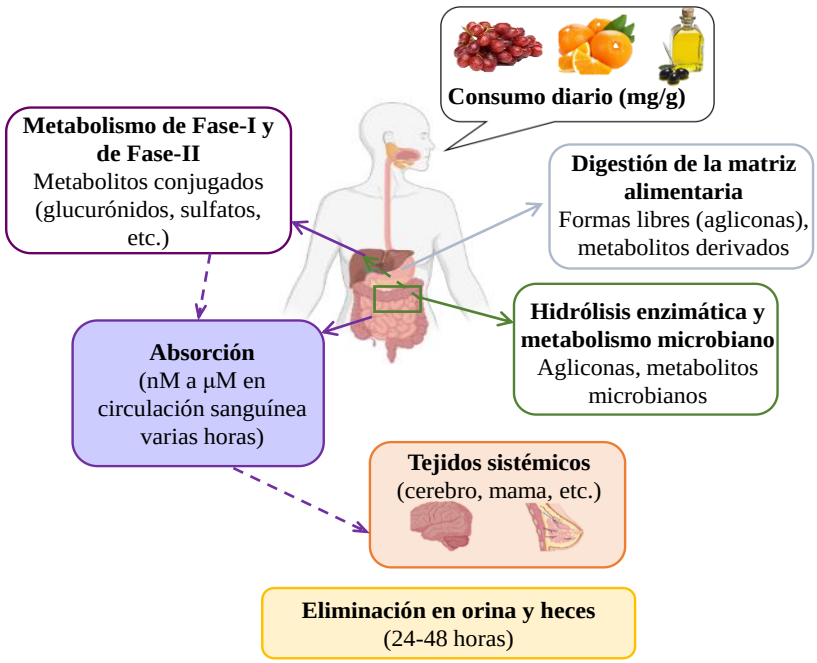


Figura 1.14. Absorción y metabolismo de compuestos fenólicos.

Dado el extenso metabolismo que sufren los compuestos fenólicos en el organismo se hace necesario conocer la forma molecular, la concentración y la cinética de cada metabolito fenólico que llega al tejido tumoral mamario (TTM), para definir realmente su posible actividad quimiopreventiva frente al cáncer de mama.

Respecto a la distribución de compuestos fenólicos y/o metabolitos derivados en tejido mamario humano, hasta la fecha, la evidencia se resume a un número limitado de estudios de biodisponibilidad (**Tabla 1.4**). En cuanto a modelos animales, aunque existe mayor número de estudios (**Tabla 1.5**), los resultados son contradictorios, ya que no existe una metodología homogénea a la hora de identificar y cuantificar los compuestos fenólicos y metabolitos derivados detectados.

La mayoría de los estudios que han evaluado la distribución de compuestos fenólicos en tejido mamario han sido tras el consumo de isoflavonas, tanto en humanos (**Tabla 1.4**) como en animales (**Tabla 1.5**). En general, los estudios en humanos muestran que daidzeína y genisteína son detectadas en TSM y TTM en concentraciones en el rango nanomolar (Pumford et al., 2002; Maubach et al., 2004), así como metabolitos microbianos derivados de estas isoflavonas, dihidrodaidzeína y equol (éste último solo en aquellos individuos productores de equol) (Maubach et al., 2004; Bolca et al., 2010a). Sin embargo, hay que apuntar que estas concentraciones detectadas en tejido mamario de compuestos fenólicos en su forma libre se han obtenido tras una hidrolisis enzimática, por lo que realmente se está sobreestimando la cantidad de estos compuestos en detrimento de sus metabolitos conjugados, que están o pudieran estar presentes en el tejido mamario. Un ejemplo de este hecho es el estudio llevado a cabo por Bolca et al. (2010a) realizado en mujeres que se sometieron a una cirugía estética mamaria, donde se identificaron y cuantificaron los compuestos fenólicos que se encontraban en tejido mamario adiposo y glandular tras el consumo de leche de soja o de un suplemento con

isoflavonas. Para la cuantificación de los compuestos, los tejidos mamarios se procesaron con y sin hidrólisis enzimática, observándose, como era de esperar, que en los tejidos no hidrolizados del total de compuestos un 98% eran glucurónidos (900–1150 pmol/g), principalmente genisteina-7-*O*-glucurónido y daidzeína-7-*O*-glucurónido, mientras que genisteína y daidzeína en forma libre solo se observaron trazas (Bolca et al., 2010a). En este sentido, los estudios animales donde el análisis de las muestras de tejido mamario se ha realizado con hidrólisis enzimática y sin ella (**Tabla 1.5**) muestran que los metabolitos detectados en tejido mamario tras el consumo de isoflavonas son mayoritariamente glucurónidos (>60%), donde las formas libres son casi indetectables (Chang et al., 2000; Lamartiniere et al., 2002; Yuan et al., 2003; Urpí-Sarda et al., 2008). Siguiendo con los estudios en animales, se debe considerar que se han descrito mayores cantidades de isoflavonas y concentraciones totales de metabolitos en TTM que en tejido sano (hígado y colon), concretamente para genisteína y daidzeína (Yuan et al., 2003).

En un estudio posterior, de nuevo Bolca et al. (2010b), realizando la misma aproximación y metodología (voluntarias que se sometieron a una cirugía estética mamaria), detectaron más de un 90% de metabolitos conjugados de prenilflavonoides tras el consumo de cápsulas de lúpulo, mientras que los compuestos en forma libre xanthohumol, isoxanthohumol y 8-prenilnaringenina (8-PN) solo se detectaron tras la hidrólisis enzimática y en bajas concentraciones (rango picomolar (0,8–83,7 pmol/g tejido)) (Bolca et al., 2010b). Este resultado está de acuerdo con lo descrito en modelos animales donde los glucurónidos de 8-PN y 6-PN fueron los compuestos que principalmente se detectaron en tejido mamario tras la administración de prenilflavonoides o extracto de lúpulo (Overk et al., 2008; Dietz et al., 2013).

En los últimos años, nuevos estudios han aportado más información en la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en tejido mamario, no solo

evaluando los resultados con y sin tratamiento enzimático, sino también comparando la distribución entre TTM y TSM.

En este sentido, dos estudios recientes han mostrado mayores cantidades del flavonolignano silibina (Lazzeroni et al., 2016) y de la catequina EGCG (Lazzeroni et al., 2017) en TTM, frente a las detectadas en TSM (tras hidrólisis enzimática), obteniendo en ambos estudios concentraciones de estos compuestos fenólicos en rango ng/g tejido. Al igual que lo observado en otros estudios, cuando no se realizó la hidrólisis enzimática las concentraciones de compuestos detectados en forma libre fueron muy inferiores a lo detectado tras hidrólisis, o incluso inexistentes como en el caso de EGCG (Lazzeroni et al., 2016; 2017), evidenciando el alto metabolismo de Fase-II de los compuestos fenólicos. Sin embargo, la cuantificación de los conjugados fue realmente una estimación, pues se realizó con los patrones de las formas libres debido a la falta de patrones en forma conjugada (Lazzeroni et al., 2016; 2017). Estudios con ratones han mostrado que tras la administración de extracto de té se identifican catequinas en forma conjugada (metilos y sulfatos) (Kaur et al., 2007). También en modelos animales se han llegado a cuantificar concentraciones superiores de EGCG en tejido mamario, además de otras catequinas como epicatequina y catequina en las muestras hidrolizadas (Sartippour et al., 2006) (**Tabla 1.5**).

Respecto a otros compuestos fenólicos de los que se ha descrito una potencial actividad anticancerígena, como por ejemplo la curcumina o los lignanos, la evidencia de su metabolismo y distribución en tejido mamario es inexistente en humanos, habiéndose descrito tan solo en animales (**Tabla 1.5**). En este sentido, se han descrito metabolitos microbianos derivados de fenólicos como son los enterolignanos (enterodiol y enterolactona) en forma libre y sus conjugados, en tejido mamario de ratas y cerdos (Laerke et al., 2009; García-Mateos et al., 2017).

En general, y basándonos en la evidencia actual, la distribución de compuestos fenólicos y metabolitos derivados en tejido mamario es similar a la descrita en plasma. No obstante, a diferencia de la mayoría de los compuestos fenólicos, la curcumina resulta un compuesto paradójico. Aun mostrando una biodisponibilidad muy baja y siendo rápidamente metabolizada en el organismo (principalmente en forma de glucurónido), estudios recientes en animales han identificado curcumina libre en mayores concentraciones (hasta 15 veces superiores) que las detectadas de curcumina glucurónido en TTM, tras administración oral e intravenosa de este compuesto (Liu et al., 2019). Aunque al igual que para otros fenólicos, las concentraciones de curcumina fueron superiores en TTM que en TSM (Liu et al., 2019).

Por otro lado, es importante también destacar los estudios preclínicos que utilizan estrategias para incrementar la biodisponibilidad y estabilidad de los compuestos fenólicos, consiguiendo entre otras, mayores concentraciones de los metabolitos derivados. Se han descrito diferentes técnicas y aproximaciones en modelos animales, como son la encapsulación (micelas, liposomas, nanopartículas, etc.), sistemas de administración de fármacos auto-microemulsificantes ("*loaded self-microemulsifying drug delivery system*" (SMEDDS)) o auto-nanoemulsificantes ("*self-nanoemulsifying drug delivery system*" (SNEDDS)), los cuales se han usado con diferentes fenólicos (curcumina, quercetina, RSV, etc.) en estudios de biodisponibilidad y para evaluar su efecto quimiopreventivo (**Tabla 1.5**, **Tabla 1.8** (dada la extensión de la **Tabla 1.8**, se encuentra al final del **Capítulo 1**).

Como se ha comentado anteriormente, existe mayor número de estudios animales que en humanos sobre la distribución de compuestos fenólicos en tejido mamario (**Tabla 1.5** *vs* **Tabla 1.4**), así como en un mayor número de compuestos fenólicos, algunos de ellos con alta evidencia sobre su actividad anticancerígena, como son curcumina, RSV,

lignanos, etc. En el caso concreto de RSV, se ha descrito que en TTM de ratas los metabolitos detectados son principalmente metabolitos de Fase-II (RSV-3-*O*-glucurónido, RSV-4'-*O*-glucurónido y en menor cantidad sulfatos) (Kisková et al., 2014). Sin embargo, otro estudio llevado a cabo en ratones trasplantados con células tumorales de mama mostró elevadas concentraciones de RSV en forma libre (entre 157,7–661,5 nmol/g) tras el consumo de una dieta habitual suplementada con 5 g/kg de RSV durante 5 semanas y tras la inducción del tumor, aunque no se detectaron niveles de RSV libre en plasma (Rossi et al., 2018). A día de hoy, estos resultados no se pueden comparar con ningún estudio en humanos, como también ocurre con otros fenólicos con gran actividad quimiopreventiva, como por ejemplo la curcumina.

3.3. Actividad quimiopreventiva de los compuestos fenólicos frente al cáncer de mama

Numerosos meta-análisis, estudios observacionales y epidemiológicos han sugerido el papel quimiopreventivo de los compuestos fenólicos frente al cáncer de mama (Farvid et al., 2016; Rothwell et al., 2017; Grosso et al., 2017). En este sentido, un gran número de patrones dietéticos con un alto consumo de alimentos ricos en compuestos fenólicos se han relacionado con efectos protectores frente al cáncer de mama. Principalmente se ha observado con altos consumos de soja y derivados en dietas de países asiáticos, atribuyendo el efecto a las isoflavonas por su actividad como fitoestrógenos (Chen et al., 2014; Micek et al., 2020), o también con patrones de dieta mediterránea frente a dietas occidentales, donde predomina el consumo de alimentos vegetales y aceite de oliva (Castelló et al., 2014; Castelló et al., 2017).

Tabla 1.4. Compuestos fenólicos y/o metabolitos derivados detectados en tejido mamario humano.

Tamaño de la muestra	Dieta o compuesto fenólico consumido	Condiciones de extracción y análisis	Compuestos fenólicos identificados y/o cuantificados	Referencias
8 Mujeres intervenidas quirúrgicamente por un tumor mamario o sometidas a una biopsia	Un grupo (n=4) consumió cuatro panecillos/día suplementados con soja que proporcionaron aproximadamente 45 mg de isoflavonas. Otro grupo control (n=4) no lo consumió. El consumo fue durante 14 días antes de la cirugía.	Los tejidos mamarios se extrajeron y posteriormente se hidrolizaron con tratamiento enzimático[a]. El análisis se realizó mediante GC/MS y la cuantificación utilizando los patrones específicos.	La concentración media de daidzeína (DAZ) en el grupo que no consumió el suplemento de soja fue de 0,021 (rango 0,017–0,028) nmol/g tejido, mientras que en las pacientes que consumieron los panecillos con soja fue de 0,145 (rango 0,083-0,218) nmol/g tejido. La concentración media de genisteína (GEN) en el grupo que no consumió el suplemento de soja fue de 0,120 (rango 0,103–0,142) nmol/g tejido, mientras que en las pacientes que consumieron los panecillos con soja fue de 0,665 (rango 0,571–0,723) nmol/g tejido.	Pumford et al., 2002
3 Mujeres que se sometieron a reducción mamaria	2 Pacientes consumieron suplemento de soja (100mg GEN/GEN + 37 mg de DAZ/daidzina + 15 mg de gliciteína/glicitina (90% glicósidos)). Una paciente consumió una cápsula/día y otra paciente 3 cápsulas/día. Una paciente consumió placebo. Consumo de 5 días.	Los tejidos mamarios se extrajeron y posteriormente se hidrolizaron con tratamiento enzimático[a]. El análisis se realizó mediante HPLC-DAD comparando con el tiempo de retención de los correspondientes patrones y el espectro UV.	Las concentraciones medias de GEN y equol fueron 4,16 μg/g tejido y 52,98 μg/g, respectivamente, en la paciente que consumió una dosis diaria mientras que DAZ estuvo por debajo del límite de detención. Las concentraciones medias de GEN, equol y DAZ fueron 35,1 μg/g tejido, 681,7 μg/g tejido y 16,0 μg /g tejido, respectivamente, en la paciente que consumió tres dosis diarias.	Maubach et al., 2003
28 Mujeres que se sometieron a reducción mamaria	Un grupo (n=9) consumió un suplemento de soja con 100 mg GEN/genistina, 37 mg de DAZ/daidzina, y 15 mg de gliciteina/glicitina (90% glicósidos). Otro grupo control (n=19) consumió una cápsula placebo. Consumo de 5 días.	Los tejidos mamarios se extrajeron y posteriormente se hidrolizaron con tratamiento enzimático[a]. El análisis se realizó mediante HPLC-MS. La cuantificación se hizo utilizando los patrones específicos.	Las concentraciones (mediana) de DAZ y equol fueron de 7,03 nM y 2,44 nM, respectivamente, en las pacientes del suplemento de soja. No se detectó GEN. La concentración (mediana) de DAZ fue de 5,44 nM en las pacientes control. Equol y GEN se detectaron en algunas pacientes del grupo control con concentraciones de equol 10 veces superiores a las de GEN.	Maubach et al., 2004
31 Mujeres que se sometieron a reducción mamaria	Un grupo (n=11) consumió 250 mL de leche de soja que contenía 16,98 mg de GEN + 5,40 mg DAZ; otro grupo (n=10) consumió cápsulas con 5,27 mg	Los tejidos mamarios se diferenciaron en glandular y adiposo, y se analizaron mediante HPLC-MS/MS, con y sin tratamiento enzimático[a]. Para	La distribución de isoflavonas fue 40:60 (tejido adiposo/glandular). El rango de concentraciones de GEN y DAZ en los tejidos hidrolizados (adiposo y glandular) fue de 92,33–493,80 pmol/g tejido y 22,15–770,80 pmol/g tejido, respectivamente. Equol y DH-DAZ se	Bolca et al., 2010a

	GEN + 17,56 mg DAZ; y otro grupo control (n=10) no consumió ningún suplemento. Las dosis fueron 3 diarias durante 5 días.	la cuantificación se usaron patrones de agliconas pero no de conjugados.	detectaron en algunas pacientes, siendo los valores máximos (según el suplemento) 559,4 pmol/g tejido y hasta 368,8 ± 171,1 pmol/g tejido, respectivamente. En los tejidos no hidrolizados (adiposo y glandular) se detectaron trazas de GEN y DAZ. Se estimó que los compuestos eran mayoritariamente glucurónidos (aproximadamente 98%; 900–1.150 pmol/g tejido), en concreto, GEN-7-*O*-glucurónido y DAZ-7-*O*-glucurónido. No se detectaron metabolitos microbianos (DH-DAZ, equol, ODMA) ni sus conjugados.	
21 Mujeres que se sometieron a reducción mamaria	Un grupo (n=11) consumió cápsulas de lúpulo que contenían 2,04 mg xanthohumol (XN), 1,2 mg isoxanthohumol (IX), y 0,1 mg 8-prenilnaringenina (8-PN). Otro grupo (n=10) consumió placebo. El consumo fue una dosis diaria durante 5 días.	Los tejidos mamarios se diferenciaron en glandular y adiposo, y se analizaron mediante HPLC-MS/MS, con y sin tratamiento enzimático[a]. Para la cuantificación se usaron patrones de agliconas pero no de conjugados.	La distribución de prenilflavonoides fue 38:62 en tejido adiposo/glandular. El rango de concentraciones de XN y IX en los tejidos hidrolizados fue de 0,26–5,14 pmol/g tejido y 1,16–83,67 pmol/g tejido, respectivamente. Las concentraciones de 8-PN fueron en productores moderados hasta 0,78 pmol/g tejido y, en altos productores 4,83 pmol/g tejido. En los tejidos no hidrolizados se observó una glucuronidación superior al 90%.	Bolca et al., 2010b
12 Pacientes con cáncer de mama que requerían cirugía sin neoadyuvancia	Todas las pacientes (n=12) consumieron un suplemento oral de un granulado de 2,8 gramos/día de silibinina-fosfatidilcolina (% silibinina de 30 a 36%). Consumo de 4 semanas antes de la cirugía.	Los tejidos mamarios (tumoral y sano) se analizaron mediante HPLC-MS/MS, con y sin tratamiento enzimático[a] Para la cuantificación se usó el patrón de silibina.	Las concentraciones (mediana) de silibina en tejido tumoral y sano (hidrolizados) fueron de 131 ng/g tejido y 11 ng/g tejido, respectivamente. La concentración (mediana) de silibina en tejido tumoral (no hidrolizado) fue de 33 ng/g tejido, sin detectarse en tejido sano.	Lazzeroni et al., 2016
12 Pacientes con cáncer de mama que requerían cirugía sin neoadyuvancia	Todas las pacientes consumieron un suplemento granulado oral de 300 mg té verde (sin cafeína) formulado con lecitina. Cada 300 mg de granulado contenían 44,9 mg de EGCG y 65,1 mg de catequinas. Consumo de 4 semanas antes de la cirugía.	Los tejidos mamarios (tumoral y sano) se analizaron mediante HPLC-MS/MS, con y sin tratamiento enzimático[a]. La cuantificación se hizo con el patrón de EGCG.	La concentración (mediana) de EGCG en tejido tumoral (hidrolizado) fue de 3,18 ng/g tejido, sin detectarse en tejido sano. La concentración (mediana) de EGCG en tejido sano (no hidrolizado) fue de 1,07 ng/g tejido, sin detectarse en tejido tumoral.	Lazzeroni et al., 2017

[a]Tratamiento enzimático utilizando las enzimas β-glucuronidasa y sulfatasa. Abreviaturas: **DAD**, detector *"diode-array"*; **DAZ**, daidzeína; **DH-DAZ**, dihidrodaidzeína; **EGCG**, epigalocatequina-3-galato; **GC**, cromatografía de gases; **GEN**, genisteína; **HPLC**, cromatografía líquida de alta resolución; **MS**, espectrometría de masas; **ODMA**, *O*-demetilangolensina; **UV**, ultravioleta.

Tabla 1.5. Compuestos fenólicos y/o metabolitos derivados detectados en tejido mamario de animales.

Tamaño de la muestra	Dieta o compuesto fenólico consumido	Condiciones de extracción y análisis	Compuestos fenólicos identificados y/o cuantificados	Referencias
		Isoflavonas		
Ratas hembra Sprague-Dawley (n=5 por grupo)	Dieta suplementada con genisteína (GEN) (25 y 250 mg/kg) desde la gestación hasta 21 días después del parto.	Los tejidos mamarios, una vez extraídos, se analizaron mediante HPLC/MS, con y sin hidrólisis enzimática[a]. Para la cuantificación se usó GEN como patrón.	Las concentraciones obtenidas de GEN libre y el total (cuantificado con hidrólisis) fueron de 318 ± 56 y 440 ± 129 pmol/g tejido, respectivamente, tras la suplementación de 250 mg/kg de GEN en la dieta durante 7 días. Las concentraciones obtenidas de GEN libre y el total fueron de 304 ± 13 y 370 ± 36 pmol/g tejido, respectivamente, tras la suplementación de 250 mg/kg de GEN en la dieta durante 21 días.	Fritz et al., 1998
Ratas hembra Sprague-Dawley (n=6 por grupo)	Dieta suplementada en ratas gestantes con GEN (5, 100 y 500 μg/g) hasta el destete de las crías (140 días en total).	Los tejidos mamarios, una vez extraídos, se analizaron mediante HPLC/MS, con y sin hidrólisis enzimática[a]. Para la cuantificación se usó GEN como patrón.	La concentración de GEN sin hidrólisis fue de 0,12 ± 0,02 (41% del total que se obtuvo con hidrólisis) y 1,18 ± 0,22 (49% del total) pmol/mg de tejido, tras el consumo de las dosis de 100 y 500 μg/g, respectivamente.	Chang et al., 2000
Crías de ratas Sprague-Dawley (mínimo n=6)	Dieta suplementada en ratas gestantes con daidzeína (DAZ) (250 mg/kg) desde el inicio de la gestación hasta 7 días después del parto.	Los tejidos mamarios, una vez extraídos, se analizaron mediante HPLC/MS, con y sin hidrólisis enzimática[a]. Para la cuantificación se usaron DAZ y equol como patrones.	Las concentraciones de DAZ libre (sin hidrólisis) y total (tras hidrolisis) fueron de 400 ± 120 y 407 ± 105 pmol/g tejido, respectivamente. La concentración total de equol fue de 27 ± 8 pmol/g tejido. No se detectó equol libre.	Lamartiniere et al., 2002
Ratones hembra BALB/cA Jcl-nu atímicos con tumores producidos por xenotransplante de la línea celular MDA-MB-231 (n=5)	Dieta suplementada con un 1% de polisacárido de GEN (GCP™) durante 28 días tras la inducción del tumor. GCP™ contenía 116 ± 8,4 mg de GEN, 28,5 ± 5,4 mg de DAZ, 13,5 ± 2,6 mg de gliciteína y un 3% de polisacáridos.	Los tejidos mamarios, una vez extraídos, se analizaron mediante HPLC/MS, con y sin hidrólisis enzimática[a]. Para la cuantificación se usaron los patrones de GEN, DAZ y gliciteína.	La concentración de GEN aglicona respecto al total de GEN (tras hidrólisis) en tejido tumoral mamario fue de 78,42 ± 23,17 μg/mg proteína, significativamente mayor (3 veces) que en tejido sano hepático y colónico. Los porcentajes de GEN aglicona respecto al total de GEN (aglicona y conjugados) fueron de 80:20 en tejido mamario tumoral/sano. DAZ y gliciteína también se detectaron en tejido tumoral pero sus concentraciones fueron inferiores a 1 μg/mg proteína.	Yuan et al., 2003

Ratas hembra Sprague-Dawley (n=6)	Dieta formulada con proteína de soja aislada que contenía 0,27 mg/g de GEN y 0,21 mg/g de DAZ durante 4 días.	Los tejidos mamarios, una vez extraídos, se analizaron con hidrólisis de ácido clorhídrico o con tratamiento enzimático[a]. El análisis se realizó mediante LC-MS y la cuantificación se realizó con el patrón de biochanin A.	El total de GEN fue de 0,11 ± 0,01 y 0,03 ± 0,01 nmol/g tejido, tras hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática, respectivamente. El total de DAZ fue de 0,17 ± 0,01 y 0,02 ± 0,01 nmol/g tejido, tras hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática, respectivamente.	Gu et al., 2005
Ovejas lactantes de 3 años (n=2)	Dieta con un 50% de trébol rojo durante 1 mes. La ingesta diaria fue de 157,6 mg/kg de isoflavonas (81,8 mg formononetina, 64,8 mg biochanin A, 7,6 mg GEN y 2,9 mg DAZ).	Los tejidos mamarios, una vez extraídos, se analizaron con y sin hidrólisis enzimática[a] para determinar la fracción de equol y DAZ presente en forma de aglicona. El análisis se realizó mediante HPLC-*Coularray* y LC/MS-MS y se cuantificó con los patrones específicos de cada isoflavona.	El total de isoflavonas (<10 nmol/g tejido de daidezina y equol) se detectaron principalmente en forma de glucurónido. Formononetina y biochanin A no se detectaron. DAZ libre no se detectó. La concentración de equol en forma libre fue de 1,9 ± 1,9% del total de equol detectado.	Urpi-Sarda et al., 2008
Ratas hembra Sprague-Dawley (n=5)	Dieta suplementada con isoflavonas (1,047 g/kg) procedentes de proteína aislada lavada con alcohol. El consumo fue durante 28 días.	Los tejidos mamarios una vez extraídos, se hidrolizaron con tratamiento enzimático[a]. El análisis se realizó mediante UPLC/MS y la cuantificación con los patrones específicos de cada isoflavona.	Las concentraciones totales de equol y GEN fueron de 1,12 ± 0,06 nmol/g y 0,11 ± 0,02 nmol/g tejido tras la hidrólisis enzimática. No se detectó ni DAZ ni gliciteina.	Gilani et al., 2011
Cerdos hembra (n=15)	Dieta comercial de soja que contenía 582,8 mg/kg de isoflavonas (dieta soja) o dieta de soja suplementada diariamente con 2,3 g de GEN (dieta soja + GEN) durante 93 días.	Los tejidos mamarios una vez extraídos, se hidrolizaron con tratamiento enzimático[a]. El análisis se realizó mediante UPLC/MS y la cuantificación con los patrones específicos de cada isoflavona.	Las concentraciones totales detectadas fueron: DAZ: 0,07 ± 0,02 y 0,13 ± 0,02 nmol/g tejido con la dieta soja o con la dieta soja + GEN, respectivamente. Equol: 0,12 ± 0,03 y 0,19 ± 0,04 nmol/g tejido con la dieta soja o con la dieta soja + GEN, respectivamente. GEN: 0,03 ± 0,00 y 0,15 ± 0,01 nmol/g tejido con la dieta soja o con la dieta soja + GEN, respectivamente. No se detectó gliciteína.	Gilani et al., 2011

Catequinas (Té verde)				
Ratones *"nude"* hembra (n=4 por grupo)	Extracto de té verde administrado en el agua de bebida (las dosis en cada grupo fueron 0,625 g/L, 1,25 g/L y 2,5 g/L) durante 4 días.	Los tejidos mamarios (*"fat pads"*) una vez extraídos se hidrolizaron con tratamiento enzimático[a]. El análisis se realizó mediante HPLC y la cuantificación, con epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC) y epigalocatequina-3-galato (EGCG).	Las concentraciones más altas cuantificadas fueron de EGCG, siendo los valores aproximados[b] 28, 38 y 45 ng/g tejido en los grupos que consumieron las dosis de 0,625, 1,25 y 2,5g/L, respectivamente. Las concentraciones aproximadas[b] de EC fueron 4, 8 y 30 ng/g tejido; por último, las concentraciones aproximadas[b] de ECG fueron 2, 3 y 8 ng/g tejido, según las dosis de 0,625, 1,25 y 2,5 g/L, respectivamente.	Sartippour et al., 2006
Ratones hembra transgénicos heterocitogos (Ratón Tag con desarrollo de tumores palpables) (n=4)	Un 0,05% (p/v) de extracto de té verde administrado en el agua de bebida durante 7 semanas.	Los tejidos mamarios, una vez extraídos, se analizaron mediante HPLC/MS, con y sin hidrólisis enzimática[a]. La cuantificación de los compuestos se realizó con EC, EGC y EGCG, pero no con metabolitos conjugados.	Solo se pudo cuantificar EGC tras la hidrólisis enzimática (rango 32–104 pmol/g tejido), mientras que sus conjugados metilados y sulfatos se identificaron las muestras no hidrolizadas. No se detectó la presencia de EGCG ni EC.	Kaur et al., 2007
Prenilflavonoides				
Ratas hembra Sprague-Dawley ovariectomizadas (n=24)	A un grupo se administró intraperitonealmente 8-prenilnaringenina (8-PN) (3 dosis diferentes: 0,4, 4 y 40 mg/kg) y a otro grupo, isoxanthohumol (IX) que se usó como grupo control (n=6 en cada grupo).	A las 24 h de la administración intraperitoneal, los tejidos mamarios se extrajeron sin posterior hidrólisis. El análisis se realizó mediante LC/MS-MS usando para cuantificar el patrón de 8-PN.	8-PN se detectó en todos los animales a los que se administró 8-PN, pero no en los que recibieron IX (grupo control). Las concentraciones de 8-PN fueron de 0,014 ± 0,01; 0,047 ± 0,05 y 0,6 ± 0,4 μg/g según las dosis 0,4, 4, 40 mg/kg de 8-PN, respectivamente. Se detectaron dos glucurónidos de 8-PN, pero no se cuantificaron. Los niveles relativos de los glucurónidos de 8-PN fueron superiores que los de 8-PN en forma libre.	Overk et al., 2008
Ratas hembra Sprague-Dawley (n=5 por grupo)	Un grupo recibió alimentación con xanthohumol ((XH) 100 mg/kg diarios) con inyección subcutánea y otro grupo recibió la dieta con extracto de lúpulo (7,5 g/kg/día). La administración subcutánea se realizó durante 4 días.	Tras la última administración subcutánea, los tejidos mamarios se extrajeron sin posterior hidrólisis. El análisis se realizó mediante LC/MS-MS usando para cuantificar XH, pero no sus metabolitos derivados.	En general, 8-PN y 6-PN fueron más abundantes que XH, principalmente en forma de conjugados (glucurónidos). La detección de 8-PN glucurónido fue superior que la de 6-PN glucurónido. La cuantificación de XH aglicona fue de 0,30 ± 0,1 μg/g tejido tras la inyección subcutánea de XH y, 0,05 ± 0,04 μg/g tejido tras la dieta con extracto de lúpulo.	Dietz et al., 2013

		Flavanonas		
Ratones obesos hembra C57BL/6 ovariectomizadas transplantados con células tumorales murinas E0771 (n=10 por grupo)	Un grupo consumió una dieta rica en grasa con bajo contenido en narigenina (1%, dieta LN). Otro grupo consumió la misma dieta con alto contenido de narigenina (3%, dieta HN). El consumo fue durante 2 semanas más 3 semanas tras trasplante en el tejido mamario adiposo.	Los tejidos mamarios adiposos se extrajeron y homogeneizaron; después se hidrolizaron con tratamiento enzimático[a]. El análisis se realizó mediante LC/MS-MS. Para la cuantificación se usó el patrón de narigenina.	La concentración total de naringenina fue 3 veces superior en los ratones que consumieron la dieta HN (en tejido tumoral de 5,68 ± 1,45 μmol/kg tejido y 2,49 ± 0,34 μmol/kg tejido en tejido mamario adiposo) frente a los que consumieron dieta LN (en tejido tumoral de 2,05 ± 0,87 μmol/kg tejido y 0,75 ± 0,14 μmol/kg tejido en tejido mamario adiposo)	Ke et al., 2017
		Resveratrol		
Ratas hembra Sprague-Dawley (n=15 por grupo)	Se administró RSV (100 mg/kg) solo o en combinación con celecoxib ((Cele), 0,167%) oralmente durante 2 semanas y 16 semanas después de una dosis inicial de N-metil-*N*-nitrosourea para inducir carcinogénesis mamaria.	Los tejidos mamarios tumorales se extrajeron y homogeneizaron sin hidrólisis posterior. El análisis se realizó mediante HPLC y para la cuantificación se usó el patrón de RSV y sus correspondientes metabolitos.	Las concentraciones de RSV libre fueron muy similares en los dos grupos (grupo RSV: 0,53 ± 0,19 ng/mg tejido *vs* grupo RSV + Cele: 0,57 ± 0,13 ng/mg tejido). La mayoría de los compuestos detectados en el tejido tumoral mamario fueron conjugados de RSV. El metabolito principal fue RSV-3-*O*-glucurónido y, en menores cantidades RSV-4'-*O*-glucurónido y RSV-3-*O*-sulfato (no se detallan)	Kisková et al., 2014
Ratones hembra BALB/c *nude* transplantados con la línea tumoral MCF-7 / Adr (n=18)	Se administraron diferentes formulaciones en 3 grupos (n=6). Un grupo recibió RSV libre (20 mg/kg), otro grupo, RSV liposomado (20 mg/kg, RSV-LIP) y otro grupo 8 mg/kg de paclitaxel + 20 mg/kg de RSV (RSV-PTX). La administración fue cada 2 días.	Los ratones se sacrificaron a 24 h, 48 h y 2 semanas tras el inicio de la administración de cada tratamiento (n=6 en cada punto). Los tejidos mamarios tumorales (volumen, de 50 mm^3 a 100 mm^3) se analizaron mediante HPLC (no se detallan condiciones de extracción).	Las concentraciones[b] de RSV en el grupo al que se administró la formulación de RSV libre fueron aproximadamente de 2, 3 y 5 μg/g tejido a las 24 h, 48 h y 2 semanas, respectivamente. Las concentraciones[b] en el tejido mamario tumoral de los grupos tratados con RSV-PTX o RSV-LIP fueron entre 1,6 y 5 veces superiores al grupo tratado con RSV libre.	Meng et al., 2016
Ratones hembra C57BL/6 ovariectomizadas trasplantados con células tumorales murinas M-Wnt (n=15)	Dieta obesogénica suplementada con RSV (5 g/kg) durante 6 semanas y 5 semanas más tras el trasplante (11 semanas en total).	Los tejidos tumorales se extrajeron y homogeneizaron, sin posterior hidrólisis. El análisis se realizó mediante UPLC, cuantificando con RSV y piceatanol (datos obtenidos por fluorescencia).	Las concentraciones de RSV detectadas en los tumores mamarios (n=7) estuvieron entre 157,7 y 661,5 nmol/g tejido.	Rossi et al., 2018

		Lignanos		
Cerdos adultos (n=17)	Un grupo (n=8) consumió pan de trigo con bajo contenido en lignanos (124 μg/100g) y otro grupo (n=9) consumió pan de centeno con alto contenido en lignanos (4.152 μg/100g) durante 9 días.	Los tejidos se extrajeron, homogeneizaron y, posteriormente se hidrolizaron con tratamiento enzimático[a]. El análisis se realizó mediante HPLC-CEAD usando el patrón de enterolactona para la cuantificación.	La concentración de enterolactona en tejido mamario fue de 0,3 ± 0,2 pmol/g y de 25,8 ± 4,1 pmol/g tejido según se consumiera pan con bajo contenido en lignanos o pan con alto contenido en lignanos, respectivamente.	Laerke et al., 2009
Ratones hembra *"wild-type"* y *"knockout"*(Abcg $2^{-/-}$) (n=7-8 por grupo)	Dieta suplementada con 1% extracto de aceite de semilla de lino rico en lignanos (2 mg/g SDG) durante 1 semana.	Los tejidos mamarios se extrajeron y homogeneizaron sin posterior hidrólisis. El análisis se realizó mediante UPLC-QTOF-MS usando para la cuantificación patrones de las diferentes agliconas pero no sus formas conjugadas.	Enterodiol y SDG se detectaron en el tejido mamario de ambos grupos en concentraciones 400 ng/g tejido y 70 ng/g tejido, respectivamente. La concentración de enterolactona fue mayor en la cepa *"wild-type"* que en los ratones Abcg2$^{-/-}$ (180 ng/g tejido *vs* 80 ng/g tejido, respectivamente). Los glucurónidos de enterodiol, enterolactona y SDG se identificaron en mayor proporción en los ratones Abcg2$^{-/-}$ que en los *"wild-type"*. No se detectó SDG.	García-Mateos et al., 2017
		Curcumina		
Ratones hembra Kunming trasplantados con la línea tumoral murina EMT6 (n=6 por grupo)	Se administró por vía intravenosa curcumina en forma de micelas o curcumina (dosis en ambos casos, 10 mg/kg) diariamente durante 9 días.	Los ratones se monitorizaron a las 2, 6, 12 y 24 h tras la administración de curcumina, mediante fluorescencia. La información de la biodistribución en tejido tumoral se obtuvo mediante análisis de imagen usando el software Winmi.	Se detectaron menores cantidades de curcumina libre en los tumores de los ratones a los que se le administró curcumina libre observándose las mayores concentraciones en las primeras 6 h y detectando solo trazas a las 24 h. Las cantidades de curcumina detectadas en el tumor de los ratones a los que se le administró la curcumina en forma de micelas fueron considerablemente superiores.	Lv et al., 2014
Ratones BALB/c *"nude"* trasplantados con la línea tumoral MCF-7	Una dosis de curcumina (10 mg) en combinación con doxorrubicina (10 mg/5ml) libre o encapsulada con nanopartículas cubiertas de transferrina se administraron en la vena de la cola.	Los ratones se sacrificaron tras 10 min, 1, 8, 24 y 48 h de la administración de las diferentes formulaciones con curcumina. El tejido tumoral mamario se homogeneizó en suero salino. El análisis se realizó mediante HPLC y la cuantificación, con curcumina.	La concentración de curcumina en el tumor de los ratones a los que se le administró la formulación de curcumina encapsulada fue mayor que los que recibieron la curcumina libre (alrededor de 18–22 μg/g y 40-50 μg/g tejido, respectivamente)[b], manteniéndose las concentraciones relativamente estables desde 1 a 48 h después de la administración.	Cui et al., 2017

Ratones hembra *"wild-type"* Balb/c y trasplantados con células tumorales murinas 4T1 (n=4-5 por grupo)	Administración oral de curcumina-SMEDDS (30 mg de curcumina solubilizados en 1 g de SMEDDS). La dosis administrada fue de 100 mg/kg una vez al día durante 2 semanas una vez que los tumores alcanzaron un volumen de 400 mm^3.	Los tejidos mamarios (sanos y tumorales) se extrajeron y homogeneizaron sin posterior hidrólisis. El análisis se realizó mediante HPLC/MS-MS usando para la cuantificación los patrones específicos.	Los valores de curcumina fueron aproximadamente 15 veces superiores (149,8 ± 18,0 ng/g tejido) en los tumores de los ratones trasplantados que en el tejido mamario sano (10,5 ± 2,1 ng/g tejido) del grupo de ratones al que no se le indujo tumor mamario. La concentración de curcumina glucurónido en los tumores fue mucho menor que la de curcumina (<15 ng/g tejido), al igual que en tejido mamario sano del otro grupo de ratones también fue menor.	Liu et al., 2019
Ratones hembra Balb/c trasplantados con células tumorales 4T1 o TuBo (alta y baja actividad β-glucuronidasa, respectivamente) Otro grupo Balb/c *"wild-type"* sin trasplantar (n=15 por grupo)	En los grupos de ratones trasplantados se administró oralmente curcumina o curcumina glucurónido formuladas en SMEDDS (100 mg/kg). La otra administración fue curcumina glucurónido (2 mg/kg) mediante inyección intravenosa en todos los grupos de ratones (en el modelo tumoral cuando el volumen del tumor fue de 400 mm^3).	Los ratones se sacrificaron a 0,5, 1, 2, 4 y 8 h tras la administración oral; y 0,25, 1, 2, 4, 8 y 24 h tras la administración intravenosa (n=3-4 en cada tiempo). Los tejidos mamarios (sanos y tumorales) se extrajeron y homogeneizaron sin posterior hidrólisis. El análisis se realizó mediante HPLC/MS-MS, usando para la cuantificación los patrones específicos.	El perfil farmacocinético con la dosis oral fue: El valor C_{max} de curcumina en tejido tumoral del grupo 4T1 fue de 105 ± 18 ng/g *vs* C_{max}=63 ± 18 ng/g tejido en el grupo TuBo. La concentración de curcumina en los tumores fue significativamente superior que de curcumina glucurónido (<20 ng/g) en ambos grupos. El perfil farmacocinético con la dosis intravenosa fue: En todos los modelos se detectaron bajas concentraciones de curcumina a tiempos cortos (0,25 hasta 4 h) pero incrementaron de forma constante hasta alcanzar 30–40 ng/g tejido (> 8 h) mientras que, la concentración de curcumina glucurónido disminuyó (<10 ng/g tejido). En los ratones Balb/c *"wild-type"* la concentración de curcumina en tejido mamario sano fue significativamente menor (3-4 veces menos) que en los grupos donde se indujo el tumor.	Liu et al., 2019

[a]Tratamiento enzimático utilizando enzimas β-glucuronidasa y sulfatasa; [b]Valores obtenidos de las gráficas del trabajo original. Abreviaturas: **CEAD**, detector culométrico de red de diodos; **DAZ**, daidzeína; **GEN**, genisteína; **HPLC**, cromatografía líquida de alta resolución; **MS**, espectrometría de masas; **p/v**, peso/volumen; **QTOF**, cuadrupolo-tiempo de vuelo; **RSV**, resveratrol; **SDG**, secoisolariciresinol diglucósido; **SMEDDS**, *"self-microemulsifying drug delivery"*; **UPLC**, cromatografía líquida de ultra-alta resolución.

Una gran cantidad de compuestos fenólicos que se consumen de manera habitual en la dieta han demostrado tener actividad pleiotrópica, incluida la actividad quimiopreventiva, en múltiples modelos celulares y animales, afectando a la proliferación y viabilidad celular, limitando la diferenciación y su capacidad invasiva o modificando la expresión de diferentes marcadores relacionados con el cáncer de mama, entre otros (Pan et al., 2015; Losada-Echeberría et al., 2017). Sin embargo, a día de hoy, no hay una evidencia definitiva que relacione a los compuestos fenólicos con ser los compuestos responsables de ejercer este efecto beneficioso frente al cáncer de mama (WCRF/AICR, 2018).

El principal problema de la evidencia preclínica es que los resultados se basan en estudios *in vitro* o con animales modelo donde no se ha tenido en cuenta las dosis ensayadas, biodisponibilidad, metabolismo y/o distribución en el ser humano (concretamente en el tejido mamario) de los compuestos fenólicos evaluados. Por tanto, extrapolar los mecanismos de acción descritos para estos compuestos frente al cáncer de mama en personas, es bastante especulativo.

3.3.1. Evidencia preclínica de diferentes familias de compuestos fenólicos frente al cáncer de mama

Los compuestos fenólicos son una larga familia de compuestos y que presentan una estructura química muy diversa. En parte, esta diferencia estructural les confiere que su actividad biológica frente al cáncer de mama pueda estar mediada por diferentes mecanismos de acción.

Aunque en los siguientes apartados se describe la evidencia de estudios *in vitro* e *in vivo* (con modelos animales) de cada familia de compuestos fenólicos, es importante destacar que en la **Tabla 1.6** se recopilan solo aquellos estudios *in vitro* que han utilizado condiciones fisiológicamente representativas, empleando metabolitos derivados de

fenólicos (principalmente conjugados de Fase-II) con relevancia en el tejido mamario. En resumen, pese al reducido número de estos estudios realizados con conjugados fenólicos, en parte debido a la falta de disponibilidad de estos metabolitos relevantes, todos corroboran que el metabolismo de Fase-II reduce o anula el efecto citotóxico y/o antiproliferativo de los compuestos fenólicos evaluados frente a diferentes modelos de cáncer de mama. Sin embargo, no hay que descartar el potencial papel de los metabolitos Fase-II (principalmente glucurónidos y sulfatos) en TTM como fuentes de formas libres de compuestos fenólicos con actividad biológica. Esta hipótesis se debe a la posible desconjugación que pueden sufrir estos compuestos conjugados en condiciones específicas, como por ejemplo en el estado inflamatorio que encontramos en el microambiente tumoral, donde el ratio UGT/glucuronidasa es menor que en tejidos sanos (Shimoi y Nakayama, 2005). Sin embargo, esta hipótesis todavía no está clara a día de hoy, aunque se ha descrito en algún estudio *in vitro* (Kunihiro et al., 2019) y con animales (Ávila-Gálvez et al., 2019).

Por otro lado, respecto a los estudios en animales, existen más de 200 estudios que describen los efectos quimiopreventivos de diferentes familias de compuestos fenólicos frente al cáncer de mama, los cuales se recogen en la **Tabla 1.8**. En resumen, isoflavonas (genisteína y daidzeína) y lignanos o alimentos ricos en ellos (semillas de lino y secoisolariciresinol diglucósido (SDG)) representan la mayoría de estos estudios (casi un 50% del total), mientras que otros compuestos como antocianinas o flavonas han sido menos estudiados (**Tabla 1.8**).

En general, los resultados que encontramos en los estudios con animales muestran que las dietas suplementadas con diferentes compuestos fenólicos (antocianinas, isoflavonas, flavanonas, flavonas, flavonoles, flavan-3-oles, RSV, curcumina, lignanos y taninos

hidrolizables) se asociaron con una reducción en el crecimiento de tumores mamarios, en la incidencia, número de tumores, metástasis (principalmente pulmonares) y mayores tiempos de latencia en la formación del tumor, efectos que se acompañaron con mayores tasas de supervivencia.

3.3.1.1. Antocianinas

Diferentes estudios *in vitro* han descrito numerosos efectos de actividad quimiopreventiva de las antocianinas frente al cáncer de mama, incluyendo la inhibición de la proliferación celular, inducción de apoptosis o supresión de la migración celular en células tumorales, entre otros. Sin embargo, estos efectos se han descrito principalmente para cianidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido que aunque han demostrado reducir la migración y proliferación en líneas celulares de cáncer de mama HER2-enriquecido, mediante la inhibición de la fosforilación de HER2 (Liu et al., 2014) o incluso reprimir la expresión de genes relacionados con la migración y carácter invasivo de tumores mamarios (Liang et al., 2019), estos compuestos carecen de relevancia fisiológica.

Respecto a los modelos animales, tanto cianidina como peonidina, ambos compuestos sin su grupo glucósido, han demostrado reducir la formación de tumores en ratones de modelos xenográficos con células de cáncer de mama triple negativo (Yang et al., 2016; Cho et al., 2017). Además, otro estudio describió que la suplementación de 150 mg/kg/día de un extracto de arroz negro rico en antocianinas redujo la formación de tumores mamarios y las metástasis pulmonares, además de disminuir el porcentaje de expresión Ki-67 en el modelo murino empleado (Luo et al., 2014).

Tabla 1.6. Estudios *in vitro* realizados con compuestos fisiológicamente relevantes en modelos celulares de cáncer de mama.

Modelo celular	Compuesto fenólico ensayado	Dosis/duración	Resultados	Referencias
		Estilbenos (RSV)		
MCF-7, ZR-75-1, MDA-MB-231 (líneas tumorales) y MCF-10A (línea no tumoral)	RSV, RSV 3-sulf, RSV 4'-sulf, RSV 3,4'-disulf.	1–350 µM; 48 h.	RSV: IC_{50}=67,6–82,2 µM en todas las líneas celulares tumorales; IC_{50}=20 µM en MCF-10A. RSV 3-sulf: IC_{50}=189–258 µM en MCF-7 y MDA-MB-231; IC_{50}=228,3 µM en MCF-10A. RSV 4'-sulf y RSV 3,4'-disulf: no efectos citotóxicos frente a ninguna línea tumoral; IC_{50}=202,4–202,9 µM en MCF-10A.	Miksits, et al., 2009
MCF-7	RSV, RSV 3-sulf, RSV 4'-sulf, RSV 3,5 disulf, RSV 3,4'-disulf, RSV 3,4',5-trisulf.	340 µM; 72 h.	Efectos citotóxicos (solo con RSV y RSV 3-sulf).	Hoshino et al., 2010
Saccharomyces cerevisiae cepa Y190 transformada con ERα LBD, coactivador hTif2 y MCF-7	RSV, RSV 3-glucósido, RSV 3-glur, RSV 3-sulf, RSV 4'-sulf.	0,05–100 µM; 18–24 h.	RSV 3-sulf: mostró actividad antiestrogénica a 10 y 50 µM (con preferencia por REα entre 10–100 µM), y una débil actividad estrogénica. RSV: mostró actividad estrogénica en MCF-7 (entre 5–10 µM).	Ruotolo et al., 2013
		Flavanonas		
MCF-7 y H184B5F5/M10 (línea epitelial no tumoral)	Baicaleína, baicaleína 7-sulf y baicaleína 8-sulf.	50, 100, y 200 µM; 24 h.	Efectos en MCF-7: ↓viabilidad celular; ↑liberación de LDH; bloqueo del ciclo celular; inducción de cambios morfológicos; ↑apoptosis; ↑ROS; ↑actividad caspasa-3 y caspasa-9. En H184B5F5/M10 ningún compuesto mostró efectos citotóxicos.	Wang et al., 2014
		Flavonoles		
MCF-7	Quer, Quer-3-glucósido, Quer 3-glur, Quer 4'-sulf, tamarixetina, isoramnetina.	50 µM; 48 h.	↓Proliferación celular (no efectos con Quer-3-glucósido ni con Quer 3-glur).	Delgado et al., 2014
Saccharomyces cerevisiae ERα-Tif2 o ERβ-Tif2 y MCF-7	Quer, rutina, isoquercitrina, Quer 3-glur, Quer 3-sulf.	0,1–100 µM; 18–24 h.	Quer 3-glur: IC_{50}=2,1 ± 0,38 µM y actividad estrogénica en MCF-7. En REα-Tif2 (IC_{50}=103 ± 2,24 µM) y REβ-Tif2 (IC_{50}=96 ±1,2 µM), en ambos casos actividad agonista. Quer: IC_{50}=2,4 ± 0,93 µM y actividad estrogénica en MCF-7. En REβ-Tif2, IC_{50}=5,3 ± 0,9 µM; mostrando débil actividad agonista. Isoquercitrina: Similar actividad agonista que Quer 3-glur en REβ-Tif2.	Ruotolo et al., 2014

MDA-MB-231	Quer 3-glur (individual o en combinación con A y NA).	10^{-10}–10^{-4} M (ensayo de unión) y 0,01–1 µM (ensayo celular); 1–24 h.	Quer 3-*O*-glur: Mostró unión competitiva con [3H]-NA por el receptor β2-RA (10^{-7}–10^{-4} M). ↓Formación de ROS; ↓expresión génica de HMOX1, MMP-2, y MMP-9; ↓niveles intracelulares de cAMP; ↓p-ERK 1/2 y p-P38; ↓Activación de RAS; ↓capacidad invasiva de MDA-MB-231; ↓Actividad MMP-9.	Yamazaki et al., 2014a
MCF-10A (línea no tumoral)	Quer y Quer 3-glur (individual o en combinación con 4-hidroxiestradiol y NA).	10^{-10}–10^{-4} M (ensayo de unión) y 0,05-10 µM (ensayo celular); 1 h.	Quer y Quer 3-glur mostraron unión competitiva con [3H]-NA por α2-AR. ↓activación de γ-H2AX y AP.	Yamazaki et al., 2014b
MCF-7 y H184B5F5/M10 (línea epitelial mamaria no tumoral)	Quer, isoramnetina e isoramnetina 3-glur.	25, 50, and 100 µM; 24–48 h.	Efectos en MCF-7: ↓viabilidad celular; ↑liberación de LDH; bloqueo del ciclo celular; inducción de cambios morfológicos; ↑apoptosis; ↑ROS. En H184B5F5/M10 ningún compuesto mostró efectos citotóxicos.	Wu et al., 2018a
MCF-7 y H184B5F5/M10 (línea epitelial mamaria no tumoral)	Quer, Quer 3-glur y Quer 3-sulf.	25, 50 y 100 µM; 24–48 h.	Efectos en MCF-7: ↓viabilidad celular; ↑liberación de LDH; bloqueo del ciclo celular; inducción de cambios morfológicos; ↑apoptosis; ↑ROS. En H184B5F5/M10 ningún compuesto mostró efectos citotóxicos.	Wu et al., 2018b
Flavan-3-oles				
MCF-7	Epi, Epi-3'-sulf, 3'-metil-Epi, 4'-metil-Epi, catequina, 3'-metil-catequina.	100 µM; 48 h.	↓Viabilidad celular (solo con 4'-*O*-metil-Epi).	Delgado et al., 2014
Isoflavonas				
MCF-7	GEN, GEN 4'-glur, GEN 7-glur, GEN 4'-sulf-7-glur, GEN 4'-sulf, GEN 7-sulf, GEN 4',7-di-sulf, DAZ, DAZ 4'-glur, DAZ 7-glur, DAZ 4'-sulf-7-glur, DAZ 4'-sulf, DAZ 7-sulf, DAZ 4',7-di-sulf, gliciteína, gliciteína 7-glur, DH-DAZ, DH-DAZ 7-glur, ODMA, ODMA 7-glur.	10–1000 µM; 24 h.	Ligero incremento de la proliferación en MCF-7, inducción de β-Gal y unión a RE con GEN 4'-sulf-7-glur, GEN 4'-sulf, GEN 7-sulf, GEN 4',7-di-sulf, gliciteína 7-glur y DH-DAZ. Muy ligero incremento de la proliferación (o sin efecto) en MCF-7, inducción de β-Gal y unión moderada a RE con GEN 4'-glur, GEN 7-glur, DAZ 4'-glur, DAZ 7-glur y ODMA 7-glur. Moderado incremento de proliferación en MCF-7 e inducción de β-Gal, pero con ligera o ausencia de unión a RE con DAZ 4'-sulf-7-glur. ODMA: fue el compuesto que indujo un mayor incremento en la proliferación de MCF-7, inducción de β-Gal y unión con ERβ.	Kinjo et al., 2004

MCF-7	GEN, GEN 7-glur, DAZ, DAZ 7-glur.	16 µM; 72 h.	↑Citotoxicidad (solo DAZ).	Pritchett et al., 2008
MCF-7	GEN, GEN 7-sulf, GEN 4'-sulf, DAZ, DAZ 7-sulf, DAZ 4'-sulf, equol, equol-7-sulf (en presencia de 4×10^{-10} M [2,4,6,7-3H] estradiol).	10^{-7}–10^{-4} M; 18-24 h (ensayo de unión y expresión génica) y 7 o 14 días (ensayo celular).	La sulfatación en posición 7 redujo la capacidad estrogénica de GEN y equol. GEN 4'-sulf: no aumento la proliferación celular (a 1 y 10 µM) pero similar o incluso superior afinidad a unirse con RE (en comparación con GEN). DAZ 4'-sulf: mostró incremento de la proliferación celular (a 10 µM) pero baja afinidad por la unión con RE. DAZ 7-sulf: mostró similar o incluso superior afinidad por la unión con RE y similar incremento de la proliferación celular (a 1 y 10 µM) en comparación con DAZ).	Pugazhendhi et al., 2008
HS578T, MDA-MB-231, y MCF-7	Puerarina, GEN, DAZ, y una mezcla de conjugados (glucurónidos y sulfatos) de DAZ	12,5–100 µM (compuestos individuales) y 2,35 µM mezcla de conjugados de DAZ; 24-72 h.	Efecto con los compuestos individuales: IC_{50}=29–71 µM; ↓viabilidad celular; bloqueo del ciclo celular; ↑apoptosis; ↑actividad caspasa-3. Efecto con la mezcla de conjugados de DAZ: IC_{50}=2,35 µM; ↓proliferación celular; bloqueo del ciclo celular; ↑apoptosis; ↑caspasa-9, p53, p21 y Bax.	Lin et al., 2009
MCF-7, T47D, and MCF-10A (línea no tumoral)	GEN, GEN 7-sulf, GEN 4'-sulf, GEN 7-glur.	$5{,}12\times10^{-3}$–80 µM para GEN y 2,2-4,5 µM para los conjugados; 3 días.	Efectos diferentes de GEN: Bajas concentraciones incrementaron la proliferación celular, mientras que altas concentraciones la disminuyeron. GEN 7-glur: ↑proliferación celular (efecto relacionado con la desconjugación del compuesto). GEN 7-sulf y GEN 4'-sulf: No ejercieron efectos.	Yuan et al., 2012
T47D y T47D-ERβ (expresión de ERβ dependiente de tetraciclina)	GEN, GEN 7-glur, DAZ, DAZ 7-glur.	10^{-5}–1000 µM; 48 h. 20–400 µM (ensayo desconjugación); 24 h.	Efectos diferentes: Bajas concentraciones disminuyeron la proliferación celular, mientras que altas concentraciones la incrementaron. Menor inducción de la proliferación que con 17β-estradiol: PC_{50} en T47D: 17β-estradiol=$4{,}2\times10^{-6}$ µM; GEN=0,19 µM; GEN 7-glur=21,4 µM; DAZ=0,186 µM; DAZ 7-glur=107 µM. PC_{50} en T47ERβ: 17β-estradiol=$2{,}45\times10^{-7}$ µM; GEN=0,2 µM; GEN 7-glur=7,8 µM; DAZ=0,035 µM; DAZ 7-glur>400 µM. La desconjugación observada fue <2%.	Islam et al., 2015

MCF-7 y T47D	DAZ, DAZ 4'-sulf, DAZ 7-sulf, DAZ 4',7-di-sulf, equol, ODMA y dos diferentes mezclas de metabolitos (sulfatos o microbianos).	0,1, 1 y 10 µM; 1–24 h.	Efectos en neuroglobina: ↑con equol, ODMA, DAZ 7-sulf, DAZ 4',7-di-sulf y ↓ con DAZ y DAZ 4'-sulf. Efectos en la fosforilación de proteínas: DAZ, DAZ 4'-sulf y equol ↑p-ERα/ERα; ↑p-Akt/Akt (solo equol a 1 h de tratamiento); ↑p-p38/p38 (todos los compuestos a 1 y 24 h de tratamiento). DAZ, DAZ 4'-sulf y equol mantienen la actividad de paclitaxel en MCF-7 (↓neuroglobina, ↑ degradación de PARP-1 y ↓ número de células) en presencia de 17β-estradiol. Mezcla de metabolitos sulfatos[a]: ↓neuroglobina con en presencia o ausencia de 1 µM DAZ; con 1 µM DAZ conservan los efectos de paclitaxel (↑ degradación de PARP-1) en presencia de 17β-estradiol. Mezcla de metabolitos microbianos[b]: ↑neuroglobina con equol + ODMA (1 µM de cada uno) en presencia o ausencia de 1 µM DAZ; ↓efectos de paclitaxel (↑degradación de PARP-1) en presencia de 17β-estradiol.	Montalesi et al., 2020
Urolitinas				
MCF-7aro	Ácido elágico, ácido galágico, Uro-A, metil-Uro-A, dimetil-Uro-A, acetil-Uro-A, Uro-B, metil-Uro-B, acetil-Uro-B y Uro-B 3-sulf	0–4,7 µM; 3 h (ensayo de aromatasa) y 0–4,7 µM; 48 h (ensayo proliferación celular)	Uro-A, metil-Uro-A, Uro-B, metil-Uro-B, acetil-Uro-B y Uro-B 3-sulf inhibieron la actividad aromatasa (2,35–4,7 µM). Uro-A, Uro-B, metil-Uro-B, ácido galágico y Uro-B 3-sulf inhibieron la proliferación celular en MCF-7/aro (a partir de 1,18 µM) en combinación con 1nM de testosterona o de estradiol.	Adams et al., 2010

[a]Mezcla de metabolitos sulfatos=DAZ 4'-sulf + DAZ 7-sulf + DAZ 4'7-di-sulf (1 µM de cada uno); [b]mezcla de metabolitos microbianos=equol + ODMA (1µM de cada uno). Abreviaturas: **A**, adrenalina; **α2-AR**, receptor adrenérgico alfa-2; **β2-AR**, receptor adrenérgico beta-2; **cAMP**, adenosín monofosfato cíclico; **DAZ**, daidzeína; **DH-DAZ**, dihidrodaidzeína; **Epi**, epicatequina; **ERE-CAT**, elemento de respuesta estrogénica-cloranfenicol acetil transferasa; **glur**, (-*O*-glur), glucurónido; **γ-H2AX**, miembro de la familia de histonas **H2A** fosforilado en el residuo de serina 139; **GEN**, genisteína; **HMOX1**, hemo oxigenasa; **hTif2**, coactivador del receptor nuclear; LBD, dominio de unión a ligando; **LDH**, lactato deshidrogensa; **MCF-7aro**, línea celular MCF-7 transformada con incremento de expresión de aromatasa, **NA**, noradrenalina; NGB, neuroglobina; **ODMA**, *O*-desmetilangolensina; **PC**, potencia de concentración; **PARP-1**, poli [ADP-ribosa] polimerasa1; **Quer**, quercetina; **ROS**, especies reactivas de oxígeno; **RE**, receptor estrogénico; **RSV**, resveratrol; **sulf**, (-*O*-sulf), sulfato; **Uro-A**, urolitina A; **Uro-B**, urolitina B.

3.3.1.2. Flavonoles, flavonas y flavanonas

Respecto a los mecanismos de quimioprevención de estos compuestos frente al cáncer de mama, el flavonol quercetina cuenta con gran cantidad de estudios *in vitro* que han demostrado su capacidad para inhibir la proliferación celular de células tumorales humanas de mama a través de diferentes mecanismos de acción. De manera más relevante se incluyen estudios que han descrito también efecto antiproliferativo para su conjugado, quercetina 4'-*O*-sulfato (Delgado et al., 2014). Además, otro estudio ha descrito que conjugados de quercetina (glucurónidos y sulfatos) ejercen actividad estrogénica mediante unión a RE (Ruotolo et al., 2014). Recientemente, se han descrito otros efectos quimiopreventivos para quercetina y sus conjugados, como son la disminución de la viabilidad celular, incremento de apoptosis o aumento de ROS en células tumorales de mama. Sin embargo, estos efectos fueron menores para los conjugados que para la forma libre, y la concentración mínima empleada fue de 25 µM (Wu et al., 2018b). Respecto a los estudios animales, el consumo de quercetina como suplemento en la dieta habitual se ha asociado con un aumento del estado de latencia de tumores inducidos con 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) (Verma et al., 1988; Pereira et al., 1996), mientras que en presencia de estradiol ocurre el efecto contrario (Singh et al., 2010) (**Tabla 1.8**).

Respecto a las flavonas, los compuestos más representativos son apigenina y luteolina, los cuales han demostrado en estudios *in vitro* reducción de la proliferación de células de cáncer de mama mediante un incremento en la producción de ROS (Khan et al., 2013). Además, se ha descrito que apigenina inhibe la expresión de HER2, afectando a la ruta de señalización HER2/HER3-PI3K/Akt (Way et al., 2004a).

Respecto a flavanonas, se han evidenciado *in vitro* mecanismos de inhibición de la proliferación en células tumorales de mama utilizando como tratamiento distintos

extractos cítricos. Por ejemplo, un extracto de limón aumentó las proteínas BAX y caspasa-3 como consecuencia de una disminución de la expresión de *Bcl-2* y *Mdm2* (Alshatwi et al., 2011). En el caso de moléculas como narigenina se ha visto que bloquea el ciclo celular en fase G_0/G_1 (Li H et al., 2013), o que hesperidina inhibe la formación de microtúbulos (Lee et al., 2010). A día de hoy, la evidencia de metabolitos conjugados de flavanonas fisiológicamente relevantes es solo de un estudio *in vitro* que muestra que baicaleína 7-*O*-sulfato (concentración mínima de 25 µM) disminuye la viabilidad celular, incrementa la liberación de LDH, bloquea el ciclo celular, induce apoptosis e incrementa la producción de ROS en células tumorales de mama, mientras que en células de mama normales no produce efectos citotóxicos (Wang et al., 2014).

La evidencia quimiopreventiva para estas familias de flavonoides (flavanoles, flavonas y flavanonas) en estudios *in vivo* con animales es algo más extensa, mostrando en general que el suplemento de la dieta con compuestos fenólicos como naringenina, apigenina y/o quercetina reduce la formación de tumores mamarios y el tamaño de los mismos (**Tabla 1.8**). Sin embargo, estos estudios no identifican a los responsables del efecto como tampoco tienen en cuenta el intenso metabolismo microbiano que sufren estas familias de fenólicos en el organismo. Aunque existen indicios de que estos flavonoides podrían proteger frente al cáncer de mama, los estudios en animales existentes no siguen una metodología adecuada que permita extrapolar los resultados a humanos (Pérez-Vizcaíno y Fraga, 2018).

3.3.1.3. Isoflavonas

Este grupo de compuestos fenólicos presenta una gran relevancia frente al cáncer de mama dependiente de estrógenos. Su especial interés se debe a que estos compuestos presentan una cierta similitud estructural con el estrógeno 17β-estradiol, lo que les

confiere actividad estrogénica y antiestrogénica. Esta es la razón por la cual las isoflavonas se conocen como los fitoestrógenos más abundantes de la dieta (Griffiths et al., 2014).

El efecto quimiopreventivo de las isoflavonas frente al cáncer de mama se basa principalmente en: mecanismos antiestrogénicos (Kang et al., 2012), cambios en la expresión del RE (Korobkova, 2015) y capacidad de inhibir la enzima aromatasa (Way et al., 2004b).

La actividad quimiopreventiva de las isoflavonas es un tema controvertido, porque si bien es cierto que son innumerables estudios *in vitro* los que han demostrado la reducción de la proliferación celular en distintas líneas tumorales de mama (mediante disminución de Akt, disminución de MMPs, etc.) o inducción de apoptosis (con incremento de NF-kB, Bax, caspasa-3, etc.); muchos otros estudios, han evidenciado un incremento de la proliferación mediante un aumento del REα, incremento de ciclina D1, o incremento de PI-9, entre otros. Un estudio *in vitro* reciente muestra que el metabolito conjugado daidzeína 7-*O*-sulfato ejerce, al igual que daidzeína en forma libre, actividad antiestrogénica en células tumorales de mama sugiriendo su posible efecto protector frente al cáncer de mama. Sin embargo, los metabolitos microbianos derivados de isoflavonas como son equol y ODMA no ejercen tal efecto (Montalesi et al., 2020).

En estudios animales, la controversia sobre el papel que tienen las isoflavonas en el cáncer de mama se sigue manteniendo. Se ha observado que dietas suplementadas con genisteína o derivados de soja proporciona una reducción significativa en la formación de tumores mamarios ratas gestantes (Fritz et al., 1998; Hakkak et al., 2000), o que el consumo de una dosis diaria de soja con cantidades de isoflavonas dentro de los niveles diarios recomendados, es capaz de impedir la carcinogénesis inducida por DMBA en ratas adultas (Constantinou et al., 2001). Sin embargo, en otros estudios animales se muestra

ausencia de efectos quimiopreventivos con un consumo prolongado de isoflavonas en la dieta (**Tabla 1.8**), o incluso que el suplemento de genisteína en la dieta durante 12 semanas aumenta la formación de tumores en ratas ovariectomizadas (Hsieh et al., 1998).

La controversia sobre los resultados descritos en estudios animales se debe principalmente al modelo animal utilizado en el ensayo. Con modelos animales ovariectomizados (que recrean lo que sería una situación de depleción estrogénica en la mujer, como es la menopausia) se observa un efecto "pro-cancerígeno"; mientras que en animales sin esta privación estrogénica se observa un efecto anticancerígeno con la administración de isoflavonas. En este sentido, parece que el consumo de isoflavonas durante la etapa premenopáusica reduce la incidencia de cáncer de mama y en cambio la incrementa en mujeres menopáusicas, aunque hasta la fecha esta evidencia sigue sin estar demostrada en humanos (WCRF/AICR, 2018).

Otro hecho que se debe tener en cuenta es que las isoflavonas, al igual que la mayoría de los compuestos fenólicos, pueden metabolizarse por acción de la microbiota intestinal. En relación con esto, tiene especial interés el metabolito microbiano equol. Este metabolito microbiano tiene propiedades fitoestrogénicas equivalentes, o incluso superiores, a las de las isoflavonas precursoras (Setchell et al., 2002). Sin embargo, no todas las personas producen equol debido a las diferencias en la microbiota de cada individuo. Esto refuerza, aún más la necesidad de conocer la biodisponibilidad y metabolismo (incluso a nivel individual) de estos compuestos para poder usarlos frente al cáncer de mama (Larkin et al., 2008; Cortés-Martín et al., 2020).

3.3.1.4. Procianidinas y flavan-3-oles

La mayoría de los estudios *in vitro* que describen un efecto quimiopreventivo frente al cáncer de mama de los flavan-3-oles y procianidinas son ensayos donde se han empleado

como tratamiento extractos vegetales de frutas como el lichi (Zhao et al., 2007) o extractos de semilla de uva (Dinicola et al., 2014). Por tanto, estos estudios no han tenido en cuenta el efecto matriz del alimento y el intenso metabolismo que sufren en el organismo estos compuestos fenólicos de estructuras complejas. Sin embargo, hay que destacar un estudio donde se evaluaron el efecto de diferentes metabolitos derivados de flavan-3-oles (**Tabla 1.6**) en células tumorales de mama dependientes de estrógenos, observando que solo 4'-*O*-metil-epicatequina reducía la viabilidad celular a concentraciones suprafisiológicas de 100 µM (Delgado et al., 2014).

En cuanto a la evidencia *in vivo*, un estudio llevado a cabo con ratones muestra una reducción de un 40-70% en la formación de tumores mamarios tras trasplante xenográfico con el consumo de un suplemento en la dieta de extracto de lichi durante 10 semanas (Wang et al., 2006). En este mismo estudio, los mecanismos de acción se evaluaron *in vitro* en dos líneas tumorales de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), resultando en ambas una inhibición de la proliferación celular e inducción de apoptosis acompañadas del incremento de la expresión de *CYP1A1*. También se observó la regulación de la expresión génica de diferentes genes (*BIRC3*, *ADAM9*, etc.) relacionados con la proliferación celular, apoptosis, así como señales de transducción y transcripción relacionadas con el control de la motilidad y capacidad invasiva de ambas líneas tumorales (Wang et al., 2006).

La EGCG es una de las procianidinas más ampliamente investigadas en estudios preclínicos para evaluar su actividad frente al cáncer de mama. En este sentido, su enorme interés para la comunidad científica reside en que es uno de los compuestos mayoritarios en el té que es la bebida más ampliamente consumida alrededor del mundo (Xiang et al., 2016). El efecto quimiopreventivo de las catequinas presentes en el té verde ha sido también investigado en numerosos modelos animales (**Tabla 1.8**). Sin embargo, la

mayoría de estos estudios ensayan altas concentraciones que difícilmente se pueden obtener en una persona tras consumir té (Chow y Hakim, 2011).

Además de los mecanismos descritos para otras catequinas, a los compuestos fenólicos presentes en el té verde se les atribuye la capacidad de transformar células tumorales con fenotipo RE- a un fenotipo RE+, mediante la inhibición de enzimas ADN metiltransferasas causando una modificación en la cromatina (Meeran et al., 2012). Esta modificación epigenética que transforma líneas de cáncer de mama RE- a RE+ se traduciría a nivel clínico en una mayor sensibilidad a tratamientos hormonales con fármacos como el tamoxifeno, mejorando el pronóstico y tratamiento de la enfermedad.

3.3.1.5. Ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos) y fenoles simples

Aun representando una proporción importante de los compuestos fenólicos, el efecto quimiopreventivo de los ácidos fenólicos ha sido relativamente poco estudiado (Rothwell et al., 2017). Los estudios en modelos celulares que utilizan compuestos fisiológicamente relevantes de esta familia son inexistentes. Sin embargo, encontramos estudios que describen que un extracto de alcachofa (rico en ácidos hidroxicinámicos) induce apoptosis mediada por el incremento de p21 y del ratio de BAX:Bcl-2 en células tumorales de mama (Mileo et al., 2012), o que el consumo de 0,8 mg/día de extracto mango (rico en ácidos hidroxibenzoicos) durante cuatro semanas disminuye la formación de carcinomas ductales en animales reduciendo la expresión de mTOR (Nemec et al., 2017).

Por otro lado, dentro de los fenoles simples, el principal representante es hidroxitirosol cuya principal fuente de la dieta es el aceite de oliva virgen (Romani et al., 2019). En este sentido, el consumo de aceite de oliva en la dieta de diferentes modelos animales ha

mostrado reducir la formación de tumores, los cuales además presentan una histopatología compatible con un menor grado de malignidad (Escrich et al., 2011). No obstante, la biodisponibilidad de hidroxitirosol es muy baja y sufre un rápido metabolismo de Fase-II. Además, la matriz del alimento influye enormemente en su biodisponibilidad y metabolismo (Alemán-Jiménez et al., 2020). Todo ello se debería considerar antes de atribuir al hidroxitirosol las presuntas propiedades quimiopreventivas del aceite de oliva virgen.

3.3.1.6. Estilbenos

Dentro de los estilbenos, RSV (3,5,4´-trihidroxi-*trans*-estilbeno) es el compuesto más relevante y estudiado frente al cáncer de mama. El trabajo publicado en la revista *Science* por Jang et., al. (1997), donde se describió por primera vez la actividad quimiopreventiva de RSV, impulsó a la comunidad científica a interesarse por este compuesto (Jang et., 1997).

Desde entonces, diferentes estudios han explorado los efectos de RSV frente al cáncer de mama en diferentes modelos celulares y animales, aunque como con la mayoría de compuestos fenólicos son escasos aquellos que utilizan condiciones fisiológicamente relevantes. En este sentido, mientras que innumerables estudios en modelos celulares muestran una actividad quimiopreventiva de RSV, solo 3 estudios evalúan el efecto de sus conjugados de Fase-II (**Tabla 1.6**). En estos estudios se ha observado un menor o nulo efecto antiproliferativo así como escasa actividad estrogénica y/o antiestrogénica de las formas conjugadas en comparación con RSV en forma libre (**Tabla 1.6**).

Respecto a estudios animales, se han descrito efectos que evidencian su actividad quimiopreventiva frente al cáncer de mama incluyendo la capacidad de frenar la formación de tumores mamarios inducidos con DMBA en modelos murinos (Banerjee et

al., 2002), disminuir la angiogénesis en modelos xenográficos con células de cáncer de mama triple negativo (García-Quiroz et al., 2019), o que una combinación de RSV con otros fenólicos (quercetina + catequina) reduce la formación y el tamaño de tumores primarios de mama e inhibe las metástasis óseas y hepáticas (Castillo-Pichardo et al., 2009). Otros mecanismos descritos en modelos animales incluyen la reducción del número de estructuras TEBs ("*terminal end buds*") (Papoutsis et al., 2015; de Lima E Silva et al., 2017), relacionado con la prevención de la formación de tumores inducidos por carcinógenos como DMBA; la reducción de la peroxidación lipídica y disminución de daño en el ADN (Chatterjee et al., 2011), relacionados con su capacidad antioxidante; o la inhibición de las enzimas LOX-5 y COX-2, bloqueando la activación de NF-kB, disminuyendo la formación de tumores inducidos con DMBA (Banerjee et al., 2002; Chatterjee et al., 2011), relacionada con su actividad como antiinflamatorio.

A todos estos mecanismos de acción hay que añadir que RSV tiene cierta actividad como fitoestrógeno, lo que le convierte en un compuesto de especial interés frente a los cánceres de mama RE+. En la literatura se encuentran descritos distintos mecanismos de acción que lo sitúan como un potente anticancerígeno en tumores RE+, como por ejemplo su capacidad de inhibir la enzima aromatasa mediante la reducción de ARNm de *CYP19* (Wang et al., 2006).

Sin embargo, la rápida conjugación, baja disponibilidad y elevado metabolismo microbiano que sufre RSV en el organismo, hace que todos los efectos quimiopreventivos frente al cáncer de mama descritos deban evaluarse con cautela. El consumo de RSV resulta en unas concentraciones plasmáticas insuficientes para ejercer la actividad biológica de esta molécula demostrada *in vitro* (Goldberg et al., 2003). En este sentido, aunque se ha descrito en tejido colónico tumoral humano RSV aglicona (Patel et al., 2010) los principales metabolitos producidos tras el consumo de RSV son sus conjugados de

Fase-II (glucurónidos y sulfatos) tanto en plasma (Brown et al., 2010), como en tejidos sistémicos (Tomé-Carneiro et al., 2013).

3.3.1.7. Taninos hidrolizables

Puesto que los elagitaninos son el principal grupo de taninos hidrolizables y dado el interés que suscita la actividad quimiopreventiva de su compuesto derivado el EA, nos centraremos en este grupo. Aunque una de las actividades biológicas más estudiadas de esta familia de compuestos fenólicos es su capacidad de captar radicales libres dada su estructura química poli-hidroxilada, el consumo de alimentos ricos en elagitaninos como la granada se ha asociado con propiedades beneficiosas frente al cáncer de mama (Sharma et al., 2017).

Los resultados de distintas investigaciones con animales también muestran que el extracto de granada reduce la expresión de RE e interfiere en la señalización de Wnt/β-catenina (Mandal y Bishayee, 2015). Otro estudio muestra un efecto quimiopreventivo del extracto de granada a través del incremento de Bax y diferentes caspasas con disminución de Bcl-2 (Bishayee et al., 2016). En modelos animales también se ha descrito en gran número de estudios que el consumo en la dieta de EA reduce el crecimiento de tumores mamarios y metástasis pulmonares, además de inhibir la producción de diferentes proteínas implicadas en el desarrollo y capacidad invasiva de tumores (**Tabla 1.8**). El potencial del EA también se ha evaluado *in vitro* observando que bloquea el ciclo celular en G_0/G_1 inhibiendo diferentes ciclinas, con un aumento de la expresión de *p21*, *p15* y *p19* en células de cáncer de mama dependientes de estrógenos (Chen et al., 2015).

Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, la absorción del EA y los elagitaninos en el organismo es escasa, siendo estos compuestos principalmente

metabolizados por la microbiota intestinal, resultando como productos finales metabolitos microbianos denominados urolitinas (Cerdá et al., 2005).

Respecto a las propiedades que presentan estos compuestos microbianos frente al cáncer de mama, a día de hoy, la evidencia solo reside en estudios *in vitro*, destacando su actividad estrogénica/antiestrogénica dosis-dependiente por la que se modula la proliferación de células de cáncer de mama (Larrosa et al., 2006). Esta actividad también se ha descrito en un estudio *in vitro* donde se ha mostrado que diferentes urolitinas en forma libre y sus conjugados inhiben la actividad aromatasa disminuyendo la proliferación de células de cáncer de mama RE+ (Adams et al., 2010). Otro estudio *in vitro* donde se usó como tratamiento en células de cáncer de mama la orina de voluntarios que previamente habían consumido un zumo rico en elagitaninos, relacionó el efecto antiproliferativo y el bloqueo del ciclo celular en fase G_2/M observado, con los metabolitos derivados de elagitaninos presentes en la orina (Teixeira et al., 2017).

Además, también se ha descrito que urolitina A y urolitina A sulfato son sustratos del transportador ABCG2/BCRP (González-Sarrías et al., 2013). Este transportador ABC se ha relacionado con los mecanismos de resistencia al tratamiento con quimioterapia en cáncer de mama, dada su elevada expresión en células tumorales de mama.

3.3.1.8. Cumarinas

Las cumarinas son compuestos que raramente se encuentran en los alimentos, poseen gran actividad biológica aunque dependiendo de la dosis pueden llegar a ser tóxicos (Matos et al., 2015). En este sentido, la FDA ("*Food and Drug Administration*") tiene regulado su uso como saborizantes en alimentos ya que se han notificado reacciones adversas tras su consumo como náuseas, diarrea o incluso hepatoxicidad dependiendo de la dosis consumida (Musa et al., 2008).

No obstante, estudios *in vitro* han descrito que las cumarinas tienen un efecto antiproliferativo en líneas tumorales de mama y reducen el crecimiento de tumores mamarios en modelos animales, proponiendo incluso el diseño de estudios clínicos para evaluar el papel de las cumarinas frente al cáncer de mama en humanos (Venkata Sairam et al., 2016). Además, las cumarinas han demostrado tener acción sinérgica con el fármaco paclitaxel empleado para tratar diferentes tipos de cánceres entre los que se encuentra el cáncer de mama (Baghdadi et al., 2018). Sin embargo, y dados los efectos opuestos que pueden presentar según las dosis consumidas (además del desconocimiento sobre su biodisponibilidad y distribución en tejido mamario) a día de hoy, hay poca evidencia para atribuir efectos beneficiosos de este grupo de compuestos fenólicos frente al cáncer de mama.

3.3.1.9. Lignanos

Los lignanos son conocidos por su actividad estrógénica y por ser ampliamente transformados por la microbiota intestinal dando lugar a los metabolitos enterodiol y enterolactona que contienen únicamente dos grupos -OH en su estructura pero que han demostrado gran actividad biológica *(*Raffaelli et al., 2002; Saleem et al., 2005; D'Archivio et al., 2007*).*

Aunque no hay estudios *in vitro* que ensayen estos metabolitos microbianos en su forma conjugada en modelos celulares de mama, un elevado número de estudios animales describen la actividad quimiopreventiva tras el consumo de semillas de lino o de SDG. De hecho, estos estudios suponen (junto con las isoflavonas) casi el 50% de los estudios en modelos animales que investigan la actividad quimiopreventiva de compuestos fenólicos frente al cáncer de mama (**Tabla 1.8**).

Entre los estudios en animales encontramos que el consumo de una combinación de isoflavonas con semillas de lino, enterodiol y/o enterolactona es capaz de disminuir el crecimiento y desarrollo de tumores mamarios (Saarinen et al., 2006; Power et al., 2006). De los numerosos mecanismos descritos por los cuales estos compuestos tendrían actividad quimiopreventiva frente al cáncer de mama, destacan que tanto el lino como de SDG parecen tener un papel como moduladores de la expresión de los marcadores moleculares RE, RPg y HER2 (Chen et al., 2009; Ezzat et al., 2018), los cuales presentan una gran relevancia en el cáncer de mama.

3.3.2. Evidencia clínica de diferentes familias de compuestos fenólicos frente al cáncer de mama

En la siguiente tabla (**Tabla 1.7**) se recoge la información de los estudios clínicos realizados hasta la actualidad, en los cuales se han evaluado efectos tras el consumo de diferentes compuestos fenólicos en pacientes con cáncer de mama. Los principales criterios de búsqueda han sido: estudios clínicos donde participaran pacientes con cáncer de mama (con enfermedad activa o no) y se evaluaran cambios en marcadores relacionados con el tumor u otros aspectos clínicos relevantes relacionados con el cáncer de mama tras un consumo oral de compuestos fenólicos puros, así como extractos vegetales o alimentos ricos en compuestos fenólicos, incluyendo también los estudios con pacientes en tratamiento farmacológico para el cáncer de mama (hormonoterapia, radioterapia, etc.) y donde se buscara medir una reducción de efectos adversos de estos tratamientos, mejora en la calidad de vida, etc.

En la búsqueda se descartaron los estudios clínicos con mujeres sanas en riesgo de padecer la enfermedad (postmenopáusicas, densidad mamaria aumentada, etc.) o con tumores benignos. Tampoco se incluyeron estudios con mujeres que han pasado un cáncer

de mama y se estudiaran síntomas asociados a la menopausia (como sofocos), lípidos sanguíneos, etc. Como se muestra en la **Tabla 1.7**, la evidencia a nivel clínico que tienen los compuestos fenólicos frente al cáncer de mama se reduce a 14 estudios en pacientes, siendo limitada y contradictoria. En resumen, la mayoría de estudios han sido realizados con EGCG, como componente de extractos de té verde, y curcuminoides presentes en extractos ricos en curcumina.

El primer estudio en pacientes de cáncer de mama mostró que el consumo de 25 g/día de semillas de lino frente a placebo disminuía el porcentaje de Ki-67 y la expresión de HER2, y aumentaba la inducción de apoptosis en células tumorales (Thompson et al., 2005). A pesar de estos prometedores resultados, pasó una década hasta el siguiente estudio clínico con este grupo de compuestos frente al cáncer de mama. Este estudio mostró que el consumo de 25 g/día de semillas de lino junto con anastrazol (inhibidor de aromatasa) disminuía la producción endógena de estrógenos en mujeres postmenopáusicas diagnosticadas de cáncer de mama RE+ (McCann et al., 2014), lo cual supone un importante hallazgo dada la relevancia de la terapia farmacológica para reducir la producción de estrógenos en tumores de mama RE+.

Tabla 1.7. Estudios clínicos donde se evalúa el efecto del consumo de compuestos fenólicos en pacientes con cáncer de mama.

Tamaño de la muestra	Diseño del estudio	Objetivo	Resultado	Otros resultados	Referencia
Pacientes (n=32) con cáncer de mama recién diagnosticado, sin tratamiento hormonal	Ensayo de intervención dietética previo a cirugía, aleatorizado, doble-ciego, placebo-controlado. Un grupo (n=19) consumió una magdalena con 25 g/día de semillas de lino y otro grupo control (n=13) una magdalena placebo. La media de consumo fue 32 y 39 días en el grupo intervención y control, respectivamente.	Evaluar el efecto del consumo de semillas de lino en los niveles de marcadores relacionados con el tumor.	Reducción significativa en Ki-67 (34,2%) y en la expresión de HER2 (71%) en el grupo que consumió semillas de lino. Además, en este grupo se observó un incremento de apoptosis (30,7%) en el tejido tumoral. En el grupo control no se observaron cambios.	Un consumo más prolongado de semillas de lino se correlacionó con mayor reducción de expresión de HER2 y con un mayor incremento en la inducción de apoptosis.	Thompson et al., 2005
Pacientes (n=66) con fibrosis en tejido mamario por tratamiento con radioterapia por cáncer de mama (al menos 24 meses antes de iniciar el estudio)	Ensayo cínico fase II aleatorizado, doble-ciego, placebo-controlado. Un grupo (n=44) consumió 3 cápsulas/día con 100 mg de procianidinas (extracto de semilla de uva). Un grupo control (n=22) consumió 3 cápsulas placebo.	Evaluar la superficie del área de tejido mamario con fibrosis después de 12 meses.	No se observaron cambios significativos en la reducción de fibrosis en el tejido mamario entre el grupo que consumió procianidinas y el grupo control.	No se observaron cambios en las mamografías. Tampoco se observaron diferencias en la sensibilidad y/o reducción de dolor en los senos entre los grupos.	Brooker et al., 2006
Pacientes (n=14) con cáncer de mama metastásico	Estudio clínico abierto, fase I, con escalada de dosis. Un único grupo (n=14) recibió un ciclo 100 mg/m^2 de DOC cada 3 semanas (6 ciclos) y, durante 7 días (desde el día -4 hasta el día +2 del ciclo) consumieron de 500 mg hasta 8 g/día de curcumina.	Establecer una dosis segura y tolerable de curcumina para una terapia combinada con DOC.	La dosis recomendada fue de 6 g/día de curcumina durante 7 días para la combinación con DOC cada 3 semanas.	Disminución en un 90% de pacientes de los niveles de CEA y VEGF tras el último ciclo con DOC + curcumina. No hubo grupo control tratado solo con DOC para comparar.	Bayet-Robert et al., 2010

Pacientes (n=40) con resección de un tumor mamario triple negativo en estadio de I a III	Ensayo clínico fase IB, aleatorizado, doble-ciego, placebo-controlado con escalada de dosis. Un grupo (n=30), se dividió en: 1º (n=16) consumió 800 mg/día, 2º (n=11) 1,2 g/día y, 3º (n=3) 1,6 g/día de EGCG. Otro grupo control (n=10) consumió placebo. El consumo fue de 6 meses.	Definir la dosis máxima tolerada de las cápsulas de té verde. Estudiar distintos marcadores relacionados con el riesgo de padecer cáncer de mama.	La dosis máxima tolerada fue de 600 mg dos veces al día (1,2 g diarios de EGCG).	No existieron cambios significativos en SHBG, IGF-1, IGFBP-3, % Ki-67, RE ni se observaron cambios en la densidad mamaria de ninguno de los grupos.	Crew et al., 2012
Pacientes postmenopáusicas (n=28) con carcinoma mamario ductal *in situ* o con cáncer de mama en estadio I o II que requería cirugía	Estudio de intervención dietética previo a la cirugía. Un grupo (n=13) consumió 3 cápsulas/día de extracto de té verde rico en EGCG. Otro grupo control (n=15) no consumió cápsulas. El consumo diario de EGCG fue de 940 mg durante una media de 35 días.	Evaluar cambios tras el consumo de EGCG en marcadores relacionados con el tumor.	Descenso significativo de Ki-67 solo en tejido mamario sano del grupo que consumió el extracto de té verde.	No se observó incremento de inducción de apoptosis mediante incremento de caspasa-3; ni tampoco cambios en marcadores de angiogénesis (CD34) en tejido sano ni en tejido tumoral mamario.	Yu et al., 2013
Pacientes (n=30) con cáncer de mama no inflamatorio o carcinoma *in situ* en tratamiento con radioterapia sin coadyuvancia de quimioterapia	Ensayo clínico aleatorizado, doble-ciego, placebo-controlado. Un grupo (n=14) consumió 6 g/día de curcuminoides (4,7 g curcumina; 0,9 g DMC; y 150 mg BDMC). Otro grupo control (n=16) consumió placebo. El consumo fue en cada sesión de radioterapia (alrededor de 30 sesiones radioterapia, 6 meses).	Evaluar la capacidad de los curcuminoides para reducir la severidad de la dermatitis producida por la radioterapia.	Disminución significativa de la severidad de la dermatitis en el grupo que consumió las cápsulas de curcuminoides.	No se observaron cambios en el enrojecimiento de la piel debido al tratamiento. Tampoco se observaron diferencias en el resto de los parámetros relacionados con el dolor y reacciones adversas relacionadas con el tratamiento con radioterapia, en ninguno de los dos grupos.	Ryan et al., 2013

Pacientes postmenopáusicas (n=24) con cáncer de mama RE+ que requerían cirugía	Estudio de intervención dietética previo a la cirugía, aleatorizado, con diseño factorial 2x2 y placebo-controlado. Se dividieron 4 grupos: 1º (n=6) consumió 25 g/día de semillas de lino + 1 cápsula placebo; 2º (n=7) 1mg/día de inhibidor de aromatasa (anastrozol); 3º (n=6) 25g/día de semillas de lino + 1 mg/día de anastrozol; y un 4º (n=5) 1 cápsula/día de placebo. Tiempo de consumo 13-16 días.	Evaluar los efectos producidos tras el consumo de semillas de lino frente anastrozol en niveles de diferentes hormonas y en marcadores relacionados con el tumor.	Se observó una reducción (40%) en la expresión de REβ en el grupo que consumió semillas de lino + anastrozol respecto a los niveles basales. Se observaron correlaciones negativas en los niveles plasmáticos de androsterona en el grupo lino + anastrozol frente al control y en DHEA en el grupo que consumió anastrozol frente al control.	No se observaron cambios en el % de Ki-67 ni en la expresión de caspasa-3. La excreción de enterolactona fue mucho menor en el grupo que consumió semillas de lino+anastrozol que en el grupo que solo consumió semillas de lino.	McCann et al., 2014
Pacientes (n=34) con resección de un tumor mamario triple negativo en estadio de I a III. Estudio auxiliar del estudio previo de Crew et al., 2012	Del grupo que consumió las cápsulas de té verde se seleccionó n=26, donde: n=14 consumió 800 mg/día; n=11 consumió 1,2 g/día y; n=1 consumió 1,6 g/día. Un grupo (n=8) que no consumió cápsulas se usó como control.	Evaluar el efecto del consumo de extracto de té verde (rico en EGCG) en marcadores relacionados con el cáncer de mama.	Disminución significativa de la concentración plasmática de HGF en el grupo que consumió las cápsulas de té verde frente al control, solo tras dos meses de consumo e independientemente de la dosis consumida.	No se observaron cambios significativos en VEGF, triglicéridos, colesterol, estrés oxidativo ni en marcadores relacionados con la inflamación.	Crew et al., 2015
Pacientes (n=12) con cáncer de mama que requerían cirugía sin neoadyuvancia	Estudio de intervención dietética previo a la cirugía. Las pacientes consumieron un granulado de 2,8 gramos/día de silibinina-fosfatidilcolina (porcentaje de silibinina del 30 al 36%) durante 4 semanas antes de la cirugía.	Evaluar biodisponibilidad y distribución en TSM, TTM, plasma y orina de la formulación de silibinina.	Valores (mediana) de silibinina en plasma, TTM y, TSM: <u>Sin hidrólisis enzimática</u>: -Plasma=5,8 ng/mL -TTM=33 ng/g -TSM=no detectado <u>Con hidrólisis:</u> -Plasma=14,5 ng/mL -TTM=131 ng/g -TSM=11 ng/g	No existieron cambios significativos en los valores de óxido nítrico, IGF-1 ni en % Ki-67 tras un mes de consumo de la formulación de silibinina.	Lazzeroni et al., 2016

Pacientes (n=12) con cáncer de mama que requerían cirugía sin neoadyuvancia	Estudio de intervención dietética previo a la cirugía donde cada paciente (n=12) consumió 300 mg/día de un granulado de té verde en una formulación con lecitina. Cada 300 mg de granulado contenían 44,9 mg de EGCG y 65,1 mg de catequinas. El consumo antes de la cirugía fue de 4 semanas.	Evaluar biodisponibilidad y distribución en TSM, TTM y plasma de la formulación de EGCG; proliferación y angiogénesis en células tumorales; marcadores de estrés oxidativo y de resistencia a insulina.	Valores (mediana) de EGCG en plasma, TTM y, TSM: <u>Sin hidrólisis</u>: -Plasma=30,9 ng/mL -TTM= no detectado -TSM=1,07 ng/g <u>Con hidrólisis:</u> -Plasma=89 ng/mL -TTM=3,18 ng/g -TSM=no detectado	Incremento de los niveles de testosterona tras 4 semanas de consumo del granulado de té verde. Correlación positiva de mayores concentraciones plasmáticas de EGCG con un menor % de Ki-67 en TTM.	Lazzeroni et al., 2017
Pacientes (n=578) con cáncer de mama no inflamatorio o carcinoma *in situ* en tratamiento con radioterapia sin coadyuvancia de quimioterapia	Ensayo clínico aleatorizado, doble-ciego, placebo-controlado. Un grupo (n=283) consumió 6 g/día de curcuminoides (5,4 g curcumina; 0,5 g DMC; y 0,12 g BDMC). Otro grupo control (n=295) consumió placebo. El consumo fue en cada sesión de radioterapia (7 días en alrededor de 30 sesiones radioterapia, 6 meses).	Comprobar la eficacia del tratamiento oral de curcumina frente a placebo como tratamiento para evitar la dermatitis severa asociada a la radioterapia.	El consumo de curcumina no redujo la severidad de la dermatitis asociada a radioterapia en el grupo que consumió curcuminoides frente al grupo placebo.	No se observaron diferencias entre ambos grupos respecto a dolores y reacciones adversas asociadas al tratamiento con radioterapia ni tampoco en diferentes parámetros relacionados con la calidad de vida.	Ryan Wolf et al., 2018
Pacientes postmenopáusicas (n=45) con cáncer de mama RE+ y/o RPg+, con resección del tumor mamario y en tratamiento hormonal	Ensayo clínico abierto de un solo brazo. Un único grupo (n=45) consumió 3 cápsulas/día. Cada cápsula contenía: 460 mg de aceite de pescado rico en DHA+EPA; 125 mg de extracto de olivo (12,5 mg de hidroxitirosol) y; 50 mg de extracto de cúrcuma (47,5 mg curcuminoides).	Evaluar si existe disminución en los niveles de proteína C reactiva tras el consumo de las cápsulas ricas en compuestos fenólicos y ácidos grasos ω-3.	Disminución significativa de los niveles de proteína C reactiva a los 30 días frente a los valores basales.	Reducción de los dolores musculoesquelético (en un 21,5% de las pacientes) asociados al tratamiento hormonal.	Martínez et al., 2019

Pacientes (n=10) con cáncer de mama sin neoadyuvancia	Estudio de intervención dietética previo a la cirugía, controlado y con dos brazos. Un grupo (n=5) consumió aproximadamente 60 g/día de nueces y otro grupo control (n=5) no consumió. El consumo fue entre 2 y 3 semanas.	Evaluar el efecto en la expresión de diferentes genes en tejido mamario tumoral tras el consumo de nueces.	Se observaron diferencias en la expresión de 456 genes del tejido tumoral mamario de la biopsia inicial al tejido tumoral mamario retirado en la cirugía en el grupo que consumió nueces.	El análisis bioinformático utilizando "*Ingenuity Pathway Analysis*" mostró activación en rutas de promoción de apoptosis y adhesión celular, así como, de inhibición de la proliferación y migración celular.	Hardman et al., 2019
Pacientes premenopáusicas (n=81) con cáncer de mama RE+, con resección del tumor mamario y en tratamiento con tamoxifeno	Estudio clínico aleatorizado, doble-ciego y placebo-controlado. Completaron n=81. El grupo de intervención (n=42) consumió extracto de trébol rojo (80 mg isoflavonas/día) mientras que el grupo control (n=39) consumió placebo durante 24 meses.	Evaluar si el consumo de isoflavonas afecta en la calidad de vida y reduce los efectos adversos del tratamiento con tamoxifeno.	Se observó una reducción significativa en el IMC y en la circunferencia de cintura en el grupo que consumió isoflavonas frente al placebo.	No se observaron diferencias entre los grupos para el resto de los parámetros analizados: MRS, HDL, LDL, colesterol total, insulina, triglicéridos, índice de resistencia a insulina, niveles de hormonas sexuales ni tampoco en la densidad mamaria y grosor del endometrio.	Ferraris et al., 2020

Abreviaturas: **BDMC**: bidemetoxicurcumina; **CEA**: antígeno carcinoembrionario; **c-erbB2 (**o **HER2)**: receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano; **DHA**: ácido docosahexaenoico; **DMC**: demetoxicurcumina; **DOC**, docetaxel; **EGCG**: epigalocatequina 3-galato; **EPA**: ácido eicosapentaenoico; **HDL**: Lipoproteínas de alta densidad; **HGF**: factor de crecimiento hepatocitario; **IGF-1**: factor de crecimiento insulínico tipo 1; **IGFBP-3**: proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina; **LDL**: Lipoproteínas de baja densidad; **MRS**: "*menopausal rating score"*; **RE**: receptor de estrógenos; **RPg**: receptor de progesterona; **SHBG**: globulina fijadora de hormonas sexuales; **TS**, tejido mamario sano; **TTM**, tejido tumoral mamario; **VEGF**: factor de crecimiento vascular.

El efecto del té verde frente al cáncer de mama ha sido objeto de estudio en distintos estudios clínicos. Este interés se debe al alto contenido del compuesto fenólico EGCG presente en el té. Sin embargo, la actividad biológica de este compuesto no se ha demostrado a nivel clínico. El efecto del té verde sobre diferentes marcadores relacionados con el cáncer de mama se ha evaluado a corto (Yu et al., 2013; Lazzeroni et al., 2017) y largo plazo (6 meses) (Crew et al., 2012). En este último estudio se estableció la dosis máxima tolerada de EGCG en 1,2 g/día durante 6 meses en pacientes RE- y RPg-, no observando cambios tras el consumo en RE, Ki-67, IGF-1, IGFBP-3, ni en la densidad mamaria en comparación con las pacientes que consumieron placebo (Crew et al., 2012). Los mismos autores exploraron los efectos de más marcadores en el mismo grupo de pacientes, no encontrando diferencias en VEGF, daño oxidativo, marcadores inflamatorios, entre otros; aunque sí una disminución transitoria de HGF en las pacientes consumidoras de extracto de té verde *vs* placebo (Crew et al., 2015).

Otro estudio en mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama mostró una reducción del porcentaje de Ki-67 (aunque solo en TSM y no en TTM), sin efectos relacionados con apoptosis (caspasa-3) o angiogénesis (CD34), tras el consumo de 2,2 g/día de extracto de té verde durante 35 días antes de la cirugía (Yu et al., 2013).

Más recientemente, otro estudio clínico en pacientes RE+ mostró que el consumo de EGCG en una formulación con fosfatidilcolina (durante unas 4 semanas antes de la cirugía) no ejerció cambios en marcadores relacionados con el cáncer de mama, pero sí un significativo aumento de los niveles de testosterona (Lazzeroni et al., 2017). Esta hormona se puede convertir en estradiol por medio de la enzima aromatasa, lo cual incrementaría la proliferación de las células tumorales de mama. Sin embargo, la testosterona se ha asociado con un efecto protector frente al cáncer de mama (Davis y Wahlin-Jacobsen, 2015; Glaser y Dimitrakakis, 2015). Otro compuesto fenólico que se

ha estudiado frente al cáncer de mama es la curcumina, aunque principalmente los estudios clínicos existentes se basan en la combinación con un agente quimioterapéutico y evalúan el papel de este compuesto fenólico para disminuir los efectos adversos causados por el tratamiento farmacológico.

Así, el primer estudio clínico que encontramos con este fenólico evaluó la dosis máxima tolerada de curcumina en pacientes con cáncer de mama metastásico (n=14) en combinación con la administración intravenosa del fármaco quimioterapéutico docetaxel, estableciendo una dosis máxima de curcumina en 8 g/día en combinación con 100 mg/m^2 del fármaco durante 6 ciclos de quimioterapia, no observándose efectos en la disminución de marcadores relacionados con el tumor (Bayet-Robert et al., 2010).

Posteriormente, otro estudio exploratorio en 30 pacientes con cáncer de mama que consumieron 6 g/día de curcumina (durante 6 meses), mostró una disminución de los efectos adversos producidos por el tratamiento con radioterapia en comparación con el grupo que consumió placebo (Ryan et al., 2013). Sin embargo, estos autores posteriormente evaluaron estos mismos efectos en un total de 686 pacientes observando que el consumo de curcumina tras 30 sesiones de radioterapia no disminuyó la severidad de los efectos de la radioterapia (Ryan Wolf et al., 2018). Este hecho refleja la necesidad de un tamaño muestral adecuado para poder evaluar un efecto a nivel clínico.

El resto de los estudios clínicos que encontramos en pacientes con cáncer de mama evalúan el efecto de productos o alimentos ricos en compuestos fenólicos como extractos de semilla de uva (rico en procianidinas) (Brooker et al., 2006), cardo mariano (rico en flavonolignanos) (Lazzeroni et al., 2016), trébol rojo (rico en isoflavonas) (Ferraris et al., 2020) o alimentos como nueces (ricas en elagitaninos) (Hardman et al., 2019) e incluso productos que contienen una mezcla de hidroxitirosol + curcumina con ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) (Martínez et al., 2019). Sin embargo, los efectos en estos estudios

han sido escasos o nulos. En este sentido, un consumo de 300 mg/día de extracto de semilla de uva durante 12 meses no consiguió reducir los efectos adversos asociados a la radioterapia (Brooker et al., 2006). Tampoco un consumo de 80 mg/día de extracto de trébol rojo durante 2 años disminuyó los efectos adversos del tratamiento con tamoxifeno en pacientes con cáncer de mama RE+, aunque se observó una reducción significativa del IMC y de la circunferencia de cadera en el grupo que consumió el extracto de trébol rojo frente al que consumió placebo (Ferraris et al., 2020).

No obstante, debemos destacar que el único estudio donde se evalúa el efecto tras el consumo de un alimento y no de una formulación, llevado a cabo por Hardman et al., mostró que el consumo de 30 gramos diarios de nueces durante 2-3 semanas, incrementaban la expresión de 456 genes relacionados con inducción de apoptosis u otros relacionados con la inhibición de adhesión, proliferación y migración celular medidos en el tumor, aunque el tamaño muestral de este estudio fue de solo 10 pacientes (Hardman et al., 2019).

Por último, un estudio reciente describe el efecto antiinflamatorio por la disminución de la proteína C-reactiva en pacientes con cáncer de mama (enfermedad no activa) que estaban en tratamiento hormonal tras el consumo de una formulación que contenía 460 mg de aceite de pescado (rico en ácidos grasos omega-3), extracto de olivo (125 mg de hidroxitirosol) y 50 mg de curcumina durante 1 mes (Martínez et al., 2019). Sin embargo, aunque el descenso de los niveles plasmáticos de proteína C-reactiva fue significativo (de 8,2 mg/L a 5,3 mg/L), los valores seguían en el límite de los asociados con una menor supervivencia en el paciente (Pierce et al., 2009) y alto riesgo cardiovascular (Tomé-Carneiro et al., 2012). Además, no se identificó al compuesto de la mezcla consumida que ejercía el efecto antiinflamatorio descrito.

4. METILXANTINAS

Las xantinas son una variedad de compuestos pertenecientes a la familia de las purinas. Entre estas moléculas se incluyen sustancias endógenas con un papel fundamental en el organismo como la guanina, adenina, hipoxantina y ácido úrico, todas ellas compartiendo una base nitrogenada heterocíclica como esqueleto. No obstante, los compuestos más representativos de las xantinas son los derivados N-metilados, conocidos como metilxantinas. Las metilxantinas han sido descritas en un centenar especies de plantas. Sin embargo, solo algunas de ellas contienen altas concentraciones, tales como *Coffea arabica* (café), *Camellia sinensis* (té) y *Theobroma cacao* (cacao) (Langer et al., 2011). Las metilxantinas se consideran sustancias alcaloides que producen, principalmente, efectos estimulantes. Su presencia en bebidas como el café o el té las convierte en las sustancias estimulantes más consumidas por el hombre.

4.1. Clasificación de metilxantinas y sus fuentes en la dieta

Cafeína, teobromina y teofilina son las principales metilxantinas que se pueden encontrar de manera natural en la dieta. Las metilxantinas se pueden clasificar en función del número de sustituyentes metilo, encontrando principalmente 3 grupos (**Figura 1.15**):

- **Trimetilxantinas**. La cafeína es la trimetilxantina por excelencia. Contiene tres grupos metilo en su estructura y se encuentra principalmente en la planta del café. Este compuesto también se puede extraer de otras plantas como el té o guaraná y, en estos casos, se le llama comúnmente teína o guaranina, respectivamente.
- **Dimetilxantinas**. Son xantinas dimetiladas. Las principales que se encuentran en la dieta son teobromina (3,7-dimetilxantina), representativa del cacao; y teofilina (1,3-dimetilxantina), representativa de diferentes variedades de té. Existe un tercer compuesto

dimetilado que es la paraxantina (1,7-dimetilxantina), pero no se encuentra en los alimentos de forma natural y procede del metabolismo de la cafeína.

- **Monometilxantinas**. Son xantinas con un solo grupo metilo en su estructura. Se han descrito tres isómeros diferentes, 1-, 3- y 7-metilxantina, pero no se encuentran como tales en los alimentos, sino que se producen a partir del metabolismo de tri- y dimetilxantinas.

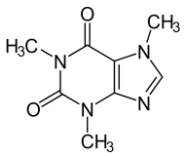
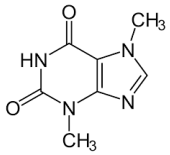
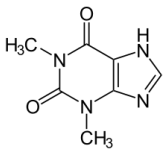
Metilxantinas	Compuestos	Alimentos
Trimetilxantinas		
	Cafeína	Café Té verde Cacao Guaraná
Dimetilxantinas		
	Teobromina	Cacao Chocolate Guaraná
	Teofilina	Mate Té negro Té verde

Figura 1.15. Clasificación de metilxantinas que se pueden obtener de la dieta, compuestos representativos y la fuente donde se encuentran.

4.2. Biodisponibilidad y metabolismo de las metilxantinas

Existen diversos factores que pueden influir en la biodisponibilidad y metabolismo de las metilxantinas, desde la genética (edad, sexo, hormonas) hasta otros factores como la actividad física, la obesidad, la dieta y el consumo de tabaco o alcohol (Arnaud, 2011).

En general, las metilxantinas son absorbidas rápida y completamente en el tracto gastrointestinal, principalmente en el intestino delgado. Tras su absorción, son metabolizadas a otras metilxantinas con menor grado de metilación mediante reacciones de desmetilación y de hidroxilación por distintas isoenzimas CYPs (**Figura 1.16**). Además, la xantina oxidasa (XO) es la responsable a nivel hepático de convertir las monometilxantinas formadas en ácidos úricos. Las metilxantinas pueden transformarse mediante tres rutas metabólicas (**Figura 1.16**). En el caso de la cafeína, la ruta de la paraxantina ha mostrado ser la predominante con un rendimiento del 80%, seguida de la ruta de la teobromina (12%) y de la teofilina (7%) (Thorn et al., 2012). De esta forma, en un primer paso, prácticamente el 100% de cafeína es metabolizada, produciendo principalmente paraxantina, seguida de teobromina y teofilina y, en menor proporción, ácido 1,3,7-trimetilúrico.

La biodisponibilidad de metilxantinas en humanos se ha estudiado principalmente en orina y plasma. Además, su presencia y distribución en tejidos también se ha estudiado en animales.

La cafeína se ha identificado en diferentes fluidos corporales (bilis, semen, líquido cefalorraquídeo, etc.) y, tras la administración de cafeína marcada con un isotopo radioactivo, se ha detectado su presencia en prácticamente todos los órganos y tejidos corporales (Arnaud, 1976). La teofilina se ha descrito en órganos como cerebro o hígado y en tejidos como el muscular o el adiposo alcanzando concentraciones en torno a 100 µM (Ståhle et al., 1991). La teobromina marcada también se ha empleado para conocer

su distribución en órganos y tejidos. Así, en un modelo animal se ha identificado que un día después de la administración de esta metilxantina, no existe acumulación de teobromina, ni metabolitos derivados, en ningún órgano ni tejido (Arnaud y Welsch, 1979).

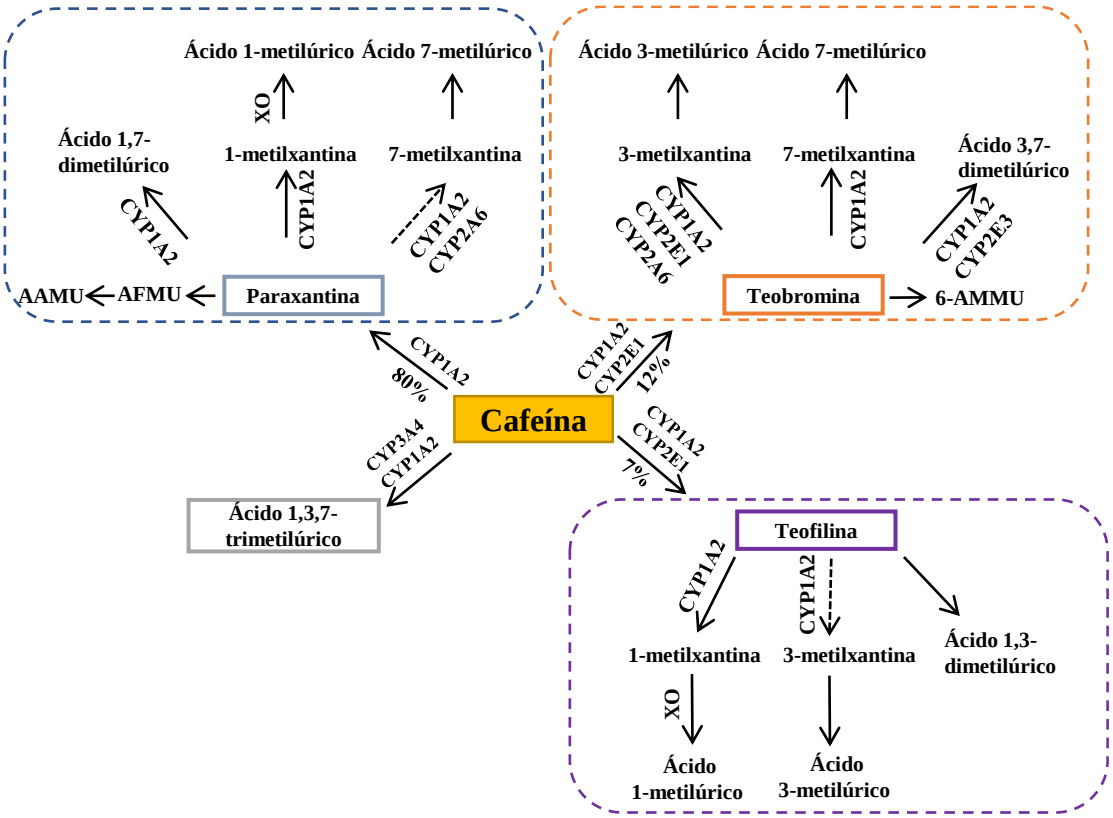


Figura 1.16. Rutas metabólicas derivadas del metabolismo de la cafeína.

La administración de metilxantinas ha sido evaluada mayoritariamente tras el consumo directo del compuesto. Sin embargo, se debería considerar que el consumo de metilxantinas al igual que el de compuestos fenólicos puede estar influido por el efecto matriz del alimento o por el consumo de otros ingredientes (Jonkman et al., 1985).

La principal ruta de eliminación de las metilxantinas y sus metabolitos es la vía urinaria. Las monometilxantinas y los ácidos metilúricos, metabolitos derivados de la biotransformación de tri- y dimetilxantinas que están poco presentes en plasma, son los

compuestos mayoritarios en orina. La baja presencia plasmática de estos derivados frente a su alta presencia en orina indica el rápido metabolismo y aclarado de estos compuestos.

Las metilxantinas originales (presentes en los alimentos) son escasamente eliminadas en orina como tales. Por ejemplo, solo un 2-3% de cafeína se excreta sin metabolizar en individuos sanos (Schneider et al., 2003) y menos de un 1% de la teofilina ingerida (Zydron et al., 2004). En el caso de la teobromina, su eliminación urinaria sin metabolizar puede alcanzar niveles superiores de hasta el 20% del total de metabolitos (Rodopoulos et al., 1996).

4.3. Actividad quimiopreventiva de las metilxantinas frente al cáncer de mama

Existen evidencias que relacionan de manera inversa el consumo o administración de distintas metilxantinas con una menor incidencia de cáncer (Monteiro et al., 2019). En las últimas décadas se han publicado resultados donde se rechaza mayoritariamente la creencia existente del pasado de que este grupo de compuestos tenía un efecto negativo para la salud, o que incluso podía relacionarse con la incidencia de ciertos tipos de cáncer. En este sentido, la cafeína o alimentos ricos en metilxantinas han mostrado efectos protectores en la salud humana. Además, se ha demostrado que consumos diarios de altas dosis de cafeína (hasta 700 mg/día) tampoco se relacionan con un aumento en la incidencia de cáncer de mama (Nawrot et al., 2003).

Respecto a la actividad quimiopreventiva frente al cáncer de mama, también existen evidencias que respaldan este efecto. En estudios epidemiológicos, el consumo de café se ha relacionado de manera inversa con el riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres premenopáusicas (Baker et al., 2006), e incluso con una menor incidencia de mutaciones en *BCRA* (Nkondjock et al., 2006).

En un estudio observacional se ha demostrado que un alto consumo (5 tazas diarias) o moderado (entre 2 y 5 tazas diarias) de cafeína reduce la recurrencia de cáncer de mama en pacientes tratadas con tamoxifeno (Rosendahl et al., 2015).

Los estudios preclínicos donde se han evaluado los mecanismos de acción de las metilxantinas como quimiopreventivos frente al cáncer de mama son más escasos que para los compuestos fenólicos. A continuación, se resumen los estudios preclínicos encontrados en literatura, en los que se ha descrito efecto quimiopreventivo frente al cáncer de mama para alguna de las tres metilxantinas que se consumen de manera natural en la dieta (cafeína, teobromina y teofilina).

4.3.1. Evidencia preclínica de metilxantinas frente al cáncer de mama

En la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (RE+) se ha descrito que cafeína y teofilina son capaces de inducir senescencia e inhibir la formación de colonias a concentraciones de 0,5 mM (Chang et al., 2017). En otro estudio *in vitro* con la línea tumoral MDA-MB-231 (ER-), teofilina ha mostrado reducir la proliferación celular inhibiendo la fosfodiesterasa y a través del incremento de ROS (Crumpton et al., 2001). También, se ha descrito que teofilina a 10 mM reduce la proliferación celular bloqueando el ciclo celular en un modelo celular metastásico de mama (Slotkin et al., 2000).

La teofilina mejora el tratamiento con yodo radioactivo en células tumorales de mama a través del incremento de la expresión de *NIS* ("*sodium/iodide symporter*") (Yoon et al., 2009). Esta metilxantina ha demostrado un efecto sinérgico con otro alcaloide (berberina), reduciendo la proliferación, formación de colonias y migración celular; además de inducir apoptosis y reducir la necrosis promovida por berberina en la línea celular MDA-MB-231 (Hashemi-Niasari et al., 2018).

La cafeína es capaz de inducir un bloqueo en fase G_2/M del ciclo en la línea celular MCF-7, acompañado de un incremento de caspasa-3 (Essmann et al., 2004).

Cafeína y teofilina son capaces de disminuir de manera significativa el transportador ABCG2, sensibilizando a una línea tumoral resistente a mitoxantrona al tratamiento con este fármaco (Ding et al., 2012).

Los estudios animales donde se evalúa el efecto de metilxantinas frente al cáncer de mama son más escasos. Sin embargo, cafeína ha demostrado en diferentes estudios animales inhibir el proceso de angiogénesis (Ryzhov et al., 2007); inhibir la carcinogénesis pulmonar (Chung et al., 1998); o incluso ha demostrado que es capaz de prevenir la formación de metástasis en un modelo de ratón transgénico (Yang et al., 2004). Otros estudios han indicado que el tratamiento con cafeína reduce la incidencia de tumores mamarios (fibroadenomas) en ratas tratadas con DMBA (Wolfrom et al., 1991), así como con diferentes carcinógenos (VanderPloeg et al., 1991). El consumo de cafeína también ha demostrado ejercer un efecto protector en la formación de tumores mamarios en ratas tras el consumo prolongado de dietilestilbestrol (Petrek et al., 1985). Teobromina y teofilina han mostrado en diferentes modelos animales su actividad como quimiopreventivos, interfiriendo en diferentes puntos de rutas relacionadas con la carcinogénesis (Hirsh et al., 2004; Sugimoto et al., 2014).

Además, las metilxantinas también han mostrado potenciar o mejorar el tratamiento con ciertos quimioterapéuticos usados en el cáncer de mama. Se ha demostrado una potencial sinergia de diferentes metilxantinas asociadas con diferentes quimioterapéuticos como la doxorrubicina (Kakuyama y Sadzuka, 2001). Incluso se ha descrito que las metilxantinas son capaces, en diferentes modelos tumorales mamarios, de mejorar la sensibilidad al tratamiento con radioterapia (Youn et al., 2009).

En este sentido, se ha descrito que células tumorales de mama resistentes al quimioterapéutico epirubicina se pueden sensibilizar al fármaco tras tratarlas con cafeína mediante la inhibición de la quinasa ATM (Millour et al., 2011). Otro estudio también indicó que cafeína ejercía un efecto aditivo con el fármaco tamoxifeno en células tumorales de mama RE+, además de inducir expresión de receptores hormonales en células RE- (Rosendahl et al., 2015).

Por último, hay que destacar la falta de estudios preclínicos encontrados donde se evalúe la actividad de teobromina (principal metilxantina del cacao) frente al cáncer de mama.

4.3.2. Evidencia clínica de metilxantinas frente al cáncer de mama

Tras revisar la literatura, no existen estudios clínicos donde se evalúe el efecto quimiopreventivo frente al cáncer de mama de las diferentes metilxantinas que se pueden consumir con la dieta (teobromina, cafeína, teofilina). En la búsqueda se han considerado estudios llevados a cabo en pacientes con cáncer de mama o con riesgo a padecer la enfermedad y que hubieran consumido metilxantinas, té, café y/o cacao donde no se atribuyera el efecto medido a los compuestos fenólicos sino a las metilxantinas.

Los únicos estudios de intervención en pacientes con cáncer de mama y metilxantinas son con pentoxifilina. La pentoxifilina es una metilxantina que mejora la circulación periférica y ha demostrado tener actividad frente a ciertos tipos de cáncer (Golunski et al., 2018). Sin embargo, no se puede consumir a través de los alimentos.

En definitiva, debido a que los alimentos ricos en metilxantinas como el café, cacao, o té también contienen gran cantidad de compuestos fenólicos, y dada la gran cantidad de estudios que describen las actividades biológicas de los compuestos fenólicos y los numerosos mecanismos de acción por los cuales ejercen estos efectos, es evidente que se

haya atribuido el efecto protector frente al cáncer de mama a los compuestos fenólicos tras consumir estos alimentos. Sin embargo, aunque los compuestos fenólicos presentes en el té, café o cacao han mostrado un efecto quimiopreventivo y/o anticancerígeno a través de diferentes mecanismos de acción en estudios preclínicos, las metilxantinas que se encuentran en estos alimentos también podrían contribuir a estos efectos beneficiosos.

Tabla 1.8. Estudios en modelos murinos de cáncer de mama donde se evalúa el efecto anticancerígeno tras el consumo o administración de compuestos fenólicos o extractos vegetales ricos en fenólicos.

Modelo animal (hembras)	**Extracto o compuesto fenólico**	**Dosis; duración**	**Resultados**	**Referencias**
		Antocianinas		
Ratas Wistar Furth; tumor xenográfico con MT-450	Delfinidina.	Grupo 1: 11,8 µM (inyección subcutánea); 21 días. Grupo 2: 11,8 µM (vía oral); 28 días.	Grupo 1: ↑crecimiento del tumor, tamaño de nódulos linfáticos y metástasis pulmonares; ↓CD31 y LYVE-1. Grupo 2: ↑crecimiento del tumor, tamaño de nódulos linfáticos y metástasis pulmonares.	Thiele et al., 2013
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con NMU	Delfinidina.	100 mg/kg/día (en dieta); 18 semanas.	↓Incidencia de tumores y Ki-67 (tejido tumoral mamario y metástasis de pulmón); ↓*HOTAIR* y ↑miR-34a (tejido mamario sano y tumoral).	Han et al., 2019
Ratones BALB/c *nude* inmunodeprimidos; tumor xenográfico con MDA-MB-231	Extracto de arroz negro rico en antocianinas.	100 mg/kg/día (vía oral); 28 días.	↓Crecimiento, proliferación y densidad microvascular del tumor; ↓MMP-2, MMP-9 y proteína activadora de plasminógeno de tipo uroquinasa.	Hui et al., 2010
Ratones BALB/c *nude (nu/nu)*; tumor xenográfico con MDA-MB-231	Extracto de arroz negro rico en antocianinas.	150 mg/kg/día (vía oral); 21 días.	↓Crecimiento del tumor, nódulos tumorales y metástasis en el pulmón; ↓Ki-67.	Luo et al., 2014
Ratones BALB/c *nude (nu/nu)*; tumor xenográfico con MDA-MB-231-Luc-GFP	Delfinidina-3-*O*-glucósido.	40 mg/kg/día (vía oral); 28 días.	↓Crecimiento del tumor, expresión de *HOTAIR* y p-Akt; ↑IRF-1.	Yang et al., 2016
Ratones Crl:NU-*Foxn1*^{nu}; tumor xenográfico con MDA-MB-231	Cianidina-3-*O*-glucósido.	1,6 y 3,2 g/kg (vía oral, dos veces al día); 25 días.	↓Crecimiento del tumor (dosis-dependiente).	Cho et al., 2017
		Flavanonas		
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Zumo de naranja, zumo de uva, naringina y naringenina.	Los zumos (naranja y uva) se administraron *ad libitum*. Naringina y naringenina a 500 y 240 mg/100 g dieta, respectivamente (en 5 o 20% de aceite de maíz); 15 semanas.	↓Tamaño y peso del tumor; ↑tiempo de latencia (solo con naringina, y zumo de naranja y dieta con 5% de aceite de maíz). ↑Peso del tumor (con zumo de uva y dieta 20% de aceite de maíz). ↓Peso del tumor (con naringenina + 20% de aceite de maíz).	So et al., 1996

Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Hesperidina.	30 mg/kg peso; 45 días.	Reducción de enzimas metabolizadoras de carbohidratos[1], perfil lipídico[2] (plasma e hígado) y ATPasas[3] (eritrocitos e hígado).	Nandakumar et al., 2014
Ratas Wistar; tumor mamario inducido con DMBA	Naringenina-tamoxifeno (TAM) o naringenina-TAM-SNEEDS.	20 mg/kg; 30 días (60 días en ensayo de supervivencia).	Los efectos se observaron con Naringenina-TAM-SNEEDS: ↓tamaño y peso del tumor; ↑tiempo de supervivencia.	Sandhu et al., 2017
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	NSD con hesperetina-MAN-SLS-DOSS[4] o mezcla física con hesperetina-MAN-SLS-DOSS. Grupo control: solo con MAN-SLS-DOSS.	20 mg/kg vía oral (respecto al contenido de hesperetina) una vez al día; 106 días.	Efectos con los tratamientos de NSD y mezcla física: ↑latencia del tumor; ↓volumen y tamaño del tumor; disminución de hepatotoxicidad.	Sheokand et al., 2019
Ratas Wistar; tumor mamario inducido con DMBA	Naringenina.	2,5, 5, y 10 mg/kg peso corporal; 19 semanas.	↓Incidencia del tumor, crecimiento y tamaño; ↓proliferación; ↑apoptosis, caspasa-3 y -9; ↑enzimas Fase-I, Fase-II y actividad enzimática ATPasa[3]. Disminución de hepatotoxicidad: modulación de enzimas metabolizadoras de carbohidratos[1], perfil lipídico[2], estado antioxidante[5], marcadores de apoptosis[6] y glicoproteínas.	Zhao et al., 2019
Ratones BALB/c (tumor xenográfico con 4T1) y ratones C57BL/6	Naringenina.	100 mg/kg/día (vía oral); 35 días (160 días en el ensayo de supervivencia).	↑Tasa de supervivencia; ↓metástasis pulmonares; ↑activación de células T, INF-γ y células T que expresan IL-2.	Qin et al., 2011
Ratones BALB/c atímicos (ovariectomizados); tumor xenográfico con MCF-7aro[7] (y androstendiona)	Hesperetina.	500, 1.000 y 5.000 ppm; hasta 13 semanas.	↓Tamaño y volumen del tumor; ↓niveles 17 β-estradiol en plasma; ↓mRNA de *pS2* y *CYP1A1*; ↓ciclina D1, CDK4, y Bcl-xL; ↑$p57^{Kip2}$.	Ye et al., 2012
Ratones BALB/c atímicos (ovariectomizados); tumor xenográfico con MCF-7aro[7] (y androstendiona)	Hesperetina (sola o con letrozol).	5.000 ppm; 84 días.	↓Tamaño y volumen del tumor; ↓niveles 17 β-estradiol en plasma. Prevención del deterioro óseo producido por letrozol.	Li et al., 2013
Ratones BALB/c atímicos; tumor xenográfico con 4T1/RFP o 4T1/TGF-β1	Naringenina.	200 mg/kg; 30 días.	Mejora características inmunosupresoras del entorno tumoral; ↓metástasis pulmonares; ↓TGF-β1 en plasma y pulmón; ↑tasa de supervivencia.	Zhang et al., 2016

Ratones obesos C57BL/6J (ovariectomizados); Tumor xenográfico con E0771	Naringenina.	1 y 3% (p/p) en la dieta; 33 días.	↓Crecimiento del tumor; ↑p-Akt/Akt y p-mTOR/m-TOR (tumor mamario con 3% de naringenina); ↓masa y tamaño de adipocitos; ↓*α-SMA*, *MCP-1*, *IL-6* y *leptina* (tejido adiposo con 3% naringenina).	Ke et al., 2017
Ratones *nude* atímicos (*nu/nu*);Tumor xenográfico con MCF-7 o SKBR3	2-Hidroxiflavanona.	25 mg/kg peso corporal (vía oral, cada 2 días); 8 semanas.	↓Tamaño del tumor; ↓RLIP76, Ki-67, CD31, p-Akt, vimentina; ↓ratio Bcl-2/Bax; ↑E-caderina.	Singhal et al., 2018
Ratones NOD SCID gamma; Tumor xenográfico TMD231-luc	2-Hidroxiflavanona (sola o con RLIP Ac + RLIP "*antisense*").	50 mg/kg peso corporal (vía oral, cada 2 días); 51 días.	↓Crecimiento del tumor y metástasis pulmonares; ↓RLIP, p-Akt (Ser473) y p-ERK (T202/204); ↓ratio Bcl-2/Bax; ↓Ki-67, CD31, vimentina y CDK4; ↑E-caderina.	Singhal et al., 2019
		Flavonas		
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA y con acetato de medroxiprogesterona	Apigenina.	0,02, 0,1 y 0,5% (p/p) en la dieta; 56 días.	↓Incidencia de tumores (solo a 0,1%); ↑multiplicidad de tumores en los animales (con 0,1 y 0,5%).	Mafuvadze et al., 2013
Ratones BALB/c *nude*; tumor xenográfico con MDA-MB-231	Apigenina.	25 y 50 mg/kg (en el agua de bebida); 2 semanas.	↓Crecimiento del tumor; ↓pSTAT3/STAT3, pERK/ERK, IL-6, PI3K y p-Akt, N-caderina.	Lee et al., 2019
Ratas Wistar; tumor mamario inducido con DMBA	Luteolina (sola o con ciclofosfamida).	30 mg/kg (vía oral); 20 días.	↓Incidencia y volumen del tumor; ↓peroxidación lipídica; ↑SOD, catalasa y glutatión peroxidasa.	Samy et al., 2006
Ratones BALB/c y atímicos *nude*; tumor xenográfico con 4T1 y MCF-7, respectivamente	Luteolina (sola o con DOX).	100 mg/kg (vía oral); 3 semanas.	↓Crecimiento del tumor; ↑tasa de supervivencia; ↓MDA en plasma y ↑MDA en tumor (con tratamiento luteolina+DOX). ↑SOD, catalasa; ↓MDA en plasma ↑MDA en tumor (solo con luteolina).	Du et al., 2008
Ratones atímicos *nude*; tumor xenográfico con MDA-MB-231	Luteolina.	0,01 y 0,05% (p/p) en la dieta; 13 semanas.	↓Crecimiento del tumor y proliferación celular.	Lee et al., 2012
Ratones atímicos (ovariectomizados); tumor xenográfico con MCF-7aro[7] (y androstendiona)	Luteolina (sola o con letrozol).	5, 20 y 50 mg/kg peso corporal; 84 días.	↓Crecimiento del tumor; ↓17β-estradiol (con 50 mg/kg y con letrozol); ↓tamaño uterino; ↑ratio Bax/Bcl-xL; ↑niveles HDL (con 50 mg/kg); ↓ciclinas A, D1, E, CDK4, CDK2 y p57.	Li et al., 2014

Ratones BALB/c *nude*; tumor xenográfico con MDA-MB-231	Baicaleína.	50 y 100 mg/kg (vía oral); 15 días.	↓Metástasis pulmonares y hepáticas; ↓SATB1, Wnt1, vimentina, β-catenina, SNAIL; ↑E-caderina.	Ma et al., 2016
Ratones BALB/c *nude*; tumor xenográfico con MCF-7 o MDA-MB-231	Baicaleína.	100 mg/kg (vía oral); 21 días.	↓Crecimiento del tumor; ↓p-Akt; ↑Bax y LC3.	Yan et al., 2018
Ratones BALB/c *nude*; tumor xenográfico con T47D y MDA-MB-231	Wogonina.	0,1, 1 y 10 mg/kg (vía oral, 6 días a la semana); 4 semanas.	↓Crecimiento del tumor.	Chung et al., 2008
Ratones BALB/c *nude*; tumor xenográfico con MDA-MB-231	Wogonósido.	80 mg/kg (vía oral, cada 2 días); 21 días.	↓Crecimiento del tumor y metástasis; ↓MMP-9, vimentina, y twist1; ↑E-caderina; ↓TNF-γ, TRAF2, y TRAF4.	Yao et al., 2017
Ratones BALB/c *nude*; tumor xenográfico con MDA-MB-231	Wogonósido.	80 mg/kg (vía oral, cada 2 días); 10–15 días.	↓Crecimiento del tumor y angiogenésis; ↓*CD31*; ↓hemoglobina.	Huang et al., 2019
		Flavonoles		
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Quercetina.	1% (p/p) en la dieta; 51 semanas.	No se observó ningún efecto.	Hirose et al., 1988
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA y NMU	Quercetina.	2% y 5% (p/p) en la dieta; 20 semanas.	↓Multiplicidad de tumores, latencia e incidencia.	Verma et al., 1988
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Quercetina (sola o con sulfuro de dialilo).	10 g/kg en la dieta; 24 semanas.	↓Creciente número de tumores (solo significativo con sulfuro de dialilo).	Ip y Ganther, 1991
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Quercetina.	10 o 20 g/kg en la dieta; 107 días.	↑Latencia de tumores (solo con 20 g/kg).	Pereira et al., 1996
Ratas ACI; tumor mamario inducido con 17β-estradiol	Quercetina.	2,5 g/kg; 8 meses.	No se observó efecto frente a inducción de tumores con 17β-estradiol; ↓latencia del tumor; ↓actividad COMT.	Singh et al., 2010
Ratas Wistar; tumor mamario inducido con DMBA	Quercetina.	50, 100 y 200 mg/kg peso corporal (vía oral); 16 semanas.	↑SOD, glutatión peroxidasa, y actividad catalasa en lisado de eriotrocitos, plasma y tejido mamario; ↓TBARS en plasma; ↑en tejido mamario.	Reddy et al., 2012

Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	TAM + quercetina y TAM-quercetina-NPs.	TAM + Quercetina 3 mg/kg + 6 mg/kg (1:2 p/p), TAM-quercetina-NPs (equivalente hasta 3mg/kg de TAM (vía oral, dosis repetidas cada 3 días); 30 días (hasta 60 días para estudio de supervivencia).	↓Crecimiento del tumor; ↑tasa de supervivencia (con TAM-quercetina). ↑Niveles plasmáticos de quercetina; ↓crecimiento del tumor; ↑tasa de supervivencia; ↓MMP-2 y MMP-9 en plasma; ↓hepatotoxicidad (con TAM-quercetina-NPs).	Jain et al., 2013
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Quercetina y quercetina-SNEDDS.	50 y 100 mg/kg; 12 semanas.	↑Latencia de tumores; ↓MMP-2 y MMP-9 en plasma; ↓peso del tumor; ↓hepatotoxicidad (quercetina-SNEDDS fue el tratamiento más efectivo).	Jain et al., 2014
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	TAM con quercetina y TAM-quercetina-SNEDDS.	TAM + quercetina 3 mg/kg + 6 mg/kg (1:2 p/p), TAM-quercetina-SNEDDS equivalente a 3 mg/kg TAM (vía oral, en dosis repetidas un día, durante 3 días); 30 días (hasta 60 días ensayo de supervivencia).	↑Tasa de supervivencia;↓crecimiento y peso del tumor; ↓MMP-2 y MMP-9 en plasma; ↓hepatotoxicidad (TAM-Quercetina-SNEDDS fue el tratamiento más efectivo).	Jain et al., 2013
Ratas Wistar; tumor mamario inducido con DMBA	Quercetina.	100 mg/kg peso corporal; 30 días.	Regresión del tumor: ↓Volumen del tumor; ↓infiltración celular en tejido mamario. Preservación arquitectura del tejido mamario; ↑SOD, catalasa, y actividad glutatión peroxidasa; ↓α-fetoproteína, CA 15-3 y CEA; ↓Hsp70.	Santhalakshmi y Ramakrishna, 2015
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Quercetina-RSV-GEN y quercetina-RSV-GEN SNEDDS.	Quercetina-RSV-GEN (50 mg/kg/semana de quercetina) y quercetina-RSV-GEN SNEDDS (50 mg/kg/semana de quercetina); 91 días.	↑Tasa de supervivencia; ↓incidencia y crecimiento del tumor; ↓MMP-2, MMP-9, IL-6 y TNF-α en plasma (quercetina-RSV-GEN SNEDDS fue el tratamiento más activo).	Tripathi et al., 2016
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con NMU	Rutina (con DOX).	50 mg/kg (vía oral, 7 días a la semana); 50 días.	↓Crecimiento del tumor en presencia de DOX; ↓efectos adversos provocados por DOX relacionados con función cognitiva, inflamación, estrés oxidativo en sangre y células inmunes.	Ramalingayya et al., 2019
Ratones atímicos *nude*; tumor xenográfico con GFP-MDA-MB-231	Quercetina + RSV + catequina.	0,5, 5 y 25 mg/kg peso corporal (vía oral, 3 veces semana); 117 días.	↓Crecimiento del tumor (con 5 y 25 g/kg).	Schlachterman et al., 2008

Ratones BALB/c y atímicos *nude*; tumor xenográfico con 4T1	Quercetina (sola o con DOX).	100 mg/kg; 4–6 semanas (hasta 100 días para el ensayo de supervivencia).	Los efectos observados fueron en ratones BALB\c: ↓crecimiento del tumor y metástasis pulmonares; ↑tasa de supervivencia; ↑INF-γ e IL-2; ↓IL-4 e IL-10; ↓apoptosis de T CD4+ y CD8+; ↑células T CD8+. Citotoxicidad en células 4T1.	Du et al., 2010a
Ratones BALB/c axénicos; tumor xenográfico con 4T1	Quercetina (sola o con DOX).	100 mg/kg (vía oral); 3 semanas.	↓Crecimiento de tumor y metástasis pulmonares; ↑tasa de supervivencia. Supresión toxicidad de DOX; modulación expresión *HIF-1α* y *VEGF* (con quercetina).	Du et al., 2010b
Ratones BALB/c y ratones SCDI; tumor xenográfico JIMT-1	Quercetina, vincristina, vincristina + quercetina (ratio molar 2:1) y vincristina + quercetina encapsulación liposómica[8].	Quercetina (0,24 mg/kg), vincristina (1,33 mg/kg), vincristina + quercetina (0,24 mg/kg + 1,33 mg/kg), y encapsulación liposómica de vincristina + quercetina (0,24 mg/kg + 1,33 mg/kg); 60 días.	Con encapsulación liposómica de vincristina + quercetina: ↑Tiempo en circulación y liberación *in vivo*; ↓recurrencia de tumores; ↑tiempo de latencia del tumor y de supervivencia.	Wong y Chiu, 2011
Ratones C3(1)/SV40 Tag	Quercetina.	0,02, 0,2 y 2% (p/p); 16 semanas.	Efectos según dosis: ↑número de tumores con 2% y ↓con 0,2%; ↓volumen del tumor (dosis-dependiente); modulación expresión de genes relacionados con cáncer de mama.	Steiner et al., 2014
Ratones Swiss albino; tumor inducido por inyección con células de carcinoma ascítico de Ehrlich	Quercetina.	1 mg/kg; 50 días (hasta 250 días para ensayo de supervivencia).	↓Crecimiento del tumor y Ki-67; ↑tasa de supervivencia; ↑p53 y p-p53; ↑apoptosis.	Srivastava et al., 2016
Ratones BALB/c *nude*; tumor xenográfico con MCF-7	Quercetina.	34 mg/kg; 21 días.	↓Volumen y peso del tumor; ↑necrosis tumoral; ↓número monocitos; ↓densidad microvascular en el tumor; ↓*Ki-67* y *vWF*; ↓VEGF, VEGF-R2 y NFATc3 (proteínas y mRNA); ↓actividad de calcineurina.	Zhao et al., 2016
Ratones BALB/c *nude*; tumor xenográfico con MCF-7	Quercetina y complejo vanadio-quercetina.	Quercetina (100 mg/kg) y complejo vanadio-quercetina (20 y 45 mg/kg); 24 semanas.	Preservación de arquitectura normal del tejido mamario; ↓proliferación celular; ↑p53, ratio Bax/Bcl2 y apoptosis.	Roy et al., 2018

Ratas Wistar; tumor mamario inducido con DMBA	Miricetina.	50, 100 y 200 mg/kg; 120 días.	↓TBARS (plasma y tejido mamario); ↑SOD (lisado eritrocitos y tejido mamario).	Jayakumar et al., 2014
		Isoflavonas		
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Genisteína (GEN).	25 o 250 mg/kg en la dieta; desde GD 0 (*in utero*) hasta PND 21 (destete).	↓Número de tumores; ↓número de TEB y TD; ↓número de lóbulos tipo I.	Fritz, 1998
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Proteína de soja aislada.	30, 40 y 810 mg/kg en la dieta; desde PND 36 hasta PND 127.	No se observaron efectos quimiopreventivos.	Appelt y Reicks, 1999
Ratas F-344; tumor mamario inducido con NMU	Proteína de soja y proteína de soja pobre en isoflavonas.	10 y 20% (p/p) en la dieta; 19 semanas.	No se observaron efectos quimiopreventivos.	Cohen, 2000
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Proteína de soja aislada.	Total isoflavonas: 430 mg/kg en la dieta (276 mg GEN/kg y 132 mg daidzeína (DAZ)/kg); de GD 0 hasta 2 generaciones.	↓Incidencia de tumores (%).	Hakkak et al., 2000
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Extracto Soyselect™ (12% isoflavonas).	0,35 o 0,70% (p/p); desde destete (PND 21) hasta PND 218.	↑Grado de diferenciación del tumor; ↓porcentaje de REα y PRg en el tumor.	Gallo et al., 2001
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	GEN, DAZ, GEN + DAZ, proteína de soja y proteína de soja sin isoflavonas.	GEN o DAZ (200 mg/kg), GEN + DAZ (100 + 100 mg/kg), proteína de soja y proteína de soja sin isoflavonas (160 g/kg), en la dieta; desde PND 43 hasta PND 170.	↓Multiplicidad de tumores (solo con DAZ, proteína de soja y proteína de soja sin isoflavonas).	Constantinou et al., 2001
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Proteína de soja aislada.	Total de isoflavonas: 430 mg/kg en la dieta (276 mg/kg GEN y 132 mg/kg DAZ); desde GD 4 hasta PND 48.	↓EROD y MROD hepáticos; ↓CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 (mRNA y proteína en tejido mamario); ↓AhR y ARNT (aunque incrementó mRNA).	Rowlands et al., 2001
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Proteína de soja aislada.	20% (p/p) en la dieta; desde GD 4 (*in utero*) hasta PND 21, 33, 50 o PND 48-51 (fase metaestro).	↓Densidad de TEB (no significativa); ↑células RPg+ en TEB.	Rowlands, 2002

Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	GEN.	15, 150, y 300 mg/kg en la dieta; desde GD 0 (*in utero*) hasta PND 0.	↓17β-estradiol; ↑TEB; ↓lóbulos (en la descendencia a las 8 semanas).	Hilakivi-Clarke et al., 2002
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	DAZ.	250 mg/kg en la dieta; desde PND 0 hasta PND 21.	No se observaron efectos quimiopreventivos.	Lamartiniere et al., 2002
Ratas Sprague-Dawley (ovariectomizadas); tumor mamario inducido con DMBA	GEN.	25 y 250 ppm; 36 semanas.	↑Volumen medio de los tumores (con 25 ppm).	Ueda et al., 2003
Ratas Wistar (ovariectomizadas)	Grupo 1: Soylife, rutina y semilla de lino. Grupo 2: Novasoy y Soylife. Grupo 3: Novasoy y α-estradiol.	Grupo 1: Soylife (0,5%), rutina (0,25%) y 10% semilla de lino. Grupo 2: Novasoy (20, 40 y 80 µg/g) y Soylife (4, 8, 16 µg/g). Grupo 3: Novasoy (20, 40 y 80 µg/g) y α-estradiol (30 µg/g); dosis por peso corporal, 90 días.	Grupo 1: ↑*BRCA-1* (solo con semilla de lino). Grupo 2: ↑*BRCA-2* (solo con las dosis altas). Grupo 3: ↑*BRCA-1* (también proteína, solo con las dosis altas).	Vissac-Sabatier et al., 2003
Ratas Sprague-Dawley	GEN y proteína de soja aislada.	GEN (250 mg/kg en la dieta), proteína de soja aislada (total isoflavonas: 394 mg/kg en la dieta; 216 y 160 mg/kg GEN y DAZ, respectivamente); desde GD 4 (*in utero*) hasta PND 50.	↑Apoptosis en glándula mamaria; ↑PTEN; ↑*p21*, *Bax*, *Bok* (solo con GEN).	Dave et al., 2005
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	GEN y DAZ.	GEN (105 mg/kg) y DAZ (140 mg/kg) (p/p) en la dieta (ambos compuestos con y sin TAM); 114 días.	↓Multiplicidad de tumores, incidencia y latencia; ↓niveles de 8-OHdG.	Constantinou et al., 2005
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con NMU	Dieta de proteína de soja aislada.	Agua y dieta *ad libitum* durante todo el estudio; desde GD4 (*in utero*) hasta PND165.	↓Incidencia y latencia de tumores; ↑*HRE2/neu* y *RPg*; ↓progesterona en plasma.	Simmen et al., 2005
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Proteína de soja.	20% (p/p) en la dieta; 172 días.	↓Número e incidencia de tumores; ausencia de tumores invasivos grado II y III; ↑latencia de tumores; ↓angiogenésis; ↓VEGF y bFGF; ↓proliferación.	Mukhopadhyay et al., 2006

Ratas Big Blue ® (BB) (ovariectomizadas y normales); tumor mamario inducido con DMBA	GEN, DAZ y GEN + DAZ.	GEN o DAZ (0,25 o 1 mg/kg) o GEN + DAZ (1 mg/kg cada una), en la dieta; 23 y 27 semanas.	↓Mutagénesis inducida por DMBA (*lacI* y *Hprt*); ↑proliferación celular.	Manjanatha et al., 2006
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con NMU	GEN y proteína de soja aislada.	GEN (250 mg/kg en la dieta) y proteína de soja aislada (total isoflavonas: 394 mg/kg en la dieta (216 y 160 mg/kg GEN y DAZ, respectivamente); desde GD4 hasta el nacimiento (PND 0) (*in utero*), y durante toda la vida desde GD4 hasta PND 149.	↑Latencia de tumores; ↓multiplicidad de tumores; ↓grado de invasión del tumor). ↑E-caderina (en útero con GEN). ↓Incidencia de tumores; ↑apoptosis en TEB; ↑PTEN; ↑fosforilación de p53 (tras tratamiento con proteína de soja). No se observaron efectos consumiendo GEN durante toda la vida.	Su et al., 2007
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Leche de soja.	0,28 mg/mL de isoflavonas; 20 semanas.	↓Incidencia y multiplicidad de tumores mamarios.	Qin et al., 2007
Ratas Sprague-Dawley	Soja y soja + aceite de pescado.	Soja (0,5% (p/p) (705 mg/kg isoflavonoides) o soja + aceite de pescado (0,5% + 80 g/kg (p/p)) en la dieta; 14–15 días.	↑TEB; ↑RE-α y ↓RE-β (con soja). ↑Apoptosis (con soja + aceite de pescado).	Kramer et al., 2008
Ratas Sprague-Dawley (ovariectomizadas); tumor mamario inducido con DMBA	GEN, DAZ y extracción de soja.	GEN o DAZ (50 mg/kg) en la dieta, y extracción de soja (50 y 100 mg/kg) en la dieta; 20 semanas.	↓Tamaño del tumor (solo con la dieta de extracción de soja); ↓angiogénesis; ↑apoptosis; ↓ VEGF; ↑endostatina. Efectos distintos en la proliferación: ↑con GEN y ↓en la dieta de extracción de soja.	Kang et al., 2009
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Proteína de soja sin isoflavonas.	3,3 g/rata/día (administración en la dieta); 18 semanas (4 semanas antes y 14 semanas después de la administración de DMBA).	↓Crecimiento, incidencia y latencia de tumores; ↓HSP90 y NF-kB; ↑p53, p21, y caspasa-3; ↑actividad caspasa-3; ↓VEGF.	Park et al., 2009
Ratas Wistar; tumor mamario inducido con DMBA	GEN y GEN + licopeno.	GEN (2 mg/kg peso corporal) y GEN + licopeno (2 + 20 mg/kg peso corporal) (vía oral, 3 veces a la semana); 20 semanas.	↓Incidencia, crecimiento y desarrollo de tumores; ↓MDA, 8-isoprostano y 8-OHdG.	Sahin et al., 2011
Ratas Zucker (delgadas y obesas); tumor mamario inducido con DMBA	Proteína de soja aislada.	Total de isoflavonas: 3,24 mg/g proteína; 22 semanas.	↑Desarrollo de tumores (en ratas obesas); ↓IGFBP-3 y IGF-1.	Hakkak et al., 2011

Ratas WKA; tumor mamario inducido con EMS	GEN y dieta de soja.	GEN (0,03 y 1 mg/g en la dieta) y dieta de soja (no se proporciona la composición); 12 semanas (hasta 24 semanas ensayo de supervivencia).	No se observó efecto protector con GEN. ↑Periodo de latencia tras el consumo de la dieta de soja comparado con el grupo que consumió GEN.	Ono et al., 2012
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con PhIP	Leche de soja (sola o con *Lactobacillus casei* Shirota 2×10^{11} CFU/kg).	100 g/kg en la dieta (total de isoflavonas: 335 mg/kg).	Efectos con leche de soja: ↓Incidencia, multiplicidad de tumores y peso corporal. Efectos con leche de soja + *Lactobacillus casei* Shirota: ↓multiplicidad, diámetro de tumores, peso corporal y peso relativo del hígado; ↓REα+ y Ki-67; ↓densidad microvascular.	Kaga et al., 2013
Ratones atímicos *nude* (ovariectomizados); tumor xenográfico con MCF-7	GEN.	750 ppm; 5 días y 12 semanas.	↑Crecimiento de tumores; ↑crecimiento útero y tejido mamario; ↑TEB.	Hsieh et al., 1998
Ratones atímicos *nude* (ovariectomizados); tumor xenográfico con MCF-7	GEN y genistina.	GEN (750 ppm) y genistina (1200 ppm); desde PND 56 hasta PND 133.	↑Crecimiento del tumor y proliferación celular en el tumor MCF-7; ↑*pS2*.	Allred et al., 2001
Ratones *wild-type* (REαWT) y RE-α *knockout* (ERαKO); tumor mamario inducido con DMBA	GEN.	1 g/kg en la dieta; aproximadamente 34 semanas.	↑Tumores malignos (solo REαWT).	Day et al., 2001
Ratones BALB/c atímicos (ovariectomizados); tumor xenográfico con MCF-7	GEN.	0,125–1 mg/g en la dieta; 22 semanas.	↑Crecimiento de tumores (dosis-dependiente) y proliferación celular; ↑*pS2*.	Ju et al., 2001
Ratones BALB/c atímicos (ovariectomizados); tumor xenográfico con MCF-7	GEN (con TAM).	1.000 ppm; 32 semanas.	GEN atenuó los efectos de TAM: ↑crecimiento tumoral; ↑*pS2*, *RPg receptor* y *ciclina D1*; ↓17β-estradiol en plasma.	Ju et al., 2002
Ratones transgénicos MMTV-*neu*	GEN, DAZ y mezcla de isoflavonas (NovaSoy).	GEN o DAZ (250 mg/kg) y NovaSoy (250 mg GEN/kg) en la dieta; desde PND 42 hasta 37 semanas.	↑Periodo de latencia de los tumores.	Jin y MacDonald, 2002

Ratones FVB/N-TgN (MMTV-*neu*)	Dieta de soja (Purina 5001).	Total de isoflavonas: 491 mg/kg (227 mg/kg DAZ y 214 mg/kg GEN); 15–60 semanas.	↑Periodo de latencia de los tumores; ↑diferenciación de "*end buds"* distales.	Yang et al., 2003
Ratones BALB/c atímicos *nude* (ovariectomizados); tumor xenográfico con MCF-7	Harina de soja + mezcla de isoflavonas; melaza, Novasoy® (mezcla de isoflavonas y genistina).	El contenido de todas las dietas fue de 750 ppm de GEN aglicona; 11 semanas.	↑Crecimiento de tumores y proliferación celular; ↑*pS2* y *ciclina D1* (con NovaSoy, mezcla de isoflavonas y genistina). ↑*RPg* (con genistina).	Allred et al., 2004
Ratones SCDI; tumor xenográfico con MCF-7	SPC, GSI, té negro, té verde, SPC + té negro y SPC + té negro.	SPC (0,1 y 0,5%), GSI (0,014 y 0,028), té negro (1,5% (p/p)); té verde (1,5% (p/p)); PC + té negro y SPC + GT (0,1% + 1,5% (p/v)); 10 semanas.	↓Crecimiento de tumores (no con té negro); ↓proliferación; ↑apoptosis (té negro, té verde y mezclas); ↓densidad vasos sanguíneos (mezclas); ↓REα (té negro y mezclas); ↓IGF-I (SPC + té verde).	Zhou et al., 2004
Ratones FVB-Tg.NK (MMTV/c-*neu*) (*wild type*-HER2)	Harina de soja, altas dosis de proteína de soja aislada (AD) y bajas dosis de proteína de soja aislada (BD) (con o sin TAM).	Harina de soja (isoflavonas: 491 µg/g; 214 y 277 µg/g GEN y DAZ, respectivamente). Dieta AD (misma composición que harina de soja). Dieta BD (isoflavonas= 211 µg/g (137 y 74 µg/g GEN y DAZ, respectivamente); 60 semanas.	↓Incidencia de tumores (solo con la harina de soja). La dieta con bajas dosis inhibió el efecto quimiopreventivo de TAM: ↑proliferación celular.	Liu et al., 2005
Ratones FVB-Tg.NK (MMTV/c-*neu*)	Prevasteina® (66,5% GEN, 32,3% DAZ y 1,2% gliciteína).	Dieta suplementada con alto contenido en grasas (20% p/p) y con 0,004; 0,02 y 0,06% (p/p) de Prevasteina®; 24 semanas.	↑Tamaño y multiplicidad de tumores (solo con la mayor dosis).	Thomsen et al., 2005
Ratones BALB/c *nude* (ovariectomizados); tumor xenográfico con MCF-7	GEN (con o sin 17β-estradiol).	GEN: 500 ppm; 17 semanas.	↑Crecimiento de tumores (con o sin 17β-estradiol). ↑Peso húmedo del útero (en ausencia de 17β-estradiol).	Ju et al., 2006a
Ratones BALB/c atímicos (ovariectomizados); tumor xenográfico con MCF-7	GEN.	GEN: 500 ppm; 17 semanas.	↑Crecimiento de tumores. ↑Peso húmedo del útero.	Ju et al., 2006a
Ratones BALB/c atímicos (ovariectomizados); tumor xenográfico con MCF-7	DAZ y equol.	125–1.000 ppm; 21 y 37 semanas.	↑Crecimiento de tumor MCF-7 y *pS2* (solo con DAZ).	Ju et al., 2006b

Ratones SCID; tumor xenográfico con MCF-7	GEN y SPC (con o sin TAM).	GEN (0,07% p/p) o SPC (0,2 y 0,5% p/p) en la dieta; aproximadamente 80 días.	Efectos con GEN: ↓crecimiento del tumor; ↓*pS2* y *EGFR*; ↓proliferación; ↓17β-estradiol; ↑apoptosis (solo con TAM); ↓*RE-α*; ↓angiogénesis. Efectos con SPC: ↓crecimiento del tumor; ↑apoptosis; ↓proliferación (solo con 0,5% y con TAM); ↓angiogénesis (con TAM).	Mai et al., 2007
Ratones Tg.NK (MMTV/c-*neu*)	Prevasteina® (66,5% GEN, 32,3% DAZ y 1,2% gliciteína).	Dieta suplementada con alto contenido en grasas (24% p/p) y con 90 mg/kg de Prevasteina®; desde 2 semanas antes de la fecundación hasta PND 21; desde PND21 hasta el destete y desde 2 semanas antes de la fecundación hasta fin de estudio.	↓Incidencia de tumores. Inicio tardío de los tumores.	Luijten et al., 2007
Ratones BALB/c *nude* (ovariectomizados); tumor xenográfico con MCF-7Ca[9]	GEN (con o sin androstenediona y letrozol).	250, 500 y 1.000 ppm; 19 y 31 semanas.	En ausencia de androstenediona y letrozol: ↑crecimiento del tumor; ↓*pS2* (con 250 y 500 ppm); ↓*aromatasa* (con 1.000 ppm); ↑proliferación. En presencia de androstenediona y letrozol: ↑crecimiento del tumor (dosis-dependiente); ↑*pS2* (mRNA y proteína); ↑17β-estradiol, aromatasa, proliferación y peso húmedo del útero (dosis-dependiente).	Ju et al., 2008
Ratones BRCA-1^{tm1Cxd} heterocigotos (+/-) y ratones *wild-type*; tumor mamario inducido con DMBA	GEN.	500 ppm; desde PND 15 – PND 30.	Efectos en ratones *wild-type*: ↓incidencia de tumores y alto grado de malignidad; ↑*BRCA1*; ↓CK5 y CK18; ↓TEB; ↓RPg en tumor y glándula mamaria; ↓REα y HER2 en tumor; ↓*anfirregulina* y *RankI*. Efectos en ratones BRCA-1+/-: ↓CK5 y CK18; ↓TEB elongación ductal; ↓HER2 en tumor; ↓*anfirregulina*.	de Assis et al., 2011
Ratones transgénicos MMTV-HER2	Dieta enriquecida con soja al 20%.	Total isoflavonas: 2,6 mg/g en la dieta; desde 7 semanas de edad hasta fin de estudio (máximo de 60 semanas).	↓Incidencia de tumores mamarios con altos niveles de estrógenos, pero ↓tumores mamarios con bajos niveles de estrógenos.	Zhang et al., 2012

Ratones MMTV-*Neu* y ratones ERΔ3/*Neu*	Dieta de soja.	Total isoflavonas: 619 mg/kg en la dieta (GEN: 191 mg/kg; DAZ: 143 mg/kg; gliciteína: 39 mg/kg); desde 2 meses de edad hasta fin de estudio.	No se observaron efectos con la dieta de soja en el desarrollo de tumores; ↑lesiones metástasicas en ratones ERΔ3/*Neu*.	Davis et al., 2012
Ratones *nude nu*/*nu* Crl:NU-*Foxn1nu* (tumor xenográfico con MDA-MB-231) y ratones C3(1)-SV40 Tag	GEN (con o sin TAM).	250 mg/kg en la dieta; 5–6 semanas.	Efectos en ratones *nude nu*/*nu* Crl:UN-*Foxn1nu*: ↓crecimiento de tumores (con o sin TAM); ↑RE-α (gen y proteína); ↓DNMT1 y HDAC1 (gen, proteína y actividad enzimática). Efectos en ratones C3(1)-SV40 Tag: ↓crecimiento de tumores (con o sin TAM);↑latencia de tumores; ↑RE-α (gen y proteína); ↓DNMT1 (gen y actividad enzimática); ↓HDAC1 (gen, proteína y actividad enzimática).	Li et al., 2013
Ratones transgénicos Wnt1-Tg	Proteína de soja aislada.	Total de isoflavonas: 430 mg/kg en la dieta; desde PND 21 (destete) hasta fin de estudio.	Modulación de subpoblaciones epiteliales en tejido mamario; ↓progesterona, 17β-estradiol y ↓IL-6; modulación de genes implicados en inflamación, cascada de citoquinas y proliferación; ↓formación de mamoesferas en cultivo; ↓incidencia y latencia de tumores.	Rahal et al., 2013
Ratones transgénicos MTB-IGFIR	Proteína de soja aislada (dieta suplementada con DOX).	Total de isoflavonas: 1.660 ppm (daidzina: 463 ppm; DAZ: 95 ppm; genistina: 933 ppm; GEN: 101 ppm; glicetina: 57 ppm; gliciteína: 9 ppm); desde GD 0 (*in utero*) hasta PND 365.	↑Incidencia de tumores y tardíos; ↑marcadores implicados en la ruta RE (*Pgr* y *Areg*); ↑CK5, CK14 y p63; ↓metástasis pulmonares.	Watson et al., 2015
Ratones axénicos RAG2$^{-/-}$ atímicos trasplantados con suspensiones fecales de pacientes con cáncer de mama antes y tras quimioterapia (DOC/DOX); tumor xenográfico MDA-MB-231	GEN.	250 mg/kg; 8 semanas.	↓Crecimiento del tumor; ↑latencia del tumor; modulación de la microbiota en filo (ej: Filo Verrucomicrobia), familia (ej: *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*) y géneros como *Lactococcus* y *Eubacterium*.	Paul et al., 2017

Ratones transgénicos C3(1)-SV40 Tag	GEN y GEN + brotes de brócoli.	GEN (250 mg/kg), GEN + brotes brócoli (250 mg/kg + 13% (p/p)) en la dieta; desde las 4 semanas de edad hasta fin de estudio.	↑Latencia de tumores.	Paul et al., 2018
Ratones BALB/c; tumor xenográfico con 4T1	DAZ.	145 mg/kg (vía oral); 20 ejercicios de entrenamiento seguidos de la administración de 22 días de administración oral de DAZ.	Efectos con DAZ: ↓crecimiento del tumor; ↑Fas, FADD, Bax, Cyt-C y Apaf-1. ↑Activación de caspasas 3 y 9; y ↓Bcl-xL. Efectos con DAZ + ejercicio: ↓crecimiento del tumor; ↑IL-6 y epinefrina; ↑infiltración de células NK; ↑apoptosis; ↑Fas, FADD, Bax, Cyt-C y Apaf-1. ↑Activación de caspasas 3 y 9; y ↓Bcl-xL.	Wang et al., 2020
Procianidinas y flavan-3-oles				
Ratas Sprague-Dawley: doble modelo tumoral. DMBA para inducir tumor mamario y azoximetano para inducir focos de criptas aberrantes en colon	Semilla de uva rica en procianidinas.	0,1, 0,5 y 1% (p/p) en la dieta; 27 semanas.	Ningún efecto sobre los tumores mamarios.	Singletary y Meline, 2001
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Concentrado de zumo de uva (variedad concord).	Diluido en agua de bebida 1:2, 1:1 y 2:1 (cantidad de compuestos fenólicos 346, 519 y 642 mg/dL, respectivamente); 19 semanas.	↓Volumen y multiplicidad (solo con 519 mg/dL); ↓peso del tumor (con dosis de 346 y 519 mg/dL); ↓formación de aductos DMBA-DNA; ↑glutatión S-transferasa y catalasa hepática; ↓xantina oxidasa.	Jung et al., 2006
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Té verde rico en catequinas.	1% (p/p) en la dieta; desde PND 56 hasta PND 294.	↓Tamaño de tumores; ↑tasa de supervivencia.	Hirose et al., 1994
Ratas F344; tumor mamario inducido con PhIP	Té verde rico en catequinas.	1% (p/p) en la dieta; hasta 52 semanas.	↓Tamaño de tumores.	Hirose et al., 1995
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Té verde rico en catequinas.	0,01, 0,1 o 1% (p/p) en la dieta; 34 semanas.	↓Multiplicidad de tumores a 0,01 y 1% (no efecto dosis-dependiente).	Tanaka et al., 1997
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Té negro.	1,25, 2 y 2,5% (p/v) en el agua de bebida; hasta 17 semanas.	↓Peso y tamaño de los tumores (solo con 2%).	Rogers et al., 1998

Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Té verde.	0,3% (p/v) en el agua de bebida; desde PND 30 hasta PND 175.	↓Peso de los tumores; ↓capacidad invasiva; ↑latencia de tumores.	Kavanagh et al., 2001
Ratas F344; tumor mamario inducido con PhIP	Té verde rico en catequinas.	1% (p/p) en la dieta; 52 semanas.	↓Tamaño del tumor.	Hirose et al., 2002
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	EGCG.	0,065% (p/v) en el agua de bebida; durante toda la vida: desde PND 0 hasta PND 176.	No se observaron efectos en la formación de tumores mamarios.	Whitsett et al., 2006
Ratas F344 y ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con PhIP	Polyphenon E® (64,3% EGCG; 3,1% EGC; 9.1% EC; 8.1% ECG).	333 y 1.000 mg/kg peso corporal (vía oral, 7 veces a la semana); 121 días.	No se observaron efectos en la formación de tumores mamarios.	Lubet et al., 2007
Ratones BALB/c; tumor xenográfico con 4T1	Té verde rico en polifenoles (60% EGCG).	0,2 y 0,5% (p/v) en el agua de bebida; 36–60 días.	↓Crecimiento del tumor; ↓proliferación (PCNA); ↓metástasis pulmonares; ↑esperanza de vida; ↑activación de caspasa 3 y Bax/Bcl-2.	Baliga et al., 2005
Ratones transgénicos C3(1) SV40 T,*t* con múltiples adenocarcinomas mamarios	Té verde rico en catequinas o té negro rico en teaflavinas.	0,01 o 0,05% (p/v) en agua; desde 4 semanas de edad hasta fin de estudio.	↑Esperanza de vida; ↓diámetro del tumor; ↑activación de caspasa 3.	Kaur et al., 2007
Ratones atímicos *nude* (NCr-*nu*/*nu*); tumor xenográfico MDA-MB-231	Té verde rico en polifenoles y EGCG.	Té verde (1% (p/v) en agua de bebida y EGCG (1mg/ratón vía oral, disuelto en 100 mL de agua); 70 días.	↓Volumen del tumor; ↓proliferación celular; ↑apoptosis.	Thangapazham et al., 2007
Ratones C57BL\6; tumor xenográfico con E0771	EGCG.	0,5 g/L en agua de bebida; 24 días.	↓Crecimiento de tumores y angiogénesis; ↓VEGF en plasma y tumor.	Gu et al., 2013
Ratones BALB/c; tumor xenográfico con 4T1	Extracto de té verde.	0,6 g/kg (vía oral, diario); 4 semanas.	↓Tamaño del tumor; ↓metástasis en pulmón e hígado; ↓destrucción ósea.	Luo et al., 2014

Ratones BALB/c; tumor xenográfico con 4T1	EGCG.	0,25, 0,5, 1 y 2 mg/mL en agua de bebida; 51 días.	↓Crecimiento de tumores (dosis-dependiente); ↓acumulación de MDSCs en sangre, bazo y tumor; ↑células T CD4+ y T CD8+.	Xu et al., 2020
Ratones *nude* (ovariectomizados); tumor xenográfico con MCF-7	Extracto de té verde (con o sin TAM).	2,5 g/L en agua; 64 días.	↓REα; ↓volumen de tumores y angiogénesis; ↑necrosis y apoptosis (combinación con TAM fue más efectivo).	Sartippour et al., 2006
Ratas Wistar; tumor mamario inducido con MNU	Extracto de té verde; Epican Forte ((EF), 1g extracto de té verde + 0,7 g VitC, 50 mg de quercetina + aminoácidos); EF + nutrient mix (202 mg ácido ascórbico + 155 mg lisina + 12 mg prolina + 36 mg de flavonoides cítricos); EF + quercetina y EF + nutrient mix + quercetina.	Extracto de té verde (30 mg), EF (30 mg), EF + nutrient mix (130 + 405 mg), EF + quercetina (130 + 0,3 mg) y EF + nutrient mix + quercetina (130 + 405 + 0,3 mg); 60 días.	↓Volumen del tumor, peso y multiplicidad (con EF + nutrient mix + quercetina que fue el tratamiento más efectivo).	Kale et al., 2010
Ratones C3H/OuJ	Extracto de té verde (con o sin TAM).	0,1 o 1% (p/v) en agua; desde PND 70 hasta PND 336.	↓Incidencia de tumores (no se desarrollaron tumores en el grupo que consumió té verde + TAM); ↓proliferación.	Sakata et al., 2011
		Estilbenos		
Ratas Wistar; tumor mamario inducido con MNU	RSV.	10 y 100 mg/kg peso corporal (vía oral, 5 días/semana); 127 días.	RSV ejerció efecto con 100 mg/kg: ↓Incidencia y multiplicidad de tumores; ↑latencia de tumores; ↑diferenciación alveolar y de adipocitos.	Bhat et al., 2001
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	RSV.	100 µg/rata en la dieta; 127 días.	↓Inducción carcinoma ductal; ↓incidencia tumores y multiplicidad; ↑latencia de tumores; ↓activación NF-kB; ↓COX-2; ↓MMP-9.	Banerjee et al., 2002
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	RSV.	1 g/kg dieta; desde PND 0 (nacimiento) hasta el final del estudio (PND aproximado180).	↓Número de tumores; ↑latencia de tumores y apoptosis; ↑estructuras lobulares diferenciadas; ↓proliferación en TD.	Whitsett et al., 2006

Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	RSV.	100 µg/rata en la dieta; 24 semanas.	↓Daño ADN; ↓niveles 4-hidroxinonenal; ↓peroxidación lipídica; ↑apoptosis; ↑caspasa-3; ↓*5-LOX*; ↓formación LTB4; ↓NF-kB, p65; ↑TGF-β1; ↓proliferación celular.	Chatterjee et al., 2011
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con NMU	RSV (con o sin melatonina).	100 mg/kg en la dieta; 18 semanas.	↓Incidencia de tumores; ↓capacidad invasiva y carcinomas *in situ*.	Kisková et al., 2012
Ratas ACI; administración subcutánea de 17β-estradiol	RSV.	5 y 25 mg/kg/día; 21 semanas.	↓*DNMT 3b*; ↓*DNMT1* (solo con 25 mg/kg/día); ↑miRNA-21, miRNA-129, miRNA-204, miRNA-489 (en el tejido tumoral mamario).	Qin et al., 2014
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con NMU	RSV (con o sin celecoxib).	100 mg/kg peso corporal; 16 semanas.	Efectos de RSV + celecoxib: ↓Incidencia, volumen, frecuencia de tumores y número de tumores malignos; ↑latencia tumores mamarios; ↑*GDF15*; ↓*COX-2*; ↓ROS en linfocitos.	Kisková et al., 2014
Ratas Sprague-Dawley; exposición a TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina)	RSV.	7 ppm; desde GD7 hasta PND 0 (nacimiento).	↓TD + TEB; ↑"*buds*" alveolar; ↑AhRR; ↑*BRCA-1*; ↓*BRCA-1* promotor de metilación CpG; ↓*CDK4* y *ciclina* D1. Efectos dispares en *CYP1A1:* ↓PND 46 y ↑PND 71.	Papoutsis et al., 2015
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	RSV, RSV-CoQ10 SNEDDS, RSV-CoQ10-α-tocoferol SNEDDS.	RSV (50 mg/kg), RSV-CoQ10 SNEDDS y RSV-CoQ10-α-tocoferol SNEDDS (equivalente a 50 mg/kg RSV); 91 días.	↓Latencia y crecimiento de tumores; ↓MMP-2 y MMP-9; ↓IL-6 y TNF-α; ↑tasa de supervivencia. RSV-CoQ10-α-tocopherol SNEDDS fue el tratamiento más efectivo y se correlacionó con mayores niveles de RSV y CoQ10 en plasma.	Jain et al., 2017
Ratas Wistar; tumor mamario inducido con MNU	RSV.	20 mg/kg peso corporal; desde GD 10 hasta PND 21.	↓Número de tumores; ↓tamaño de tumores; ↑apoptosis; modulación de genes implicados en la apoptosis (caspasa3 y Bcl-2); modulación a nivel morfológico en el tejido mamario (como por ejemplo ↓TEB y TD).	de Lima E Silva et al., 2017
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con NMU	RSV.	100 mg/kg peso corporal (vía oral); 16 semanas.	↓Volumen, frecuencia e incidencia de tumores; ↑latencia de tumores; ↑número de leucocitos; ↑ROS en leucocitos.	Kiskova et al., 2017

Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	RSV.	50 mg/kg (vía oral, días alternos); 18 semanas.	Modulación de los niveles de estrógenos en plasma y tejido mamario.	Zhou et al., 2018
Ratones FVB/N HER2/*neu*	RSV.	1 mg/L diluido en agua (a cada animal se administraron 4 µg RSV/día); 11 semanas.	↓Número y tamaño del tumor; ↓metástasis pulmonares; ↑apoptosis; "*down-regulation*" HER2/neu.	Provinciali et al., 2005
Ratones atímicos *nude*; tumor xenográfico con GFP-MDA-MB-231	RQC.	0,5, 5 y 20 mg/kg peso corporal (3 veces por semana); 117 días.	↓Área de tumores (con 5 y 20 mg/kg).	Schlachterman et al., 2008
Ratones atímicos *nude*; tumor xenográfico con GFP-MDA-MB-231	RQC.	5 mg/kg peso corporal (3 veces por semana); 70 días.	↓Área de tumores y metástasis; modulación de expresión de genes implicados en la ruta PI3-quinasa.	Castillo-Pichardo et al., 2009
Ratones Hairless SCDI; tumor xenográfico con GFP-MDA-MB-231	RQC (con o sin gefitinib).	5 mg/kg peso corporal de cada compuesto (vía oral, 7 días a la semana); 84 días.	↓Crecimiento de tumores y metástasis (RQC + gefitinib fue el tratamiento más efectivo).	Castillo-Pichardo y Dharmawardhane, 2012
Ratones Hairless SCDI (xenográfico con GFP-MDA-MB-231) o ratones atímicos *nu/nu* (xenográfico con GFP-MDA-MB-435)	RSV.	0,5, 5 y 50 mg/kg peso corporal (vía oral 5 días/semana); 44 días (GFP-MDA-MB-435) o 108 días (GFP-MDA-MB-231).	↑Crecimiento de tumores; ↑metástasis pulmonares (solo significativo con 5 y 50 mg/kg); ↑activación de Rac.	Castillo-Pichardo et al., 2013
Ratones Δ16HER2	RSV.	1 mg/L diluido en agua (a cada animal se administraron 4 µg RSV/día); 15 semanas.	↓Latencia de tumores; ↑multiplicidad tumores; ↑*Δ16HER2*; ↓*REα*; inhibición de la actividad de proteasoma.	Andreani et al., 2017
Ratones homocigotos BALB\c, Crl:NU(NCr)-Foxn1^{nu}; tumor xenográfico con MBCDF-T	RSV (con o sin calcitriol).	1,2 g/kg (vía oral, 3 veces por semana); 3 semanas.	↓Angiogénesis (con RSV + calcitriol).	García-Quiroz et al., 2019
		Curcumina		
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Curcumina.	10 o 20 g/kg en la dieta; 107 días.	↑Latencia de tumores (solo con 20 g/kg).	Pereira et al., 1996

Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Curcumina, dibenzoilmetano.	Ensayo "*mammary adduct assay*": 0,2 y 1% de cada compuesto; 10 días. Inhibición de tumores: curcumina (1% p/p en la dieta) y dibenzoilmetano (0,1, 0,5 y 1% p/p en la dieta); 14 días.	Efectos con dibenzoilmetano: ↓Incidencia de tumores (dosis- dependiente); ↓formación de aductos DMBA-ADN (con 1%); ↑Glutatión S-transferasa hepática, quinona reductasa y EROD (con 1%).	Singletary et al., 1998
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Cúrcuma, extracto etanólico de cúrcuma, extracto acuoso de cúrcuma libre de curcumina.	Cúrcuma (1% p/p en la dieta), extracto etanólico de cúrcuma (0,05% p/p) y extracto acuoso de cúrcuma sin curcumina (1% en agua; p/v); 4 semanas (periodo iniciación) o 20 semanas (periodo post-iniciación).	Periodo iniciación: ↓incidencia, peso y multiplicidad de tumores (con cúrcuma y extracto etanólico de cúrcuma). Periodo post-iniciación: ↓multiplicidad de tumores (con extracto etanólico de cúrcuma y con extracto acuoso de cúrcuma libre de curcumina).	Deshpande et al., 1998
Ratas Wistar-MS; irradiación con rayos-γ (periodo gestacional) e implantación subcutánea de dietilestilbestrol	Curcumina.	1% en la dieta (p/p); 13 meses.	↓Incidencia de tumores; ↓prolactina en plasma; ↓TBARS.	Inano et al., 1999
Ratas Wistar-MS; irradiación con rayos-γ (periodo gestacional) e implantación subcutánea de dietilestilbestrol	Curcumina.	1% en la dieta (p/p); desde GD 11 hasta PND 0 (nacimiento).	↓Incidencia de tumores y latencia; ↑hormona luteinizante.	Inano et al., 2000
Ratones atímicos *nu/nu*; tumor xenográfico con MCF-7 o BT-474	Curcumina (con o sin ciclofosfamida).	25 g/kg en la dieta; 3 días.	↑Crecimiento del tumor (en ratones tratados con ciclofosfamida).	Somasundaram et al., 2002
Ratones *nude* atímicos *nu/nu*; tumor xenográfico con MDA-MB-435LVB	Curcumina (con o sin PAC).	2% en la dieta (p/p); 5 semanas.	↓Metástasis pulmonares; ↓activación de NF-kB; ↓COX-2 y MMP-9.	Aggarwal et al., 2005
Ratones CD-1 Foxn1^{nu}; tumor xenográfico con MDA-MB-231	Curcumina.	1% en la dieta (p/p); 35 días.	↓Metástasis.	Bachmeier et al., 2007
Ratones *nude* atímicos; tumor xenográfico con ENU1564	Curcumina o Meriva® (curcumina con isoflavonas).	Curcumina (2% p/p en la dieta) y Meriva (6% p/p en la dieta); aproximadamente 20 días.	Efectos con Meriva: ↓Metástasis en el pulmón derivadas del cáncer de mama; ↓niveles de MMP-9.	Ibrahim et al., 2010

Ratones *nude* (Foxn1^{nu}); tumor xenográfico con MDA-MB-231	Curcumina.	Curcumina (0,6% p/p en la dieta); 6 semanas.	↓Crecimiento de tumores; ↓NF-kB; ↓moléculas de adhesión plaqueto-endoteliales-1; ↓ciclina D1; ↓p65.	Bimonte et al., 2015
Ratones *nude* atímicos CD1; tumor xenográfico con MDA-MB-231	Curcumina (con o sin EGCG).	200 mg/kg/día; 10 semanas.	↓Volumen del tumor; ↓EGFR; ↓VEGFR-1; ↓Akt (efectos sinérgicos de curcumina y EGCG).	Somers-Edgar et al., 2008
Ratones NCr-*nu/nu*; tumor xenográfico con MDA-MB-231	Curcumina (con o sin PAC).	100 mg/kg; 5 semanas.	↓Diametro del tumor; ↓células PCNA+ en el tumor; ↑apoptosis; ↑MMP-9.	Kang et al., 2009
Ratones Swiss albino; tumor inducido por inyección con células de carcinoma ascítico de Ehrlich	Curcumina (con o sin DOX).	25 y 50 mg/kg peso corporal (vía oral, días alternos); 21 días.	↓Número de células cancerosas en el tumor; ↓toxicidad inducida por DOX; ↑tasa de supervivencia.	Sen et al., 2011
Ratones Swiss albino; tumor mamario inducido con DMBA	Curcumina (con o sin ciclofosfamida o PAC).	40 mg/kg peso corporal (vía oral); 4 semanas.	↓Volumen del tumor; ↓proteína quinasa; ↓NF-kB; ↓HDAC1 y 2 (curcumina potencia los efectos de ciclofosfamida y PAC).	Royt et al., 2011
Ratones SENCAR ("*SENsitive to CARcinogen"*); tumor mamario inducido con DMBA	Curcumina (con o sin DHA).	0,2% en la dieta (p/p); 19 semanas.	↓Incidencia, peso y anchura (por gramo corporal); ↑diferenciación y latencia; ↑REα; ↑proteína maspina; ↓survivina.	Siddiqui et al., 2013
Ratones atímicos *nu/nu*; tumor xenográfico con MDA-MB-231	Curcumina (con o sin ABT-888).	20 mg/kg peso corporal (3 veces por semana); 7 semanas.	↓Crecimiento del tumor.	Choi y Park, 2015
Ratones BALB\c; tumor xenográfico con MCF-10A-Tr	Curcumina (con o sin RSV).	20 mg/kg/día (de cada compuesto); 14 días.	↓Ciclina D1; ↓p21; ↓Gli-1; ↓SHH (27 y 52 kDa); ↓c-Myc (efectos sinérgicos de curcumina con RSV).	Mohapatra et al., 2015
Ratones BALB\c; tumor xenográfico con EMT6/P	Curcumina (con o sin metformina).	50 mg/kg (100 µL por "*gavage*" todos los días); 14 días.	↓Peso del tumor y necrosis; ↑apoptosis; ↑INF-γ y IL-4 (efectos sinérgicos de curcumina con metformina).	Falah et al., 2017
Ratones BALB\c; tumor xenográfico con 4T1	Curcumina (con o sin arabinogalactano).	100 mg/kg/día; 32 días.	↓Peso y volumen del tumor; ↓Ki-67; ↑p53.	Moghtaderi et al., 2017
Ratones BALB\c y *nude* atímicos; tumor xenográfico con células tumorales de mama BALB-neuT	Curcumina (con o sin cloroquina).	2 mg/50 mL aceite de maíz (3 veces por semana); hasta 35 días.	Efectos con curcumina: ↓volumen del tumor (también en presencia de cloroquina); ↑supervivencia; inducción de autofagia; ↓p62.	Masuelli et al., 2017

Ratones BALB/c *nu/nu* y ratones *nude* atímicos; tumor xenográfico con MDA-MB-231, 4T1, JC y TuBo	Curcumina-SMEDDS	100 mg/kg (vía oral, 100 µL de formulación SMEDDS); 1 o 2 meses.	↓Volumen del tumor.	Liu et al., 2019
Ratones homocigotos BALB/c, Crl:NU(NCr)-Foxn^{1nu}; tumor xenográfico con MBCDF-T	Curcumina (con o sin calcitriol).	40 mg/kg (vía oral, todos los días); 3 semanas.	Efectos de curcumina + calcitriol: ↓volumen del tumor; ↓angiogénesis; ↓*ITGB3* (gen integrina-β3).	García-Quiroz et al., 2019
Ratones Swiss albino; tumor inducido por inyección con células de carcinoma ascítico de Ehrlich	Curcumina (con o sin PAC o PAC + vitamina D_3).	50 mg/kg (vía oral, 3 veces por semana); 3 semanas.	Efectos con curcumina + PAC + vitamina D_3: ↓Volumen del tumor; ↓tasa de supervivencia; ↑necrosis. Efectos con curcumina + PAC: ↓Volumen del tumor; ↓tasa de supervivencia; ↑necrosis; ↑MRD-1.	Attia et al., 2020
Lignanos/Flavonolignanos				
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Harina de semilla lino.	5% (p/p) en la dieta; desde PND 21 (21 semanas después de la administración de DMBA) hasta PND 50.	↓Tamaño del tumor.	Serraino y Thompson, 1992
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Harina de semilla lino.	5% (p/p) en la dieta; 25 semanas.	Modulación de ácidos grasos ω-3 y ω -6 en la glándula mamaria y en el tumor mamario.	Serraino et al., 1992
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	SDG, aceite de semillas de lino y semillas de lino.	SDG (2,2 µM/día (vía oral disuelto en agua); aceite de semillas de lino (1,82% (p/p) en la dieta), semillas de lino (2,5 y 5% (p/p) en la dieta); 7 semanas.	↓Volumen e incidencia de tumores; ↓número de tumores por rata; modulación de ácidos grasos ω-3 y ω -6 en la glándula mamaria.	Thompson et al., 1996
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con MNU	Semillas de lino y SDG.	Semillas de lino (2,5 y 5%) y SDG 2,5 % (dieta baja en SDG) y 5% (dieta alta en SDG) porcentajes equivalentes a los grupos que consumieron semillas de lino; 22 semanas.	↓Capacidad invasiva; ↓diferenciación tumoral. ↓Multiplicidad de tumores (dieta alta en SDG) y ↑multiplicidad de tumores (dieta baja en SDG).	Rickard et al., 1999

Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con MNU	Semillas de lino y SDG.	Semillas de lino (5% p/p en la dieta) y SDG (1,5 mg equivalente al grupo que consumió semillas de lino); 4 semanas.	↓Niveles plasmáticos de IGF-1 (efecto también en grupo control sin inducción con MNU).	Rickard et al., 2000
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Semillas de lino y SDG.	Semillas de lino (10% p/p en la dieta) y SDG (20,1 mg/100 g en la dieta; equivalente al grupo que consumió semillas de lino); desde PND 0 hasta PND 21 (destete).	↓Incidencia, peso, número, tamaño y anchura de tumores.	Chen et al., 2003
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Harina de lino desgrasada.	152 g/kg en la dieta; desde GD 7 (*in utero*) hasta PND 0 (nacimiento).	↑Apoptosis; ↑*p53* (pero sin cambios en la cantidad de proteína).	Yu et al., 2006
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Semillas de lino.	5 y 10% (p/p) en la dieta; 2 periodos: desde GD 7 (*in utero*) hasta PND 0 (nacimiento), y desde PND 5 hasta PND 25.	Efectos 1º periodo: ↑REα (tejido ductal y lobular); ↓REβ (tejido lobular); ↑multiplicidad de tumores (con 10%); ↓latencia de tumores. Efectos 2º periodo: ↓REα (tejido lobular); ↓REβ (TEB y tejido lobular); ↑multiplicidad y ↓latencia de tumores (con 10%).	Khan et al., 2007
Ratas Sprague-Dawley axénicas; tumor mamario inducido con DMBA	Semillas de lino.	5% (p/p) en la dieta; 13 semanas.	↓Incidencia, crecimiento y proliferación de tumores; ↑apoptosis; ↑actividad enzimática hepática y en plasma de AT, SOD y glutatión S-transferasa (efectos en ratas colonizadas con bacterias metabolizadoras de lignanos[10]).	Mabrok et al., 2012
Ratas ACI hemiovariectomizadas; tumor mamario inducido con DMBA	SDG.	10 y 100 ppm; 3 meses.	↑ESR1; ↑ESR2; ↑CDH2 y ↓*MKI67* (solo con 10 ppm).	Delman et al., 2015
Ratones transgénicos TG.NK (MMTV/*c-neu*)	Aceite de semillas de lino (con o sin melatonina).	Aceite de semillas de lino (0,05, 0,1 y 0,2 mL) y aceite de semillas de lino + melatonina (0,1 + 100 mg/kg peso corporal); 30 semanas.	↓Peso del tumor; ↓IGF-1 en plasma; ↓número de tumores por ratón.	Rao et al., 2000

Ratones *nude* atímicos (Ncr *nu*/*nu*); tumor xenográfico con MDA-MB-435	Semillas de lino.	10% (p/p) en la dieta; 8 semanas.	↓Tasa de crecimiento de tumores; ↓metástasis; ↓Ki-67 ↓IFG-I; ↓EGFR.	Chen et al., 2002
Ratones *nude* atímicos (Ncr *nu*/*nu*); tumor xenográfico con MDA-MB-435	Semillas de lino.	10% (p/p) en la dieta; 7 semanas.	↓Tasa de crecimiento de tumores; ↓metástasis; ↓VEGF.	Dabrosin et al., 2002
Ratones BALB/c atímicos ovariectomizados (*nu*/*nu*); tumor xenográfico con MCF-7	Semillas de lino (con o sin TAM y en presencia de altas/bajas dosis de 17β-estradiol).	Semillas de lino (10% p/p) en la dieta; 6 y 7 semanas (con altas o bajas dosis de 17β-estradiol).	↓Volumen de tumores, ↓Ki-67; ↑apoptosis (con semillas de lino con o sin TAM a las 6 semanas); ↓peso de tumores (semillas de lino + TAM tras 6 semanas). ↓Volumen y peso de tumores con TAM a las 7 semanas.	Chen et al., 2004
Ratones *nude* atímicos (Ncr *nu*/*nu*); tumor xenográfico con MDA-MB-435	Semillas de lino, aceite de semillas de lino, SDG, aceite de semillas de lino + SDG.	Semillas de lino (10% p/p), aceite de semillas de lino (36,53 g/kg), SDG (0,2 g/kg), aceite de semillas de lino + SDG (36,53 + 0,2 g/kg), en la dieta; 6 semanas.	↓Incidencia de metástasis (pulmonares e invasión nódulos linfáticos);↓área del tumor; ↓apoptosis; ↓Ki-67; ↑niveles de MDA en el tumor.	Wang et al., 2005
Ratones *nude* atímicos (Ncr *nu*/*nu*); tumor xenográfico con MDA-MB-435	Semillas de lino, aceite de semillas de lino, SDG, aceite de semillas de lino + SDG.	Semillas de lino (10% p/p) en la dieta, aceite de semillas de lino (36,53 g/kg), SDG (0,2 g/kg), aceite de semillas de lino + SDG (36,53 + 0,2 g/kg), en la dieta; 7 semanas.	↓Incidencia de metástasis (pulmonares e invasión nódulos linfáticos).	Chen et al., 2006
Ratones BALB/c atímicos ovariectomizados (*nu*/*nu*); tumor xenográfico con MCF-7	Semillas de lino y semillas de lino + proteína de soja aislada.	Semillas de lino (10% p/p) y semillas de lino + proteína de soja aislada (10% + 20% p/p), en la dieta; 19 semanas.	El consumo de semillas de lino no tuvo efectos sobre el tumor, pero atenúo la estimulación producida por el consumo de proteína de soja aislada.	Saarinen et al., 2006
Ratones BALB/c atímicos ovariectomizados (*nu*/*nu*); tumor xenográfico con MCF-7	Semillas de lino.	10% (p/p) en la dieta; 5 semanas.	↓Crecimiento y angiogénesis en el tumor; ↓niveles extracelulares de VEGF.	Bergman Jungestrom et al., 2007
Ratones BALB/c atímicos ovariectomizados; tumor xenográfico con MCF-7	Semillas de lino (con o sin TAM).	5 y 10% (p/p) en la dieta; 16 semanas.	El consumo de semillas de lino solo tuvo efecto en la reducción del tamaño de los tumores formados mientras que con TAM se atenuó el crecimiento tumoral; ↓proliferación celular y apoptosis; ↓ciclina D1, HER2, GF-IR y RE-α.	Chen et al., 2007a

Ratones BALB/c atímicos ovariectomizados (*nu*/*nu*); tumor xenográfico con MCF-7	Semillas de lino (con o sin TAM).	5 y 10% (p/p) en la dieta; 8 semanas.	↓Crecimiento y proliferación de tumores; ↑apoptosis; ↑niveles de RE-α; ↓niveles de RPg; ↓IGF-1.	Chen et al., 2007b
Ratones BALB/c atímicos ovariectomizados (*nu*/*nu*); tumor xenográfico con MCF-7	Semillas de lino y semillas de lino + proteína de soja aislada.	Semillas de lino 10% (p/p) y semillas de lino + proteína de soja (10% + 20% p/p), en la dieta; 2 o 25 semanas.	↓Niveles de pMAPK (con 2 semanas). ↑Proliferación; ↑ciclina D1; ↑niveles RE-α (efectos a las 25 semanas con semillas de lino + proteína de soja).	Power et al., 2008
Ratones BALB/c *nude* atímicos; tumor xenográfico con MDA-MB-231	Semillas de lino y SDG.	Semillas de lino 10% (p/p) en la dieta y SDG (dosis equivalente consumida en la dieta con semillas de lino); 4 semanas.	↓Crecimiento de tumores. ↑zinc en plasma (con consumo de semillas de lino); ↓zinc en plasma (con consumo de SDG); ↑*LIV-1* (gen transportador de zinc).	Zhang et al., 2008
Ratones BALB/c atímicos ovariectomizados (*nu*/*nu*); tumor xenográfico con MCF-7	Semillas de lino, aceite de semillas de lino y SDG.	Semillas de lino 10% (p/p) en la dieta, aceite de semillas de lino (1 g/kg en la dieta) y SDG (18 g/kg en la dieta); 7 semanas.	Efectos con semillas de lino y SDG: Regresión de tumores; ↑apoptosis; ↓Bcl-2; ↓ciclina D1; ↓pS2; ↓RE-α and RE-β; ↓EGFR; ↓IGF-IR; ↓proliferación celular; ↓pMAPK (solo con SDG); ↓HER2 (solo con semillas de lino). Efectos con aceite de semillas de lino: ↓proliferación celular; ↑Bcl-2.	Chen et al., 2009
Ratones *nude* atímicos; tumor xenográfico con MA782, MCF-7, T47D, MDA-MB-435s	Mezcla de neolignanos aislados de Vitex Negundo.	20, 40 y 80 mg/kg (vía oral); 16 o 20 días.	↓Crecimiento de tumores (dosis-dependiente).	Zhou et al., 2009
Ratones BALB/c atímicos ovariectomizados (*nu*/*nu*); tumor xenográfico con BT-474	Aceite de semillas de lino + trastuzumab.	80 g/kg en la dieta; 4 semanas.	↓Crecimiento de tumores; ↓proliferación; ↑apoptosis.	Mason et al., 2010
Ratones BALB/c atímicos ovariectomizados (*nu*/*nu*); tumor xenográfico con MCF-7	Aceite de semillas de lino, SDG o aceite de semillas de lino + SDG (con TAM).	Aceite de semillas de lino 38,5 g/kg, SDG 1 g/kg y aceite de semillas de lino + SDG (38,5 y 1 g/kg) en la dieta; 7 semanas.	↓Crecimiento de tumores (solo con aceite de semillas de lino); ↓proliferación; ↑apoptosis; modulación de RE- y factores de crecimiento implicados en la ruta de señalización (mRNA y proteína)[11].	Saggar et al., 2010a

Ratones BALB/c atímicos ovariectomizados (*nu*/*nu*); tumor xenográfico con MCF-7	Aceite de semillas de lino, SDG o aceite de semillas de lino + SDG.	Aceite de semillas de lino 38,5 g/kg, SDG 1 g/kg y aceite de semillas de lino + SDG (38,5 y 1 g/kg), en la dieta; 7 semanas.	Regresión de tumores (solo con SDG); ↓proliferación; modulación de RE- y factores de crecimiento implicados en la ruta de señalización (mRNA y proteína)[11].	Saggar et al., 2010b
Ratones BALB/c atímicos ovariectomizados (*nu*/*nu*); tumor xenográfico con MCF-7	Aceite de semillas de lino.	40 g/kg en la dieta; 8 semanas.	↓Crecimiento de tumores; ↓proliferación; ↑apoptosis; ↓ratio ω-6/ω-3, pMAPK, Akt y HER2.	Truan et al., 2010
Ratones transgénicos Tg.NK (MMTV/c-*neu*)	Semillas de lino.	60, 180 o 540 mg/kg en la dieta; 2, 6 o 23 semanas.	↓Número de tumores por ratón; ↓incidencia de tumores (con 540 mg/kg); ↓glutatión S-transferasa (con 180 y 540 mg/kg); ↑enzimas del citocromo P450: CYP1A1 y 1A2 (con 60 mg/kg).	Birkved et al., 2011
Ratones BALB/c atímicos ovariectomizados (*nu*/*nu*); tumor xenográfico con MCF-7	Fracción cotiledónica aislada de semillas de lino.	82 g/kg en la dieta; 7 semanas.	Regresión de tumores; ↓proliferación celular; ↑AIB1; ↓HER2 y pHER2; ↓REα y pREα; ↓*IGF-IR* y *pS2*.	Chen et al., 2011
Ratones BALB/c *nude* atímicos (*nu*/*nu*); tumor xenográfico con MCF-7	Semillas de lino y enterolactona.	Semillas de lino 10% (p/p) y enterolactona 100 mg/kg, en la dieta); 20 días.	↓Tasa de crecimiento de tumores ; ↓angiogénesis; ↓IL-1β murina; ↑IL-1Rα murina y humana.	Lindahl et al., 2011
Ratones BALB/c atímicos ovariectomizados (*nu*/*nu*); tumor xenográfico con MCF-7	SDG y sesamina.	SDG (1 g/kg) y sesamina (1 g/kg); 8 semanas.	Efectos con SDG: ↓Proliferación; ↓HER2 y EGFR. Efectos con sesamina: ↓Crecimiento y proliferación de tumores; ↑apoptosis; ↓HER2, EGFR y p-MAPK.	Truan et al., 2012
Ratones BALB/c atímicos ovariectomizados *nu*/*nu;* tumor xenográfico con BT-474	Semillas de lino (con o sin trastuzumab).	10% (p/p) en la dieta; 5 semanas.	Efectos con semillas de lino + trastuzumab: ↓Crecimiento de tumores; ↑tasa supervivencia; ↓ratio ω-6/ω-3, p-Akt1 y *HER2*.	Mason et al., 2013
Ratones BALB/c atímicos ovariectomizados *nu*/*nu;* tumor xenográfico con BT-474	Semillas de lino (con o sin trastuzumab).	4% (p/p) en la dieta; 4 semanas.	Efectos semillas de lino + trastuzumab: ↓Crecimiento y proliferación de tumores; ↑apoptosis; ↓*ERBB2*, *EGFR* y *MAPK2*; ↓p-HRE2; ↓ratio ω-6/ω-3.	Mason et al., 2015
Ratones Swiss albino; tumor inducido por inyección con células de carcinoma ascítico de Ehrlich	Semillas de lino, comida de semillas de lino y aceite de semillas de lino.	10% de cada tratamiento; 3 semanas.	↑Latencia de tumores; ↓RE; ↓Ki-67, RPg, IGF, VEGF y MMP-2; ↑caspasa-3.	Ezzat et al., 2018

Ratones C57BL/6J; tumor mamario inducido con DMBA	Aceite de semillas de lino.	78 g/kg en la dieta; desde la gestación hasta PND 21.	↑Incidencia de tumores con carcinógeno. ↑TEB; pubertad adelantada; ↑17β-estradiol y proliferación de células en glándula mamaria; modulación rutas enzimáticas asociadas con cáncer (sin carcinógeno).	Li et al., 2018
Ratones C57BL/6J; tumor xenográfico con E0771	SDG.	25, 74 y 100 mg/kg en la dieta; 11 semanas.	En glándula mamaria no tumoral: ↓Estructuras en forma de corona; ↓*ADGRE1* y *Ccl2*. En glándula mamaria portadora de tumores: ↓Crecimiento del tumor; ↓*ADGRE1*; ↓p-p65; modulación de genes implicados en la ruta de NF-kB.	Bowers et al., 2019
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con MNU y ratones transgénicos MMTV-*neu*	Silimarina.	Ratas: 0,03, 0,1, 0,3 y 1% (p/p) en la dieta; desde PND 21 hasta PND 161; 140 días. Ratones: 0,3% (p/p) en la dieta; desde PND 28 o 120 hasta PND 10 meses.	En ratas: ↑Número de tumores. En ratones: ↑Multiplicidad e incidencia de tumores mamarios.	Malewicz et al., 2006
Ratones transgénicos FVB/N HER2/*neu*	Complejo silibina-fosfatidilcolina (IdB 1016).	450 mg/kg (equivalentes a 414 µM/kg silibina); administrada a diario o dos veces por semana durante 1 mes.	↓Incidencia de tumores, multiplicidad y metástasis pulmonares; ↓*HER*/*neu*; ↑senescencia; ↑infiltración de neutrófilos; células CD4 yCD8.	Provinciali et al., 2007
Ratones transgénicos C3(1) SV40 T, antígeno t carcinoma múltiple mamario	Silibina o silipida.	0,2% (p/p) en la dieta; hasta 177 días.	No se observaron efectos.	Verschoyle et al., 2008
Ratones BALB\c y ratones SCDI CB17-Prkdcscid/J; tumor xenográfico con 4T1	Silibina.	150 mg/kg (vía oral, 3 veces por semana); 4–5 semanas.	En ratones BALB\c: ↑Tasa de supervivencia; ↓crecimiento de tumores; ↓acumulación de MDSCs; ↑acumulación de células T; ↑TNF-α y IL-1β; ↓IL-10 y receptor quimiocina tipo 2. No se observaron efectos en los ratones SCDI.	Forghani et al., 2014
Ratones BALB\c *nude*; tumor xenográfico con MDA-MB-468	Silibina.	200 mg/kg; 45 días.	↓Volumen de tumores; ↓*COX-2*, *MMP-9* y *VEGF*; ↓COX-2 y VEGF.	Kil et al., 2014
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Silimarina	Dieta basal suplementada con 0,5% (p/p) de silimarina-NPs; 6 meses.	↑8-OHdG; ↑apoptosis; ↓ErbB-2 plasmático; ↓capacidad antioxidante total.	Ezzat et al., 2017

Ratones C57BL/6; tumor xenográfico con Ca 755	Silibina (libre o con lecitina).	20 mg/kg peso corporal (vía oral); 10 días.	↑Esperanza de vida	Feldman et al., 2018
		Taninos hidrolizables		
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	EA (con o sin selenometionina).	0,4 g/kg en la dieta; 25 semanas.	↓Acumulación del número de tumores (solo significativo en presencia de sulfuro de dialilo).	Ip y Ganther, 1991
Ratas F344; tumor mamario inducido con PhIP	EA.	0,1% (p/p) en la dieta; hasta 52 semanas.	No se observaron efectos significativos.	Hirose et al., 1995
Ratas F344; tumor mamario inducido con PhIP	EA.	0,1% (p/p) en la dieta; hasta 52 semanas.	No se observaron efectos significativos.	Hirose et al., 2002
Ratas ACI; tumor mamario inducido con 17β-estradiol	Bayas azules deshidratadas, frambuesa negra liofilizada y EA.	Bayas azules deshidratadas (1 y 2,5% (p/p) en la dieta); frambuesa negra liofilizada (1 y 2,5% (p/p) en la dieta) y EA (400 ppm); hasta 26 semanas.	↓Incidencia y multiplicidad de tumores; ↓*CYP1A1* y *17β-HSD7*; ↓COMT (con bayas azules). ↓Incidencia y crecimiento de tumores; ↑tamaño mamas y pituitaria; ↓*CYP1A1* y *CYP1B1*; ↓COMT (con frambuesas negras). ↓Incidencia, volumen y multiplicidad de tumores; ↓*17β-HSD7*; ↓COMT (con EA).	Aiyer y Gupta, 2010
Ratas ACI; tumor mamario inducido con 17β-estradiol	EA (con o sin 17β-estradiol).	400 ppm; hasta 28 semanas.	Modulación de expresión de miRNA (miR-206, miR-182, miR-375, miR-127, miR-183, miR-122) provocada por 17β-estradiol, y expresión de genes y proteínas "dianas" (REα, ciclina D1, RASD1, FoxO3a, FoxO1, ciclina G1, Bcl-w y Bcl-2).	Munagala et al., 2013
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Emulsión de granada.	0,2, 1 y 5 g/kg (vía oral, 3 veces por semana); 18 semanas.	↓RE-α, RE-β, y ratio ER-α/ER-β; ↓nivel y acumulación de β-catenina en citoplasma; ↓ciclina D1.	Mandal y Bishayee, 2015
Ratas Sprague-Dawley; tumor mamario inducido con DMBA	Emulsión de granada.	0,2, 1 y 5 g/kg (vía oral, 3 veces por semana); 18 semanas.	↓Incidencia, proliferación y tamaño de tumores; ↑apoptosis, Bax/Bcl-2 (mRNA y proteína), Bad, caspasas-3,-7 y -9, PARP, y cit-C.	Bishayee et al., 2016
Ratones Swiss albino; tumor inducido por inyección con células de carcinoma ascítico de Ehrlich	EA.	3 mg/kg; 50 días.	↓Crecimiento de tumores.	Srivastava et al., 2016

Ratones BALB\c atímicos *nude*; tumor xenográfico con MDA-MB-231	Penta-*O*-galoil-β-D-glucosa.	20 mg/kg/día peso corporal (vía oral); 36 días	↓Crecimiento de tumores.	Chai et al., 2010
Ratones BALB\c atímicos *nude*; tumor xenográfico con MDA-MB-231	Penta-*O*-galoil-β-D-glucosa.	10 mg/kg/día peso corporal (vía oral); 36 días	↓Crecimiento de tumores y metástasis; ↓Ki-67, CD34, p-STAT, y VEGF; ↑apoptosis.	Lee et al., 2011
Ratones BALB\c atímicos (*nu/nu)*; tumor xenográfico con MDA-MB-468	Galotanino.	0,5% en agua de bebida (p/v) o inyección intraperitoneal (10 mg/kg, 5 inyecciones/semana); 30 días.	↓Crecimiento de tumores; ↓CcnD1; ↑p-Chk2.	Zhao et al., 2014
Ratones SCDI; tumor xenográfico con MDA-MB-231 luciferasa 2	EA (con o sin MRS2179).	120 µg/mL en agua de bebida; 16 semanas.	↓Crecimiento de tumores y metástasis pulmonares.	Yokdang et al., 2015
Ratones transgénicos MMTV-PyMT	EA.	50 mg/kg/día (vía oral); 15 semanas.	↓Crecimiento y peso de tumores; ↓metástasis pulmonares; ↑tasa de supervivencia; ↑latencia de tumores; ↓poblaciones tumorales de "*stem cells*".	Wang et al., 2017

[1]Hexoquinasa, fosfoglucoisomerasa, aldolasa, glucosa-6-fosfato, fructosa-1,6-difosfato y fructosa-6-fosfato; **[2]**Colesterol total (libre y esterificado), fosfolípidos, triglicéridos, ácidos grasos libres; **[3]**$Na^{+}K^{+}$-, Ca^{+2}- y Mg^{+2}-ATPasa; **[4]**Hesperetina:MAN:SLS:DOSS (2.00:7.74:0.20:0.06); **[5]**TBARS, GSH, SOD, nitrato, carbonil proteínas, catalasas, GR, vitamina C y E; **[6]**Bcl-xL, Bcl-2 (Bad), citocromo C, VDAC, Bax, Apaf-1 y pro-caspasa-9; **[7]**MCF-7aro: línea celular de cáncer de mama MCF-7 transfectada con *CYP19* humano; **[8]**Vincristina formulada con ESM (esfingomielina):colesterol:PEG2000-ceramida:quercetina (72,5:17,5:5:5);); **[9]**MCF-7Ca: línea celular de cáncer de mama MCF-7 con expresión de aromatasa; **[10]***Clostridium saccharogumia*, *Eggerthella lenta*, *Blautia producto* y *Lactonifactor longoviformis*; **[11]**mRNA= pS2, PgR, REα, ERβ, CD1, EGFR, IGF-IR, Bcl2, HER2 y proteínas=REα, HER2, MAPK, AIB1, Akt. Abreviaturas: **ADGRE1**, receptor de adhesión tipo 1 acoplado a proteínas G; **AIB1**, receptor amplificado en la mama tipo 1; **AhRR**, represor del receptor de aril-hidrocarburo; **α-SMA**, actina del músculo liso alfa; **Bcl-2** (=**Bad**) agonista asociado con muerte celular; **bFGF**, factor de crecimiento básico de fibroblastos; **BCRA**, "*Breast cancer susceptibility protein*"; **CA 15-3**, marcador específico cáncer de mama; **COMT**, catecol-*O*-metiltransferasa; **COX-2**, ciclooxigenasa-2; **DAZ**, daidzeína; **DHA**, ácido docosahexaenoico; **DMBA**, 7,12-dimetilbenzantraceno; **DOC**, docetaxel; **DOX**, doxorrubicina; **EA**: ácido elágico; **EC**: epicatequina; **ECG**: epicatequina galato; **EGC**: epigalocatequina; **EGCG**, epigalocatequina galato; **EGFR** (=**HER**), receptor del factor de crecimiento tipo epidérmico; **EMS**, metanosulfonato de etilo; **EROD**, etoxiresorufin *O*-desetilasa; **GD**, día gestación; **GEN**, genisteína; **GSI**, mezcla de isoflavonas de soja rica en genisitina; **HDAC**: histona deacetilasa; **IGF-1**, factor de crecimiento insulínico tipo 1; **IRF-1**, factor regulatorio de interferón tipo 1; **LYVE-1**, receptor linfático endotelial tipo 1; **MDA**, *malondialdehído*; **MDSCs**, células supresoras derivadas de mieloides; **MROD**, metoxiresorufin *O*-desmetilasa; **NMU**, N-Nitroso-*N*-metillurea; **NPs**, nanopartículas; **NSD**, dispersión nanocristalina sólida; **PAC**, paclitaxel; **PARP**, poli(ADP) ribosa polimerasa; **PCNA**, antígeno de proliferación celular; **PhIP**, 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol(4,5-b)piridina; **PND**, día postnatal; **p/p**, peso/peso; **pS2**, marcador hormonal dependiente de cáncer de mama; **p/v**, peso/volumen; **PTEN**, homólogo de fosfatasa y tensina; **RASD1**, Ras inducida por dexametasona **RE**, receptor estrógenos; **RPg**, receptor progesterona; **RQC**, RSV + Quercetina + Catequina; **RSV**, resveratrol; **SDG**, secoisolariciresinol diglucósido; **SPC**, concentrado fitoquímico de soja; **SCID**, inmunodeficiencia severa combinada; **SMEDDS**, "*self-microemulsifying drug delivery system*"; **SNEDDS**, "*self-nanoemulsifying drug delivery system*"; **SOD**, superóxido dismutasa; **TAM**, tamoxifeno; **TBARS**, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, **TD**, ductos terminales; **TEB**, "*terminal end bud*"; **8-OHdG**, 8-hidroxi-2'-deoxoguanosina.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los antecedentes descritos en el **Capítulo 1** sugieren que podría haber una relación inversa entre el consumo de alimentos vegetales y la incidencia del cáncer de mama. Sin embargo, la evidencia en personas sigue siendo limitada. Además, tampoco se conoce quiénes podrían ser los responsables del efecto. Por tanto, esta Tesis surge como necesidad de 1) caracterizar moléculas derivadas del consumo de alimentos vegetales que podrían alcanzar el tejido mamario maligno y 2) evaluar su posible efecto quimiopreventivo en diferentes modelos.

No obstante, aunque numerosos estudios preclínicos utilizando distintos modelos de cáncer, celulares y animales, han indicado que diferentes compuestos fenólicos de la dieta o alimentos vegetales como la granada, uva, cacao, olivo, etc. son capaces de ejercer actividad anticancerígena mediada por diferentes mecanismos de acción, la evidencia en humanos sigue siendo poco concluyente. En general, durante décadas, han existido varias razones que han llevado a generar una gran brecha entre la evidencia *in vitro* e *in vivo*. Entre las principales razones destacan, además del bajo número de estudios en humanos y la dificultad para correlacionar sus posibles efectos, el hecho de que la gran mayoría de los estudios *in vitro* se han realizado con dudosa relevancia fisiológica al no tener en cuenta aspectos como la biodisponibilidad, el metabolismo y la distribución tisular de los compuestos fenólicos o sus metabolitos derivados. Estos aspectos son cruciales para poder conocer las formas moleculares y las concentraciones fisiológicas que llegan al microentorno tumoral, especialmente en tejidos sistémicos. Por lo tanto, siguiendo la recomendación de "primero *in vivo* y luego *in vitro*", hasta la fecha, debemos ser cautelosos con toda la evidencia acumulada sobre los efectos *in vitro* que muestran los compuestos fenólicos frente al cáncer de mama.

En este sentido, se ha descrito que tras el consumo de alimentos vegetales, diferentes derivados metabólicos (principalmente conjugados de Fase-II) pueden detectarse en sangre y en distintos tejidos sistémicos. Sin embargo, se desconocen cuáles son estos derivados metabólicos y a qué concentración pueden llegar al tejido tumoral mamario (TTM) donde podrían ejercer su efecto anticancerígeno.

Por tanto, considerando todo lo anterior, el **objetivo principal** de la presente Tesis Doctoral es '**identificar qué compuestos (formas moleculares y concentraciones) llegan al tejido tumoral mamario humano tras el consumo de una mezcla de extractos vegetales, representativos de la dieta y ricos en compuestos fenólicos. Esto permitirá abordar estudios mecanísticos, más representativos de la situación *in vivo*, y así evaluar el potencial efecto quimiopreventivo de estos metabolitos, fisiológicamente relevantes, frente al cáncer de mama**'.

Para abordar este objetivo principal se plantearán los siguientes objetivos específicos:

1) Determinar el perfil metabólico de compuestos fenólicos y metilxantinas tras el consumo de una mezcla de extractos vegetales, representativos de la dieta, en tejido mamario (sano y tumoral), plasma y orina de pacientes con cáncer de mama.

Para esta caracterización se realizará un estudio de intervención en pacientes con cáncer de mama que consumirán, entre el diagnóstico y la cirugía, cápsulas con una mezcla de extractos de granada, naranja, limón, olivo, cacao, semilla de uva, además de resveratrol (RSV). Posteriormente, se llevará a cabo una estrategia de metabolómica dirigida con todos los posibles compuestos (presentes en los extractos y metabolitos derivados, y tanto formas libres como conjugados de Fase-II) que puedan detectarse en las muestras biológicas. El análisis mediante cromatografía de ultra alta resolución (UPLC) acoplado a espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo (QTOF-

MS), tras la validación previa del método empleado, nos permitirá obtener un perfil cualitativo y cuantitativo de los compuestos que alcanzan el TTM, para evaluar su actividad biológica en diferentes modelos celulares de cáncer de mama, y utilizando condiciones más cercanas a la situación *in vivo*. No obstante, este estudio clínico nos plantea una limitación importante a la hora de valorar los resultados obtenidos, que será el ayuno prolongado de las pacientes previo a la cirugía, donde se podría perder información sobre posibles compuestos y/o concentraciones que quizá pudieran detectarse a tiempos más cortos.

2) Evaluar la farmacocinética en plasma y tejido mamario de la misma mezcla de extractos vegetales que consuman las pacientes con cáncer de mama utilizando un modelo animal (ratas SD).

Este estudio de farmacocinética nos permitirá obtener una mayor información de los metabolitos que pudieran llegar al tejido mamario, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, a tiempos más cortos tras el consumo de los extractos vegetales, pudiendo así evaluar e identificar diferencias con lo observado en el estudio con pacientes.

El estudio animal consistirá en administrar mediante sonda esofágica la mezcla de extractos vegetales que consumieron las pacientes con cáncer de mama a una dosis equivalente para los animales. Tras la administración, se recogerán muestras de plasma y tejido mamario a distintos tiempos y se analizará la farmacocinética de los metabolitos detectados en estas muestras biológicas.

Además, se pretende investigar la posible interferencia en la absorción y metabolismo de compuestos fenólicos cuando se consumen de manera conjunta en una mezcla, frente al hecho de consumirlos de manera individual, utilizando RSV como ejemplo.

3) Evaluar los efectos antiproliferativos a corto plazo de compuestos relevantes que alcanzan el tejido tumoral mamario.

Se evaluará la proliferación en células humanas de cáncer de mama dependientes (MCF-7) y no dependientes (MDA-MB-231) de estrógenos. Ambas líneas se tratarán a tiempos cortos de exposición (máximo de 72 horas) con los compuestos y/o metabolitos en las formas moleculares y concentraciones fisiológicamente relevantes, así como mezclas representativas, que se detecten en el tejido tumoral mamario de las pacientes.

Además, en la línea dependiente de estrógenos (MCF-7) se determinará la proliferación celular mediante un ensayo específico (E-SCREEN) para conocer si los compuestos y/o metabolitos, así como mezclas representativas, ejercen actividad estrogénica y/o antiestrogénica, dada la similitud estructural de algunos metabolitos fenólicos con la hormona estradiol.

Por otro lado, en ambos ensayos, se realizará una comparativa entre los efectos ejercidos por las formas libres y las conjugadas, tanto de fenólicos como de sus metabolitos derivados.

4) Evaluar el posible efecto quimiopreventivo mediado por senescencia a largo plazo de metabolitos del resveratrol detectados en el tejido tumoral mamario en diferentes modelos celulares de mama, tumorales y no tumorales.

Para llevar a cabo este ensayo se emplearán dos líneas de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231. Como control se utilizará un modelo celular de mama no tumoral (MCF-10A). Para los ensayos se empleará RSV, como ejemplo ilustrativo de fenólico que llega al tejido tumoral mamario, fundamentalmente en forma conjugada. Evaluaremos de forma individual RSV libre, sus metabolitos derivados de Fase-II y microbianos, y

también una mezcla representativa de aquellos metabolitos derivados de RSV que se detecten en el tejido tumoral de las pacientes.

Se evaluará el posible efecto anticancerígeno de estos compuestos a largo plazo (2 semanas) analizando: 1) la capacidad para inhibir la formación de colonias en varios modelos celulares de mama (tumorales y no tumoral); 2) la inducción de senescencia mediante el incremento de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-Gal); 3) alteraciones del ciclo celular; 4) la expresión de diferentes proteínas implicadas en rutas relacionadas con la senescencia celular y 5) la implicación de receptores estrogénicos y/o de transportadores ABC para que los metabolitos puedan inducir senescencia.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PATRONES

trans-Resveratrol (RSV), hesperetina (HP), ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido 2,6-dihidroxibenzoico, ácido gálico, hidroxitirosol (Hytyr), ácido elágico (EA), punicalagina, apigenina, rutina, hesperidina, eriocitrina, catequina, epicatequina, teobromina, cafeína, ácido 1,7-dimetilúrico, 3-metilxantina, dihidroxicumarina (DHC), crisina, y creatinina se obtuvieron de Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EE. UU.).

Los metabolitos conjugados de Fase-II y/o derivados de la microbiota, hidroxitirosol glucurónido (Hytyr-glur), resveratrol 3-*O*-glucurónido (RSV 3-glur) (de aquí en adelante, el enlace éster –*O*-glur, y –*O*-sulf se simplifica por –glur y –sulf, respectivamente), resveratrol 3-*O*-sulfato (RSV 3-sulf), resveratrol 4'-*O*-sulfato (RSV 4'-sulf), dihidroresveratrol 3-*O*-glucurónido (DH-RSV 3-glur) y dihidroresveratrol (DH-RSV) se obtuvieron por síntesis química (Lucas et al., 2009). Por otro lado, los metabolitos derivados de EA y sus conjugados de Fase-II, urolitina A (Uro-A), urolitina A 3-*O*-glucurónido (Uro-A 3-glur), urolitina A 8-*O*-glucurónido (Uro-A 8-glur), urolitina A sulfato (Uro-A sulf, la síntesis de este metabolito produjo una mezcla de regioisómeros 50:50 de Uro-A 3-*O*-sulf y Uro-A 8-*O*-sulf), isourolitina A (IsoUro-A), isourolitina A 3-*O*-glucurónido (IsoUro-A 3-glur), isourolitina A 9-*O*-glucurónido (IsoUro-A 9-glur), urolitina B (Uro-B), urolitina B 3-*O*-glucurónido (Uro-B 3-glur), urolitina B 3-*O*-sulfato (Uro-B 3-sulf), así como los derivados de flavanonas, hesperetina (HP), hesperetina 3'-*O*-glucurónido (HP 3'-glur) , hesperetina 3'-*O*-sulfato (HP 3'-sulf), hesperetina 7-*O*-glucurónido (HP 7-glur) y hesperetina 7-*O*-sulfato (HP 7-sulf) se obtuvieron de la empresa Villapharma (Fuente Álamo, Murcia, España). Por último, el metabolito

derivado de procianidinas, 5-(3',4'-dihidroxifenil)-ɣ-valerolactona-3'-*O*-sulfato (DHFV 3'-sulf) lo proporcionó el Dr. Del Rio (Parma, Italia).

1.1. Otros reactivos

17β-Estradiol, XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2*H*-tetrazolio-5-carboxanilida), MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), PMS (N-metil dibenzopirazina metil-sulfato), PBS (tampón fosfato salino), β-glucuronidasa (≥100.000 unidades/mL) de *Helix pomatia*, sulfatasa (>10.000 unidades/g) de *Helix pomatia*, DMSO (dimetilsulfóxido), ácido pícrico, hidróxido sódico (NaOH), fosfato disódico (Na_2HPO_4), tetraborato decahidratado disódico ($Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$) y albúmina sérica bovina (BSA) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EE. UU.). Suero bovino fetal tratado con carbón-dextrano (CD-SBF) HyClone™ se adquirió de GE Healthcare (Illinois, Chicago, EE. UU.).

Los disolventes orgánicos como metanol (MeOH) y acetonitrilo (ACN) utilizados en los diferentes protocolos se obtuvieron de J.T. Baker (Deventer, Overijssel, Holanda). Para todos los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral se usó agua desionizada que se obtuvo a través del "*Milli-Q system*" de Millipore (Bedford, Massachusetts, EE. UU.).

2. EXTRACTOS VEGETALES

Los extractos vegetales utilizados en esta Tesis Doctoral fueron extractos naturales comerciales y ampliamente consumidos en diferentes suplementos dietéticos. Estos extractos se adquirieron de la empresa Laboratorios Admira S.L. (Alcantarilla, Murcia, España).

Todos los extractos vegetales contaban con sus correspondientes hojas técnicas donde se detallaba el lote de fabricación, caducidad, parámetros analíticos, el análisis de su calidad microbiológica, etc. y que fueron suministrados, junto con el dossier del ensayo clínico, al comité de ética de investigación clínica del Hospital General Universitario Reina Sofía (Murcia) y al comité de ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid).

2.1. Composición de las cápsulas

Los extractos vegetales, se utilizaron para obtener una formulación en cápsulas que simulara un consumo variado, principalmente de compuestos fenólicos, ingeridos de manera habitual en una dieta rica en frutas y verduras. Esta mezcla de extractos encapsulada constituyó el suplemento que consumieron las pacientes del estudio clínico llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral que se detalla en el **apartado 3**. Laboratorios Admira S.L, se encargó de la encapsulación cumpliendo con las directrices de la Unión Europea, relativas a las buenas prácticas de fabricación ("*Good Manufacturing Practices*", GMP).

Según especificaciones de la empresa, a falta de confirmación con análisis posterior en nuestro laboratorio, cada cápsula estaba compuesta por un total de 700 mg de una mezcla de diferentes extractos vegetales, que se detallan a continuación:

- 53,85 mg RSV 99%.
- 80,77 mg extracto de granada con alto contenido en EA.
- 80,77 mg extracto de granada con alto contenido en punicalaginas.
- 53,85 mg de extracto de naranja.
- 53,85 mg extracto de limón.
- 161,54 mg extracto de olivo.

- 161,54 mg extracto de cacao.
- 53,85 mg extracto de semilla de uva.

2.2. Análisis del contenido de las cápsulas

Una caracterización más exhaustiva de los extractos contenidos en las cápsulas se llevó a cabo analizando de forma individual y por triplicado cada uno de los extractos vegetales que componían la mezcla (**Figura 3.1**). Para ello, se pesaron 50 mg de cada extracto individual y se extrajeron con 10 mL de una mezcla (40/40/20) compuesta por MeOH/DMSO/agua acidificada con un 0,1% de ácido clorhídrico (HCl). Esta mezcla se agitó con un vórtex durante 2 minutos y se mantuvo en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. A continuación, las muestras se centrifugaron a 4.000 x g durante 10 minutos, se recogió el sobrenadante y se filtró por un filtro de PVDF (polifluoruro de vinilideno) de 0,45 µm. A continuación, se inyectaron 20 µL de la muestra filtrada directamente en el equipo HPLC-DAD-ESI-IT-MS/MS (Agilent Technologies; Waldbronn, Alemania) utilizando las condiciones que se detallan en los **apartados 6.1** y **6.1.1**.

Esta extracción fue eficaz para los extractos de RSV, olivo, cacao y limón. Sin embargo, debido a la baja solubilidad de algunos compuestos presentes en altas concentraciones en los extractos de naranja y granada, fue necesario modificar el protocolo de extracción. En estos casos, se pesaron 15 mg del extracto y fueron extraídos con 5 mL de DMSO (100%). El resto del protocolo fue igual al descrito anteriormente.



Figura 3.1. Muestras de cada uno de los extractos vegetales que contenían las cápsulas.

Por último, para el análisis de proantocianidinas presentes en el extracto de semilla de uva, se utilizó el método de floroglucinolisis tal como se detalla en el siguiente apartado.

2.2.1. Análisis de proantocianidinas mediante floroglucinolisis

El método de floroglucinolisis consiste en una reacción que se desarrolla en condiciones ácidas que permiten una despolimerización de los compuestos dando como resultado monómeros de flavan-3-oles y aductos de éstos con floroglucinol (*m/z*$^-$ 124).

Para llevar a cabo este protocolo, se pesaron 50 mg de extracto de semilla de uva y se mezclaron con 800 µL de una solución de floroglucinol (50 g/L) y ácido ascórbico (10 g/L) en MeOH con HCl 0,1 N. Tras homogeneizar durante 10 segundos con un vórtex, las muestras se incubaron en un baño de agua caliente durante 20 minutos a 50 ºC. Transcurrido este tiempo, se paró la reacción poniendo los viales en hielo y añadiendo al medio de reacción 1 mL de acetato sódico 40 mM. A continuación, las muestras se centrifugaron a 4.000 x g durante 10 minutos y el sobrenadante se filtró por un filtro de PVDF de 0,45 µm antes de ser analizado por HPLC-DAD-ESI-IT-MS/MS con las condiciones que se detallan en el **apartado 6.1.1**.

3. ESTUDIO CLÍNICO POLYSEN

El estudio clínico realizado durante la presente Tesis Doctoral se registró con el nombre de POLYSEN en la base de datos de clinicaltrials.gov con el código de registro NCT03482401. Este estudio se llevó a cabo en el Hospital General Universitario Reina Sofía de Murcia (HGURS). El ensayo respetó la legislación y los principios éticos promulgados en la última Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial para la Investigación Médica que implica seres humanos (Asociación Médica Mundial, 2013) y fue evaluado favorablemente por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) (ref. 29/03/2017) de dicho hospital, y también por el Comité de Ética del CSIC (ref. 201770E081).

3.1. Diseño del estudio y reclutamiento de pacientes

El estudio fue presentado de forma detallada en un dossier a los comités de ética anteriores y que por su extensión, se resume a continuación.

El estudio fue una intervención dietética a través de una mezcla de diferentes extractos naturales, tal como se ha detallado anteriormente, los cuales son ricos en polifenoles y con presencia de metilxantinas (a través del extracto de cacao), en pacientes diagnosticadas con una lesión tumoral de mama que requería cirugía. En la **Figura 3.2** se muestra el díptico informativo que se entregaba a las pacientes en la consulta para informarles del estudio. Cada paciente fue informada de lo que se esperaba del estudio y de su participación con una detallada descripción de los objetivos, protocolos, uso de datos y muestras. La participación de cada paciente fue voluntaria, pudiendo retirarse cuando lo deseara.



Figura 3.2. Díptico informativo del estudio clínico POLYSEN que se repartía a las pacientes que acudían a la consulta de la unidad de mama del HGURS, con una lesión de mama que requería cirugía.

El estudio no implicó ningún tipo de restricción para la paciente y la única condición fue la de consumir 3 cápsulas (**Figura 3.3**) diarias desde el diagnóstico hasta la cirugía. Cada voluntaria, previo a su participación, firmó por duplicado una hoja de consentimiento informado (copia para ella y para el personal médico de quien dependía su seguimiento y que le informó del ensayo) donde se incluía una hoja de información detallada del estudio clínico, la cual se muestra a continuación. Cada paciente recibió un formulario para anotar cualquier tipo de incidencia, incluido el olvido de ingesta de cápsulas.



Figura 3.3. Bote de cápsulas que se entregaba a cada paciente que participó en el estudio clínico.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

<u>TÍTULO DEL ESTUDIO</u>: Detección de compuestos bioactivos de la dieta y sus derivados metabólicos en tejido mamario de pacientes con lesión tumoral de mama. (Estudio Polysen)

INVESTIGADOR PRINCIPAL
-Dr. Juan Carlos Espín de Gea. (Grupo Alimentación y Salud; CEBAS-CSIC; Murcia).
PERSONAL MÉDICO RESPONSABLE:
-Dra. Beatriz Abellán Rosique. (Hospital General Universitario Reina Sofía; Murcia)

El grupo Alimentación y Salud, del CEBAS-CSIC de Murcia, viene investigando desde hace más de 15 años la acción beneficiosa de unas sustancias presentes en alimentos vegetales (llamadas polifenoles y carotenoides). Este hospital ha colaborado anteriormente con el CEBAS-CSIC en diversos estudios, incluyendo pacientes con cáncer de próstata y también de colon.

Se ha podido demostrar una actividad beneficiosa de diversos polifenoles presentes en frutas y hortalizas, frente al cáncer de mama en estudios con animales. Sin embargo, aún no hay ningún estudio que haya demostrado que estos compuestos pueden llegar al tejido mamario de mujeres.

Por esta razón hemos proyectado el presente estudio para determinar si diversos polifenoles de la dieta o sus derivados metabólicos se pueden detectar en el tejido mamario de mujeres con lesión tumoral de mama.

<u>¿Cómo se realizará este estudio?</u>

Usted puede participar porque se le ha diagnosticado una lesión tumoral en la mama que requiere cirugía. Para participar, desde el momento del diagnóstico hasta la cirugía, usted deberá tomar **3 cápsulas diarias** que contienen extractos vegetales (uva, granada, naranja, olivo y cacao). Se presenta en cápsulas para mayor comodidad y control del producto ingerido. Estas tres cápsulas diarias equivaldrían en su contenido en polifenoles bioactivos, aproximadamente, a 2 racimos de uva, 1 vaso de zumo de naranja, 1 vaso de zumo de granada, 1 ración de aceite de oliva virgen y una ración de chocolate sin grasa con cacao puro. Las 3 cápsulas las puede tomar en el momento del día que prefiera. Las puede tomar a la vez o separadas a lo largo del día. No importa que sea antes o después de las comidas. Sin embargo, recuerde que es imprescindible tomar las 3 cápsulas por la noche el día previo a la intervención.

El día de la cirugía, se obtendrá una muestra de sangre (a través de la vía) y de orina en un recipiente que le daremos. Una vez intervenida, el cirujano dará el tejido mamario al servicio de Anatomía Patológica el cual, tras su análisis, guardará en su Servicio parte del tejido y dará una porción para su estudio en este proyecto.

El estudio es realizado por médicos de este Hospital y científicos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente al Hospital General Universitario Reina Sofía y cumple con la legislación vigente: (*Declaración de Helsinki, Convenio de Oviedo, Ley 274/2002 de autonomía del paciente, Ley orgánica de protección de datos 15/1999 y Ley 14/2007 de investigación biomédica*).

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria y puede decidir no participar o cambiar su decisión en cualquier momento, sin que por ello se produzca perjuicio alguno, pudiéndose retirar del estudio y pedir que se anulen todos los datos recogidos hasta el momento de su decisión. La participación en el estudio no le supondrá coste alguno. No hay remuneración económica para usted, ni para el Hospital G. U. Reina Sofía, ni para los investigadores del CSIC.

Las porciones de tejido utilizadas para este estudio serán destruidas una vez finalizado el mismo. Este estudio no implica ningún riesgo para usted, aunque tampoco beneficio inmediato al tratarse de una investigación básica. Sin embargo, los datos obtenidos pueden ser de interés científico, y la información recogida en este estudio será empleada para el estudio de la fisiopatología/historia natural de lesiones tumorales de mama.

En este estudio se recogerán datos de su Historia Clínica. La información recogida será únicamente empleada para investigación clínica y adicionalmente para su comunicación a las Autoridades Sanitarias Nacionales. Todos sus datos serán reconocidos mediante un código y sólo su médico del estudio podrá relacionar dichos datos con usted y su historia clínica.

Conforme a las disposiciones legales, si lo desea, usted tiene derecho a conocer los datos del estudio que sobre usted se recojan, a obtener una copia, y a conocer el uso que puedan darse a los mismos. Dicha información le será suministrada por el investigador responsable.

Si posteriormente desea hacer alguna pregunta, o revocar el consentimiento, se pondrá en contacto con la Dra. Beatriz Abellán de este hospital. Tel: Ext:

Servicio Murciano de Salud

HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____

He leído la hoja de información que se me ha entregado acerca del estudio:

Detección de compuestos bioactivos de la dieta y sus derivados metabólicos en tejido mamario de pacientes con lesión tumoral de mama. (Estudio POLYSEN).

He podido hacer preguntas sobre el estudio y me han sido aclaradas todas las dudas.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con el/la Dr (a) _____

Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo revocar el consentimiento sin tener que dar explicaciones.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio

Murcia, a de de 20

Firma del paciente Médico

****

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO:

Deseo retirarme del estudio, y que mis datos no consten en los archivos del mismo

Murcia, a de de 20

Firma del paciente Médico

El ***reclutamiento de pacientes*** se realizó a través de la Unidad de Mama del HGURS de Murcia. Cada paciente fue informada del protocolo a seguir. Una vez cumplidos los criterios de inclusión/exclusión (detallados a continuación), cada paciente fue asignada a uno de los dos grupos aleatoriamente: consumidoras de extractos (polifenoles) y no consumidoras (control), si bien se acordó que el número de las participantes del grupo "polifenoles" fuera aproximadamente el doble que en el grupo control. Las muestras "control" (pacientes que no consumieron los extractos, pero que dieron su consentimiento para el uso de sus muestras) de tejido mamario, sangre y orina fueron necesarias como referencia en los estudios analíticos. Un total de 27 pacientes completaron el estudio, el diagrama de flujo de pacientes de este estudio clínico se muestra en el correspondiente capítulo de resultados (**Capítulo 4**).

Criterios de inclusión en el ensayo clínico:

- ☑ Edad mayor o igual a 18 años.
- ☑ Paciente con lesión tumoral (benigna o maligna) diagnosticada y que requiere cirugía programada.
- ☑ El tiempo desde diagnóstico hasta cirugía debe ser suficiente para que la paciente pueda consumir las cápsulas durante 3 o más días.
- ☑ Paciente que haya entregado firmado el consentimiento informado.

Criterios de exclusión en el ensayo clínico:

- ☒ Incumplimiento de alguno de los criterios de inclusión.
- ☒ Embarazo/lactancia.
- ☒ Uso de antibióticos en 1 mes antes del ensayo o en el transcurso de este.
- ☒ Alergia o intolerancia conocida al consumo de granada, oliva, naranja o cacao (no es aplicable al polen).
- ☒ Colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, úlcera u otra enfermedad crónica gastrointestinal.
- ☒ Consumo de suplementos alimenticios o extractos botánicos.

Tamaño de la muestra. Al ser un estudio exploratorio de biodisponibilidad y metabolismo donde no se buscaba un cambio específico en una variable clínica, no procedía calcular el tamaño de la muestra con el fin de ver diferencias cuantitativas definidas en esta población. Por tanto, el tamaño de la muestra estuvo condicionado por la frecuencia de casos a estudiar (cirugías programadas en el hospital) y las posibilidades de reclutamiento de la unidad participante.

3.2. Muestras de tejido mamario, plasma y orina

La recogida de muestras biológicas (tejidos, sangre y orina) se realizó en el HGURS a través del Servicio de Cirugía.

El día de la cirugía se recogían las muestras de tejido mamario, plasma y orina de cada paciente. La paciente dejaba una duquesita con la orina de primera hora de la mañana en su habitación antes de que el celador/a la bajará a quirófano.

Durante la intervención quirúrgica se extraía de la vía de la paciente un "*vacutainer"* de 5 mL con EDTA, el cual se centrifugaba tras su recepción a 3.500 rpm durante 10 min en una centrifuga Benchtop universal 320 (Andreas Hettich GmbH & Co; Tuttlingen, Alemania) para obtener el plasma.

El tejido mamario se recibía "en fresco" durante la cirugía en el Servicio de Anatomía Patológica, donde los patólogos tenían que confirmar si los márgenes estaban libres de lesión tumoral o no, para informar inmediatamente a los cirujanos que estaban interviniendo a la paciente y así, finalizar la cirugía o extirpar más cantidad de tejido para asegurarse que la lesión se había extirpado en su totalidad. Sin embargo, cuando la cirugía consistía en una mastectomía no se seguía la secuencia anterior; la resección de la pieza mamaria completa llegaba al Servicio de Anatomía Patológica para un posterior análisis en profundidad por parte de los patólogos (**Figura 3.4**).

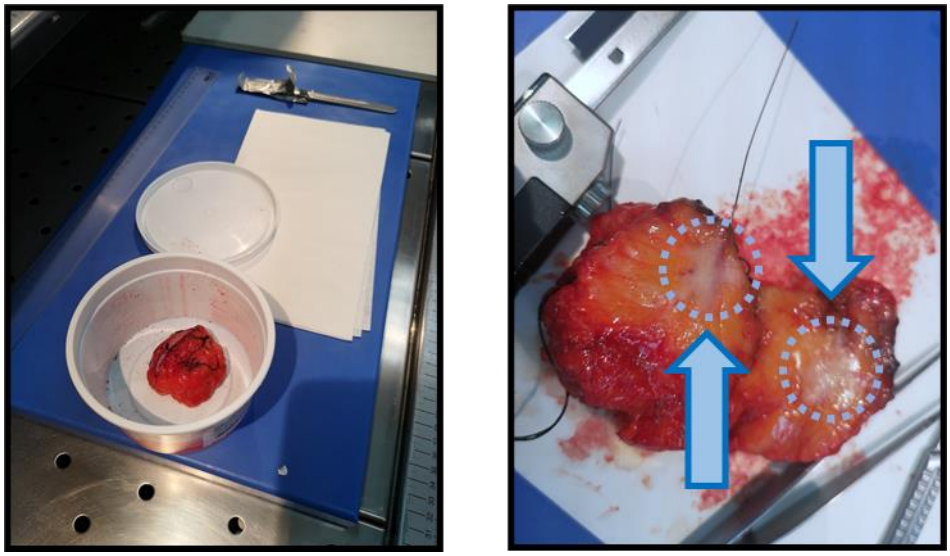


Figura 3.4. Tejido mamario "en fresco" extirpado de una paciente con cáncer de mama. A la izquierda se muestra la recepción del tejido mamario extirpado y a la derecha el tejido mamario tras el corte diferenciándose el tejido tumoral (zona blanquecina señaladas con flechas) del sano.

En todos los casos, el patólogo diferenciaba macroscópicamente el tejido sano mamario (TSM) y tumoral (TTM) de la muestra que llegaba, y nos daba una porción de cada uno de ellos. En aquellos casos en los que fue posible, también se nos facilitó una pequeña porción de tejido adiposo mamario que nos serviría para poder comparar entre dos tejidos sanos de distinta índole (glandular y adiposo).

Todas las muestras eran transportadas debidamente refrigeradas al CEBAS-CSIC donde se almacenaban a -80 ºC para su posterior análisis.

3.3. Protección de datos y privacidad

Una vez que la paciente se incorporaba al estudio, recibió una única identificación alfanumérica que hacía alusión al nº de paciente + sigla P (estudio POLYSEN) + tipo de muestra (Tejido=T; Orina=O; Plasma=P) y tipo de tejido (Sano=S; Maligno=M; Adiposo=A).

-Ejemplo tejido: 1PTS (voluntaria 1, tejido sano), 7PTM (voluntaria 7, tejido maligno), 9PTA (voluntaria 9, tejido adiposo).

-Ejemplo orina: 5PO (voluntaria 5, orina).

-Ejemplo plasma: 4PP (voluntaria 4, plasma).

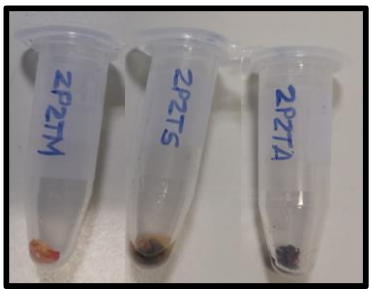


Figura 3.5. Muestras recogidas tras la cirugía en tubos eppendorf® de 5mL de cada uno de los tipos de tejido mamario.

3.4. Extracción de metabolitos en las muestras de tejido mamario, plasma y orina

3.4.1. Extracción de metabolitos en tejido mamario

Para la extracción de metabolitos en tejido mamario, TSM y TTM, se pesaban 250 mg aproximadamente siempre que era posible, ya que a veces no se disponía de muestra suficiente (el tamaño del tumor era un factor limitante para la cantidad de muestra que podíamos obtener). La cantidad pesada se lavaba con 5 mL de PBS para eliminar posibles restos de sangre y otros posibles contaminantes. Las muestras se homogeneizaron con 1,25 mL de MeOH:HCl (99,9:0,1 v/v) en un Bullet Blender Homogenizer (Next Advance; Averill Park, EE. UU.) durante 5 minutos a máxima potencia. Algunas muestras necesitaron de un segundo o tercer ciclo adicional para su completa disgregación. Para la disgregación de los tejidos se utilizaron bolas de acero (Next Advance), de las que se ponían 3 cucharadas de bolas 0,9-2 mm y 2 bolas de 3,2 mm (**Figura 3.6**) a cada tubo que contenía la muestra pesada. Después las muestras se sonicaban en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos y se centrifugaban a 10.000 x g durante 5 minutos a 4

ºC. El sobrenadante se evaporaba a alta presión en un "*speed vacuum"* Savant SPD121P (Thermo Scientific; Alcobendas, España), se resuspendía 200 µL de MeOH, y se filtraba por filtros Minisart4 de celulosa regenerada (RC) (Sartorius Stedim Laboratories; Stonehouse, Reino Unido) para inyectarlas en el UPLC-ESI-QTOF-MS tal como se detalla en el **apartado 6.2.**



Figura 3.6. Bolas de acero utilizadas para disgregar las muestras de tejido mamario.

De las muestras de tejido adiposo (TA) solo se pudo obtener de 3 pacientes del grupo "polifenoles". Estas muestras se procesaron como las muestras de TSM y TTM, con la única excepción de ser lavadas con 0,4 mL de hexano antes de la homogenización.

En las muestras de tejido mamario se añadían dos patrones internos que nos servían de controles de calidad: 0,2 ppm de DHC antes de la extracción y 0,1 ppm de crisina antes de inyectar en el UPLC-ESI-QTOF-MS.

Hidrólisis enzimática de tejido mamario. De aquellas muestras (TSM y TTM) de las que se dispuso de cantidad suficiente se realizó también la hidrólisis enzimática con β-glucuronidasa y sulfatasa para poder cuantificar aquellos compuestos de los que no disponíamos del patrón del metabolito conjugado. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo utilizando el protocolo que se ha detallado anteriormente para las muestras de TSM y TTM, pero una vez evaporado el sobrenadante, este se resuspendía en 500 µL de acetato

sódico 0,1 M, y se incubaba con 25 µL de β-glucuronidasa y 3 mg de sulfatasa durante 17 horas a 37 ºC con suave agitación. Tras la incubación, las muestras se extraían dos veces con 2 mL de acetato de etilo y se evaporaba. Finalmente, se resuspendían en 200 µL de MeOH y se inyectaban en el UPLC-ESI-QTOF-MS tal como se detalla en el **apartado 6.2**.

3.4.2. Extracción de metabolitos en plasma

De cada muestra de plasma se tomaba una alícuota de 200 µL a los que se añadían 600 µL de ACN:Ácido fórmico (98:2 v/v) para la precipitación de proteínas. Las muestras se centrifugaban a 14.000 x g, durante 10 minutos a 4 ºC. El sobrenadante se evaporaba hasta sequedad en un "*speed vacuum*". Posteriormente, se resuspendía en 100 µL de MeOH y se filtraba por filtros de RC antes de pasar el volumen al vial para inyectar la muestra en el equipo de cromatografía UPLC-ESI-QTOF-MS tal como se detalla en el **apartado 6.2**. Al igual que se ha detallado en el **apartado 3.4.1**, en las muestras de plasma se añadían también dos patrones internos como controles de calidad.

3.4.3. Análisis de metabolitos en orina

Las muestras de orina se centrifugaban a 14.000 x g durante 10 minutos, se filtraban y se realizaba una dilución 1:3 para la cuantificación de compuestos fenólicos y 1:10 para la cuantificación de metilxantinas, en ambos casos con agua acidificada con 0,1% de ácido fórmico. En algunas muestras fue necesario hacer una dilución 1:50 para cuantificar los metabolitos derivados de RSV debido a su elevada concentración. Al no ser posible la recolección del volumen de orina de 24 horas y disponer solo de una muestra puntual, se midió la concentración de creatinina mediante el método de Jaffé de cada muestra tal como lo describen Bolca et al. (2009) para poder normalizar las concentraciones de cada

metabolito cuantificado (Bolca et al., 2009). Las muestras se filtraron por filtros de PVDF de 0,45 µm antes de su inyección en el UPLC-ESI-QTOF-MS.

4. MODELOS ANIMALES

Durante la presente Tesis Doctoral se ha utilizado un modelo murino para evaluar la farmacocinética en tejido mamario y en plasma, de diferentes compuestos fenólicos y metilxantinas.

Debido al ayuno prologando antes de la cirugía (entre 8-12 horas) al que se sometían las pacientes del estudio clínico detallado en el **apartado 3**, se decidió evaluar en un modelo animal si tras el consumo de los diferentes extractos vegetales empleados en el estudio clínico, se podían alcanzar concentraciones más altas y/o presencia de más metabolitos a tiempos más cortos tanto en tejido mamario como en plasma.

Ratas Sprague-Dawley (SD). Las ratas SD son albinas y es la rata no consanguínea más ampliamente usada en investigación, en campos como toxicología, nutrición y oncología. Son animales de fácil manejo por su temperamento dócil.

Los animales fueron adquiridos del Servicio de Experimentación animal de la Universidad de Murcia y estuvieron estabulados en jaulas de grupos de 3-4 animales en salas con las siguientes condiciones controladas: temperatura (22 ± 2 ºC), humedad relativa (55 ± 10%) y ciclos controlados de luz/oscuridad (12h/12h). Se alimentaron con una dieta estándar para roedores (Panlab; Barcelona, España) de la que dispusieron *ad libitum,* así como de agua, hasta 6-8 horas antes del experimento.



Figura 3.7. Ratas SD durante su manipulación para pesarlas (izquierda) y administrándole agua mediante sonda esofágica ("*gavage*") (derecha).

4.1. Diseño del estudio animal

El ensayo de experimentación animal llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral se realizó siguiendo las normativas marcadas por la Unión Europea en materia de protección en animales de experimentación (Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo) y cumpliendo con las directrices de ARRIVE ("*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*") (Percie du Sert et al., 2020).

El protocolo utilizado en el ensayo de experimentación animal fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación animal de la Universidad de Murcia (referencia ES300305440012) y por el órgano competente del gobierno local (referencia A13180503).

El estudio de farmacocinética se llevó a cabo utilizando 60 ratas SD que pesaron 258 ± 29 g. Los animales se distribuyeron de manera aleatoria en 3 grupos: un grupo de 28 animales consumió una formulación con diferentes extractos vegetales y RSV ("MIX") similar a la que consumieron las pacientes del estudio clínico POLYSEN (detallada en el **apartado 2.1**); otro grupo de 28 animales que consumió solo RSV en la misma

proporción que se encontraba en la formulación anterior (la cantidad restante se completaba con celulosa microcristalina); y un último grupo de 4 animales que consumieron una cápsula con celulosa microcristalina que fueron utilizados como grupo control.

Los animales se sacrificaron a distintos tiempos: 0,5, 1, 2, 4, 6, 10 y 16 horas después de la administración de las cápsulas. A cada tiempo se sacrificaron 4 animales mediante inhalación de dióxido de carbono (CO_2).

4.2. Administración de los extractos vegetales

Las formulaciones utilizadas en el estudio se encapsularon en cápsulas de gelatina tamaño 9 (Torpac; Fairfield, EE. UU.) que corresponde a un tamaño adecuado para ratas que pesen aproximadamente 250 g.

Cada cápsula contenía un total de 29 mg. La formulación "MIX" estaba compuesta por la siguiente mezcla de extractos vegetales: 2,2 mg de RSV, 6,7 mg de granada, 6,7 mg de olivo, 6,7 mg de cacao, 2,2 mg de naranja, 2,2 mg de limón y 2,2 mg de semilla de uva. Por otro lado, la formulación RSV estaba compuesta por 2,2 mg de RSV y 26,8 mg de celulosa microcristalina como excipiente.

Las dosis ensayadas eran referidas a una dosis en humanos de acuerdo con la fórmula de dosis equivalente a humanos (HED, "*Human Equivalent Dose*") (Reagan-Shaw et al., 2008). Donde Km es una constante para cada especie, que relaciona el peso corporal con la superficie corporal.

$$HED\ (mg/Kg) = Dosis\ del\ animal \times \frac{Km\ animal}{Km\ humanos}$$

A cada animal se le administró mediante "*gavage*" una única cápsula que contenía una de las dos formulaciones anteriores (en caso del grupo control, una cápsula con 29 mg de

celulosa microcristalina). A continuación, se le daba al animal unos 400-500 µL de agua con ayuda de una cánula.



Figura 3.8. Cápsulas de gelatina administradas a los animales y dispositivo utilizado para la encapsulación de las mismas (izquierda); sonda dosificadora para la administración de las cápsulas mediante "*gavage*" (derecha).

4.3. Extracción de muestras. Sangre y tejido mamario

La sangre se obtuvo mediante punción cardiaca justo después del sacrificio. La sangre se recogió en tubos eppendorf a los que previamente se había añadido 50 UI heparina sódica (Laboratorios Rovi S.A.; Granada, España) para evitar la coagulación de la sangre. Tras la extracción, los tubos se centrifugaban a 14.000 x g durante 5 minutos a 4 ºC para recoger el plasma, el cual se almacenaba inmediatamente a -80 ºC para su posterior análisis siguiendo el protocolo de extracción detallado en el **apartado 3.4.2**.

Tras la extracción sanguínea, se marcaban las glándulas mamarias tanto inguinales como torácicas del animal para localizarlas, se abría al animal y se extraía el tejido mamario completo (glándulas inguinales y torácicas) (**Figura 3.9**).

El tejido mamario se almacenaba a -80 ºC hasta su posterior análisis. De este tejido se procesaban unos 300 mg siguiendo el protocolo de extracción del **aparatado 3.4.1**.

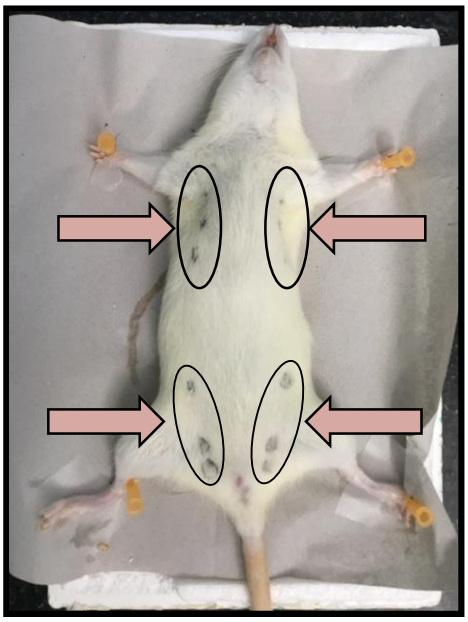


Figura 3.9. Rata SD tras la eutanasia donde se pueden observar las glándulas mamarias tanto torácicas como inguinales marcadas.

5. CULTIVOS CELULARES

En la presente Tesis Doctoral se han empleado tres líneas celulares de mama (**Figura 3.10**), dos de ellas tumorales, MCF-7 y MDA-MB-231, y una no tumoral, MCF-10A. Todas ellas se obtuvieron de la Colección de Cultivos Tipos Americana "*American Type Culture Collection*" (ATCC) (Manassas, Virginia, EE. UU.).

MCF-7 **MDA-MB-231** **MCF-10A**

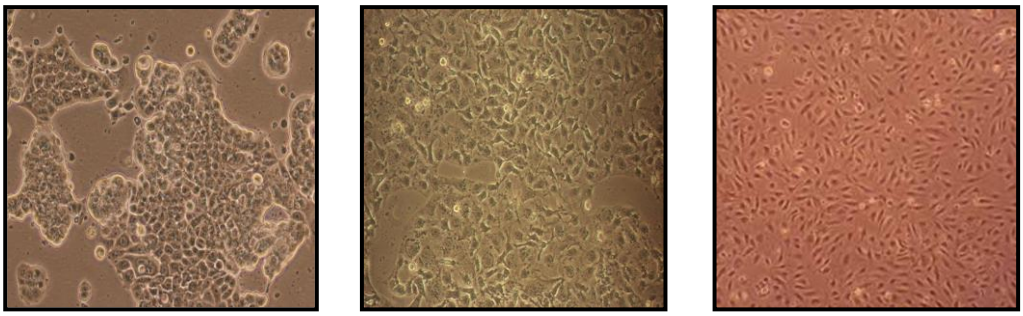


Figura 3.10. Líneas celulares de mama con las que se han trabajado durante esta Tesis Doctoral.

5.1. Condiciones generales de mantenimiento de las líneas celulares

Todas las líneas celulares se mantuvieron en un incubador a 37 ºC y con un 5% de CO_2. El medio de cultivo se renovaba cada 2 o 3 días. Las líneas celulares MCF-7 y MCF-10A se cultivaron en frascos de 75 cm^2 (Nunc; Roskilde, Dinamarca) adherentes y ventilados. Por otro lado, la línea celular MDA-MB-231 se cultivó en frascos de 75 cm^2, adherentes y no ventilados, para evitar el paso de CO_2 al interior y no alterar el pH, debido a la ausencia de bicarbonato en el medio de cultivo (detallado en **apartado 5.1.2**) que se empleó para el cultivo de esta línea celular.

El subcultivo o pase se realizaba cuando las células alcanzaban un 80-90% de confluencia lavando con PBS. A continuación, se retiraba el PBS y se adicionaban 2 mL Tripsina/EDTA al 0,25%/0,02% incubando a 37 ºC. La reacción se detenía una vez que las células estaban despegadas del frasco con medio de cultivo suplementado con suero (que contiene α_1-antitripsina). Posteriormente se centrifugaban, se resuspendían en medio y se contaban para determinar el número de células totales (vivas y muertas), así como el porcentaje de viabilidad. Esta medida se realizaba utilizando el colorante azul de tripano que tiñe las células muertas, pero no las vivas (contaje por exclusión), preparando una dilución 1:1 de la suspensión celular con el azul de tripano. De esta solución se ponían 10 µL en la cámara de contaje y se media en un contador celular automático TC10™ (Bio-Rad; Hercules, EE. UU.).

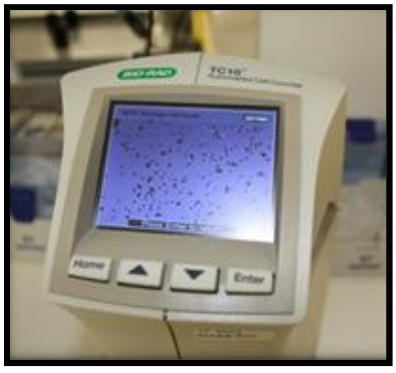


Figura 3.11. Contador automático TC10™.

Tras el conteo, el subcultivo se realizaba sembrando aproximadamente una proporción de 1:4 del total de células obtenidas. La siembra se hacía en el correspondiente frasco de cultivo para mantener la línea, y si se iniciaba algún experimento, se sembraban en la densidad necesaria en placas de 96, 12 o 6 pocillos dependiendo del tipo de ensayo.

A continuación, se detallan las características generales y el medio en el que se mantenían cada una de las líneas celulares.

5.1.1. Línea celular MCF-7

La línea MCF-7 (p53 silvestre) son células de adenocarcinoma de mama que se aislaron por primera vez del tejido mamario de una mujer de raza caucásica de 69 años. Expresan RE (α y β) y receptor de progesterona. Se corresponden al cáncer de mama dependiente de estrógenos, el cual es poco agresivo y con bajo potencial metastásico. Son adherentes de tipo epitelial.

El mantenimiento de esta línea celular se hizo utilizando el medio de cultivo "*Eagle's Minimum Essential Medium*" (EMEM) al que se le añadía: 2 mM de L-glutamina, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato sódico, 0,01 mg/mL de insulina humana recombinante, 100 U/mL de penicilina/estreptomicina y 10% de suero bovino fetal (SBF).

5.1.2. Línea celular MDA-MB-231

La línea MDA-MB-231 (p53 mutado) son células de adenocarcinoma de mama que se aislaron por primera vez del tejido mamario de una mujer caucásica de 51 años. No expresan receptores estrogénicos, receptor de progesterona, ni tampoco receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2), siendo esta línea celular la que se

corresponde con un cáncer de mama triple negativo el cual es muy agresivo e invasivo y no responde al tratamiento hormonal. Son adherentes de tipo epitelial.

El mantenimiento de esta línea celular se hizo utilizando el medio de cultivo "*Leibovitz's L-15 Medium*" (L-15) al que se le añadía: 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina/estreptomicina y 10% SBF.

5.1.3. Línea celular MCF-10A

Son células no cancerosas de fibrosis de mama que se aislaron por primera vez del tejido glandular mamario de una mujer caucásica de 36 años. Es un modelo celular no tumoral de mama ampliamente usado en investigación. Son adherentes de tipo epitelial.

El mantenimiento de esta línea celular se hizo utilizando el medio de cultivo "*Mammary Epithelial Cell Growth Basal Medium*" (MEBM) al que se le añadía: 100 ng/mL de toxina colérica, 20 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico, 0,5 mg/mL de hidrocortisona, 0,01 mg/mL de insulina humana recombinante, 100 U/mL de penicilina/estreptomicina y 5% de suero equino.

5.2. Ensayos de proliferación y viabilidad celular

Durante la presente Tesis Doctoral se han utilizado diferentes ensayos para medir el crecimiento o proliferación celular dependiendo del tipo de línea celular y la duración del experimento.

5.2.1. Ensayo de MTT

El ensayo de MTT es un método colorimétrico que mide la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa. El MTT es reducido a cristales de formazano en presencia de NADH por acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células

vivas. Los cristales de formazano son insolubles en agua, pero pueden solubilizarse en disolventes orgánicos como el DMSO.

El ensayo de MTT se utilizó en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-10A. Ambas líneas se sembraban en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 2.500 células/pocillo y se incubaban durante 24-48 horas antes de añadirles los compuestos a evaluar.

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento (de 24 a 96 horas) con los respectivos compuestos a ensayar, se retiraba el medio y se ponía medio nuevo (libre de tratamientos) al cual se le añadía la disolución de MTT a una concentración final de 1 mg/mL. Como se ha comentado en el apartado anterior, las células MDA-MB-231 se incubaban a 37 ºC en ausencia de CO_2 y las MCF-10A a 37 ºC y con un 5% de CO_2, ambas en oscuridad.

Tras 4 horas de incubación se retiraba el medio de cultivo con el MTT (para eliminar el MTT no metabolizado) y se añadían 100 µL de DMSO por pocillo para solubilizar el formazano. Las placas se agitaban en un agitador orbital durante 5 minutos a 120 x g, obteniendo un producto final de color violeta. Finalmente, se medía la absorbancia a 570 nm y 690 nm (esta última para restarle la señal de fondo) en un lector de placas FLUOstar Omega (BMG Labtech; Ortenberg, Alemania).

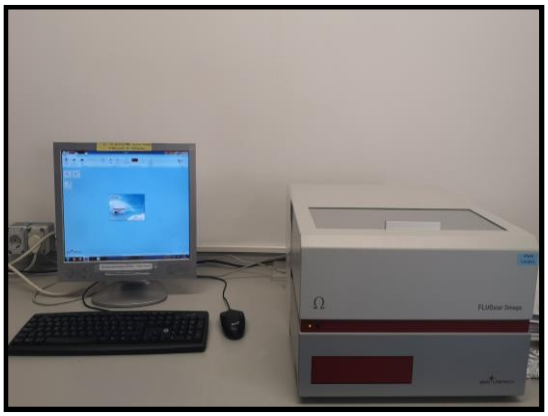


Figura 3.12. Lector de placas FLUOstar Omega utilizado para diferentes ensayos en la presente Tesis Doctoral.

5.2.2. Ensayo de XTT

El ensayo de XTT se basa, al igual que en el ensayo anterior de MTT, en la reducción del agente por acción de las deshidrogenasas mitocondriales en un producto coloreado, pero en este caso soluble en agua, por lo que no es necesario solubilizar con DMSO.

La diferencia con el método del MTT es que este método permite medir la actividad metabólica de células también en suspensión, por lo que se utilizó en la línea celular MCF-7 ya que un pequeño porcentaje de estas células pueden seguir viables en suspensión.

El XTT se añadía directamente al medio a una concentración final de 1 mg/mL. A la solución de XTT se le añadía también fenazina metosulfato (PMS) a 25 µM que actuaba como aceptor de electrones favoreciendo la reducción del agente a formazano.

Tras 4 horas de incubación a 37 ºC y con 5% de CO_2 se obtenía el formazano soluble de color naranja, y se determinaba la absorbancia a 450 nm y 690 nm en el lector de placas FLUOstar Omega (**Figura 3.12**).

5.2.3. Ensayo de E-SCREEN

Este método se utiliza para la determinación de la proliferación celular promovida por la actividad estrogénica/antiestrogénica y está basado en el método validado por el "*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*" (ICCVAM) (ICCVAM, 2003). En este método, la actividad estrogénica se define como la capacidad de inducir proliferación (hormono-dependiente) de las células de cáncer de mama MCF-7 que están cultivadas en un medio libre de estrógenos. La actividad estrogénica (control) se determinó con estradiol y sin otros compuestos en el medio.

El ensayo "E-SCREEN" (basado en la unión con receptores estrogénicos para inducir la proliferación de las células MCF-7) se realizó de acuerdo con el método de Payne et

al. (2000), con algunas modificaciones (Payne et al., 2000). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con 1.500 células por cada pocillo. Después de 48 h, las células se lavaban con PBS, se retiraba el PBS y se ponía medio de cultivo con suero libre de estrógenos HyClone™ (GE Healthcare; Chicago, EE. UU.), el cual se dejaba durante 3 días antes de los tratamientos. Después, se añadían las diferentes concentraciones de los compuestos a partir de sus correspondientes stocks en DMSO y se incubaban durante 7 días, sustituyendo una vez el medio añadido por medio nuevo con los mismos tratamientos a los 3-4 días. Las concentraciones ensayadas fueron: estradiol (1 nM), compuestos-mezclas (concentraciones de 10 y 50 µM). La concentración de DMSO nunca excedió el 0,5% en el medio para no afectar la viabilidad celular.

Por otro lado, la actividad antiestrogénica se definió como la capacidad de los compuestos o mezclas para prevenir o disminuir la proliferación de las células MCF-7 en presencia de estradiol 1 nM durante todo el experimento.

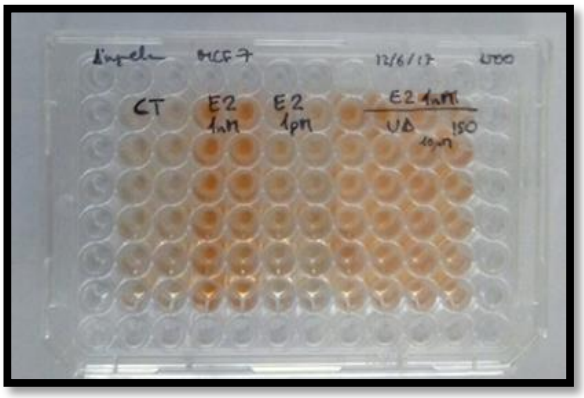


Figura 3.13. Placa incubada con XTT 4 horas después de 7 días con distintos tratamientos de estradiol (actividad estrogénica) y co-incubaciones de compuestos con estradiol (actividad antiestrogénica).

El ensayo E-SCREEN se repitió al menos tres veces con cada tratamiento para medir ambos tipos de respuestas (estrogénica y antiestrogénica). La proliferación celular estrógeno-dependiente se midió después de 7 días de incubación con los diferentes

tratamientos usando el ensayo colorimétrico del XTT, tal como se detalla en el **apartado 5.2.2**.

5.2.4. Ensayo de clonogenicidad

El ensayo de clonogenicidad o ensayo de formación de colonias es una técnica que se basa en medir la capacidad que tiene una única célula de crecer en una colonia (**Figura 3.14**). Con esta técnica se puede medir la citotoxicidad o efecto antiproliferativo de un compuesto evaluando cómo afecta a la capacidad de división celular. Además, este ensayo nos permite evaluar si la proliferación celular se ve afectada durante mucho más tiempo (hasta dos semanas de tratamiento).

Las células se sembraban en placas de 12 pocillos a una densidad inicial de 250 células/pocillo y se incubaban a 37 ºC durante dos días antes de los tratamientos. Las células se trataban con diferentes concentraciones de los compuestos a ensayar. El medio con los tratamientos se reemplazaba cada 3-4 días durante un tiempo total de dos semanas.

Al finalizar el experimento, las células se fijaban y se teñían con cristal violeta (CV) al 0,1%, tal como se detalla a continuación en el **apartado 5.2.5**. Las placas se fotografiaban para posteriormente cuantificar el área de cada colonia mediante análisis de imagen utilizando el programa ImageJ versión 1.52a ("*National Institutes of Health*" (NIH), Maryland, EE. UU.) (Guzmán et al., 2014). Con este programa se determinaba el porcentaje de área ocupada en cada pocillo por colonias, así como la intensidad de las mismas (**Figura 3.15**). El valor obtenido en cada pocillo con el tratamiento correspondiente se comparaba frente al control.

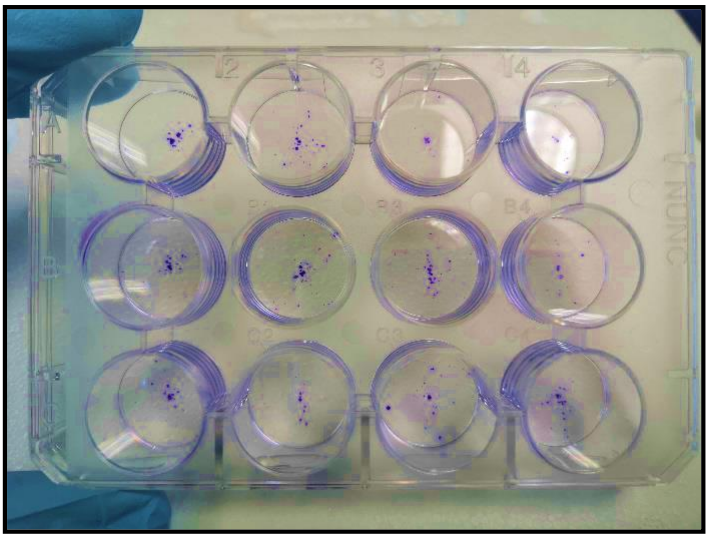


Figura 3.14. Formación de colonias en MCF-7 teñidas con cristal violeta después de dos semanas de tratamiento.

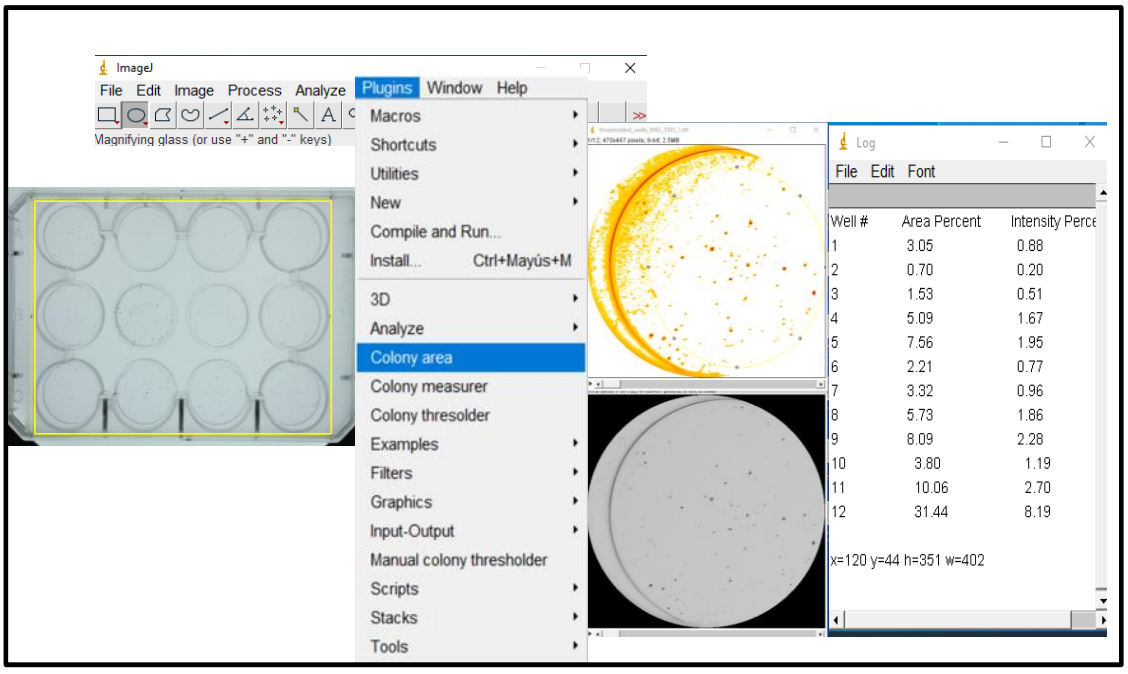


Figura 3.15. Interfaz del programa ImageJ con el plugin "*Colony Area*" para cuantificar la formación de colonias en una placa de 12 pocillos.

5.2.5. Tinción con cristal violeta

La tinción con el CV es uno de los métodos más comunes para medir la proliferación celular. El CV es un colorante que se une al ADN de las células que estarán adheridas a la superficie donde se hayan cultivado.

Para teñir las células, estas se fijaban a la placa con el fijador Carnoy que contenía MeOH:Ácido acético en una proporción 3:1. Una vez fijadas, se dejaban secar durante al menos 4 horas y se les añadía 250 µL por cm^2 de solución de CV al 0,1% preparada en agua. La tinción se incubaba en agitación durante 30 minutos. Posteriormente, se retiraba y las placas se lavaban 3 veces con agua, las cuales se dejaban secar a temperatura ambiente.

Las placas de 12 pocillos teñidas con esta técnica se utilizaron para el ensayo de clonogenicidad tal como se detalla en el **apartado 5.2.4**, y no requirieron tratamiento posterior.

Las placas de 96 pocillos se solubilizaban con 100 µL de MeOH:Ácido acético:Agua (10:5:85) y se medía la absorbancia a 570 nm en el lector de placas Infinite M200 (Tecan; Männedorf, Suiza) para determinar la cantidad de células y poder normalizar los resultados obtenidos en el ensayo de senescencia que se detalla en el **apartado 5.5.2**.

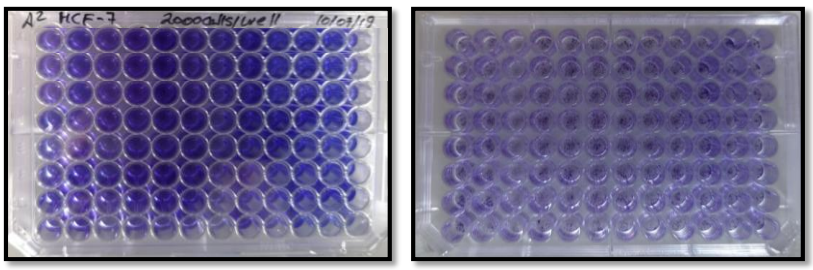


Figura 3.16. Placa de 96 pocillos de MCF-7 teñida con cristal violeta (derecha) y posteriormente solubilizada (izquierda) para la lectura de absorbancia.

5.3. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

La citometría de flujo permite determinar la distribución de poblaciones celulares en las distintas fases del ciclo celular.

Las células, en función de la fase del ciclo en la que se encuentren, pueden tener la dotación cromosómica normal (2n) cuando están en fase G_0/G_1, doble (4n) cuando están

a punto de dividirse en fase G_2/M, o bien, una cantidad de ADN intermedia cuando están en la fase S (síntesis de ADN).

Para el análisis del contenido de ADN celular, las células se resuspendieron a una concentración de $1x10^6$ células/mL en PBS. Para fijar las células se tomaron 200 µL de la suspensión celular a la que se le añadieron 2 mL de etanol (EtOH): PBS frío (70:30) y se mantuvieron durante 30 minutos a 4 ºC. Las células se centrifugaron 10 minutos a 400 x g, y se descartó el sobrenadante, resuspendiendo las células en 400 µL de PBS que contenía 100 µg/mL RNAsa y 40 µg/mL de yoduro de propidio (IP). El IP es un agente que emite fluorescencia roja y que se intercala con el material genético, pero que únicamente es capaz de penetrar en las células muertas (las cuales tienen la membrana celular dañada).

Tras la adición de la RNAsa y el IP, las células se incubaron a 37 ºC durante 30 minutos y se analizaron en el citómetro de flujo FACScan equipado con el software FACStation running Cell Quest software (Becton Dickinson; Nueva Jersey, EE. UU.).



Figura 3.17. Citómetro de flujo FACScan.

El citómetro de flujo selecciona las células en poblaciones en función de su contenido en ADN, dando lugar a un histograma en el que se representa la cantidad de ADN de la

célula frente al número de células de cada población. El análisis de las distintas fases del ciclo celular se realizó con el programa ModFit LT V4.1 (Verity Software House; Topsham, EE. UU.) cuantificando el perfil de las distintas fases del ciclo celular para cada tipo de muestra (**Figura 3.18**).

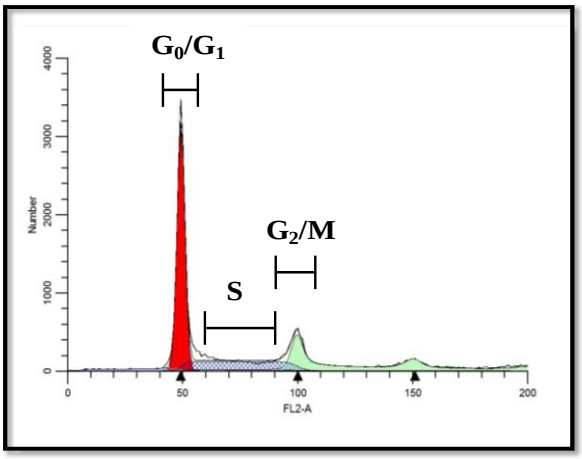


Figura 3.18. Histograma obtenido por citometría de flujo donde se representa el número de células frente al contenido celular característico de cada fase del ciclo celular.

5.4. Evaluación de apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada tiene como finalidad eliminar aquellas células innecesarias o dañadas del organismo. Este proceso juega un papel fundamental en la prevención del cáncer, ya que las células cancerosas presentan mutaciones que permiten evitar la apoptosis y, por tanto, pueden dividirse de manera descontrolada.

En la presente Tesis Doctoral se han utilizado dos técnicas para evaluar la inducción de apoptosis sobre células cancerosas tras los tratamientos: una mediante citometría de flujo y otra por microscopía de fluorescencia.

5.4.1. Ensayo Anexina V/IP. Citometría de flujo

El ensayo de Anexina V/IP es un método para determinar las células que se encuentran en apoptosis. La fosfatidilserina (PS) es un componente presente en la membrana lipídica

que se trasloca hacia la parte extracelular cuando una célula se encuentra en fase intermedia de apoptosis. La Anexina V marcada con un fluoróforo (proteína fosfolipídica) se unirá a la PS y servirá para poder detectar mediante fluorescencia las células apoptóticas.

Como se ha comentado anteriormente, el IP entra en aquellas células que tienen la membrana celular dañada y se une al material genético. La combinación de ambos permite diferenciar células en fase de apoptosis temprana (positivas para Anexina V) y apoptosis tardía (positivas para Anexina V y IP). Las células necróticas se marcarán solamente con IP, mientras que las células viables que no estén en fase de apoptosis no se teñirán con ninguno de los dos.

Para la evaluación de apoptosis se utilizó el kit Anexina V/IP de Molecular Probes™, (ThermoFisher; Barcelona, España). Después de cada tratamiento, se recogieron las células flotantes en el medio celular mediante centrifugación y se unieron a las adheridas a la superficie del pocillo que se recogieron por tripsinización.

Se resuspendieron un total de $0{,}5x10^6$ células en 400 µL de PBS y se incubaron en oscuridad con Anexina V y IP durante 10 min. Posteriormente, se analizaron mediante citometría de flujo (FACScan; **Figura 3.17**) un mínimo de 20.000 eventos por muestra. Como control positivo se utilizó la estaurosporina (Sigma) a 5 µM con alta capacidad pro-apoptótica. Para determinar el porcentaje de células apoptóticas se analizan las células en función de su tinción. De esta forma obtendríamos un diagrama (**Figura 3.19**) donde se representan: las células viables no apoptóticas en el cuadrante inferior izquierdo (no teñidas); las células en apoptosis temprana en el cuadrante inferior derecho (solo teñidas con anexina V); las células en apoptosis tardía en el cuadrante superior derecho (se tiñen con IP y anexina V); y las células necróticas en el cuadrante superior izquierdo (solo se tiñen con IP).

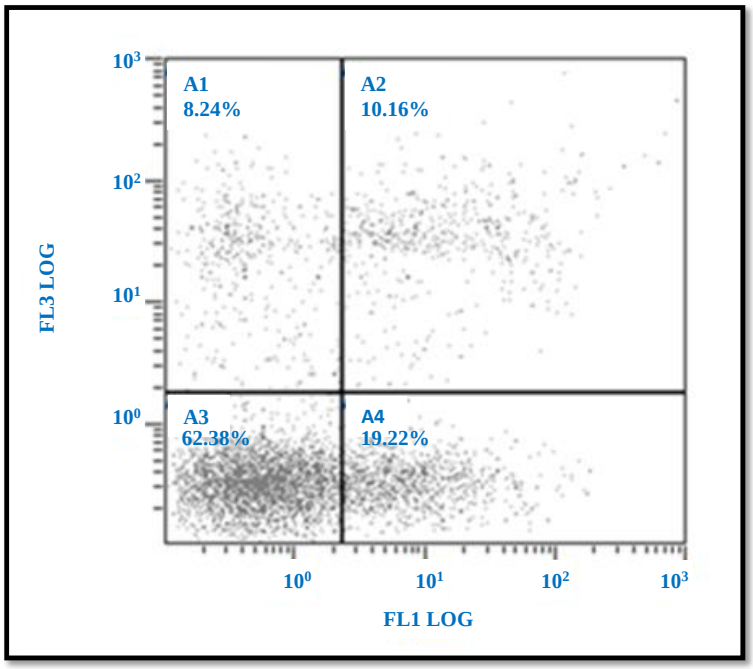


Figura 3.19. Representación del análisis obtenido por citometría de flujo usando el kit anexina V/IP que representa el porcentaje de células viables (A3), apoptosis temprana (A4), apoptosis tardía (A2) y células necróticas (A1).

5.4.2. Tinción de Hoechst. Microscopía de fluorescencia

Para esta técnica de tinción se utiliza el colorante Hoechst 33258 (Sigma) que es capaz de teñir el ADN de células vivas intercalándose en las regiones ricas en adenina y timina del ADN. Las células apoptóticas sufren diferentes cambios morfológicos entre los que se encuentran la condensación y fragmentación de la cromatina por acción de endonucleasas endógenas formando los denominados corpúsculos apoptóticos.

El colorante Hoechst tiene una longitud de onda de excitación de 346 nm y 460 nm de emisión, pudiendo observarse un alto nivel de fluorescencia azul en las células apoptóticas (**Figura 3.20**).

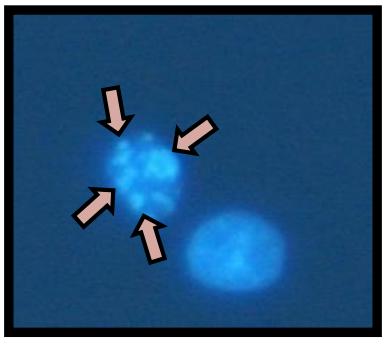


Figura 3.20. Condensación de cromatina en una célula apoptótica fotografiada con microscopía de fluorescencia.

Para la visualización de los núcleos celulares, las células se sembraron a una densidad de $3x10^4$ células/cm^2, y tras los tratamientos se fijaron con Carnoy. Primero se adicionó el fijador en proporción 1:1 con el medio de las células incubándose 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se retiró esta mezcla y se adicionó solo fijador incubándose durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el fijador y la placa se dejó secar.

Por último, las células fijadas se incubaron 20 minutos con el colorante Hoechst 33258. El exceso de colorante se eliminó con un lavado con agua destilada y se tomaron las fotografías con un microscopio de fluorescencia Nikon Diaphot-TMD (Tokio, Japón).

5.5. Medida de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-Gal)

La senescencia se corresponde con un estado de detención permanente del ciclo celular. Es un proceso de envejecimiento celular en el cual las células pierden su capacidad replicativa, pero no metabólica.

La actividad β-galactosidasa asociada a senescencia celular (SA-β-Gal), detectable a pH=6, es un marcador utilizado para evaluar si diferentes condiciones o compuestos pueden inducir la aparición de senescencia. La expresión de esta enzima lisosómica se

encuentra aumentada en células envejecidas debido al incremento de lisosomas en células senescentes.

Para medir la actividad de esta enzima se llevaron a cabo dos técnicas diferentes: ensayo X-gal (microscopía óptica) y el ensayo FDG (fluorescencia), los cuales se detallan a continuación.

5.5.1. Ensayo X-gal

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 10.000 células por cm^2 y a las 48 horas se trataron con los compuestos a evaluar. Tras 5 días de tratamiento, las células se fijaban con una solución que contenía 2% de formaldehído y 0,2% de glutaraldehído (v/v), después se lavaban con PBS y se incubaban con una solución de tinción preparada en tampón de ácido cítrico/fosfato sódico con un pH=6, a 40 mM. La solución de tinción contenía: 5 mM de hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado ($K_4[Fe(CN)_6]\cdot 3H_2O$), 5 mM de hexacianoferrato (III) de potasio ($K_3[Fe(CN)_6]$), 150 mM de cloruro sódico, 2 mM de cloruro de magnesio y 1 mg/mL del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactósido (X-gal).

El X-gal sufre una hidrólisis por acción de la β-galactosidasa liberándose 5-bromo-4-cloro-3-hidroxindol, el cual se oxida a 5-5'-dibromo-4-4'-dicloroíndigo y dimeriza, transformándose en un producto insoluble de color azul.

Tras incubar las células con esta solución durante 5 horas, cada pocillo era fotografiado en 5 campos distintos de manera aleatoria, para cuantificar con el programa ImageJ el porcentaje de área teñida entre el total de células en esa área.

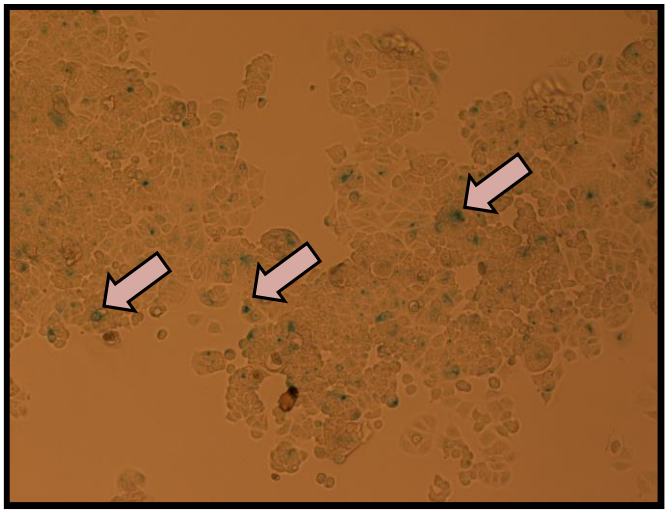


Figura 3.21. Imagen tomada de las células MCF-7 tras incubar 5 horas con X-gal. En la imagen se pueden observar diferentes células senescentes teñidas de azul.

5.5.2. Ensayo FDG

Este ensayo consiste en una técnica colorimétrica que utiliza el 5-dodecanoilaminofluorescein di-β-D-galactósido (C_{12}FDG) que es un compuesto que es permeable a través de la membrana celular. Este compuesto es hidrolizado por acción de la β-galactosidasa, y entonces emite fluorescencia.

Para este ensayo las células se sembraban en placas de 96 pocillos a una densidad de 2.000 células por pocillo, a las 48 horas se trataban con diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar y se incubaban durante 1, 3 y 5 días. Tras terminar el periodo de tratamiento, las células se fijaban con la solución que se detalla en el **apartado 5.5.1** y se lavaban con PBS. Las células ya fijadas se incubaban 24 horas con la solución de tinción del **apartado 5.5.1**, que en lugar de contener X-gal, contenía el reactivo FDG a 2 mM. El contenido de cada pocillo se transfería a una placa negra de 96 pocillos y se medía la fluorescencia a una longitud de onda de excitación a 485 nm y 520 nm de emisión en el lector de placas FLUOstar Omega (**Figura 3.12**).

Al finalizar el ensayo, las placas se teñían con CV (**Figura 3.16**) para cuantificar la cantidad de células tal como se detalla en el **apartado 5.2.5** y así normalizar los valores

de fluorescencia asociados a la SA-β-Gal por la cantidad de células que había en cada pocillo, confirmando que las diferencias en los niveles de fluorescencia se deben a cambios en la actividad β-galactosidasa.

5.6. Análisis de proteínas

Las proteínas regulan diferentes funciones en las células, por lo que la expresión/regulación de ellas es de gran utilidad a la hora de conocer los fenómenos que se están desencadenando en ellas.

5.6.1. Extracción de proteínas

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad celular de 45.000 células/pocillo para MCF-7 y 40.000 células/pocillo para MDA-MB-231. Tras 48 horas, se trataban con los diferentes compuestos o mezclas de ellos.

Tras 5 días de tratamiento, las células se lavaron con PBS frío y se lisaron con tampón RIPA compuesto por Tris-HCl 25 mM (pH=7,4); NaCl 150 mM; 0,12% Triton X-100; 0,5% deoxicolato sódico y 0,1% de dodecilsulfato sódico (SDS). A este tampón también se le añadía una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche; Mannheim, Alemania) y ortovanadato sódico y fluoruro sódico (ambos actúan como inhibidores de fosfatasas) a una concentración final de 1 mM, para evitar la degradación de las proteínas extraídas.

Tras la adición del buffer anterior, las células se raspaban y el lisado se recogía en un tubo eppendorf. Las muestras se centrifugaban a 14.000 x g durante 15 minutos a 4 ºC, recogiendo el sobrenadante, descartando el pellet y almacenando las muestras a -80 ºC.

Posteriormente, se determinó la cantidad de proteína total de cada muestra utilizando el kit comercial *DC* Protein Assay (Bio-Rad; Hercules, EE. UU.) que se basa en el método

de Lowry (Lowry et al., 1951). Para la cuantificación de proteína se realizó una recta patrón de BSA en tampón RIPA.

5.6.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida y análisis por Western-Blot

5.6.2.1. Preparación de los geles de poliacrilamida

El gel de electroforesis se preparó a una concentración de acrilamida del 12%, ya que para los pesos moleculares de las proteínas que se midieron nos permitió una óptima separación de todas ellas. A continuación, se detallan las concentraciones y reactivos que se utilizaron para la preparación de dos geles (**Tabla 3.1**).

Tabla 3.1. Concentraciones y reactivos empleados para preparar dos geles de electroforesis y dos geles "*stacking*" al 12% y 4% de acrilamida, respectivamente.

Gel electroforesis					
Agua miliQ	**30% Acrilamida/ Bisacrilamida**	**1,5 M Tris-HCl (pH=8,8)**	**SDS 10%**	**APS**	**TEMED**
3,5 mL	3,9 mL	2,5 mL	100 µL	100 µL	10 µL
Gel "*stacking*"					
Agua miliQ	**30% Acrilamida/ Bisacrilamida**	**0,5 M Tris-HCl (pH=6,8)**	**SDS 10%**	**APS**	**TEMED**
4,6 mL	990 µL	1,9 mL	75 µL	75 µL	7,5 µL

El TEMED (tetrametiletilendiamina) comienza a reaccionar con el APS (persulfato de amonio) de manera inmediata por lo que estos reactivos eran los últimos en añadirse a la preparación ya que inician la polimerización de acrilamida en bisacrilamida, formándose el gel.

Una vez se vertía entre los cristales la solución anterior hasta el nivel deseado, se añadían unos 300 µL de butanol evitando el paso de oxígeno para que el gel polimerizara

recto. En unos 30-40 minutos el gel había polimerizado, el butanol se retiraba con agua y se secaban los posibles restos con papel de filtro.

A continuación, se preparaba el gel "*stacking*" el cual sirve para concentrar todas las proteínas en una misma banda y que así empiecen a migrar al mismo tiempo.

Este gel se preparaba a una concentración al 4% de acrilamida (**Tabla 3.1**). El gel "*stacking*" se vertía sobre el de electroforesis, e inmediatamente se ponía el peine para formar cada una de las calles. Este gel polimerizaba en 20 minutos.

5.6.2.2. Electroforesis y Western-Blot

En cada calle del gel se cargaba cada muestra con una cantidad final de proteína de 20 µg. Las condiciones de electroforesis utilizadas fueron 100 V durante 90 minutos.

Tras la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), se realizaba la transferencia húmeda a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare) durante 90 minutos a 100 V. La eficacia de la transferencia se comprobaba mediante la tinción de Ponceau S (**Figura 3.22**), que es un colorante que se une débilmente a los grupos amino de las proteínas. La imagen de la membrana teñida se fotografiaba para posteriormente cuantificar la cantidad de proteína por análisis de imagen y utilizar esta tinción como control de carga proteica. Para eliminar el colorante de las membranas se lavaban 3 veces con buffer Tris salino-Tween (T-TBS).

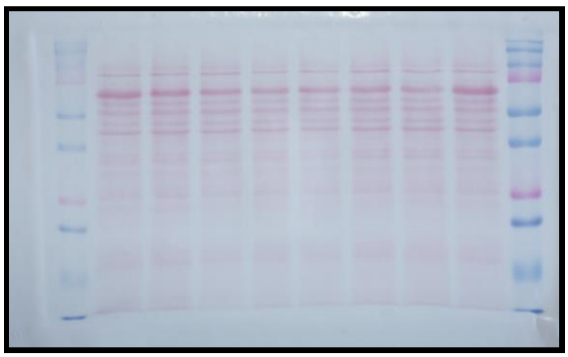


Figura 3.22. Membrana de nitrocelulosa teñida con Ponceau S.

Las membranas se bloqueaban durante 1 hora con T-TBS que contenía 5% de BSA, después se recortaban para poder incubar con diferentes anticuerpos primarios toda la noche a 4 ºC y 25 rpm en un agitador de balanceo SK-R1807-S (DLAB Scientific; Schiltigheim, Francia). Los anticuerpos y diluciones correspondientes fueron: p53 (1:1.000), $p16^{INK4a}$ (1:1.000), $p21^{Cip1/Waf1}$ (1:500), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (1:2.500), fosfo-Rb (pRb) (1:1.000) y total-Rb (tRb) (1:1.000). Todos los anticuerpos utilizados se compraron a Cell Signalling Technology (Danvers, Massachusetts, EE. UU.).

A continuación, se realizaban tres lavados con T-TBS para retirar el exceso de anticuerpo primario no unido y se incubaban seguidamente durante dos horas con el anticuerpo secundario (anti-ratón o anti-conejo, (Sigma)) a una concentración 1:3.000.

El revelado de las membranas se realizó utilizando el kit ECL 2 o el kit SuperSignal West Pico PLUS (ThermoFisher) dependiendo de la concentración de cada proteína específica.

Las imágenes se obtuvieron detectando la quimioluminescencia en el analizador Amersham Imager 600 (GE Healthcare).



Figura 3.23. Equipo Amersham Imager 600 donde se revelaban las membranas para la detección por quimioluminescencia de las diferentes proteínas analizadas.

En todos los experimentos realizados, la detección de GAPDH (36 kDa) se realizó siempre como control de carga proteica, y el análisis completo de cada proteína se realizó, al menos, por triplicado.

5.7. Procesado de medios de cultivo para evaluar metabolismo celular

Con el fin de evaluar la estabilidad y el metabolismo de los compuestos o metabolitos ensayados por cada línea celular, se recogieron alícuotas de medio de cultivo de las placas a los diferentes tiempos que se ensayaron los compuestos (1, 2, 3 y 5 días, dependiendo del tipo de ensayo) y se almacenaban a -20 ºC para el posterior análisis.

El medio de cultivo se procesaba de la siguiente forma: por cada 200 µL de medio de cultivo se añadían 200 µL de ACN:Ácido fórmico (98:2 v/v), se agitaba en vórtex durante un minuto y posteriormente se centrifugaba a 14.000 x g durante 15 minutos.

El sobrenadante se evaporaba y se disolvía en 100 µL de MeOH y por último, se filtraba por filtros de RC antes de su análisis en el UPLC-ESI-QTOF-MS tal como se detalla en el **apartado 6.2**.

6. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS

Durante la presente Tesis Doctoral se ha empleado la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detectores de ultravioleta-visible (UV-Vis) y espectrometría de masas (MS) para el análisis de extractos vegetales y para el análisis de las diferentes muestras biológicas. A continuación, se detalla cada equipo empleado y las condiciones generales usadas en cada análisis.

6.1. HPLC-DAD-ESI-IT (MS/MS)

Este equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (**Figura 3.24**) se utilizó para la identificación y cuantificación de los diferentes compuestos que contenían los extractos vegetales (**apartado 2.1**).

El equipo empleado está compuesto por un HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies) equipado con detector de barrido de diodos UV-Vis (DAD), acoplado en serie con un espectrómetro de masas con interfase de ionización por electrospray (ESI) y analizador de trampa de iones (IT) (Bruker Daltonik; Bremen, Alemania). El analizador IT consiste fundamentalmente en un electrodo anular y dos electrodos laterales de geometría hiperbólica que poseen una perforación que permite la entrada y la salida de los iones. Los iones formados en la fuente entran en el analizador donde se aplican diferentes voltajes generando un campo eléctrico tridimensional en la cavidad de la trampa. Este campo atrapa y concentra los iones dada su trayectoria de oscilación estable. La naturaleza de la trayectoria depende del potencial y de la relación *m/z* de los iones.

Una vez que los iones se encuentran atrapados dentro del analizador se puede llevar a cabo, en función del objetivo del análisis, el análisis de las masas, el aislamiento de un ion precursor y la posterior fragmentación de este ion.

La identificación de los compuestos presentes en los extractos vegetales se hizo teniendo en cuenta la información disponible en literatura, el orden de elución de los compuestos, su espectro UV-Vis, relación m/z^- y los fragmentos obtenidos por MS/MS.

Para la separación cromatográfica se utilizó una columna en fase reversa Pursuit XRs C18 (Agilent) de dimensiones 250 x 4,0 mm y 5 μm de tamaño de partícula, operando a temperatura ambiente. Como fases móviles se utilizó agua con 1% de ácido fórmico (fase A) y ACN (fase B) a un flujo de 0,8 mL/min y la siguiente elución por gradiente: de 0 a 35 min, 1-40% B; de 35 a 45 min, 40-90% B, de 45 a 47 min, se mantiene a 90% de B. A

continuación, se vuelve a las condiciones iniciales en 3 minutos y durante 6 minutos se equilibra la columna con estas condiciones iniciales. El volumen de inyección fue de 20 µL.

El detector UV-Vis registró los cromatogramas a 280, 320, 340 y 360 nm. En el espectrómetro de masas se utilizó nitrógeno como gas de nebulización a una presión de 65 psi y como gas de secado a un flujo de 11 L/min y una temperatura de 350 ºC. El voltaje del capilar se fijó en 4.000 V. Se trabajó en modo negativo y en un rango de masas de 100 a 1500 *m/z* con un "*target mass*" (masa diana) de 500 *m/z*. Se adquirieron los espectros en modo AutoMSn con tres ciclos de MS^2 (seleccionando los tres iones precursores más intensos) por cada uno de MS.



Figura 3.24. Equipo HPLC-DAD-ESI-IT (MS/MS) 1200 series (Agilent).

Para la cuantificación se prepararon rectas de calibrado con estándares disponibles de cada familia de compuestos presentes en los extractos: los ácidos fenólicos fueron cuantificados a 280 nm con ácido *p*-hidroxibenzoico y ácido gálico, Hytyr a 280 nm con su propio patrón, los flavan-3-oles a 280 nm con catequina y epicatequina, RSV a 310

nm con su propio patrón, las flavanonas a 340 nm con hesperidina y eriocitrina, las flavonas a 340 nm con apigenina, los flavonoles a 360 nm con rutina, los elagitaninos a 360 nm con punicalagina y EA; y por último, las metilxantinas teobromina y cafeína, a 280 nm con sus propios patrones.

Se prepararon disoluciones (10 mM) de cada uno de los patrones en DMSO y a partir de ellas, mezclas multi-patrón en MeOH. Por diluciones sucesivas en MeOH de estas mezclas se obtuvieron las rectas de calibrado.

6.1.1. Análisis de proantocianidinas

Para la identificación y cuantificación de las procianidinas que estaban presentes en el extracto de semilla de uva, extraídas mediante floroglucinolisis (**apartado 2.2.1**), se usó el mismo equipo de cromatografía descrito en el **apartado 6.1** (HPLC-DAD-ESI-IT (MS/MS)), pero utilizando las siguientes condiciones:

Para la separación cromatográfica se utilizó una columna en fase reversa C-18 (Agilent Technologies) de dimensiones 250 x 4,6 mm y 5 μm de tamaño de partícula, operando a temperatura ambiente. El volumen de inyección de muestra fue de 10 μL y como fases móviles se utilizó agua con 2,5% de ácido acético (fase A) y ACN (fase B) a un flujo de 1 mL/min y la siguiente elución por gradiente: min 0, 3% de B; del min 0 al min 5 se mantiene al 3%; del min 5 al min 15, 9% de B; del min 15 al min 45, 16% de B; del min 45 al min 52, 50% de B, se mantiene al 50% de B 7 minutos, del min 52 al min 57 se vuelve a las condiciones iniciales (3% de B) y se equilibra la columna con estas condiciones durante 7 minutos. El detector UV-Vis registró el cromatograma a una longitud de onda de 280 nm.

En el espectrómetro de masas se utilizó nitrógeno como gas de nebulización a una presión de 65 psi y como gas de secado a un flujo de 11 L/min y una temperatura de 325

ºC. El voltaje del capilar se fijó en 4.000 V. Se trabajó en modo negativo y en un rango de masas de 100 a 800 *m/z* con un "*target mass*" de 300. Se adquirieron los espectros en modo AutoMSn con tres ciclos de MS^2 (seleccionando los tres iones precursores más intensos) por cada uno de MS.

La identificación de los compuestos se llevó a cabo teniendo en cuenta la información disponible en bibliografía, el orden de elución de los compuestos, su espectro UV-Vis y su ion molecular.

Para la cuantificación se utilizaron rectas de calibrado a 280 nm de cada uno de los monómeros de flavan-3-ol presentes en las procianidinas de la semilla de uva: catequina, epicatequina, catequina-galato y epicatequina-galato. Los aductos con floroglucinol se cuantificaron con su correspondiente monómero. El grado medio de polimerización (GPm) se calculó con la siguiente fórmula:

$$GPm = \frac{moles\ de\ monómeros + moles\ de\ aductos}{moles\ de\ monómeros}$$

6.2. UPLC-ESI-QTOF-MS/MS

Este equipo se utilizó para el análisis de las muestras biológicas recogidas en el estudio clínico (orina, plasma y tejido mamario; **apartado 3.4**), las muestras del estudio de farmacocinética en animales (plasma y tejido mamario; **apartado 4.3**) y los medios celulares de cultivo (**apartado 5.7**).

El equipo está formado por un equipo de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) Agilent 1290 Infinity acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) (6550 Agilent Technologies) y una interfase ESI.

El analizador QTOF acopla dos analizadores en serie. El analizador de tiempo de vuelo (TOF) discrimina los iones en función de su relación *m/z* según la distinta velocidad que adquieren estos en el interior de un tubo de vuelo. Se basa en el hecho de que los iones acelerados por un campo eléctrico adquieren distintas velocidades según el valor de su relación *m/z* y por tanto, tardan distinto tiempo en recorrer una determinada distancia. Considerando constantes la carga y la energía cinética de los iones formados en la fuente, la medida del tiempo de vuelo permite determinar de forma muy precisa la masa de cada uno de estos iones. Una de las principales ventajas del analizador TOF es que proporciona una resolución muy elevada que permite obtener valores de la masa de un compuesto muy exactos (hasta cuatro decimales) y permite la determinación de la fórmula molecular del compuesto, combinando la determinación de masas exactas con el análisis de la distribución isotópica. Además, antes del analizador TOF se introduce un cuadrupolo para poder seleccionar los analitos que se quieren fragmentar, seguido de una celda de colisión donde se produce la fragmentación de los iones. Esto nos da la posibilidad de obtener los perfiles de fragmentación de los compuestos (MS/MS) añadiendo un tercer nivel de información que se une a la exactitud de masas y a la distribución isotópica para la identificación de compuestos.

Todo esto convierte al espectrómetro de masas QTOF en una herramienta excepcional para la identificación de compuestos desconocidos. Además, dada su alta sensibilidad permite cuantificar compuestos que se encuentran en muy bajas concentraciones, como por ejemplo metabolitos en muestras biológicas.



Figura 3.25. Equipo UPLC-ESI-QTOF (MS/MS) 1290 series (Agilent).

Para la separación cromatográfica se utilizó una columna de fase reversa Poroshell 120 EC-C18 de dimensiones 3 x 100 mm y 2,7 μm de tamaño de partícula (Agilent), operando a 30 ºC. Como fases móviles se utilizó agua con 0,1% de ácido fórmico (fase A) y ACN con 0,1% de ácido fórmico (fase B) con la siguiente elución por gradiente: de 0 a 3 min, 5-15%; de 3 a 11 min, 15-30% B; de 11 a 15 min, 30-50% B; de 15 a 21 min, 50-90% B. Finalmente, se vuelve a las condiciones iniciales en un minuto (5% de B) y se mantienen 5 minutos para equilibrar la columna. El flujo fue 0,4 mL/min y el volumen de inyección de las muestras fue de 3 μL para orina, plasma y medios celulares y 5 μL para las muestras de tejido.

En el espectrómetro de masas se utilizó nitrógeno como gas de nebulización y secado a una presión de 45 psi, un flujo de 9 L/min y una temperatura de 400 ºC. Se trabajó en los dos modos de ionización, negativo y positivo, para abarcar el mayor número posible

de metabolitos, y con un rango de masas de 100 a 1.100 *m/z*. Los datos fueron procesados usando el software Mass Hunter Qualitative (versión B.06.00, Agilent Technologies).

Para la identificación de los compuestos se utilizó una estrategia de metabolómica dirigida. Se creó una lista de aproximadamente 200 posibles metabolitos que se podían generar a partir de los compuestos consumidos en las cápsulas (incluyendo derivados glucurónidos, sulfatos, metilados, etc.) de los compuestos mayoritarios presentes en los extractos consumidos, o bien para derivados de RSV, en el caso de los análisis de metabolismo en modelos celulares. Para cada metabolito se aplicó su masa exacta con una ventana de extracción de 0,01 *m/z*.

Solo se consideraron identificados aquellos metabolitos que estaban presentes en al menos un 50% de las muestras de las pacientes del grupo que consumieron cápsulas y no aparecían en las muestras de aquellas pacientes del grupo control.

También se usó la fragmentación MS/MS de la molécula para confirmar la identidad. En la fragmentación MS/MS los espectros fueron recogidos en el rango de 50-800 *m/z* usando una ventana de tiempo de retención de 1 minuto, energía de colisión de 20 V y una adquisición de 4 espectros.

Para muchos de los compuestos fue posible corroborar su presencia en las muestras por comparación directa con estándares disponibles. En aquellos que no se disponía de estándares, la identificación se consideró como "tentativa".

La cuantificación de los metabolitos se llevó a cabo utilizando rectas de calibrado de sus patrones disponibles. Se cuantificaron en masas utilizando el área del pico de su cromatograma de ion extraído (EIC, "*Extracted Ion Chromatogram*"). Los compuestos fenólicos fueron cuantificados en modo negativo y las metilxantinas en modo positivo.

6.2.1. Validación del método

La validación del método se realizó en términos de linealidad, sensibilidad y precisión. Los principales parámetros analizados para la validación del método se detallan a continuación:

- **Desviación estándar relativa (%DER):** Se define como la relación (*ratio*) entre la desviación standard y la media. Este valor refleja la reproducibilidad de nuestro análisis. Los valores de DER se midieron tanto en el mismo día (intra-D, "*intra-day*") como en días diferentes (inter-D, "*inter-day*").

Los valores intra-D se calcularon inyectando la misma muestra durante 3 análisis consecutivos con las mismas condiciones. Los valores inter-D se calcularon inyectando la misma muestra con las mismas condiciones en tres días consecutivos.

- **Límite de detección (LOD):** Corresponde a la menor señal que se puede identificar de un analito. Para su cálculo se inyectaron bajas concentraciones de los patrones y se aplicó el criterio del *ratio* señal/ruido (S/R) ≥3.

- **Límite de cuantificación (LOQ):** Corresponde a la menor señal que se puede cuantificar de un analito. Para su cálculo se inyectaron bajas concentraciones de los patrones y se aplicó el criterio del *ratio* señal/ruido (S/R) ≥10.

- **Efecto matriz (%EM):** Corresponde a cómo afecta la matriz a la respuesta de los analitos que estamos midiendo. Se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\%\, EM = \frac{pendiente\ en\ matriz - pendiente\ en\ metanol}{\text{pendiente en metanol}} \times 100$$

Se construyeron rectas de calibrado de cada uno de los metabolitos disponibles en metanol y en la matriz (muestra de orina diluida, plasma y tejido) y se compararon las

pendientes de ambas rectas. En la mayoría de casos el porcentaje EM fue <30% por lo que pudimos utilizar las rectas de calibrado en MeOH.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los diferentes experimentos se realizó utilizando el programa SPSS, versión 23.0 (SPSS Science; Chicago, EE. UU.). Todos los datos mostrados son expresados como la media ± desviación estándar (DE), de varias medidas independientes (n=3 como mínimo).

En el estudio clínico que se detalla en el **Capítulo 4**, para poder evaluar las diferencias intraindividuales entre las concentraciones de metabolitos detectadas en las muestras de TSM y TTM se realizó el test de Shapiro-Wilk, para corroborar la distribución normal de los datos. Estos datos, que carecían de una distribución normal, se analizaron con el test no paramétrico de la prueba de los rangos de Wilcoxon.

En los ensayos con modelos celulares detallados en el **Capítulo 6** y **Capítulo 7**, el efecto de los compuestos ensayados frente al control se evaluó mediante el análisis de varianza (ANOVA). En los experimentos *in vitro* donde se evaluó la actividad antiproliferativa a corto plazo y actividad estrogénica/antiestrogénica de diferentes compuestos en forma libre (aglicona), también de sus metabolitos conjugados de fase-II (**Capítulo 6**) y respectivamente frente a un control celular, se evaluaron las diferencias mediante el "test de la t de Student".

Respecto al análisis farmacocinético que se realizó en el experimento con el modelo animal de roedor que se detalla en el **Capítulo 5**, se utilizó la herramienta PKSolver que consiste en un complemento para el software Microsoft Excel. Los datos se obtuvieron considerando un modelo no compartimental de una administración única por vía oral.

Los niveles de significación se ajustaron a $*P < 0,05$ y valores próximos a la significancia $0,1 > {}^{\#}P > 0,05$.

Todas las gráficas se hicieron usando el programa Sigma Plot version 13.0 (Systat Software; California, EE. UU.).

CAPÍTULO 4

Perfil metabólico de fenólicos y metilxantinas de la dieta en tejido mamario sano y tumoral de pacientes con cáncer de mama: Estudio clínico POLYSEN

Ávila-Gálvez, M.Á., García-Villalba, R., Martínez-Díaz, F., Ocaña-Castillo, B., Monedero-Saiz, T., Torrecillas-Sánchez, A., Abellán, B., González-Sarrías, A. and Espín, J.C. Metabolic profiling of dietary polyphenols and methylxanthines in normal and malignant mammary tissues from breast cancer patients. *Mol Nutr Food Res*, **2019**, 1801239.

Perfil metabólico de fenólicos y metilxantinas de la dieta en tejido mamario sano y tumoral de pacientes con cáncer de mama: Estudio clínico POLYSEN

RESUMEN

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer entre mujeres de todo el mundo. En las últimas décadas, varios estudios observacionales y epidemiológicos reflejan que una dieta rica en alimentos vegetales puede tener efectos beneficiosos frente a diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer de mama. Sin embargo, pese a estos estudios y a la alta evidencia observada en estudios preclínicos, sobre todo en modelos celulares, a día de hoy, la evidencia en humanos es todavía contradictoria.

Además de la escasa evidencia clínica, aún existe mucho desconocimiento de si los compuestos o metabolitos derivados de estos alimentos vegetales pueden llegar al tejido tumoral mamario y, por ende, si las concentraciones que puedan alcanzar y/o la forma molecular detectada en el tumor pueden ejercer actividad anticancerígena.

Ante estos antecedentes, el objetivo principal del presente capítulo fue realizar un estudio clínico en pacientes con lesión tumoral de mama para: 1) identificar y cuantificar los metabolitos procedentes de una mezcla de extractos vegetales representativos de la dieta, en tejido sano mamario (TSM) y tumoral (TTM); 2) caracterizar el perfil metabólico en muestras de orina y plasma y; 3) evaluar la actividad antiproliferativa, estrogénica y antiestrogénica de aquellos metabolitos que pudieran alcanzar el tejido tumoral en un modelo *in vitro* de cáncer de mama (MCF-7).

Para ello, se diseñó un estudio clínico controlado y aleatorizado que consistió en una intervención dietética en pacientes con lesión tumoral de mama que requerían cirugía. Un

grupo de pacientes (n=19) consumió 3 cápsulas diarias de una mezcla de resveratrol (RSV) y extractos vegetales (granada, naranja, limón, olivo, cacao y semilla de uva) frente a otro grupo control (n=8) que no consumió cápsulas. Cada paciente consumió 538,8 mg/día de fenólicos y 19,7 mg/día de metilxantinas. El día de la cirugía, los tejidos mamarios, sangre y orina se recogieron para su análisis posterior mediante UPLC-ESI-QTOF-MS/MS.

Los análisis de las muestras biológicas permitieron identificar un total de 101 metabolitos en orina, 69 en plasma, 39 en TSM y 33 en TTM. En el tejido mamario se detectaron principalmente metabolitos conjugados (glucurónidos y sulfatos), a excepción de las metilxantinas que se identificaron en forma libre. Los metabolitos más abundantes (se detallan valores de la mediana y el rango) en TTM fueron: ácido 2,5-dihidroxibenzoico (40,2; 27,7–52,2 pmol/g tejido), RSV 3-*O*-sulfato (86,4; 7,8–224,4 pmol/g tejido), dihidroresveratrol 3-*O*-glucurónido (109,9; 10,3–229,4 pmol/g tejido), urolitina A 3-*O*-glucurónido (26,2; 3,2–66,5 pmol/g tejido) y teobromina (715; 153,9–3.216 pmol/g tejido). En general, el perfil metabólico en TTM y TSM fue similar. Respecto al estudio *in vitro*, mezclas representativas de metabolitos detectados en tejido mamario no ejercieron actividad anticancerígena, ni tampoco actividad estrogénica/antiestrogénica en nuestras condiciones de ensayo.

Como principal conclusión de este estudio se destaca que se han identificado y cuantificado por primera vez diferentes metabolitos fenólicos y metilxantinas procedentes de la dieta en TTM de pacientes con cáncer de mama. Además, se ha demostrado que la conjugación de Fase-II de los metabolitos limita la actividad anticancerígena y estrogénica/antiestrogénica *in vitro*, incluso a concentraciones superiores a las detectadas *in vivo*.

1. INTRODUCCIÓN

Veíamos en el **Capítulo 1** de la Tesis (**Introducción**) que el cáncer de mama es el cáncer más diagnosticado entre mujeres a nivel mundial, y la primera causa de muerte por cáncer entre mujeres de todo el mundo (Bray et al., 2018). También comentamos que con la dieta se consumen diferentes fitoquímicos con potencial actividad anticancerígena, incluidos los compuestos fenólicos, presentes en alimentos de origen vegetal (verduras, frutas, aceite de oliva, té, cacao, etc.).

Numerosos estudios en animales han demostrado la actividad preventiva frente al cáncer de mama de diferentes alimentos vegetales ricos en compuestos fenólicos (**Capítulo 1**; **Tabla 1.8**). Sin embargo, no queda claro quién puede ser el responsable de los efectos observados.

También hemos comentado anteriormente que los polifenoles de la dieta son metabolizados, principalmente por la microbiota intestinal; y conjugados por acción de las enzimas de Fase-II, dando lugar a diversos derivados glucurónidos, sulfatos, etc. En estudios animales se ha observado que estos derivados metabólicos pueden circular en sangre, alcanzar numerosos tejidos (cerebro, hígado, riñón, próstata, colon, etc.) y ser excretados por orina y heces (González-Sarrías et al., 2009; Azorín-Ortuño et al., 2011). Sin embargo, los estudios de distribución en tejidos en humanos son mucho más limitados (González-Sarrías et al., 2010; Núñez-Sánchez et al., 2014).

Sin embargo, que estos metabolitos conjugados sean los fisiológicamente relevantes, no significa que hayan sido los mayoritariamente estudiados *in vitro*. Al contrario, son innumerables los estudios *in vitro* realizados hasta la fecha que se basan en la exposición de modelos celulares a tipos y concentraciones de polifenoles (tal como se encuentran en el alimento o en forma libre, sin conjugar) que muy dudosamente alcanzarían el tejido mamario.

Por otro lado, también comentábamos en el **Capítulo 1** que podemos ingerir una importante cantidad de alcaloides y sus derivados en la dieta (té, cacao y café), siendo las metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina) las más representativas. Se han descrito diferentes efectos beneficiosos para estos alcaloides, fundamentalmente psicoestimulantes, pero también otros, como por ejemplo, actividad frente al cáncer de mama (**Capítulo 1**, **apartado 4.3.1**).

Por tanto, considerando que diferentes compuestos pueden circular en sangre y encontrarse en diferentes tejidos sistémicos de animales, y también en humanos, es posible que diferentes compuestos o metabolitos fenólicos y metilxantinas de la dieta, o sus derivados metabólicos, puedan alcanzar el TTM donde ejerzan una posible actividad anticancerígena.

Para confirmar nuestra hipótesis, se realizó un estudio clínico en pacientes con cáncer de mama donde se exploró el perfil metabólico de diferentes compuestos fenólicos y metilxantinas en TSM, TTM, plasma y orina. Una vez identificadas las formas moleculares y concentraciones de los compuestos y/o metabolitos que alcanzaban el tejido mamario, se evaluó su posible actividad anticancerígena y estrogénica/antiestrogénica en un modelo *in vitro* de cáncer de mama.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Patrones y reactivos

Los patrones utilizados para la cuantificación de compuestos, los metabolitos conjugados de Fase-II y/o derivados de la microbiota empleados para la cuantificación y para realizar los tratamientos en los ensayos llevados a cabo en el modelo celular, así

como otros reactivos y disolventes orgánicos se obtuvieron como se describe en el **Capítulo 3**, **apartado 1**.

2.2. Extractos vegetales y formulación de las cápsulas empleadas

Los extractos empleados en el presente estudio clínico se adquirieron de la empresa Laboratorios Admira S.L. (Alcantarilla, Murcia, España). Las cantidades de cada extracto que contenían las cápsulas se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 2.1**. La extracción y análisis para determinar el contenido de compuestos se puede encontrar en el **Capítulo 3**, **apartado 2.2**. Respecto al análisis del extracto de semilla de uva para determinar la cantidad de procianidinas, se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 2.2.1**. La identificación y cuantificación de compuestos presentes en las cápsulas se analizó mediante HPLC-DAD-ESI-IT (MS/MS) como se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 6.1**, y en el **apartado 6.1.1** para las procianidinas del extracto de semilla de uva.

2.3. Pacientes y diseño del estudio

Tal como se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 3**, el estudio clínico cumplía con los principios éticos de la última declaración de Helsinki. Se realizó en el Hospital General Universitario Reina Sofía de Murcia (HGURS), cuyo comité ético de investigación clínica lo evaluó y aprobó previamente.

El periodo de reclutamiento comprendió los meses de junio a diciembre de 2017. Durante este periodo se reclutaron un total de 28 pacientes, de los cuales 27 completaron el estudio. La distribución de pacientes en cada uno de los grupos, así como la toma de las muestras el día de la cirugía, se puede ver en la **Figura 4.1**. Del total de pacientes que completaron el estudio (n=27), 19 pacientes participaron consumiendo las cápsulas de extractos vegetales y 8 de ellas participaron sin consumir cápsulas (grupo control). Las

pacientes que participaron consumiendo los extractos vegetales (n=19) tomaron 3 cápsulas diarias, desde el diagnóstico hasta la noche antes de la cirugía (6 ± 2 días), momento en el cual se dieron instrucciones para que se consumieran las 3 últimas cápsulas juntas. La dosis total ingerida en las 3 cápsulas diarias fue de 538,8 mg de compuestos fenólicos y de 19,7 mg de metilxantinas (teobromina y cafeína). Cabe destacar que aunque entre las pacientes (n=27) de este estudio 1 paciente era varón, en todo momento nos referiremos a "las pacientes", ya que el cáncer de mama es una patología claramente prevalente en la mujer y con una incidencia muy baja en varones.

Por último, con objeto de controlar posibles compuestos o metabolitos procedentes de la dieta, todas las pacientes anotaron lo que consumieron el día antes de la cirugía, especialmente el consumo de frutas, cacao, té o aceite de oliva.

2.4. Extracción y análisis de metabolitos en muestras de tejido, plasma y orina

El procesado de las muestras de tejido mamario, tanto de TSM como de TTM, ha sido detallado en el **Capítulo 3**, **apartado 3.4.1**; el procesado de las muestras de plasma y de orina se han detallado en el **Capítulo 3**, **apartado 3.4.2** y **apartado 3.4.3**, respectivamente. Por otro lado, la identificación y cuantificación de metabolitos en todas estas muestras biológicas se analizó mediante UPLC-ESI-QTOF-MS/MS como se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 6.2**.

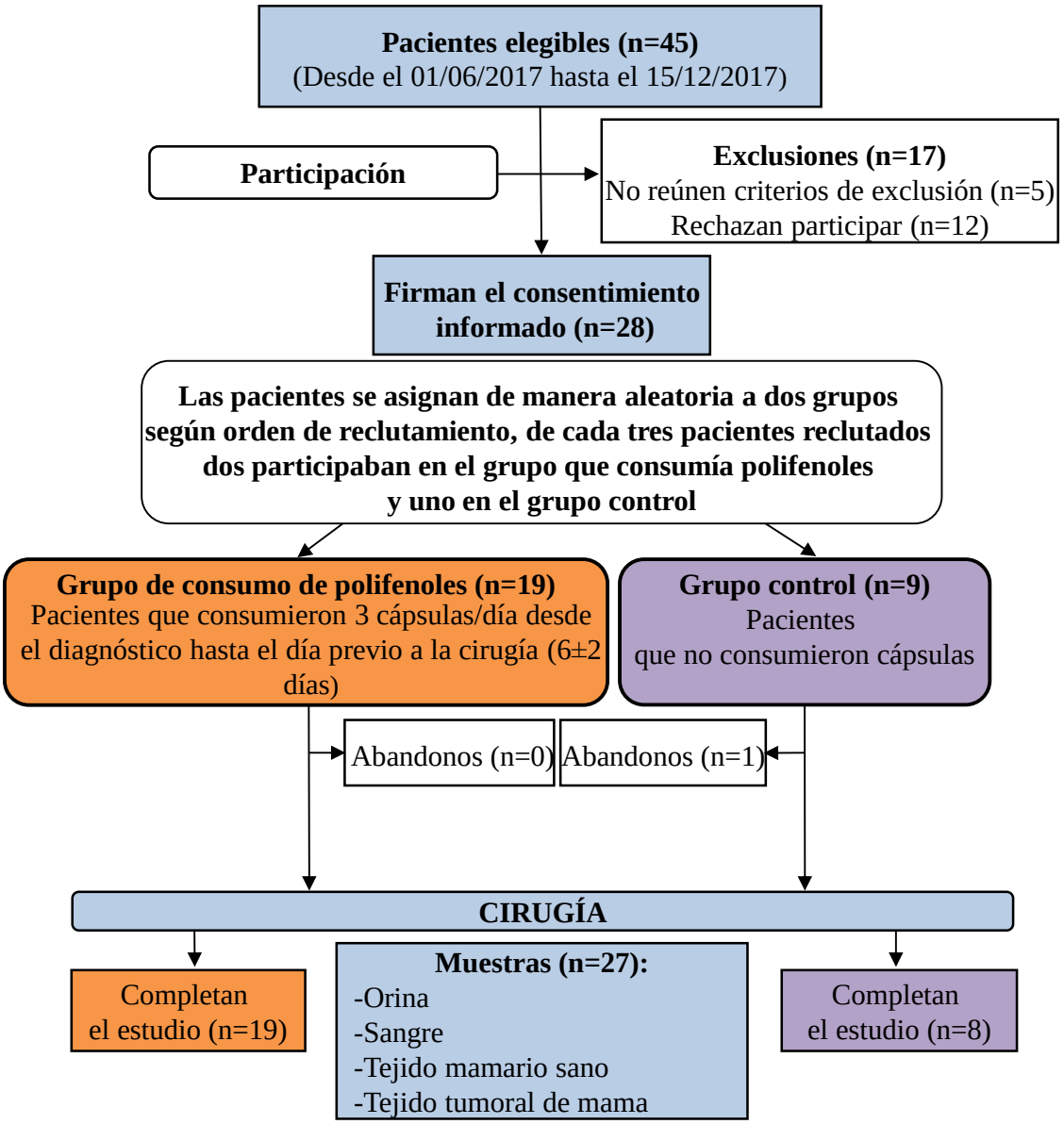


Figura 4.1. Flujo de pacientes en el estudio clínico POLYSEN.

2.5. Validación del método

El método de análisis de las muestras biológicas se validó en términos de linealidad, sensibilidad y precisión para todos los compuestos cuantificados. La validación y los parámetros analizados se detallan ampliamente en el **Capítulo 3**, **apartado 6.2.1.**

A continuación, en la **Tabla 4.1** y **Tabla 4.2** para fenólicos y metilxantinas, respectivamente, se detallan los porcentajes del efecto matriz (EM) (plasma, orina, tejido), los porcentajes de recuperación (en plasma y tejido, ya que el protocolo de las

muestras de orina no requería ninguna extracción), los LOD y LOQ, hasta que concentración mantenían la linealidad así como, la precisión del análisis de cada compuesto (expresado como porcentaje de DER), tanto en un mismo día (intra-D) como en días diferentes (inter-D).

El EM se evaluó en orina, plasma y tejido mamario, utilizando para ello muestras control que no presentaran los compuestos, esto fue posible para todos ellos en las tres matrices, a excepción de los ácidos 2,5- y 2,6- dihidroxibenzoicos y de la DHFV 3-sulf en orina, ya que estuvieron presentes en todas las orinas de las pacientes del grupo control. Debido a que las pacientes no se sometieron a ninguna restricción alimentaria durante la participación en este estudio, en la mayoría de las pacientes del grupo control se detectaron los ácidos 2,5- y 2,6- dihidroxibenzoicos, la DHFV 3-sulf en tres pacientes, y derivados de flavanonas (HP 3'-glur, HP 7-glur y HP 3'-sulf) en 1 paciente que registró el consumo de un zumo de naranja la noche antes a la intervención quirúrgica.

La recuperación de los compuestos se hizo por triplicado, usando muestras control de tejido mamario y plasma, añadiéndoles una mezcla de todos los patrones a una concentración final de 0,5 µM y realizando los protocolos de extracción para cada tipo de muestra descritos en el **Capítulo 3**, **apartados 3.4.1** y **3.4.2**, respectivamente**.** Los porcentajes de recuperación estuvieron entre el 43% y 85% en tejido mamario para los fenólicos (**Tabla 4.1**), y entre el 81% y 108% para las metilxantinas (**Tabla 4.2**).

En términos generales, todos los compuestos presentaron una buena linealidad, entre 2 y 5 µM para los fenólicos, excepto la Uro-B 3-sulf que la mantuvo hasta 1 µM. Por otro lado, todas las metilxantinas presentaron una linealidad de hasta 20 µM (**Tabla 4.2**).

Por último, la precisión se evaluó inyectando una mezcla de los patrones a 0,5 µM preparados en MeOH tres veces en el mismo día (intra-D) y en tres días diferentes (inter-D). En todos los casos el porcentaje de DER fue <3% intra-D y <13% inter-D**.**

2.6. Condiciones del cultivo celular y tratamientos

La línea celular de cáncer de mama MCF-7 que expresa receptores estrogénicos (RE+) se utilizó para evaluar tanto la actividad antiproliferativa como la actividad estrogénica/antiestrogénica de mezclas representativas de los metabolitos que se detectaron en el tejido mamario de las pacientes. Las condiciones de cultivo y mantenimiento de esta línea celular se detallan en el **Capítulo 3**, **apartado 5.1.1**.

Los metabolitos empleados se solubilizaron en DMSO y filtraron por 0,22 µm antes de añadirlos al medio de cultivo, siempre a una concentración final <0,5% de DMSO. En paralelo, siempre se ponía el correspondiente control de células (0,5% DMSO) para poder evaluar los cambios producidos por los tratamientos.

Para medir la actividad antiproliferativa, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 5.000 células por pocillo, y tras 48 horas se trataban con los distintos tratamientos a 10 y 50 µM. Las células se incubaron con los tratamientos durante 72 horas y la proliferación celular se determinó utilizando el método colorimétrico del XTT, detallado en el **Capítulo 3**, **apartado 5.2.2**. Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de inhibición de la proliferación respecto al control tratado con DMSO. Los ensayos se realizaron al menos 3 veces (n=12 pocillos por tratamiento en cada réplica).

Tabla 4.1. Parámetros analíticos para la determinación de diferentes fenólicos en muestras de orina, plasma y tejido mamario utilizando UPLC-ESI-QTOF-MS.

Compuesto	TR (min)	EM[1] (%)			Recuperación (%)		LOD (nM)	LOQ (nM)	Linealidad	Precisión (% DER[2])	
		Orina	Plasma	Tejido	Plasma	Tejido				Intra-D	Inter-D
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	4,63	-	+12,1	+1,1	79 ± 3	85 ± 4	17	59	LOQ-5 µM	2,3	0,8
DHFV 3'-sulf	5,26	-	+13,3	+3,2	81 ± 3	83 ± 1	1	4	LOQ -2 µM	0,4	10,6
Ácido 2,6-dihidroxibenzoico	5,38	-	19,2	-29,9	77 ± 1	76 ± 2	3	10	LOQ -5 µM	0,9	6,8
Uro-A 3-glur	6,28	-36,3	+3,4	+7,7	86 ± 2	67 ± 2	5	16	LOQ -5 µM	0,4	4,3
IsoUro-A 3-glur	6,72	+6,0	-17,3	+3,2	83 ± 2	64 ± 2	5	17	LOQ -5 µM	0,9	8,4
RSV 4'-sulf	7,18	+4,6	+22,8	-9,0	65 ± 3	60 ± 3	0,7	2	LOQ -5 µM	1,5	7,4
RSV 3-glur	7,27	-1,1	-16,7	+29,9	71 ± 2	61 ± 2	4	12	LOQ -5 µM	1,2	12,1
Uro-A sulf	7,83	-27,1	+7,0	-23,7	87 ± 2	60 ± 3	2	5	LOQ -2 µM	2,1	8,8
DH-RSV 3-glur	8,02	+5,5	-12,2	+6,2	73 ± 3	66 ± 3	6	20	LOQ -5 µM	1,1	0,9
RSV 3-sulf	8,29	-7,1	-2,3	-15,0	67 ± 3	43 ± 3	3	9	LOQ -5 µM	0,6	6,1
Uro-B 3-glur	9,76	-16,3	-7,1	-0,3	86 ± 3	75 ± 3	3	10	LOQ -5 µM	0,6	6,7
HP 7-glur	10,02	+10,5	-2,2	+14,8	61 ± 4	66 ± 3	7	22	LOQ -5 µM	1,1	8,1
HP 3'-glur	10,31	+8,9	+0,8	+9,2	65 ± 5	64 ± 4	7	23	LOQ -5 µM	1,9	7,1
HP 3'-sulf	10,76	+10,4	-11,1	+1,9	59 ± 4	56 ± 5	1	8	LOQ -5 µM	1,1	6,2
Uro-B 3-sulf	10,97	-15,7	+26,2	-13,5	79 ± 3	56 ± 7	0,7	2	LOQ -1 µM	1,2	3,6

[1]**EM**, Efecto matriz; [2]**DER**, Desviación Estándar Relativa**.**

Tabla 4.2. Parámetros analíticos para la determinación de diferentes metilxantinas en muestras de orina, plasma y tejido mamario utilizando UPLC-ESI-QTOF-MS.

Compuesto	TR (min)	EM[1] (%)			Recuperación (%)		LOD (nM)	LOQ (nM)	Linealidad	Precisión (% DER[2])	
		Orina	Plasma	Tejido	Plasma	Tejido				Intra-D	Inter-D
3-Metilxantina	2,24	-2,7	+2,4	+11,8	86 ± 6	81 ± 8	7	22	LOQ-20 µM	0,5	8,5
Teobromina	2,84	+3,1	-0,9	-15,2	99 ± 16	108 ± 26	10	35	LOQ-20 µM	1,2	1,3
Teofilina	3,44	-3,3	-2,1	-12,2	105 ± 19	107 ± 29	5	16	LOQ-20 µM	0,7	0,5
Cafeína	4,46	-8,3	-1,1	-14,1	118 ± 19	96 ± 13	5	17	LOQ-20 µM	1,6	4,0

[1]**EM**, Efecto matriz**;** [2]**DER**, Desviación Estándar Relativa**.**

2.7. Actividad estrogénica/antiestrogénica determinada con el ensayo E-SCREEN

La actividad estrogénica y antiestrogénica de los tratamientos se evaluó también a 10 y 50 µM, y se determinó usando el ensayo de E-SCREEN, como se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 5.2.3**.

La actividad estrogénica se evaluó midiendo el incremento de proliferación de las células tratadas con los distintos tratamientos frente al control de células tratadas con 1 nM de 17β-estradiol; mientras que la actividad antiestrogénica se evaluó como la disminución de la proliferación de las células co-tratadas con los tratamientos más 1 nM de 17β-estradiol frente al control de células tratadas con 1 nM de 17β-estradiol.

Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de proliferación respecto a los correspondientes controles. Los ensayos se realizaron al menos 3 veces (n=12 pocillos por tratamiento en cada réplica).

2.8. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron usando el software SPSS versión 23.0 (SPSS Science; Chicago, EE. UU.), tal como se detalla en el **capítulo 3**, **apartado 7**.

Las gráficas y figuras se realizaron utilizando el programa Sigma Plot versión 13.0 (Systat Software; California, EE. UU.).

3. RESULTADOS

3.1. Composición de fenólicos y metilxantinas en las cápsulas

Es importante destacar que la formulación de las cápsulas no fue diseñada para ver cambios clínicos en las pacientes, sino un punto de partida que sirviera para poder

explorar si los metabolitos derivados de los compuestos ingeridos podían llegar al tejido mamario. Así, la formulación fue concebida para aportar un número representativo de compuestos fenólicos de la dieta a partir de diferentes extractos comerciales. Estos extractos tenían purezas muy variadas para cada tipo de fenólico, lo que hacía muy difícil poder conseguir cantidades parecidas de cada compuesto.

El análisis por HPLC-DAD-ESI-IT (MS/MS) permitió identificar ocho clases diferentes de compuestos fenólicos: ácidos fenólicos, fenoles simples (Hytyr) y derivados hidroxibenzoicos como el EA; estilbenos; flavan-3-oles; flavonas; flavanonas; flavonoles; elagitaninos, y procianidinas. Además de los compuestos fenólicos, también se identificaron dos alcaloides del grupo de las metilxantinas (teobromina y cafeína).

Dentro de las clases anteriores, se identificaron un total de 39 compuestos (37 compuestos fenólicos y 2 alcaloides) procedentes de los extractos de granada, cacao, olivo, limón y naranja, además de RSV (forma *cis*- y *trans*-). En la **Tabla 4.3** se muestran todos los compuestos identificados y cuantificados, ordenados por tiempo de retención y con información acerca de su masa, su perfil de fragmentación, su máximo de absorbancia en UV, y en el extracto en el que fueron determinados. La cuantificación media por cápsula de estos compuestos fue 157,9 mg de fenólicos y 6,6 mg de metilxantinas.

Por otro lado, las procianidinas presentes en el extracto de semilla de uva fueron analizadas por reacción de floroglucinolisis. Este análisis permitió identificar un total de 8 compuestos (**Tabla 4.4**). De estos 8 compuestos, 4 fueron monómeros: catequina, epicatequina, catequina galato y epicatequina galato. Es importante destacar que, de estos monómeros, la catequina y epicatequina también se identificaron en el extracto de cacao, aunque en menor medida (**Tabla 4.3**).

Tabla 4.3. Compuestos identificados en la mezcla de extractos vegetales utilizando HPLC-DAD-ESI-IT-MS/MS.

Nº	Compuesto	TR (min)	*m/z*⁻	MS/MS	λ_{max}	Extracto	mg/g extracto ± DE	Consumo por cápsula (mg) ± DE
1	**Ácido gálico**	8,71	169	124	270	Granada	0,29 ± 0,02	0,20 ± 0,01
2	**Punicalina**	9,80	781	721/601/299	258/380	Granada	1,39 ± 0,16	0,97 ± 0,13
3	**Ácido protocatéquico**	11,56	153	109	230/260	Cacao	0,50 ± 0,05	0,35 ± 0,03
4	**Hytyr**	11,63	153	123	272	Olivo	7,28 ± 0,41	5,09 ± 0,29
5	**Teobromina**	12,80	179	-	272	Cacao	9,15 ± 0,28	6,41 ± 0,19
6	**Punicalagina**	13,12/15,18	1083	781/721/601	258/380	Granada	20,86 ± 2,34	14,6 ± 1,64
7	**Catequina**	15,72	289	245	278	Cacao	0,14 ± 0,05	0,10 ± 0,04
8	**Cafeína**	17,72	193	-	272	Cacao	0,23 ± 0,00	0,16 ± 0,00
9	**Ácido ferúlico *O*-Glu**	18,00	355	235/217/193/175/160/134	295/328	Limón	3,95 ± 0,53	2,76 ± 0,37
10	**Luteolina 6,8-di-*C*-Glu**	18,32	609	519/489/399/369	270/338	Limón	0,37 ± 0,04	0,26 ± 0,03
11	**Epicatequina**	18,57	289	245	280	Cacao	0,17 ± 0,03	0,12 ± 0,02
12	**Glucósido del EA**	19,30	463	301	252/362	Granada	1,00 ± 0,09	0,7 ± 0,07
13	**Apigenina 6,8-di-*C*-Glu (Vicenina2)**	19,64	593	503/473/383/353	271/332	Limón	1,36 ± 0,02	0,95 ± 0,01
14	**Eriodictiol-Glu-Ramn-Glu**	19,93	757	595/449/287	282/330	Limón	0,78 ± 0,09	0,54 ± 0,06
15	**Diosmetina 6,8-di-*C*-Glu**	20,51	623	605/533/503/413/383	270/346	Limón	0,68 ± 0,04	0,48 ± 0,03
16	**Ácido galágico**	20,95	601	299/271/242	254/380	Granada	0,63 ± 0,06	0,44 ± 0,04
17	**Crisoeriol 6,8-di-*C*-Glu**	21,05	623	533/503/413/383	270/346	Limón	2,26 ± 0,04	1,58 ± 0,03
18	**Luteolina 6 u 8-*C*-Glu**	21,96	447	429/357/327	270/338	Limón	0,32 ± 0,03	0,22 ± 0,02
19	**Eriocitrina (Eriodictiol rutinósido)**	22,58	595	459/329/287	284/334	Limón	13,83 ± 0,98	9,68 ± 0,68
20	**Ribósido del EA**	22,59	447	301	252/364	Granada	0,42 ± 0,04	0,29 ± 0,03
21	**Apigenina 8-*C*-xilanopiranosil-Glu**	23,39	563	413/341/311/293	268/332	Limón	0,59 ± 0,09	0,41 ± 0,06
22	**EA**	23,62	301	256/184	254/360	Granada	47,95 ± 4,85	33,57 ± 3,39
23	**Quercetina 3-*O*-rutinósido (Rutina)**	23,94	609	301	254/350	Limón	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,01
24	**Luteolina 7-*O*-rutinósido**	24,06	593	285	260/348	Naranja Limón	0,05 ± 0,02 1,32 ± 0,03	0,03 ± 0,01 0,92 ± 0,02

25	**Diosmetina 8-*C*-Glu**	24,88	461	371/341	268/344	Limón	0,84 ± 0,03	0,59 ± 0,02
26	**Naringenina 7-*O*-rutinósido (Naringina)**	25,02	579	271	278/328	Limón Naranja	NC 0,47 ± 0,16	NC 0,33 ± 0,11
27	**Limocitrina-Glu-HMG-Glu**	26,16	813	753/693/651/549	260/272/350	Limón	0,45 ± 0,02	0,32 ± 0,02
28	**Apigenina 7-*O*-rutinósido**	26,16	577	269	270/342	Limón Naranja	NC 0,06 ± 0,02	NC 0,04 ± 0,01
29	**Limocitrina-neohesperidósido**	26,33	653	345/330/301	S	Limón	NC	NC
30	**HP 7-*O*-rutinósido (Hesperidina)**	26,61	609	301	284/336	Naranja Limón	37,15 ± 0,85 2,19 ± 0,08	26,01 ± 0,60 1,54 ± 0,06
31	**Diosmetina 7-*O*-rutinósido (Diosmina)**	26,90	607	299/284	270/334	Limón Naranja	NC 1,00 ± 0,63	NC 0,70 ± 0,44
32	**Isoramnetina rutinósido**	27,05	623	315/299	254/368	Naranja	0,05 ± 0,03	0,04 ± 0,02
33	**HP glucósido**	27,80	462	301	284/330	Naranja	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01
34	**Limocitrina-HMG-Glu**	27,98	651	549/507/345	274/350	Limón	0,15 ± 0,01	0,10 ± 0,00
35	**Limocitrol-Glu-HMG**	28,16	681	619/579/537/375	S	Limón	NC	NC
36	***trans*-RSV**	28,55	227	185	306	Resveratrol	76,12 ± 7,14	53,29 ± 5,00
37	***cis*-RSV**	31,68	227	185/159	286	Resveratrol	0,23 ± 0,06	0,16 ± 0,04
38	**Isosakuranetina 7-neohesperidósido (Poncirina)**	31,88	593	285	284/332	Naranja	0,47 ± 0,16	0,33 ± 0,11
39	**HP**	35,60	301	-	288/330	Naranja	0,26 ± 0,01	0,18 ± 0,01
	TOTAL FENÓLICOS						**225,7 ± 19,2**	**157,9 ± 13,5**
	TOTAL METILXANTINAS						**9,4 ± 0,3**	**6,6 ± 0,2**

TR, Tiempo de retención; **Nº**, Número del compuesto según orden de elución; **DE**, Desviación Estándar. Abreviaturas: **EA**: ácido elágico; **Glu**, glucósido; **HMG**, 3-hidroxi-3-metil-glutaril; **HP**, hesperetina; **Hytyr**, hidroxitirosol; **NC**, identificado, pero no cuantificado; **Ramn**, ramnósido; **RSV**, resveratrol; **S**, corresponde a compuestos que su pico en UV está solapado con otro compuesto y no podemos definir λ_{max} ni tampoco podemos cuantificarlo.

En la **Tabla 4.4** se muestra la información de los compuestos identificados y cuantificados en el extracto de semilla de uva, ordenados por tiempo de retención, información de su masa y perfil de fragmentación. Todos ellos presentaron un máximo de absorbancia en UV a 280 nm. Las procianidinas del extracto de semilla de uva aportaron una media por cápsula de 21,7 mg.

En definitiva, teniendo en cuenta el aporte total de todos los extractos, cada cápsula contenía 179,6 mg de fenólicos y 6,6 mg de metilxantinas, lo que resultó en un consumo diario de las pacientes de 538,8 mg de fenólicos y 19,7 mg de metilxantinas considerando las 3 cápsulas ingeridas al día.

Tabla 4.4. Compuestos identificados en el extracto de semilla de uva mediante reacción de floroglucinolisis utilizando HPLC-DAD-ESI-IT-MS/MS.

Nº	**Compuesto**	**TR (min)**	***m/z*⁻**	**MS/MS**	**mg/g extracto ± DE**	**Consumo por cápsula (mg) ± DE**
1’	**Aducto de catequina**	9,13	289	287/261/175/125	1,28 ± 0,04	0,89 ± 0,03
2’	**Aducto de epicatequina**	9,80	289	287/261/175/125	10,30 ± 0,24	7,21 ± 0,17
3’	**Catequina**	13,16	289	271/245/205/179	9,74 ± 0,36	6,82 ± 0,26
4’	**Aducto de galato de epicatequina**	15,22	441	439/413/395/287/261	1,78 ± 0,04	1,25 ± 0,03
5’	**Aducto de epicatequina**	17,27	289	271/245/205/179	5,09 ± 0,19	3,56 ± 0,13
6’	**Aducto de galato de catequina**	18,63	441	439/413/395/287/261	0,54 ± 0,02	0,38 ± 0,02
7’	**Galato de Epicatequina**	23,42	441	397/331/289/193/169	1,59 ± 0,05	1,11 ± 0,04
8’	**Galato de catequina**	23,84	441	397/331/289/193/169	0,72 ± 0,02	0,50 ± 0,02
	TOTAL PROCIANIDINAS				**31,0 ± 0,9**	**21,7 ± 0,7**
GPm (grado medio de polimerización) 1,80 ± 0,02						

TR, Tiempo de retención; **Nº**, Número del compuesto según orden de elución; **DE**, Desviación Estándar.

3.2. Características de las pacientes

Las características de las pacientes, así como la clasificación de sus tumores, se muestran en la **Tabla 4.5**.

El perfil medio de la paciente que participó en el estudio clínico se correspondió con una mujer de 56 años de edad media, con menopausia instaurada, no fumadora, con sobrepeso (IMC=28 ± 6,6) y con antecedente familiar de cáncer (en un 69% de los casos).

La mayoría de los tumores fueron carcinoma ductal infiltrante, mientras que el 96% de los tumores fueron RE+ y el 77% RPg+. Solo una paciente del grupo control fue diagnosticada con un cáncer triple negativo (RE-, RPg- y HER2-). Respecto a la clasificación TNM para la estadificación de tumores, la mayoría fueron T1 (tumor de unos 2 cm) y T2 (tumor entre 2-5 cm); N0 (sin propagación a ganglios linfáticos adyacentes); y M0 (sin metástasis a distancia).

3.3. Perfil metabólico de fenólicos, metilxantinas y sus derivados en orina, plasma y tejido mamario

Para la identificación de compuestos y metabolitos en las muestras biológicas se aplicó la metabolómica dirigida. Se realizó una búsqueda de un total de 200 posibles metabolitos que podían estar presentes tras el consumo de las cápsulas. Se identificaron un total de 101 metabolitos en orina (90 derivados de compuestos fenólicos y 11 procedentes de metilxantinas). De estos 101 metabolitos, 69 se detectaron en plasma y de estos últimos, un total de 39 en TSM y 33 en TTM (**Tabla 4.6** y **Tabla 4.7**).

Tabla 4.5. Características de las pacientes con cáncer de mama y la clasificación de sus tumores.

	Pacientes (n=27)	
	Consumidoras de extractos (n=19)	**Control (n=8)**
Edad media ± DE, rango	56 ± 10, (41–76)	56 ± 10, (45–76)
IMC medio (kg/m^2), rango	28 ± 6, (22–45)	29 ± 8, (21–45)
Mujeres/hombres	18/1	8/0
Menopausia (sí/no)	12/6	6/2
Localización del tumor (derecha/izquierda)	12/7	4/4
Tabaquismo:		
>10 cigarrillos/día	4	2
<10 cigarrillos/día	2	0
NO	13	6
Tipo de tumor:		
Ductal	15	6
Lobular	1	0
Mixto	1	1
Otros	2	1
Tamaño del tumor[a]:		
Tis (*in situ)*	1	1
T1	11	2
T2	6	5
T3	1	0
Gánglios linfáticos[a]:		
N0	17	5
N1	2	3
Metástasis[a]:		
MX	6	3
M0	13	5
HER2 +/-	2/17	0/8
RE +/-	19/0	7/1
RPg +/-	13/6	7/1

[a]De acuerdo a la clasificación TNM. Abreviaturas: **HER2**, receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 ("*human epidermal growth factor receptor 2"*); **RE**, receptor de estrógeno; **RPg**, receptor progesterona.

La estrategia aplicada para la identificación de estos compuestos fue seleccionar aquellos metabolitos que presentaban un pico cromatográfico intenso en el EIC y estuvieran presentes en al menos un 80% de las muestras de las pacientes del grupo

consumidoras de extractos. Para todos los compuestos, se obtuvo su fórmula molecular con un alto *score* (>90%) y un bajo error (<5 ppm) y además, se analizó su perfil de fragmentación MS/MS. En la **Tabla 4.6** se muestran los fenólicos y sus metabolitos derivados (analizados en "modo negativo") identificados en las muestras biológicas, detallando sus características moleculares y cromatográficas. Por otro lado, en la **Tabla 4.7** se muestra la misma información, pero de las metilxantinas y sus derivados (analizados en "modo positivo"). Es importante destacar que solo se cuantificaron aquellos compuestos de los que se dispuso de patrones y que se detectaron en tejido mamario. En definitiva, el total de compuestos cuantificados en las muestras de orina, plasma, TSM y TTM fue de 15 derivados de compuestos fenólicos (**Tabla 4.8**) y 4 derivados de metilxantinas (**Tabla 4.9**).

En general, la concentración de derivados de compuestos fenólicos fue algo mayor en TTM que en TSM. Al explorar las diferencias intraindividuales para todos los compuestos cuantificados en tejido mamario, se observó mayor cantidad en TTM que en TSM de RSV 3-sulf (1,5 veces más, P=0,07), y para el metabolito DHFV 3'-sulf (2,5 veces más, P=0,02).

Tabla 4.6. Compuestos fenólicos y metabolitos derivados identificados en tejido mamario sano (**S**) y tumoral (**T**), plasma (**P**) y orina (**O**) de pacientes con cáncer de mama mediante UPLC-ESI-QTOF-MS.

Nº	Compuesto	TR (min)	*m/z*⁻ experimental	MS/MS	Fórmula molecular	Error (ppm)	*Score*	Localización
1	**Hytyr sulfoglur**	2,30	409,0440	329/233/153	$C_{14}H_{18}O_{12}S$	0,84	95,38	**O**
2	**Hytyr-glur (Isómero 1)***	2,85	329,0878	153/123/113	$C_{14}H_{18}O_9$	0,12	99,87	**O**
3	**Ácido benzoico sulf***	3,06	216,9810	137/93	$C_7H_6O_6S$	1,18	99,24	**O,P,S,T**
4	**Hytyr-glur (Isómero 2)***	3,12	329,0876	153/123/113	$C_{14}H_{18}O_9$	0,11	97,81	**O**
5	**Ácido hidroxi-hipúrico (Isómero 1)***	3,24	194,0462	150/93	$C_9H_9NO_4$	0,90	99,84	**O,P,S,T**
6	**Hytyr sulf (Isómero 1)***	3,25	233,0127	153/123	$C_8H_{10}O_6S$	-0,60	98,16	**O,P**
7	**Alcohol homovanílico glur**	3,37	343,1027	167/113	$C_{15}H_{20}O_9$	1,73	96,48	**O**
8	**Ácido dihidroxifenil acético glur***	3,56	343,0670	167/113	$C_{14}H_{16}O_{10}$	0,05	99,41	**O**
9	**Ácido dihidroxifenil propiónico glur***	3,59	357,0825	181/137	$C_{15}H_{18}O_{10}$	0,71	99,58	**O,P**
10	**Tirosol glur***	3,59	313,0926	137/122	$C_{14}H_{18}O_8$	1,16	99,11	**O**
11	**Ácido hidroxi-hipúrico glur***	3,63	370,0779	194/150	$C_{15}H_{17}NO_{10}$	-0,13	98,80	**O**
12	**Ácido hidroxi-hipúrico (Isómero 2)***	3,69	194,0462	180/137/93	$C_9H_9NO_4$	0,90	99,84	**O,P,S,T**
13	**DHFV sulfoglur***	3,69	463,0549	383/287/207	$C_{17}H_{20}O_{13}S$	0,59	97,13	**O,P**
14	**Ácido dihidroxi-fenilpropiónico sulf***	3,74	261,0078	181/137/122	$C_9H_{10}O_7S$	-1,17	98,10	**O,P**
15	**Ácido caféico sulf***	3,80	258,9916	179/122	$C_9H_8O_7S$	0,64	98,59	**O**
16	**Ácido hidroxi-(hidroxi-metoxifenil) valérico glur***	3,94	415,1245	239/113	$C_{18}H_{24}O_{11}$	0,39	99,07	**O,P**
17	**Ácido hidroxi-(dihidroxifenil) valérico sulf (Isómero 1)***	3,99	305,0336	225/123/101	$C_{11}H_{14}O_8S$	0,12	98,71	**O,P,S,T**
18	**RSV diglur (Isómero 1)**	4,18	579,1356	403/227	$C_{26}H_{28}O_{15}$	-0,60	99,56	**O,P**
19	**Alcohol homovanílico sulf***	4,20	247,0280	167/112/79	$C_9H_{12}O_6S$	-1,24	93,81	**O**
20	**Ácido hidroxi-(dihidroxifenil) valérico sulf (Isómero 2)***	4,23	305,0336	225/208/164	$C_{11}H_{14}O_8S$	0,28	97,65	**O,P,S**
21	**Tirosol***	4,23	137,0608	95/109	$C_8H_{10}O_2$	0,10	98,37	**O,P**
22	**Ácido metoxi-(hidroxifenil) propiónico glur (Isómero 1)***	4,50	371,0979	195/113	$C_{16}H_{20}O_{10}$	0,99	99,28	**O**
23	**Ácido metoxi-(hidroxifenil) propiónico sulf***	4,51	275,0232	195/59	$C_{10}H_{12}O_7S$	0,23	98,85	**O,P,S,T**
24	**Uro-A sulfoglur**	4,54	483,0233	403/306/227	$C_{19}H_{16}O_{13}S$	0,97	97,60	**O,P,S,T**

25	**RSV diglur (Isómero 2)**	4,60	579,1356	403/227	$C_{26}H_{28}O_{15}$	-0,73	97,36	**O,P**
26	**Ácido 2,5-dihidroxibenzoico***	4,63	153,0192	108/68	$C_7H_6O_4$	-0,16	99,78	**O,P,S,T**
27	**Epicatequina glur**	4,73	465,1041	289	$C_{21}H_{22}O_{12}$	-0,43	98,65	**O**
28	**Ácido hidroxifenil propiónico sulf***	4,78	245,0128	165/121	$C_9H_{10}O_6S$	-1,28	98,02	**O,P**
29	**Ácido hidroxifenil propiónico glur***	4,85	341,0874	165/59	$C_{15}H_{18}O_9$	0,80	99,32	**O,P**
30	**N-[4′-hidroxi-3′-metoxi-E-cinamoil]-L-ácido aspártico***	4,88	308,0774	132/113	$C_{14}H_{15}N0_7$	0,37	99,21	**O**
31	**RSV sulfoglur (Isómero 1)**	4,89	483,0603	403/307/227	$C_{20}H_{20}O_{12}S$	0,06	98,05	**O,P,S,T**
32	**Hytyr sulf (Isómero 2)***	4,95	233,0125	153/123	$C_8H_{10}O_6S$	-0,54	99,01	**O,P**
33	**Epicatequina sulf**	5,04	369,0285	289/245	$C_{15}H_{14}O_9S$	0,24	98,45	**O**
34	**EA glur**	5,05	477,0299	300/212	$C_{20}H_{14}O_{14}$	2,41	94,80	**O**
35	**Metil éter epicatequina sulf (Isómero 1)***	5,12	383,0441	303/207	$C_{16}H_{16}O_9S$	0,76	96,79	**O**
36	**DHFV glur***	5,14	383,0982	207/163/113	$C_{17}H_{20}O_{10}$	0,58	99,37	**O,P**
37	**DHFV 3'-sulf ***	5,26	287,0229	207/163	$C_{11}H_{12}O_7S$	0,66	98,03	**O,P,S,T**
38	**5'-(metoxihidroxifenil)-γ-valerolactona glur***	5,29	397,1139	221/206/113	$C_{18}H_{22}O_{10}$	0,36	99,75	**O,P**
39	**Ácido 2,6-dihidroxibenzoico***	5,38	153,0192	109/65	$C_7H_6O_4$	-0,43	98,78	**O,P,S,T**
40	**5'-(metoxihidroxifenil)-γ-valerolactona sulf***	5,40	301,0386	221/206/162	$C_{12}H_{14}O_7S$	-0,14	98,17	**O,P**
41	**RSV sulfoglur (Isómero 2)**	5,45	483,0603	403/307/227	$C_{20}H_{20}O_{12}S$	0,12	98,45	**O,P,S**
42	**Metil éter epicatequina sulf (Isómero 2)***	5,57	383,0441	303/137	$C_{16}H_{16}O_9S$	0,51	97,65	**O**
43	**RSV disulf**	5,65	386,9850	307/227	$C_{14}H_{12}O_9S_2$	-0,97	95,44	**O,P**
44	**5-(3'-hidroxifenil)-γ-valerolatona glur**	5,66	367,1031	268/191	$C_{17}H_{20}O_9$	1,24	98,96	**O,P**
45	**5-(3'-hidroxifenil)-γ-valerolatona sulf**	5,73	271,0278	191/147	$C_{11}H_{12}O_6S$	1,26	97,90	**O,P**
46	**DH-RSV sulfoglur**	5,76	485,0754	405/409/229	$C_{20}H_{22}O_{12}S$	0,61	97,70	**O,P**
47	**RSV 4'-glur**	5,88	403,1033	227/113	$C_{20}H_{20}O_9$	0,52	99,78	**O,P,S,T**
48	**5'-(metoxihidroxifenil)-γ-valerolactona sulf***	5,90	301,0386	221/206/149	$C_{12}H_{14}O_7S$	-0,76	97,99	**O,P**
49	**Uro-C glur**	6,11	419,0615	243/175	$C_{19}H_{16}O_{11}$	1,26	98,24	**O,P**
50	**Uro-A 3-glur**	6,28	403,0676	227/187	$C_{19}H_{16}O_{10}$	-1,16	99,24	**O,P,S,T**
51	**Acetato de hidroxitirosol glur**	6,47	371,0983	195/151/113	$C_{16}H_{20}O_{10}$	0,43	98,40	**O**

52	**Ácido metoxi-(hidroxifenil) propiónico glur (Isómero 2)***	6,48	371,0979	195/151/113	$C_{16}H_{20}O_{10}$	1,12	99,03	**O,P**
53	**Ácido fenil propiónico glur***	6,67	325,0929	149/113/85	$C_{15}H_{18}O_{8}$	1,17	99,38	**O,P**
54	**IsoUro-A 3-glur**	6,72	403,0678	227	$C_{19}H_{16}O_{10}$	-1,60	97,99	**O,P,S**
55	**Ácido metil elágico glur**	6,75	491,0475	315/300	$C_{21}H_{16}O_{14}$	-1,05	97,79	**O**
56	**Ácido metoxi-(hidroxifenil) propiónico sulf (Isómero 2)***	6,84	275,0232	195/59	$C_{10}H_{12}O_{7}S$	0,28	98,35	**O,P,S**
57	**Eriodictiol sulfoglur***	6,86	543,0449	463/367	$C_{21}H_{20}O_{15}S$	0,20	98,19	**O**
58	**EA**	7,04	300,9992	229	$C_{14}H_{6}O_{8}$	-0,65	94,16	**O**
59	**RSV 4'-sulf**	7,18	307,0288	227	$C_{14}H_{12}O_{6}S$	-2,07	96,03	**O,P,S,T**
60	**Ácido ferúlico glur**	7,19	369,0824	193/149/113	$C_{16}H_{18}O_{10}$	0,69	99,41	**O,P**
61	**Ácido fenilpropiónico sulf**	7,27	229,0176	149/123/81	$C_{9}H_{10}O_{5}S$	-0,18	98,25	**O**
62	**RSV 3-glur**	7,27	403,1035	227/113	$C_{20}H_{20}O_{9}$	-0,55	97,07	**O,P,S,T**
63	**DH-RSV 4'-glur**	7,31	405,1191	229/113	$C_{20}H_{22}O_{9}$	-0,65	95,67	**O,P,S,T**
64	**Ácido dimetil elágico glur**	7,47	505,0623	329/263/127	$C_{22}H_{18}O_{14}$	-1,48	95,94	**O**
65	**DH-RSV sulf (Isómero 1)**	7,73	309,0443	123/229	$C_{14}H_{14}O_{6}S$	-1,57	97,12	**O,P,S,T**
66	**Uro-A sulf**	7,83	306,9925	227	$C_{13}H_{8}O_{7}S$	-2,30	95,83	**O,P,S,T**
67	**Ácido hidroxifenil valérico sulf**	7,90	273,0441	193	$C_{11}H_{14}O_{6}S$	-0,70	97,34	**O,P**
68	**Ácido hidroxifenil valérico glur**	7,99	369,1186	193/99	$C_{17}H_{22}O_{9}$	1,07	97,99	**O,P**
69	**DH-RSV 3-glur**	8,02	405,1199	229/113	$C_{20}H_{22}O_{9}$	-2,27	96,36	**O,P,S,T**
70	**RSV 3-sulf**	8,21	307,0287	227	$C_{14}H_{12}O_{6}S$	-1,91	95,35	**O,P,S,T**
71	**Tirosol sulf (Isómero 1)***	8,37	217,0176	137/122/79	$C_{8}H_{10}O_{5}S$	0,76	99,24	**O,P,S,T**
72	**DH-RSV sulf (Isómero 2)**	8,42	309,0443	123/229	$C_{14}H_{14}O_{6}S$	-1,74	96,98	**O,P,S,T**
73	**Uro-C**	8,47	243,0299	187	$C_{13}H_{8}O_{5}$	-2,51	97,73	**O,P**
74	**Tirosol sulf (Isómero 2)***	8,58	217,0176	137/122/79	$C_{8}H_{10}O_{5}S$	0,42	99,00	**O,P,S,T**
75	**Eriodictiol glur**	8,90	463,0880	287/151	$C_{21}H_{20}O_{12}$	0,48	99,47	**O,P**
76	**Narigenina-4'-glur***	9,18	447,0939	271/113	$C_{21}H_{20}O_{11}$	1,13	98,19	**O**
77	**Narigenina-7-glur***	9,35	447,0935	271/113	$C_{21}H_{20}O_{11}$	-0,83	95,11	**O**
78	**Ácido metil elágico**	9,56	315,0147	300	$C_{15}H_{8}O_{8}$	-0,16	99,69	**O**

79	**Uro-B 3-glur**	9,76	387,0731	211	$C_{19}H_{16}O_9$	-2,36	95,69	**O,P,S,T**
80	**HP 7-glur**	10,02	477,1042	301	$C_{22}H_{22}O_{12}$	-0,54	99,44	**O,P,S,T**
81	**HP 3'-glur**	10,31	477,1034	301	$C_{22}H_{22}O_{12}$	0,74	98,29	**O,P,S,T**
82	**Eriodictiol sulf***	10,43	367,0123	287/151	$C_{15}H_{12}O_9S$	0,63	98,93	**O,P**
83	**HP 3'-sulf**	10,76	381,0282	301	$C_{16}H_{14}O_9S$	1,06	98,92	**O,P,S,T**
84	**IsoUro-A**	10,84	227,0356	171/159	$C_{13}H_8O_4$	-2,62	98,41	**O**
85	**DH-RSV**	10,89	229,0878	138	$C_{14}H_{14}O_3$	-2,33	96,23	**O**
86	**Uro-B 3-sulf**	10,97	290,9975	211	$C_{13}H_8O_6S$	-2,33	96,23	**O,P,S,T**
87	**Uro-A**	11,12	227,0350	198/182/159	$C_{13}H_8O_4$	0,28	99,60	**O**
88	**Ácido dimetil elágico**	12,55	329,0296	314/299	$C_{16}H_{10}O_8$	1,97	98,25	**O**
89	**Ácido fenil-valérico glur***	13,78	353,1241	177/113	$C_{17}H_{22}O_8$	0,45	96,76	**O,P**
90	**Uro-B**	14,77	211,0405	167/139	$C_{13}H_8O_3$	-1,75	98,25	**O**

Nº, Número asignado al metabolito según el orden de elución (tiempo de retención, **TR**). *****Los compuestos que aparecen con asterisco también se detectaron en algunas de las muestras de las pacientes del grupo control; son metabolitos poco específicos que pueden proceder de diferentes fuentes de la dieta. Abreviaturas: **DHFV**, dihidroxifenil-ɣ-valerolactona; **DH-RSV**, dihidroresveratrol; **diglur**, diglucurónido; **disulf**, disulfato; **EA**, ácido elágico; **glur**, (-*O*-glur), glucurónido; **HP**, hesperetina; **Hytyr**, hidroxitirosol; **IsoUro-A**, isourolitina A; **RSV**, resveratrol; **sulf**, (-*O*-sulf), sulfato; **sulfoglur**, sulfoglucurónido; **Uro-A**, urolitina A; **Uro-B**, urolitina B; **Uro-C**, urolitina C.

Tabla 4.7. Metilxantinas y metabolitos derivados identificados en tejido mamario sano (**S**) y tumoral (**T**), plasma (**P**) y orina (**O**) de pacientes con cáncer de mama mediante UPLC-ESI-QTOF-MS.

Nº	Compuesto	TR (min)	m/z^+ experimental	MS/MS	Fórmula molecular	Error (ppm)	*Score*	Localización
1’	**Ácido metilúrico (isómero 1)***	1,96	183,0518	122/96	$C_6H_6N_4O_3$	-3,09	95,84	**O**
2’	**7-Metilxantina***	2,08	167,0564	124	$C_6H_6N_4O_2$	-2,04	97,70	**O,P,S,T**
3’	**Ácido metilúrico (isómero 2)***	2,11	183,0514	122/96	$C_6H_6N_4O_3$	-1,15	97,59	**O,P,S**
4’	**3-Metilxantina***	2,24	167,0573	124	$C_6H_6N_4O_2$	-3,71	94,26	**O,P,S,T**
5’	**1-Metilxantina***	2,40	167,0567	110	$C_6H_6N_4O_2$	-2,13	98,52	**O,P,S,T**
6’	**Ácido 1,3-dimetilúrico**	2,73	197,0674	197	$C_7H_8N_4O_3$	-2,47	98,42	**O,P**
7’	**Teobromina***	2,84	181,0725	110	$C_7H_8N_4O_2$	-2,04	97,70	**O,P,S,T**
8’	**Ácido 1,7-dimetilúrico**	3,20	197,0675	121	$C_7H_8N_4O_3$	-3,13	97,67	**O,P,S**
9’	**Teofilina***	3,44	181,0719	110	$C_7H_8N_4O_2$	-0,07	98,09	**O,P,S,T**
10’	**Ácido 1,3,7-trimetilúrico**	3,74	211,0833	154	$C_8H_{10}N_4O_3$	-1,19	90,58	**O**
11’	**Cafeína***	4,46	195,0874	154/138	$C_8H_{10}N_4O_2$	0,94	97,62	**O,P,S,T**

Nº, Número asignado al metabolito según el orden de elución (tiempo de retención, **TR**). *****Los compuestos que aparecen con asterisco también se detectan en algunas de las muestras de las pacientes que no han consumido; pueden proceder de fuentes de la dieta como el cacao, café o té.

Tabla 4.8. Compuestos fenólicos y metabolitos derivados cuantificados en TSM y TTM, plasma y orina de pacientes con cáncer de mama.

Nº	Compuesto	Concentración media ± DE mediana (rango)			
		TTM (pmol/g)	TSM (pmol/g)	Orina (nmol/mg creatinina)	Plasma (nM)
26	**Ácido 2,5-dihidroxibenzoico**	40,2 ± 17,5 40,2 (27,7–52,2)	31,1 ± 25,2 20,1 (14,9–83,5)	2,6 ± 1,3 1,9 (0,6–5,8)	36,6 ± 19,1 28,1 (13,5–69,5)
37	**DHFV 3'-sulf**	19,8 ± 19,4 14,6 (3,8–61,5)	6,9 ± 8,6 10,6 (0,8–75,0)	10,1 ± 12,2 5,6 (0,1–40,6)	56,3 ± 67,1 31,7 (1,7–227,7)
39	**Ácido 2,6-dihidroxibenzoico**	12,3 ± 5,8 13,6 (3,9–22,7)	7,7 ± 3,8 8,3 (2,5–15,0)	0,6 ± 0,6 0,6 (0,1–2,4)	56,9 ± 38,2 42,3 (14,2–152,3)
50	**Uro-A 3-glur**	29,4 ± 23,9 26,2 (3,2–66,5)	27,4 ± 21,2 27,4 (1,9–65,3)	16,6 ± 16,1 14,3 (0,07–56,2)	140,6 ± 142,2 99,5 (21,0–534,8)
54	**IsoUro-A 3-glur**	ND[a]	9,6 ± 5,4 8,4 (5,4–16,9)	17,6 ± 14,6 13,9 (5,7–37,2)	100,4 ± 91,4 91,6 (12,3–206,1)
59	**RSV 4'-sulf**	8,1 ± 3,9 8,1 (3,5–13,3)	3,9 ± 3,6 3,2 (1,3–13,3)	4,5 ± 3,8 2,9 (0,3–12,2)	30,4 ± 19,1 28,3 (4,0–71,2)
62	**RSV 3-glur**	29,2 ± 8,7 28,7 (20,0–41,1)	29,2 ± 31,4 20,3 (1,7–104,9)	95,3 ± 81,4 77,9 (7,9–275,5)	142,2 ± 105,3 153,4 (11,4–336,5)
66	**Uro-A sulf**	4,8 ± 3,5 4,8 (2,2–7,4)	5,4 ± 4,8 2,5 (1,8–11,9)	0,9 ± 1,2 1,3 (0,01–11,0)	18,0 ± 15,0 14,0 (1,9–42,7)
69	**DH-RSV 3-glur**	100,1 ± 85,5 109,9 (10,3–229,4)	82,4 ± 71,3 73,8 (1,7–234,6)	73,3 ± 131,3 33,9 (0,07–586,4)	665,6 ± 660,0 263,1 (6,8–1.811)
70	**RSV 3-sulf**	89,3 ± 71,1 86,4 (7,8–224,4)	56,5 ± 75,0 25,3 (3,9–280,1)	94,8 ± 82,1 74,7 (1,7–270,8)	359,7 ± 260,1 309,5 (3,0–918,7)
79	**Uro-B 3-glur**	11,3 ± 1,8 11,3 (10,0–12,3)	14,4 ± 5,1 13,9 (8,2–213,0)	15,9 ± 11,5 17,4 (3,1–28,7)	137,8 ± 76,3 178,4 (13,2–195,9)
80	**HP 7-glur**	5,0[b]	5,0 ± 3,3 5,8 (1,2–7,9)	0,8 ± 1,0 0,2 (0,04–3,4)	16,0 ± 11,3 12,1 (5,0–38,5)
81	**HP 3'-glur**	10,0 ± 6,2 12,9 (2,7–14,1)	3,7 ± 2,7 4,1 (1,0–10,0)	2,3 ± 3,5 0,6 (0,2–11,8)	27,0 ± 23,5 18,7 (5,9–79,9)
83	**HP 3'-sulf**	6,0 ± 4,4 6,0 (1,3–10,7)	2,3 ± 0,2 2,5 (1,3–3,8)	0,5 ± 0,5 0,2 (0,02–1,8)	20,0 ± 20,9 10,8 (4,2–77,9)
86	**Uro-B 3-sulf**	1,0 ± 0,6 1,0 (0,6–1,2)	1,3 ± 0,6 1,3 (0,6–1,8)	0,03 ± 0,03 0,02 (0,006–0,06)	9,7 ± 5,2 8,8 (4,9–16,2)

[a]No detectado. [b]Detectado solo en una paciente. **Nº**, Número de cada metabolito según **Tabla 4.6**.

Tabla 4.9. Metilxantinas y metabolitos derivados cuantificados en TSM y TTM, plasma y orina en pacientes con cáncer de mama.

Nº	Compuesto	Concentración media ± DE mediana (rango)			
		TTM (pmol/g)	TSM (pmol/g)	Orina (nmol/mg creatinina)	Plasma (nM)
4’	3-Metilxantina	523,5 ± 201,2 468,1 (303,0–875,9)	229,5 ± 172,9 149,4 (56,0–571,1)	57,8 ± 45,8 40,0 (10,8–148,2)	388,9 ± 287,7 270,0 (101,1–1.208)
7’	Teobromina	919,4 ± 827,2 715,0 (153,9–3.216)	620,0 ± 898,9 246,1 (20,6–3.903)	32,8 ± 30,0 24,4 (2,8–111,1)	2.345 ± 2.072 1.963 (279,6–7.941)
9’	Teofilina	570,0 ± 547,8 314,4 (22,8–1.881)	402,2 ± 561,7 179,4 (3,9–2.134)	31,1 ± 41,1 23,9 (0,2–177,2)	1.389 ± 1.595 495,4 (23,0–4.898)
11’	Cafeína	496,4 ± 692,8 181,4 (27,3–2.197)	409,3 ± 561,3 89,2 (5,7–2.011)	3,6 ± 3,6 2,6 (0,2–11,9)	1.468 ± 1.792 353,8 (26,0–6.348)

Nº, Número de cada metabolito según **Tabla 4.7**.

Con el objetivo de mostrar las diferencias entre muestras biológicas, a continuación, se muestra un cromatograma representativo de una paciente donde se puede ver la diferencia de intensidad y diversidad de compuestos fenólicos según la muestra representada: orina (**Figura 4.2**), plasma (**Figura 4.3**), TSM (**Figura 4.4**) y TTM (**Figura 4.5**). En conclusión, se puede observar que la detección de metabolitos fue muy superior en orina al resto de muestras, seguida del plasma, mientras que se observó un perfil bastante parecido en las muestras de tejido mamario, independientemente de que fuera sano o tumoral.

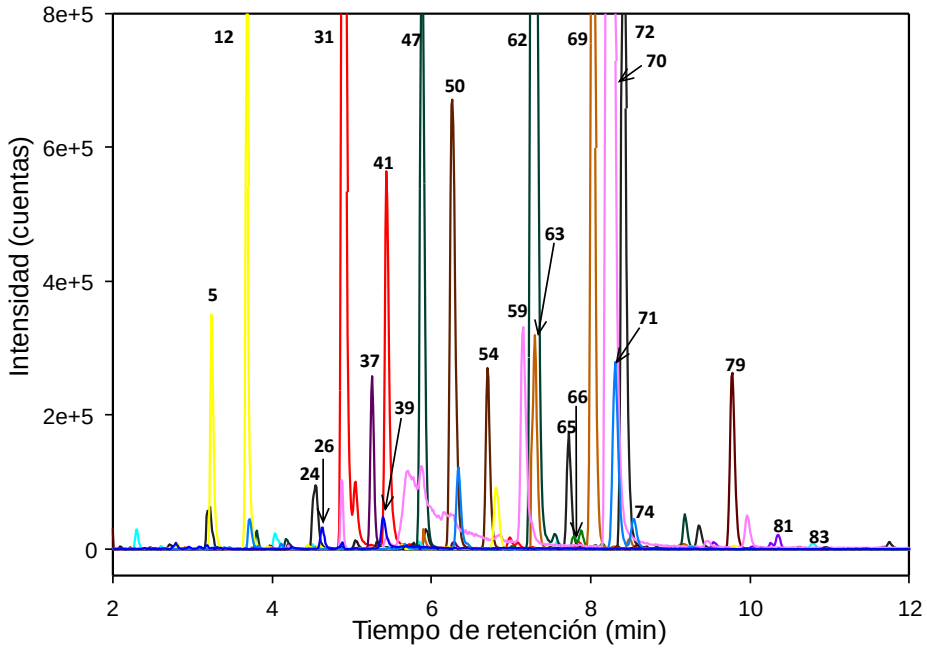


Figura 4.2. **EICs** de compuestos fenólicos en orina. El número de cada pico cromatográfico hace referencia a la **Tabla 4.6**.

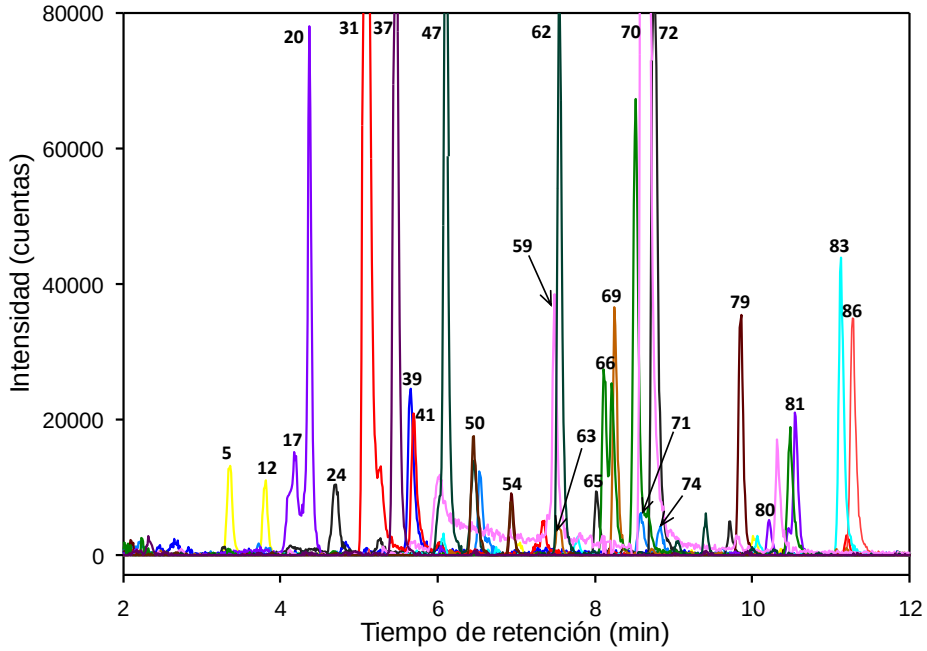


Figura 4.3. **EICs** de compuestos fenólicos en plasma. El número de cada pico cromatográfico hace referencia a la **Tabla 4.6**.

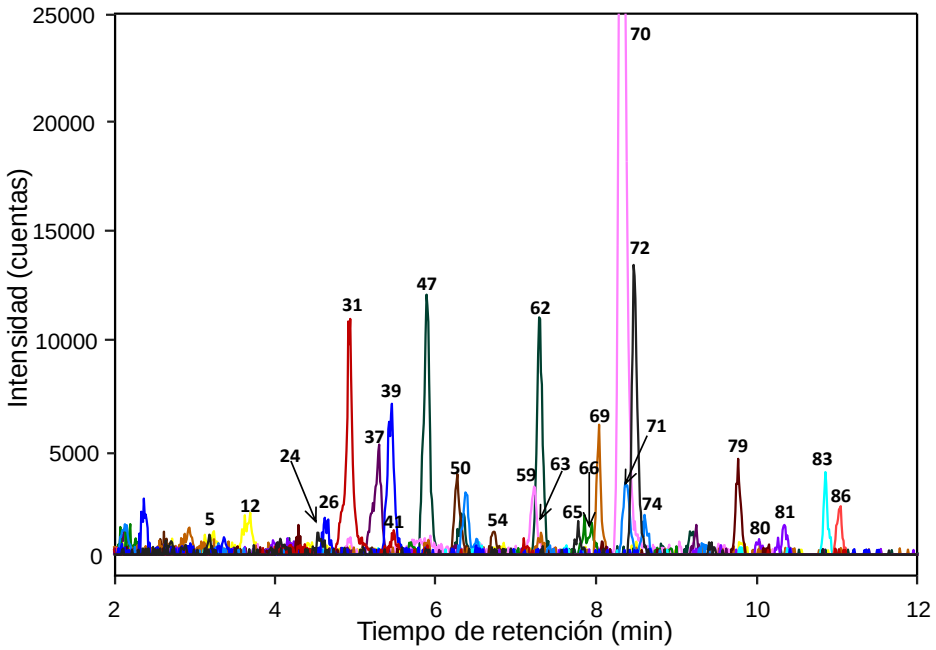


Figura 4.4. **EICs** de compuestos fenólicos en tejido sano mamario. El número de cada pico cromatográfico hace referencia a la **Tabla 4.6**.

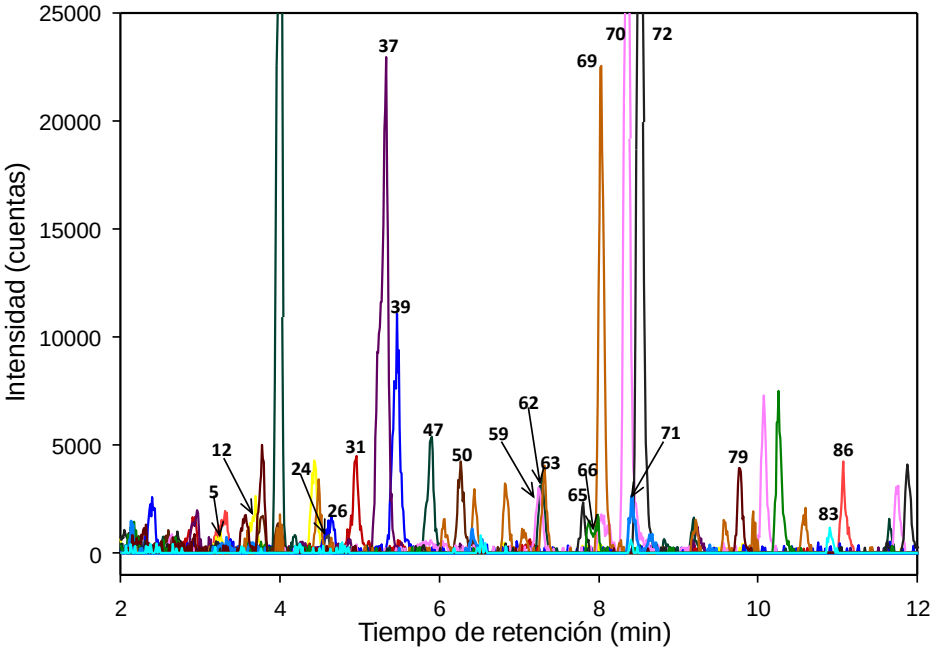


Figura 4.5. **EICs** de compuestos fenólicos en tejido tumoral mamario. El número de cada pico cromatográfico hace referencia a la **Tabla 4.6**.

En cuanto a los alcaloides del grupo de las metilxantinas presentes en el extracto de cacao (cafeína y teobromina), se detectaron diversos metabolitos derivados, así como las

propias cafeína y teobromina originalmente presentes en el extracto. En este caso, aunque la estrategia de búsqueda e identificación fue similar a la realizada para los metabolitos fenólicos, la detección se llevó a cabo mediante el modo de ionización "positivo" debido a que la señal de las metilxantinas (al ser derivados nitrogenados) es mucho mayor en positivo que en negativo. Como resultado de los análisis se identificaron 11 metilxantinas (**Tabla 4.7**), de las cuales 8 se detectaron en tejido mamario y 4 pudieron ser cuantificadas (**Tabla 4.9**).

Si se compara con lo observado para los metabolitos fenólicos, podemos observar que llegan a concentraciones bastante superiores (**Tabla 4.8** *vs* **Tabla 4.9**). Por este motivo, quisimos verificar si la concentración de metilxantinas podría ser mayor si aumentábamos la cantidad ingerida de extracto de cacao. Para ello seleccionamos una paciente (no incluida en los resultados finales de este estudio) para que consumiera tres cápsulas que contenían solo este extracto, cuadruplicando la dosis del extracto de cacao en cada cápsula. Esto supuso una ingesta diaria de unos 80 mg de teobromina y 2 mg de cafeína diarios frente a los 19 mg de teobromina y 0,5 de cafeína que consumieron el resto de las pacientes. Sin embargo, las cantidades detectadas en esta paciente estuvieron dentro del rango observado para el resto de las pacientes, justificando que las concentraciones que alcanzan el tejido mamario son "residuales". Por tanto, a pesar de la mayor cantidad ingerida, en el tiempo de ayuno previo a la cirugía se excretaba la gran mayoría de metabolitos, pudiendo detectar o cuantificar cantidades muy inferiores a las que podrían alcanzarse si se analizaran las muestras obtenidas a tiempo más corto tras su consumo.

Respecto a la cuantificación, las metilxantinas, al igual que los compuestos fenólicos, se detectaron en mayores concentraciones en TTM que en TSM (**Tabla 4.9**). Así, la concentración de cafeína fue 1,8 veces mayor en TTM que en TSM (P=0,06); para 3-

metilxantina 2 veces superior (P=0,02); para teobromina 2 veces superior (P<0,001); y para teofilina 1,5 veces superior (P=0,04).

A continuación, al igual que para los compuestos derivados de fenólicos, se muestra un cromatograma representativo de una paciente donde se puede ver la diferencia de intensidad y diversidad de las metilxantinas según la muestra representada (orina, plasma, TSM y TTM). En definitiva, el perfil de detección para las diferentes muestras fue similar al de los metabolitos derivados de compuestos fenólicos, siguiendo el orden: orina >> plasma > TTM ≥ TSM (**Figuras 4.6**, **4.7**, **4.9** y **4.8**, respectivamente), destacando una mayor detección de 7-metilxantina, 3-metilxanina, teobromina y teofilina en TTM frente al TSM (de 1,5 a 5 veces más, según metilxantina).

Centrándonos en las concentraciones obtenidas para cada familia de metabolitos derivados del consumo de las cápsulas encontramos que:

Los compuestos derivados de fenólicos más abundantes en TSM fueron (valores de mediana y rango en pmol/g): 2,5-ácido dihidroxibenzoico (20,1; 14,9–83,5) (compuesto 26, **Figura 4.4**); Uro-A 3-glur (27,4; 1,9–65,3) (compuesto 50, **Figura 4.4**); RSV 3-glur (20,3; 1,7–104,9) (compuesto 62, **Figura 4.4**); DH-RSV 3-glur (73,8; 1,7–234,6) (compuesto 69, **Figura 4.4**) y RSV 3-sulf (25,3; 3,9–280,1) (compuesto 70, **Figura 4.4**). Respecto a TTM, los compuestos derivados de fenólicos más abundantes fueron los mismos que en TSM: 2,5-ácido dihidroxibenzoico (40,2; 27,7–52,2) (compuesto 26, **Figura 4.5**); Uro-A 3-glur (26,2; 3,2–66,5) (compuesto 50, **Figura 4.5**); RSV 3-glur (28,7; 20,0–41,1) (compuesto 62, **Figura 4.5**); DH-RSV 3-glur (109,9; 10,3–229,4) (compuesto 69, **Figura 4.5**); y RSV 3-sulf (86,4; 7,8–224,4) (compuesto 70, **Figura 4.5**). En referencia a las metilxantinas, el compuesto mayoritario fue teobromina tanto en TSM (246,1; 20,6–3.903) (compuesto 7', **Figura 4.8**) como en TTM (715; 153,9–3.216) (compuesto 7', **Figura 4.9**).

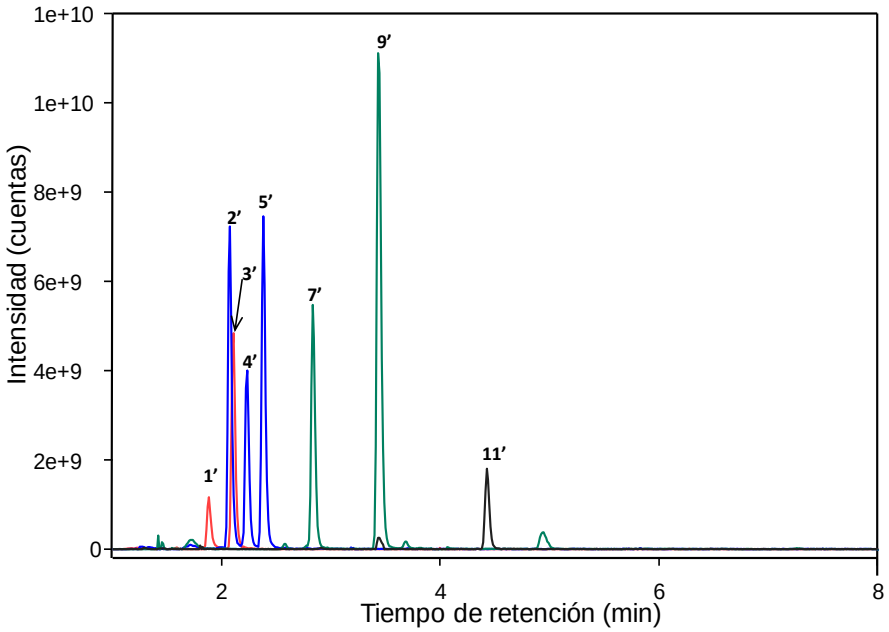


Figura 4.6. **EICs** de metilxantinas en orina. El número de cada pico cromatográfico hace referencia a la **Tabla 4.7**.

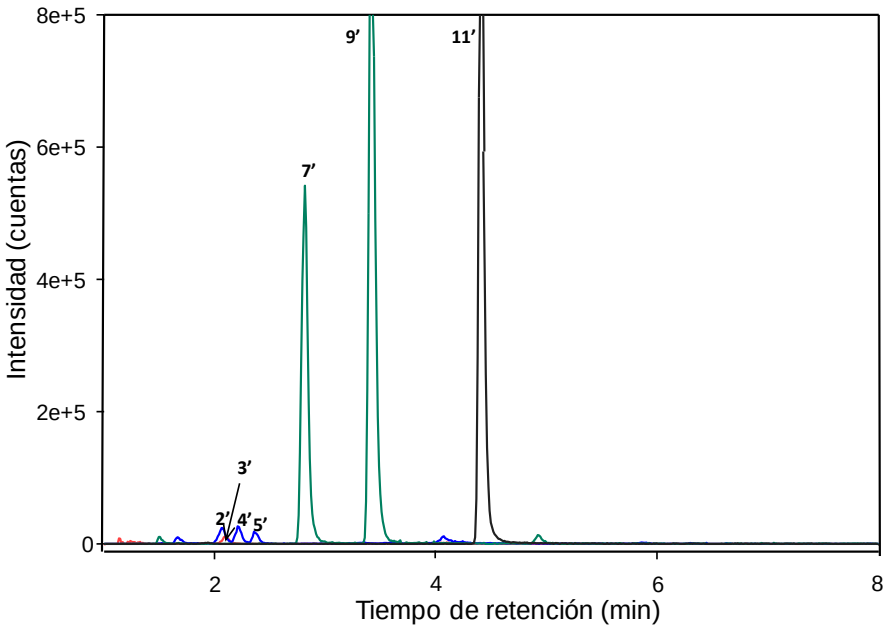


Figura 4.7. **EICs** de metilxantinas en plasma. El número de cada pico cromatográfico hace referencia a la **Tabla 4.7**.

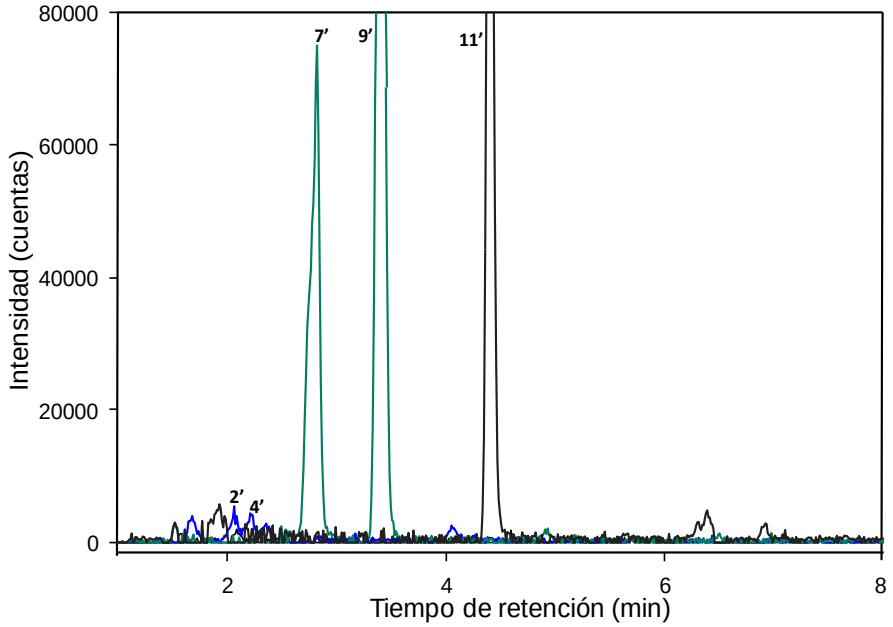


Figura 4.8. **EICs** de metilxantinas en tejido sano mamario. El número de cada pico cromatográfico hace referencia a la **Tabla 4.7**.

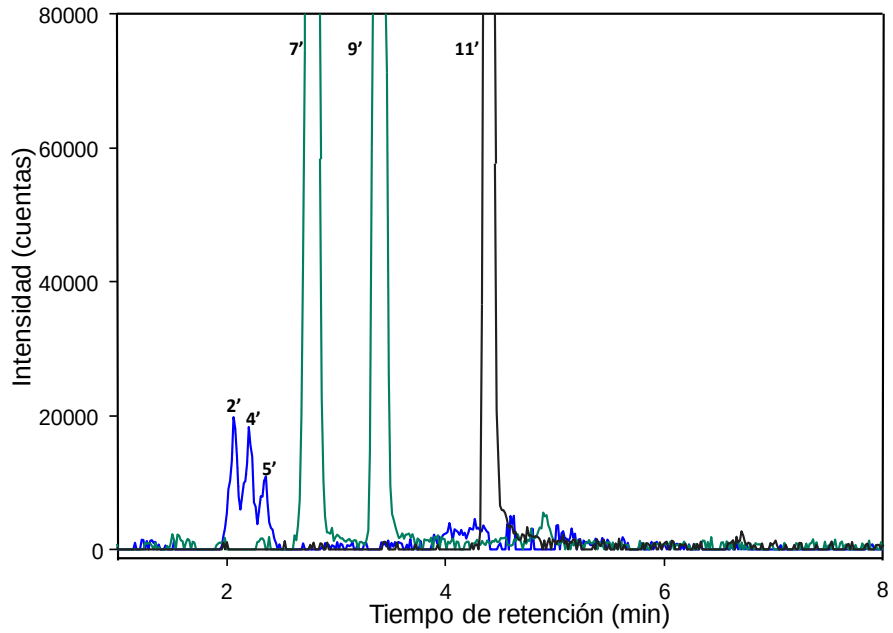


Figura 4.9. **EICs** de metilxantinas en tejido tumoral mamario. El número de cada pico cromatográfico hace referencia a la **Tabla 4.7**.

Respecto al perfil de los metabolitos conjugados detectados en TSM y TTM, hay que indicar que todas las metilxantinas se detectaron en forma libre, mientras que los conjugados fenólicos fueron en su gran mayoría glucurónidos y sulfatos, tanto en TSM como en TTM (86,6% y 85,5%, respectivamente). Entre estos conjugados de Fase-II se observó un ligero porcentaje superior de sulfatos (42%) en TTM frente a TSM (31%), mientras que en las muestras de orina y plasma este porcentaje fue del 29 y 32%, respectivamente, estando en consonancia con el 31% observado en TSM. Por último, los únicos metabolitos fenólicos en forma libre que se cuantificaron en tejido mamario fueron los ácidos 2,5- y 2,6- dihidroxibenzoicos.

Por otro lado, el análisis del tejido adiposo (TA) que fue posible realizar en 3 pacientes, permitió identificar que las concentraciones detectadas tanto de fenólicos como de metilxantinas fueron sustancialmente inferiores a las observadas en TSM. Además, los siguientes metabolitos no se detectaron en TA: HP 3'-glur, IsoUro-A 3-glur, Uro-B 3-glur, RSV 3-glur, RSV 4'-sulf, Uro-B 3-sulf y Uro-A 3-sulf, mientras que otros metabolitos como HP 7-glur, HP 3'-sulf y, los ácidos 2,5- y 2,6- dihidroxibenzoicos, se detectaron por debajo del LOQ, por lo que no fue posible su cuantificación. Además, la diferencia de distribución que existió entre TSM/TA de los metabolitos que pudieron cuantificarse en TA fue la siguiente: 99,99/0,01 para DHFV 3'-sulf; 99,97/0,03 para Uro-A 3-glur; 99,98/0,02 para DH-RSV 3-glur y 99,99/0,01 para RSV 3-sulf. Estos ratios fueron similares en las metilxantinas: 99,96/0,04 para 3-metilxantina; 99,95/0,05 para teobromina; 99,98/0,02 para teofilina y 99,93/0,07 para cafeína.

Por último, aunque también se realizó la cuantificación tras la hidrólisis enzimática en tejido mamario, solo fue posible cuantificar los ácidos 2,5- y 2,6- dihidroxibenzoicos, HP, Uro-A, IsoUro-A y Uro-B en su forma libre. Los rangos de valores obtenidos para cada uno de ellos fueron: HP (de 3,5 a 172 pmol/g en TSM y 18,1–261,4 pmol/g en TTM)

(LOD: 0,1 nM y LOQ: 0,6 nM), Uro-A (de 2,1–29,6 pmol/g en TSM y de 4,3–34,6 pmol/g en TTM) (LOD: 1 nM y LOQ: 4 nM), Iso-A (de 3,2–3,8 pmol/g en TSM y de 1,8–7 pmol/g en TTM) (LOD: 0,2 nM y LOQ: 0,8 nM), y Uro-B (de 2–19,6 pmol/g en TSM y de 8–15,7 pmol/g en TTM) (LOD: 0,5 nM y LOQ: 2 nM).

Resulta curioso que pese a que los metabolitos derivados de RSV fueron los más representativos y abundantes en el tejido mamario (**Tabla 4.6**, **Tabla 4.8**), tras la hidrólisis enzimática no fue posible cuantificar RSV en forma libre. Esto podría explicarse por las diferencias en los LOQ, valor relativamente alto para RSV (LOQ=130 nM) en comparación con sus metabolitos conjugados de Fase-II (**Tabla 4.1**), RSV 4'-sulf (LOQ=2 nM), RSV 3-glur (LOQ=12 nM) y RSV 3-sulf (LOQ=9 nM). Por esta misma razón, tampoco se pudo cuantificar la forma libre de DHFV.

3.5. Actividad antiproliferativa, citotóxica y estrogénica/antiestrogénica de los metabolitos detectados en el tejido mamario

Nuestro siguiente objetivo fue evaluar la potencial actividad antiproliferativa (dependiente o no de estrógenos) ensayando mezclas representativas de los compuestos detectados en TTM de fenólicos (MF), metilxantinas (MX), y de una mezcla de ambas (MF + MX), en la línea celular MCF-7 (**Tabla 4.10**). Es importante destacar que estas mezclas se ensayaron también a concentraciones de 10 y 50 μM (más altas que las detectadas en tejido mamario).

Estas mezclas se detallan en la **Tabla 4.10**, indicando los porcentajes de cada uno de los compuestos que contenía cada una de las mezclas, así como el porcentaje que representaban estos en la mezcla de ambas. Los resultados mostraron que ninguna de las

mezclas, ni la combinación de ambas, tuvo efecto citotóxico ni actividad antiproliferativa en la línea celular MCF-7 tras 72 horas de incubación a ambas concentraciones ensayadas.

Por otro lado, debido a la analogía estructural de algunos derivados fenólicos con el 17β-estradiol, como por ejemplo con la Uro-A (**Figura 4.10**), se evaluó la posible actividad estrogénica/antiestrogénica que los compuestos que alcanzaban el tejido mamario pudieran tener mediante el ensayo de E-SCREEN.

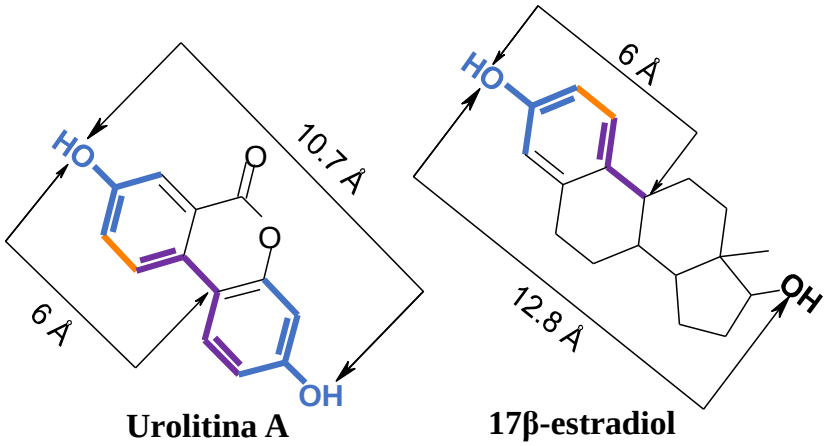


Figura 4.10. Estructuras de Urolitina A y 17β-estradiol donde se muestra la presencia de bióforos (diferente color) y la distancia entre ellos, los cuales se relacionan con la capacidad de unión a receptores estrogénicos. (Adaptada de Larrosa et al., 2006).

Las mezclas evaluadas para medir estas actividades fueron las mismas que se detallan en la **Tabla 4.10** y las concentraciones 10 y 50 µM.

Como cabía esperar, en el control positivo, el tratamiento con 17β-estradiol (1 nM) produjo una inducción del crecimiento superior a tres veces en comparación con las células control (**Figura 4.11**). Sin embargo, las mezclas representativas a concentraciones fisiológicamente relevantes (en el momento concreto de análisis del tejido), y a concentraciones superiores de 10 e incluso 50 µM, no fueron capaces de incrementar la proliferación al compararlo con el control positivo (**Figura 4.11A**). Por tanto, los metabolitos que alcanzan el tejido mamario tumoral, a concentraciones incluso muy

superiores, parece que no pueden unirse al receptor estrogénico y, por tanto, no ejercen actividad estrogénica, al menos en nuestras condiciones de ensayo.

Tabla 4.10. Mezclas de compuestos derivados de fenólicos (**MF**) y metilxantinas (**MX**) individuales o en combinación (**MF** + **MX**) que ilustran los diferentes metabolitos detectados en TTM.

Compuesto	MF + MX	MF	MX
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	2%	10%	-
DHFV 3'-sulf	0,8%	4%	-
Ácido 2,6-dihidroxibenzoico	0,8%	4%	-
Uro-A 3-glur	1,4%	7%	-
IsoUro-A 3-glur	0,8%	4%	-
RSV 4'-sulf	0,4%	2%	-
RSV 3-glur	1,6%	8%	-
Uro-A sulf	0,2%	1%	-
DH-RSV 3-glur	6%	30%	-
RSV 3-sulf	4%	20%	-
Uro-B 3-glur	0,6%	3%	-
HP 7-glur	0,2%	1%	-
HP 3'-glur	0,6%	3%	-
HP 3'-sulf	0,4%	2%	-
Uro-B 3-sulf	0,2%	1%	-
3-Metilxantina	20%	-	25%
Teobromina	32%	-	40%
Teofilina	16%	-	20%
Cafeína	12%	-	15%
CONCENTRACIONES FINALES	**10 y 50 µM**		

Respecto a la actividad antiestrogénica, definida como la capacidad de los metabolitos para competir con el estradiol por sus receptores y prevenir la actividad estrogénica ejercida por este, las mezclas representativas en combinación con 1 nM de 17β-estradiol, no disminuyeron la proliferación celular promovida por el 17β-estradiol por lo que tampoco ejercieron actividad antiestrogénica (**Figura 4.11B**).

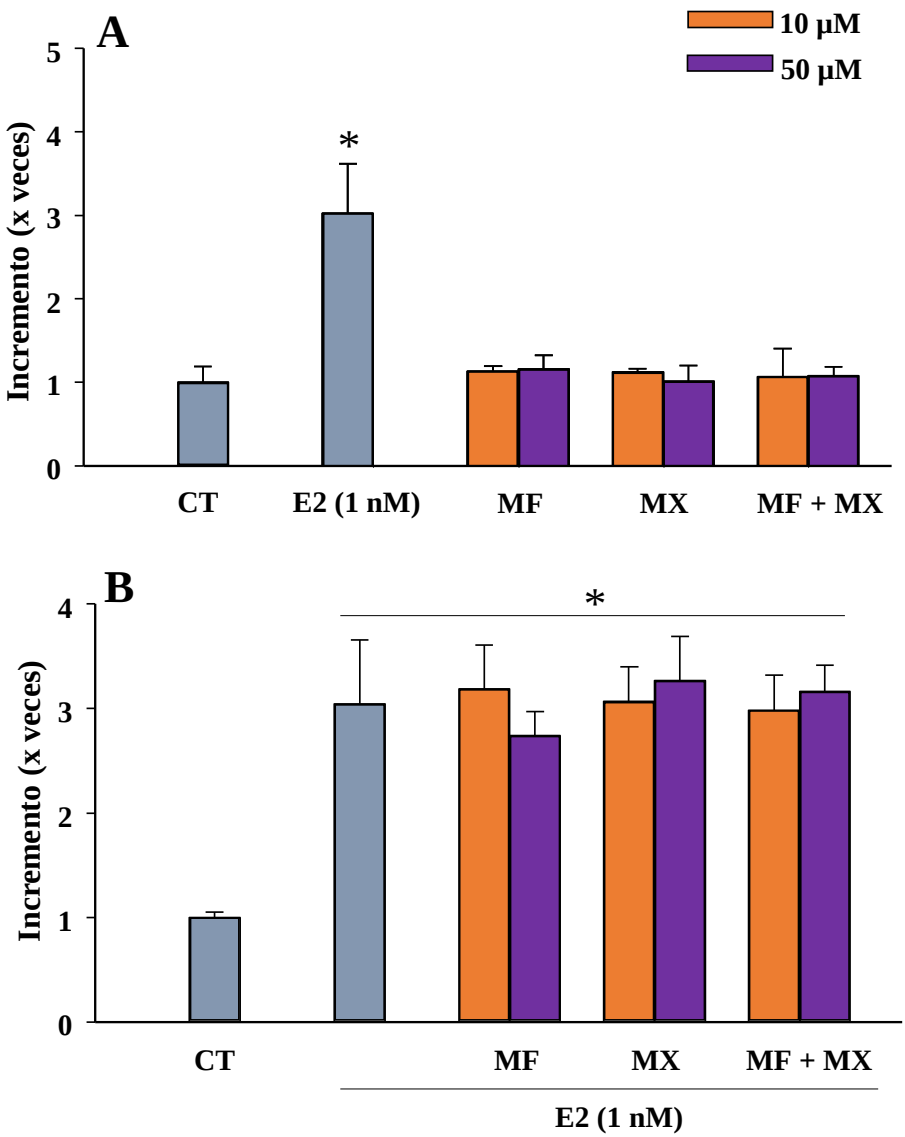


Figura 4.11. (**A**) Actividad estrogénica y (**B**) antiestrogénica de metabolitos detectados en tejido mamario. Se muestran los cambios inducidos respecto a células control. **E2**, 17β-estradiol; **MF**, mezcla de metabolitos fenólicos; **MX**, mezcla de metilxantinas; **MF + MX**, mezcla de metabolitos fenólicos y metilxantinas. **P*<0,05 (diferencias respecto al control, **CT**).

4. DISCUSIÓN

Aunque algunos estudios previos con polifenoles de la dieta han descrito una potencial actividad anticancerígena en modelos animales de carcinogénesis en la mama (Amatori et al., 2016; Bishayee et al., 2016; Singhal et al., 2018), hay que indicar que se desconocía

si estos polifenoles o sus metabolitos derivados eran capaces de alcanzar el tejido mamario en humanos.

En este trabajo se ha dado respuesta a dos preguntas fundamentales: 1) Al tejido tumoral mamario llegan diferentes metabolitos de compuestos fenólicos, pero en forma de conjugados de Fase-II (principalmente glucurónidos y sulfatos), además de diferentes metilxantinas en forma libre y, 2) las concentraciones y formas moleculares que llegan realmente al tejido tumoral mamario no ejercen actividad anticancerígena ni tampoco estrogénica/antiestrogénica incluso a concentraciones más altas de las detectadas en un modelo celular de cáncer de mama tras 3 días de tratamiento.

Anteriormente, y como se recogió en la revisión dentro del **Capítulo 1**, Lazzeroni et al., (2017) había descrito la presencia de epigalocatequina 3-galato en tejido mamario tumoral de 8 pacientes con cáncer de mama, tras el consumo diario durante cuatro semanas de extracto de té verde, usando una formulación con lecitina. Sin embargo, en ese estudio no se identificaron más posibles metabolitos procedentes del consumo del extracto de té verde rico en compuestos fenólicos, ni tampoco hubo ningún grupo control (consumidoras de té verde sin lecitina o un grupo de no consumidoras) para poder comparar entre ellos.

Por otro lado, Bolca et al. (2010a,b), detectaron por primera vez la presencia de isoflavonas de la soja (Bolca et al., 2010a) y prenilflavonoides (Bolca et al., 2010b) del lúpulo en tejido mamario sano. Sin embargo, se desconoce la distribución de estos compuestos fenólicos en tejido canceroso. Estos polifenoles han demostrado tener actividad estrogénica/antiestrogénica pudiendo ejercer efectos beneficiosos en el cáncer de mama, principalmente frente aquellos cánceres RE+ (Dietz et al., 2016). Bolca et al. (2010a,b) también hablan sobre la posibilidad de que la distribución en tejido mamario de hombres sea diferente al de las mujeres. En nuestro estudio, hemos contado con la

participación de un hombre (con obesidad). Es reseñable la ausencia de metabolitos procedentes de RSV, aun siendo estos los más abundantes en el resto de las pacientes tras el análisis de sus muestras de tejido (en TSM y TTM). No obstante, no se puede sacar ninguna conclusión de un solo caso y serían necesarios más estudios para confirmar esto.

En estos estudios humanos, la presencia en tejido mamario sano de metabolitos de isoflavonas (Bolca et al., 2010a) y de prenilflavonoides (Bolca et al., 2010b) fue mayoritariamente en forma de conjugados (98% y >90%, respectivamente), principalmente glucurónidos. Esto coincide con los resultados obtenidos en nuestro estudio clínico, donde la mayoría de metabolitos identificados en tejido mamario procedentes de compuestos fenólicos se encuentran en forma de conjugados (**Tabla 4.6**). Bolca et al. (2010a,b) especularon con la posibilidad de que la presencia de estos conjugados pudiera ser un reservorio de formas libres, no conjugadas, que sí tendrían actividad biológica en los tejidos. Esto tiene especial interés dado que en el tejido tumoral de mama se han descrito concentraciones 6 veces superiores de la actividad enzimática β-glucuronidasa frente a tejido sano (Albin et al., 1993). Desafortunadamente, los autores no pudieron contrastar su hipótesis de que los conjugados pudieran ser un reservorio de formas libres "bioactivas" ya que en sus estudios participaron mujeres que se sometían a una cirugía estética y no eran pacientes con cáncer de mama.

Respecto a algunos compuestos fenólicos, se ha descrito la desconjugación de los mismos. Por ejemplo, para la luteolina en plasma tras la inducción de β-glucuronidasa en ratas tratadas con lipopolisacárido (LPS) (Shimoi et al., 2001), o para la Uro-A en diferentes tejidos tras administración de LPS en un modelo de rata (Ávila-Gálvez et al., 2019). En modelos *in vitro* también se ha identificado la desconjugación de RSV 3-sulf y RSV 4'-sulf a RSV libre, aunque era dependiente de la línea celular (Patel et al., 2013).

Aunque en este estudio no se hayan detectado concentraciones de metabolitos desconjugados en TTM para apoyar la teoría de la conjugación/desconjugación, no podemos descartar este hecho ya que esto podría depender de muchos factores como el tipo de metabolito, tipo de tejido, procesado de la muestra, etc. Tampoco podemos descartar la presencia de RSV libre en nuestras muestras de tejido mamario. Sin embargo, los valores relativamente altos de LOQ (130 nM) y LOD (40 nM) frente a los de sus metabolitos conjugados de Fase-II (**Tabla 4.1**), podría explicar no haberlo detectado en las muestras.

En nuestro estudio, las concentraciones detectadas de metabolitos en TSM y TTM fueron bastante similares (**Tabla 4.8**, **Tabla 4.9**). En algunos casos se detectaron concentraciones más altas en TTM que en TSM, pudiéndose explicar este hecho por el mayor flujo sanguíneo del TTM frente al TSM (Choe et al., 2014). Sin embargo, esta regla no se aplica a todos los tejidos y según el tejido donde se analice el perfil metabólico la situación puede ser inversa, como ocurre por ejemplo en el tejido colónico (Núñez-Sánchez et al., 2014).

En el presente estudio, cabe destacar que se encontró mayor sulfatación que glucuronidación de metabolitos en TTM que en TSM, lo cual puede estar en concordancia con una mayor actividad sulfotransferasa en células de cáncer de mama (Larrosa et al., 2006; Harrelson y Lee, 2016).

Por otro lado, los resultados del estudio *in vitro* muestran que mezclas representativas de metabolitos detectados en TTM no ejercen actividad antiproliferativa, incluso a concentraciones superiores de las detectadas en el tejido mamario de las pacientes, lo que está de acuerdo con resultados de estudios previos donde se ha visto que la conjugación de compuestos fenólicos o derivados limita su actividad anticancerígena (González-Sarrías et al., 2014).

Respecto a la actividad estrogénica/antiestrogénica de las mezclas representativas del TTM, se ha demostrado que también carecen de estas actividades, al contrario de lo observado para sus formas libres como en el caso de RSV, Uro-A o Uro-B en un estudio anterior en el mismo modelo celular (MCF-7) (Larrosa et al., 2006).

Por tanto, estos resultados sugieren que la posible actividad antiproliferativa, así como las actividades estrogénicas/antiestrogénicas están determinadas por la forma molecular. Sin embargo, aunque la conjugación de Fase-II limita la actividad antiproliferativa a corto plazo en el modelo *in vitro* empleado, no debe descartarse una posible actividad a más largo plazo, como sería por ejemplo la mediada por senescencia. En este sentido, Patel et al., (2013) describieron recientemente un efecto antiproliferativo mediado por senescencia del RSV sulfato en la línea celular HT-29 de cáncer de colon (Patel et al., 2013). Este hecho abre nuevas vías de investigación para estudiar la potencial actividad de los metabolitos fenólicos conjugados frente al cáncer.

En cuanto a las metilxantinas, este estudio ha mostrado por primera vez la detección y cuantificación de diferentes metilxantinas de la dieta en tejido mamario, por lo que no tenemos estudios previos para comparar. Un hecho relevante, son las altas concentraciones de estos compuestos detectados tanto en TTM como en TSM, habiendo consumido las pacientes menos cantidad respecto a compuestos fenólicos, pese a la rápida absorción y eliminación descrita para este tipo de compuestos (Arnaud, 2011).

Respecto a la falta de dosis-respuesta observada en una paciente con una suplementación de 4 veces más de metilxantinas que la consumida por el resto, queda demostrado que el ayuno prolongado de aproximadamente 10-12 horas antes de la cirugía limita el poder identificar mayores concentraciones en el tejido mamario, aunque se requiere más investigación, debido a que se trata solo de un caso analizado. Sin embargo, a pesar del ayuno, en algunas pacientes control también se detectaron cantidades

importantes de metilxantinas, por lo que estos resultados nos llevan a pensar que estos compuestos podrían persistir más tiempo en el organismo de lo que se pensaba. Esto es importante, ya que se ha descrito actividad quimiopreventiva relacionada con diferentes efectos para las metilxantinas, como por ejemplo la inhibición de la enzima poli(ADP-ribosa)polimerasa-1 (Geraets et al., 2006), la cual está aumentada en enfermedades inflamatorias crónicas como puede ser el cáncer; o la reversión de resistencia al fármaco antitumoral mitoxantrona mediante la inhibición de transportadores relacionados con la resistencia a fármacos en cáncer de mama (BCRP/ABCG2) (Ding et al., 2012).

En definitiva, y considerando las limitaciones de nuestro estudio (bajo número de pacientes y largo periodo de ayuno desde el consumo de las últimas cápsulas hasta la recogida de las muestras), se ha mostrado un amplio y detallado perfil metabólico en tejido mamario (sano y tumoral) en pacientes con cáncer de mama, de diferentes compuestos fenólicos y metilxantinas que se consumen en una dieta habitual.

Estos resultados establecen una sólida base para futuras investigaciones sobre el papel beneficioso que pueden jugar estos compuestos frente al cáncer de mama.

CAPÍTULO 5

Farmacocinética de compuestos fenólicos y metilxantinas de la dieta en plasma y tejido mamario de la rata

Ávila-Gálvez, M.Á., Romo-Vaquero, M., González-Sarrías, A. and Espín, J.C. Kinetic disposition of dietary polyphenols and methylxanthines in the rat mammary tissue. *J Funct Foods*, **2019**, 61, 103516.

Farmacocinética de compuestos fenólicos y metilxantinas de la dieta en plasma y tejido mamario de la rata

RESUMEN

El estudio POLYSEN, llevado a cabo en pacientes con lesión tumoral de mama que consumieron los días previos a su cirugía cápsulas con diferentes extractos vegetales, permitió identificar un amplio perfil de metabolitos fenólicos y metilxantinas de la dieta en tejido sano mamario (TSM) y tumoral (TTM) de estas pacientes con cáncer de mama. Sin embargo, tras ese ensayo, aún quedaron preguntas por responder. En ese estudio se detectaron bajas concentraciones de los compuestos que alcanzaban el tejido mamario, en el rango de pmol/g tejido, así como valores en rango nanomolar en el plasma. Este hecho pudo deberse principalmente al ayuno prolongado al que tenían que someterse las pacientes antes de la cirugía. Por tanto, quizás a tiempos más cortos se pudiera obtener una información más completa y realista de todos los compuestos que llegan al tejido mamario, así como de las concentraciones máximas (C_{max}) que realmente pudieran llegar a detectarse.

Con estos antecedentes, el objetivo principal del presente trabajo fue estudiar la biodisponibilidad, y farmacocinética en plasma y de distribución en el tejido mamario de compuestos fenólicos y metilxantinas de la dieta. Para llevar a cabo este estudio, se emplearon ratas Sprague Dawley (SD). A los animales se les administraron cápsulas, mediante "*gavage*", con la misma mezcla de extractos vegetales ("MIX") que habían consumido las pacientes. Además, también se comparó la biodisponibilidad, cinética y distribución de resveratrol (RSV) administrado de manera individual o cuando se consume en la mezcla con los diferentes extractos.

El estudio se realizó con 60 ratas, donde a diferentes tiempos tras la administración de las cápsulas, los animales se sacrificaron obteniendo el plasma sanguíneo y el tejido mamario para su posterior análisis mediante UPLC-ESI-QTOF-MS.

Los resultados obtenidos revelaron, por primera vez, que a tiempos más cortos tras la ingesta se alcanzan valores de C_{max} en el rango micromolar de metilxantinas y metabolitos fenólicos conjugados de Fase-II (pero no libres) de RSV, dihidroresveratrol (DH-RSV), hesperetina (HP), urolitinas e hidroxitirosol (Hytyr), en plasma y en tejido mamario.

Por otro lado, el estudio comparativo de RSV reveló que sus metabolitos conjugados (RSV 3-glur y RSV 3-sulf, pero no RSV libre), así como el derivado glucurónido de su metabolito microbiano DH-RSV (DH-RSV 3-glur) muestran valores más bajos de T_{max} y mayores de C_{max} cuando se consume RSV de manera individual que cuando se toma en una mezcla con otros compuestos.

Por último, hay que destacar que la información obtenida con la realización de este estudio servirá de guía sólida para el diseño de estudios preclínicos con el fin de que ensayar concentraciones fisiológicas relevantes en modelos celulares de mama.

1. INTRODUCCIÓN

Como se ha descrito en el **Capítulo 4**, en el estudio POLYSEN, las pacientes consumieron una mezcla de diferentes extractos vegetales y RSV desde el diagnóstico de la lesión hasta la cirugía, y se identificó un perfil de 39 y 33 compuestos fenólicos o metabolitos derivados en TSM y TTM, respectivamente. Además, también se detectaron por primera vez 8 y 6 metilxantinas en TSM y TTM, respectivamente. En ese estudio se identificó la presencia solamente de conjugados de Fase-II, excepto las metilxantinas y los ácidos 2,5- y 2,6- dihidroxibenzoicos. Asimismo, las concentraciones detectadas de todos los compuestos estuvieron dentro del rango nanomolar. Sin embargo, ese estudio

clínico presentó algunas limitaciones: 1) el ayuno al que se sometieron las pacientes antes de la cirugía (entre 10-12 horas) que podría haber limitado el número de compuestos realmente detectables, así como la forma molecular y concentraciones de los mismos que llegan al tejido mamario y 2) la administración simultánea de diferentes compuestos fenólicos (que aunque es lo habitual en la dieta) podría interferir con la absorción o biodisponibilidad de los mismos.

Por tanto, para poder dar respuesta a estas dos limitaciones, se utilizó un modelo animal (ratas SD) para evaluar la farmacocinética en plasma y tejido mamario de los mismos compuestos fenólicos y metilxantinas que tomaron las pacientes del estudio clínico POLYSEN. Además, debido a que RSV fue el compuesto que aportó la mayoría de metabolitos identificados en el tejido mamario de las pacientes, así como las concentraciones más altas, otro grupo de animales consumió las cápsulas solo con RSV. De esta manera, se pretendió evaluar si su biodisponibilidad y farmacocinética podrían estar limitadas por el consumo de otros compuestos de manera conjunta.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Patrones y reactivos

Los patrones y metabolitos conjugados de Fase-II y/o derivados de la microbiota utilizados para la identificación y cuantificación de compuestos, así como otros reactivos y solventes orgánicos se obtuvieron como se describe en el **Capítulo 3**, **apartado 1**.

2.2. Extractos vegetales y formulaciones empleadas

Los extractos empleados en este estudio farmacocinético se adquirieron de la empresa Laboratorios Admira S.L. (Alcantarilla, Murcia, España). Los extractos se administraron

a los animales en cápsulas de gelatina blanda mediante vía oral "*gavage*" como se indica en la **Figura 3.8**. del **Capítulo 3**, **apartado 4**.

La composición de las cápsulas con las cantidades de cada extracto que consumieron los animales de las dos formulaciones empleadas se detallan en el **capítulo 3**, **apartado 4.2**. Una formulación fue la misma mezcla consumida en el estudio clínico POLYSEN (formulación "MIX") y la segunda formulación estaba compuesta solo por RSV (formulación RSV) en la misma cantidad que se encontraba en la formulación "MIX", añadiendo como excipiente celulosa microcristalina.

La extracción y análisis para determinar el contenido de los compuestos de cada extracto se puede encontrar en el **Capítulo 3**, **apartado 2.2**. Respecto al análisis del extracto de semilla de uva para determinar la cantidad de procianidinas, se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 2.2.1**. La identificación y cuantificación de compuestos presentes en las cápsulas se analizó mediante HPLC-DAD-ESI-IT (MS/MS) como se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 6.1**, y en el **apartado 6.1.1** para las procianidinas del extracto de semilla de uva.

2.3. Animales y diseño del estudio

Tal como se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 4.1**, el estudio animal realizado siguió las pautas marcadas por la normativa europea en materia de protección en animales de experimentación y fue evaluado favorablemente por el Comité de Ética de Experimentación animal de la Universidad de Murcia y por el órgano competente del gobierno local. Las condiciones de estabulación de todos los animales aparecen detalladas en el **Capítulo 3**, **apartado 4**.

El estudio de farmacocinética en plasma y distribución en tejido mamario se llevó a cabo en 60 ratas SD que se distribuyeron en 3 grupos: un grupo que consumió la mezcla

de extractos ("MIX") (n=28); un grupo que consumió solo RSV (n=28); y un grupo control que consumió únicamente celulosa microcristalina (n=4).

El diseño detallado del estudio se muestra a continuación en la **Figura 5.1**, donde se puede ver la distribución de los animales según el contenido de las cápsulas consumidas y los tiempos de sacrificio de cada grupo de animales.

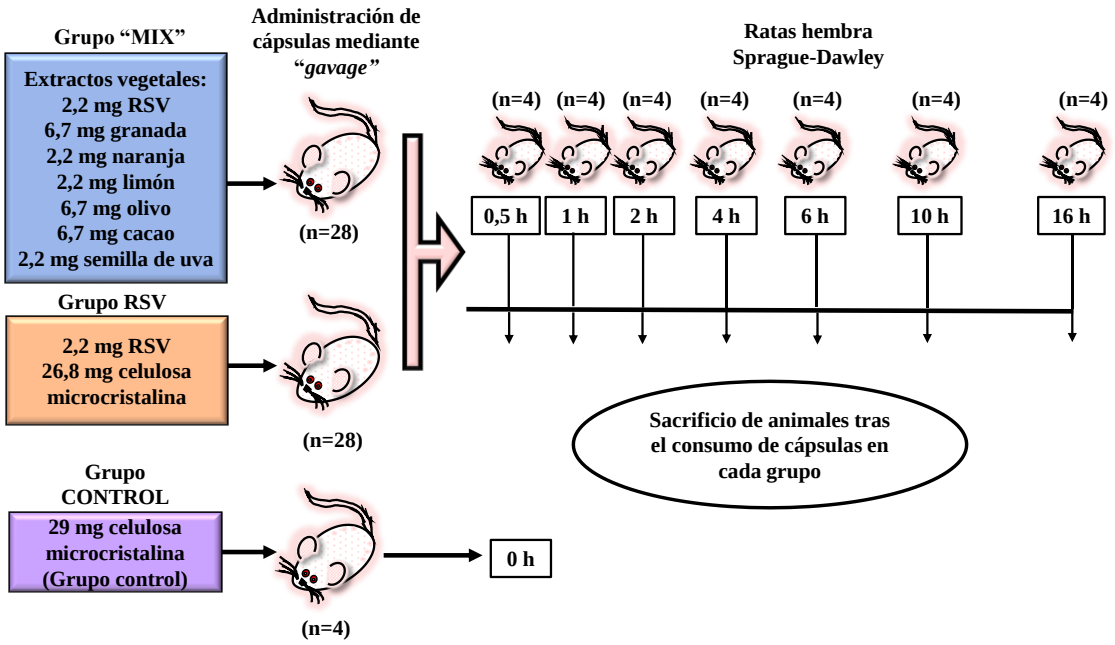


Figura 5.1. Diseño del estudio de farmacocinética realizado en las 60 ratas SD.

2.4. Extracción de metabolitos en muestras de tejido mamario y plasma

La extracción de las muestras de sangre y de tejido mamario de los animales se detallan en el **Capítulo 3**, **apartado 4.3**.

El procesado de las muestras de tejido mamario y de plasma, ha sido detallado en el **Capítulo 3**, **apartado 3.4.1** y en el **apartado 3.4.2**, respectivamente.

2.5. Análisis de metabolitos en muestras de tejido mamario y plasma mediante UPLC-ESI-QTOF-MS

La identificación y cuantificación de metabolitos en las muestras biológicas se hizo mediante UPLC-ESI-QTOF-MS siguiendo una estrategia de metabolómica dirigida, como se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 6.2**. El método empleado fue validado en términos de linealidad, precisión, reproducibilidad, límites de identificación y cuantificación y también, efecto matriz. Todos los parámetros analíticos determinados para validar el método con los diferentes compuestos fenólicos se muestran en la **Tabla 4.1** y para metilxantinas en la **Tabla 4.2**, así como los detalles de la validación del método se describen en el **apartado 2.5** del **Capítulo 4**.

2.6. Análisis estadístico y farmacocinético

Los parámetros farmacocinéticos analizados se determinaron usando la herramienta PKSolver, tal como se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 7**.

El análisis estadístico de la comparativa de parámetros farmacocinéticos obtenidos del grupo que consumió la formulación "MIX" frente el grupo que consumió RSV se realizó con la prueba no paramétrica de los rangos de Wilcoxon o "el test de la *t* de Student" según los datos cumplieran una distribución normal o no, respectivamente, como se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 7**.

Las gráficas y figuras se realizaron utilizando el programa Sigma Plot versión 13.0 (Systat Software; California, EE. UU.).

3. RESULTADOS

3.1. Formulaciones administradas a los animales

La formulación "MIX" administrada a los animales estaba compuesta por 2,2 mg de RSV, 6,7 mg de granada, 6,7 mg de olivo, 6,7 mg de cacao, 2,2 mg de naranja, 2,2 mg de limón y 2,2 mg de semilla de uva. Como se muestra en la **Tabla 5.1** esta formulación aportó en total 39 compuestos fenólicos y 2 metilxantinas (teobromina y cafeína) que fueron identificados y cuantificados tras el análisis por HPLC-DAD-ESI-IT (MS/MS) (véase **Capítulo 3**, **apartado 6.1**, y **apartado 6.1.1** para las procianidinas del extracto de semilla de uva).

Estos compuestos aparecen como la cantidad contenida en cada cápsula y se detalla el extracto del que procedía cada compuesto (**Tabla 5.1**). En la formulación "MIX", las familias más abundantes de compuestos fenólicos fueron RSV (2,2 mg), derivados del ácido elágico (EA) (~2,1 mg) procedentes del extracto de granada, flavanonas (~1,6 mg) procedentes de los extractos de naranja y limón, y procianidinas (~0,9 mg) procedentes del extracto de semilla de uva y, en menor medida, del extracto de cacao. Respecto a las metilxantinas (~0,3 mg), la cafeína y teobromina procedían exclusivamente del extracto de cacao (**Tabla 5.1**).

En general, la formulación de estas cápsulas aportó un total de 7,4 mg de compuestos fenólicos y 0,3 mg de metilxantinas (0,265 mg de teobromina y 0,007 mg de cafeína) (**Tabla 5.1**). Estas cantidades, referidas a una dosis equivalente en humanos (HED) para una persona de 70 kg, fueron de 336 mg de compuestos fenólicos, 13,6 mg de teobromina y 0,3 mg de cafeína. En definitiva, estas dosis fueron algo inferiores a las consumidas por las pacientes del estudio clínico, ya que las 3 cápsulas que tomaban diariamente aportaban 538 mg de compuestos fenólicos, 19,2 mg de teobromina y 0,5 mg de cafeína. Sin

embargo, dado al estrés al que se tenían que someter a los animales para administrarles las cápsulas se decidió administrar estas cantidades puesto que podían ser administradas en una sola cápsula.

Por otro lado, la segunda formulación administrada al grupo RSV de animales, contenía únicamente 2,2 mg de RSV y 26,8 mg de celulosa microcristalina como excipiente. Los 2,2 mg de RSV equivaldrían a 100 mg según la fórmula HED para una persona de 70 kg.

3.2. Análisis farmacocinético en plasma y tejido mamario de compuestos fenólicos

En la **Tabla 5.2** aparecen los parámetros farmacocinéticos de los metabolitos derivados de compuestos fenólicos identificados y cuantificados en plasma y tejido mamario tras el consumo de las cápsulas con la formulación "MIX" o RSV.

En general, los valores medios más altos alcanzados de C_{max} se obtuvieron para los metabolitos derivados de RSV cuando este se consumió de manera individual. El perfil de los valores de C_{max} fue RSV 3-glur > DH-RSV 3-glur > RSV 3-sulf, en tejido mamario y plasma (**Tabla 5.2**; **Figuras 5.2A-F**). En plasma, el mayor valor de C_{max} se observó en el caso de RSV 3-glur (C_{max}=11,2 ± 4,4 μM) cuando se consumieron las cápsulas que contenían solo RSV, siendo menor (C_{max}=8,9 ± 1,5 μM) al consumir el "MIX" (**Tabla 5.2**).

Tabla 5.1. Compuestos identificados y cuantificados mediante HPLC-DAD-ESI-IT-MS/MS en las formulaciones consumidas por los animales.

Compuesto	Extracto	Consumo por cápsula (µg) ± DE
Ácido gálico	Granada	8,4 ± 0,6
Punicalina	Granada	40,3 ± 4,6
Ácido protocatéquico	Cacao	14,5 ± 1,5
Hytyr	Olivo	211,1 ± 11,9
Teobromina	Cacao	265,4 ± 8,1
Punicalagina	Granada	604,9 ± 67,9
Catequina	Cacao	4,1 ± 1,6
	Semilla de uva	319,2 ± 9,4[a]
Cafeína	Cacao	6,7 ± 0,0
Ácido ferúlico *O*-Glu	Limón	114,6 ± 15,4
Luteolina 6,8-di-*C*-Glu	Limón	10,7 ± 1,2
Epicatequina	Cacao	5,0 ± 0,9
	Semilla de uva	446,2 ± 12,6[a]
Glucósido del EA	Granada	29,0 ± 2,6
Apigenina 6,8-di-*C*-Glu (Vicenina-2)	Limón	39,4 ± 0,6
Eriodictiol-Glu-Ramn-Glu	Limón	22,6 ± 2,6
Diosmetina 6,8-di-*C*-Glu	Limón	19,7 ± 1,2
Ácido galágico	Granada	18,3 ± 1,7
Crisoeriol 6,8-di-*C*-Glu	Limón	65,5 ± 1,2
Luteolina 6 u 8-*C*-Glu	Limón	9,3 ± 0,9
Eriocitrina (Eriodictiol rutinósido)	Limón	401,1 ± 28,4
Ribósido del EA	Granada	12,2 ± 1,2
Apigenina 8-*C*-xilanopiranosil-Glu	Limón	17,1 ± 2,6
EA	Granada	1.390 ± 140,6
Quercetina 3-*O*-rutinósido (Rutina)	Limón	2,9 ± 0,3
Luteolina 7-*O*-rutinósido	Naranja	1,5 ± 0,6
	Limón	38,3 ± 0,9

Galato de epicatequina	Semilla de uva	97,7 ± 2,9[a]
Diosmetina 8-*C*-Glu	Limón	24,4 ± 0,9
Naringenina 7-*O*-rutinósido (Naringina)	Limón	NC
	Naranja	13,6 ± 4,6
Galato de catequina	Semilla de uva	36,5 ± 1,5[a]
Limocitrina-Glu-HMG-Glu	Limón	13,1 ± 0,6
Apigenina 7-*O*-rutinósido	Limón	NC
	Naranja	1,7 ± 0,6
Limocitrina-neohesperidósido	Limón	NC
HP 7-*O*-rutinósido (Hesperidina)	Naranja	1.077 ± 24,7
	Limón	63,5 ± 2,3
Diosmetina 7-*O*-rutinósido (Diosmina)	Limón	NC
	Naranja	29,0 ± 18,3
Isoramnetina rutinósido	Naranja	1,5 ± 0,9
HP glucósido	Naranja	1,2 ± 0,3
Limocitrina-HMG-Glu	Limón	4,4 ± 0,3
Limocitrol-Glu-HMG	Limón	NC
***trans*-RSV**	Resveratrol	2.207 ± 207,1
***cis*-RSV**	Resveratrol	6,7 ± 1,7
Isosakuranetina 7-neohesperidósido (Poncirina)	Naranja	13,6 ± 4,6
HP	Naranja	7,5 ± 0,3
TOTAL FENÓLICOS		**7.446 ± 583,8**
TOTAL METILXANTINAS		**272,0 ± 8,1**

[a]Cantidades de compuestos determinadas mediante floroglucinolisis; **DE**, Desviación Estándar. Abreviaturas: **EA**: ácido elágico; **Glu**, glucósido; **HMG**, 3-hidroxi-3-metil-glutaril; **HP**, hesperetina; **Hytyr**, hidroxitirosol; **NC**, identificado, pero no cuantificado; **Ramn**, ramnósido; **RSV**, resveratrol.

En el caso del tejido mamario, la situación fue la misma para RSV 3-glur, alcanzando concentraciones mayores con el consumo de la formulación RSV (C_{max}=1,3 ± 0,6 pmol/g tejido) frente al "MIX" con alrededor de 2 veces menos (C_{max}=0,7 ± 0,1 pmol/g tejido; *P*<0,05) (**Tabla 5.2**). Cabe destacar que, aunque existieron diferencias entre el consumo de la formulación "MIX" o RSV, RSV 3-glur fue el metabolito fenólico con mayores valores de C_{max} en plasma y tejido mamario, independientemente de la formulación consumida (**Tabla 5.2**; **Figuras 5.2A**, **5.2B**). Respecto al metabolito RSV 3-sulf, éste presentó un perfil cinético muy diferente a RSV 3-glur tanto en plasma (**Figuras 5.2A** *vs* **5.2C**) como en tejido mamario (**Figuras 5.2B** *vs* **5.2D**), principalmente cuando se consumió la formulación RSV. La principal diferencia se observó en los valores de C_{max} de RSV 3-sulf, que fueron aproximadamente 10 veces menos en plasma y tejido mamario en comparación con los valores de C_{max} para RSV 3-glur en cada una de las formulaciones.

A continuación, como era de esperar, el metabolito microbiano conjugado de Fase-II derivado de RSV (DH-RSV 3-glur), mostró en plasma y tejido mamario valores más altos de T_{max} que RSV 3-glur y RSV 3-sulf, independientemente de la formulación consumida (**Tabla 5.2**; **Figuras 5.2A-F**).

Por otro lado, centrándonos en el resto de metabolitos fenólicos producidos tras el consumo de la formulación "MIX", cabe destacar el caso de Hytyr glur, metabolito de Fase-II procedente del Hytyr del extracto de olivo. Entre todos los metabolitos, Hytyr glur mostró los valores de T_{max} más bajos, siendo su T_{max}=0,9 ± 0,8 horas en plasma y T_{max}=1,0 ± 0,7 horas en tejido mamario, tras la administración de las cápsulas (**Tabla 5.2**; **Figura 5.3A**). Además, también se identificó Hytyr sulf en varios animales, pero su cuantificación no fue posible debido a la falta de su patrón específico.

Respecto a la cinética de las flavanonas, los conjugados de HP (HP 3'-glur, HP 7-glur y HP 3'-sulf) (**Figuras 5.3B**, **5.3C**), así como de los conjugados de urolitina A, metabolito derivado del EA y elagitaninos, (Uro-A 3-glur y Uro-A sulf) (**Figura 5.3D**), presentaron perfiles cinéticos muy similares en plasma y tejido mamario. Debido a que estos metabolitos de Fase-II son previamente producidos por la microbiota intestinal, se explica que sus valores de T_{max} estuvieran comprendidos entre 12-16 horas en el plasma y 11-16 horas en el tejido mamario (**Tabla 5.2**).

Por último, y aunque el aporte de procianidinas presentes en el extracto de semilla de uva de la formulación "MIX" fue sustancial (~0,9 mg), solo se detectó la presencia del metabolito DHPV 3'-sulf en un número pequeño de animales por lo que no fue posible su análisis farmacocinético.

3.3. Análisis farmacocinético en plasma y tejido mamario de metilxantinas

En la **Figura 5.4** se muestra el perfil farmacocinético de las metilxantinas detectadas y cuantificadas (teobromina, teofilina y cafeína) en plasma (**Figura 5.4A**) y tejido mamario (**Figura 5.4B**), tras el consumo de la formulación "MIX". Los perfiles cinéticos que mostraron las metilxantinas fueron bastante similares, excepto los valores de C_{max} y AUC de teobromina que fueron bastante más elevados que el resto en plasma y en tejido mamario (**Tabla 5.2**). No obstante, hay que señalar que teobromina fue el compuesto mayoritario del grupo de las metilxantinas aportado por el extracto de cacao (**Tabla 5.1**).

Tabla 5.2. Parámetros farmacocinéticos en plasma y tejido mamario de los principales metabolitos fenólicos y metilxantinas.

	T_{max} (h)		$T_{1/2}$ (h)		T_{last} (h)		C_{max}		AUC_{0-t}		MRT_{0-t} (h)	
Compuestos	**Plasma**	**Tejido**	**Plasma**	**Tejido**	**Plasma**	**Tejido**	**Plasma (nM)**	**Tejido (pmol/g)**	**Plasma (nM h)**	**Tejido (pmol/g h)**	**Plasma**	**Tejido**
Hytyr-glur[a]	0,9 ± 0,8	1,0 ± 0,7	0,8 ± 0,1	1,4 ± 0,5	4,0 ± 0,0	3,0 ± 1,2	457 ± 148	77,2 ± 38,7	803 ± 171	110 ± 68,7	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,3
HP 3-glur[a]	9,5 ± 4,7	9,5 ± 4,7	–	–	12 ± 4,9	10,5 ± 4,1	29,1 ± 7,3	2,1 ± 0,7	153 ± 87,6	10,3 ± 6,1	8,2 ± 2,5	7,6 ± 3,6
HP 7-glur[a]	10,0 ± 6,0	8,0 ± 5,4	–	–	14,0 ± 3,5	11,0 ± 4,1	18,3 ± 1,2	2,3 ± 0,3	147 ± 31,5	14,4 ± 3,4	8,2 ± 2,2	7,5 ± 3,1
HP 7-sulf[a]	10,0 ± 0,0	–	–	–	16,0 ± 0,0	–	1,2 ± 0,3	–	10,6 ± 4,0	–	8,8 ± 0,8	–
Uro-A 3-glur[a]	13,0 ± 4,2	13,0 ± 4,2	–	–	16,0 ± 0,0	16,0 ± 0,0	150 ± 16,0	6,7 ± 3,8	1.408 ± 157	47,9 ± 14,6	11,5 ± 0,5	12,0 ± 1,2
Uro-A sulf[a]	16,0 ± 0,0	–	–	–	16,0 ± 0,0	–	5,8 ± 1,3	–	49,3 ± 3,9	–	12,0 ± 0,3	–
RSV 3-glur[a]	3,3 ± 2,2	3,3 ± 2,2	2,4 ± 1,3	2,9 ± 1,2	16,0 ± 0,0	16,0 ± 0,0	8.939 ± 1.538	668 ± 127	63.812 ± 13.364	4.631 ± 794	4,9 ± 0,7	5,5 ± 0,4
RSV 3-glur[b]	1,0 ± 0,7***	1,7 ± 0,6*	5,1 ± 2,8	2,9 ± 0,6	14,5 ± 3,0	16,0 ± 0,0	11.209 ± 4.405	1.262 ±597*	53.393 ± 6.067	7.256 ± 1.040	5,1 ± 1,1	5,2 ± 1,1
RSV 3-sulf[a]	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	2,1 ± 0,5	5,0 ± 4,0	13,5 ± 5,0	13,0 ± 6,0	758 ± 94,9	61,6 ± 28,3	3.356 ± 962	238 ± 150	4,9 ± 1,3	4,8 ± 0,7
RSV 3-sulf[b]	0,6 ± 0,3***	1,5 ± 0,7***	3,5 ± 0,8	3,4 ± 1,1	16,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	1.397 ± 482	112 ± 40,9	4.375 ± 821	399 ± 8,6	3,4 ± 1,3	4,1 ± 0,7
DH-RSV 3-glur[a]	8,0 ± 2,3	9,0 ± 2,0	–	–	16,0 ± 0,0	16,0 ± 0,0	1.980 ± 836	206 ± 113	16.460 ± 5.265	1.654 ± 877	9,2 ± 0,9	9,6 ± 1,6
DH-RSV 3-glur[b]	8,7 ± 2,3	8,7 ± 2,3	–	–	16,0 ± 0,0	14,0 ± 3,5	3.162 ± 1.835	406 ± 332	21.568 ± 10.654	2.571 ± 1.697	9,5 ± 1,3	9,0 ± 1,6
Teobromina[a]	2,3 ± 1,5	3,0 ± 2,0	5,2 ± 1,5	5,6 ± 4,2	16,0 ± 0,0	16,0 ± 0,0	1.525 ± 348	678 ± 186	14.351 ± 788	4.062 ± 386	6,5 ± 0,5	6,1 ± 0,6
Teofilina[a]	3,5 ± 1,9	3,0 ± 2,0	11,7 ± 9,1	6,8 ± 2,7	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	39,1 ± 7,5	10,9 ± 2,3	240 ± 26,8	68,5 ± 7,5	5,5 ± 0,8	5,1 ± 0,7
Cafeína[a]	2,0 ± 0,0	2,5 ± 1,0	4,1 ± 1,0	7,3 ± 2,4	12,0 ± 4,9	16,0 ± 0,0	159 ± 69,5	53,0 ± 13,1	829 ± 206	377 ± 81,1	4,7 ± 1,5	6,1 ± 0,7

–, no determinado; **T_{max}**, tiempo de la máxima concentración; **T_{last}**, tiempo de la última concentración detectada; **$T_{1/2}$**, semivida de eliminación; **C_{max}**, concentración máxima; **AUC_{0-t}**, área bajo la curva; **MRT_{0-t}**, tiempo medio de residencia hasta el último tiempo experimental. Los asteriscos indican diferencias significativas en los parámetros cuando se administraron las cápsulas "MIX"**[a]** frente a solo RSV**[b]** (**P*<0.05; ****P*<0.001).

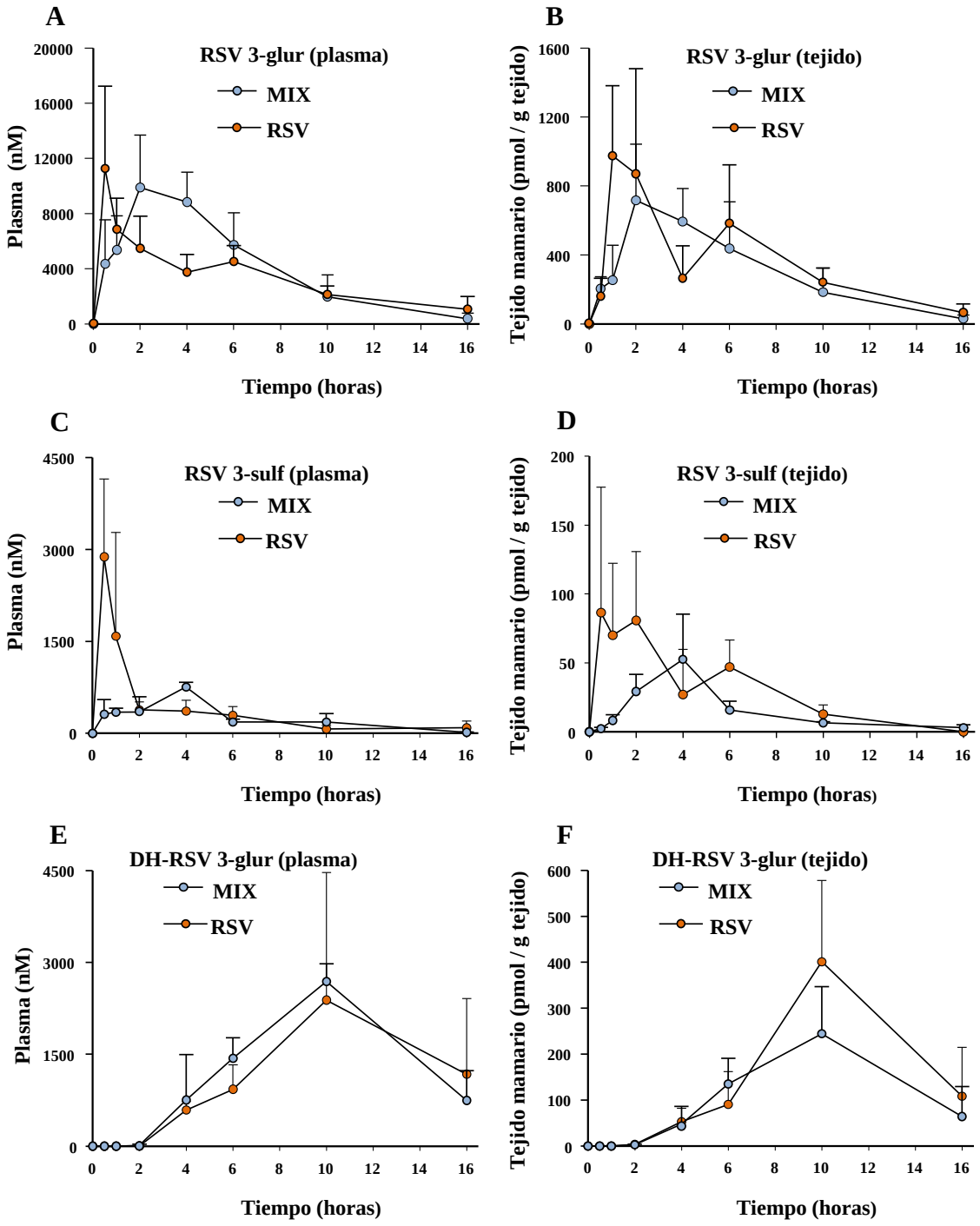


Figura 5.2. Perfiles farmacocinéticos de los metabolitos derivados del resveratrol (RSV) en plasma (**A, C, E**) y tejido mamario (**B, D, F**) tras la administración de la formulación "MIX" o solo RSV. Los resultados representados corresponden a los valores de la media ± DE (n=4).

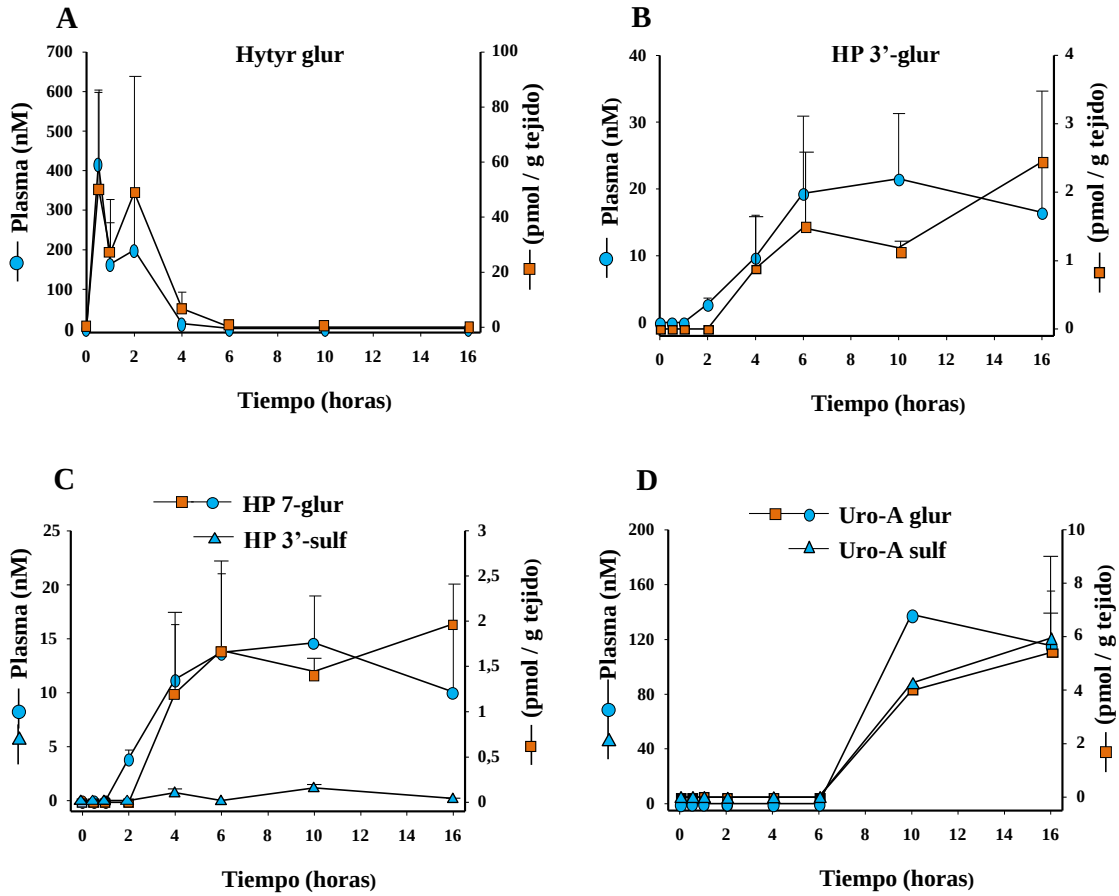


Figura 5.3. Perfiles farmacocinéticos en plasma y tejido mamario de los metabolitos derivados del hidroxitirosol (Hytyr) (**A**), hesperetina (HP) (**B**, **C**) y urolitina A (Uro-A) (**D**) tras la administración de la formulación "MIX". Los resultados representados corresponden a los valores de la media ± DE (n=4).

Otro hecho reseñable es que el valor de C_{max} alcanzado para teobromina en el tejido mamario fue muy similar al alcanzado por RSV 3-glur (**Tabla 5.2**), aunque el contenido de teobromina en la formulación fue de 10 veces menos que RSV (**Tabla 5.1**).

En cuanto al parámetro $T_{1/2}$ para las metilxantinas, las tres presentaron valores superiores a los observados para los metabolitos fenólicos en plasma y tejido mamario (**Tabla 5.2**). Así, el valor mayor de $T_{1/2}$ en plasma entre las metilxantinas se observó para teofilina (11,7 ± 9,1 horas), mientras que en tejido mamario se observó para cafeína (7,3 ± 2,4 horas).

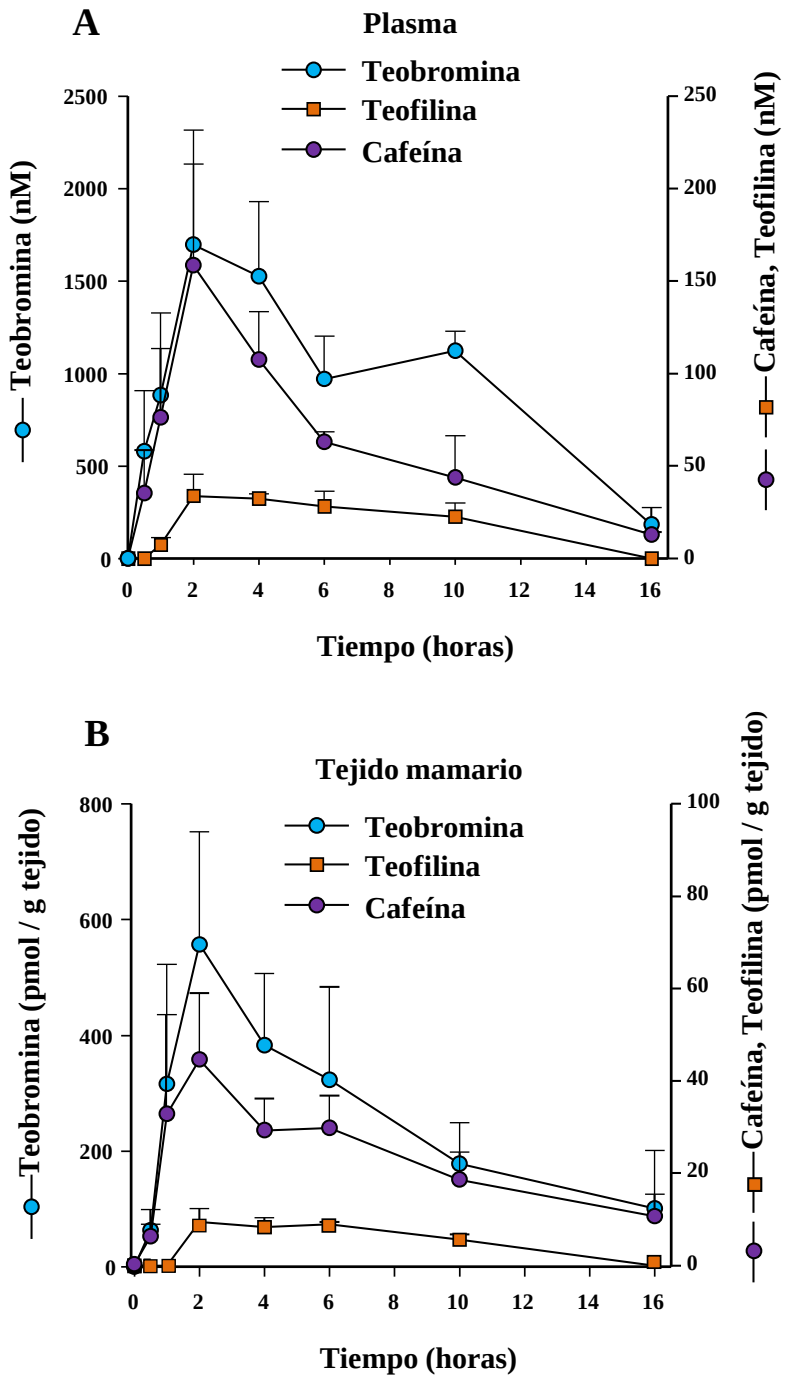


Figura 5.4. Perfiles farmacocinéticos en plasma (**A**) y tejido mamario (**B**) de las metilxantinas teobromina, teofilina y cafeína la administración de la formulación "MIX". Los resultados representados corresponden a los valores de la media ± DE (n=4).

4. DISCUSIÓN

En el capítulo anterior se ha descrito que diferentes compuestos y metabolitos de fenólicos, así como diferentes metilxantinas, son capaces de llegar al tejido mamario (sano y tumoral) en pacientes con cáncer de mama al consumir diferentes extractos ricos en estos compuestos (**Capítulo 4**).

En el presente estudio de farmacocinética en plasma y tejido mamario en un modelo animal se buscaba dar respuesta a cuestiones que quedaron abiertas en el estudio clínico anterior. La primera de ellas era si el ayuno previo a la cirugía de estas pacientes limitaba la detección de otros posibles compuestos y/o mayores concentraciones de los mismos; y por otro lado, si se alcanzarían concentraciones más altas al consumir los compuestos de manera individual en lugar de hacerlo en una mezcla junto a otros compuestos.

Con el fin de responder a estas preguntas, se evaluó la farmacocinética de compuestos fenólicos y metilxantinas utilizando dos formulaciones diferentes. Cabe destacar que este estudio también se concibió con la hipótesis de que existiera la posibilidad de que formas libres de los compuestos presentes en los extractos u otros metabolitos derivados, no detectados en el estudio clínico, pudieran también detectarse a tiempos más cortos tras el consumo de los extractos vegetales.

En este estudio animal se observó que el metabolito más abundante en plasma y tejido mamario derivado del consumo de RSV fue RSV 3-glur. Este resultado está de acuerdo con lo descrito anteriormente por otros autores en plasma, músculo y tejido adiposos de ratas (Andrés-Lacueva et al., 2012). Es destacable que este resultado muestra diferencias a lo observado en humanos, donde el metabolito mayoritario detectado es RSV 3-sulf, en plasma y en tejido mamario (**Capítulo 4**; Boocock et al., 2007).

Por otro lado, aunque en el estudio clínico los metabolitos derivados de procianidinas, principalmente los dos ácidos 2,5- y 2,6- dihidroxibenzoicos, así como DHPV 3'-sulf, se

detectaron en cantidades abundantes en plasma y tejido mamario humano (**Capítulo 4**), en este estudio animal solo el último de ellos se detectó en algún animal de forma aislada, impidiendo la cuantificación y, por tanto, su análisis farmacocinético. Este hecho sugiere que existen diferencias en el metabolismo de procianidinas entre ratas y humanos, posiblemente debidas a la distinta composición en la microbiota intestinal de cada especie.

Respecto a otros metabolitos microbianos conjugados de Fase-II (derivados de HP, Uro-A y DH-RSV), éstos se detectaron hasta las 10-16 horas (T_{last}) tras el consumo de las cápsulas (**Tabla 5.2**). Este hecho podría justificar las altas concentraciones detectadas de DH-RSV 3-glur en los tejidos de las pacientes con cáncer de mama frente a otros metabolitos derivados de RSV que se encontraron en cantidades inferiores (**Capítulo 4**, **Tabla 4.8**).

En definitiva, los valores de MRT de todos los metabolitos en plasma y en tejido mamario (**Tabla 5.2**) sugieren que el ayuno previo a la cirugía al que se sometieron las pacientes con cáncer de mama limitó drásticamente la detección de concentraciones más altas de los compuestos. Este hecho se refleja claramente en los valores de C_{max} obtenidos para los metabolitos derivados de RSV, que estuvieron dentro del rango de micromolar frente al rango nanomolar en el que se detectaron en las pacientes (aunque tampoco podemos descartar posibles diferencias inter-especies). Junto a estos resultados, hay que destacar que el ayuno también interfirió con la identificación de otros metabolitos como el caso de Hytyr glur que tiene un MRT de tan solo 1,6 horas en plasma y 1,5 horas en tejido mamario lo cual avala el no haber sido detectado en el tejido mamario de las pacientes.

También, este estudio animal muestra que la cinética de RSV es diferente cuando se administra en conjunto con otros extractos vegetales a cuando se consume de manera

individual (**Tabla 5.2**; **Figuras 5.2A-F**). Así, la absorción de RSV cuando se consume de manera individual es más rápida, este hecho se refleja en los valores de T_{max} de cada metabolito derivado de RSV, comparando entre las dos formulaciones (**Tabla 5.2**). Hay que puntualizar que este comportamiento podría depender de cada compuesto fenólico, ya que existen casos como la excreción de flavan-3-oles para los que se ha descrito una absorción y excreción similar cuando se ingieren de manera individual o en una mezcla (Borges et al., 2010). Sin embargo, se ha descrito que la co-admnistración de diferentes compuestos fenólicos, que como se ha comentado es el contexto más normal en la dieta, puede provocar competencia en los transportadores ABC, retrasando la absorción de estos compuestos (Planas et al., 2012).

En cuanto a las metilxantinas, previamente descritas en tejido mamario de pacientes con cáncer de mama, también se sugirió la posibilidad de que estos compuestos podrían permanecer más tiempo en el organismo de lo que se pensaba debido a las altas concentraciones cuantificadas tras el ayuno de las pacientes (**Capítulo 4**, **Tabla 4.9**). Los resultados de la cinética del estudio animal confirmaron esta hipótesis (**Tabla 5.2**; **Figuras 5.4A**, **5.4B**), al menos consumiéndolas dentro de una mezcla con otros extractos.

Además, teniendo en cuenta las bajas cantidades consumidas de metilxantinas frente a las consumidas de compuestos fenólicos, si comparamos el ratio C_{max} plasma/C_{max} tejido y los valores de AUC para todos los metabolitos (**Tabla 5.2**), los resultados de este estudio muestran que las metilxantinas son compuestos mucho más biodisponibles, llegando en mayores concentraciones al tejido mamario que los derivados de compuestos fenólicos.

En las pacientes con cáncer de mama no se detectaron compuestos en su forma libre, aunque se especuló con la posibilidad de que existiera presencia de RSV libre (**Capítulo 4**). Así, el principal motivo de no haber detectado RSV en forma libre pudo deberse al tiempo de ayuno, sumado a las concentraciones tan bajas de aquellos compuestos

detectados junto a que el RSV en forma libre tiene unos valores de LOD y LOQ relativamente altos en comparación con otros metabolitos (**Capítulo 4**). Sin embargo, los resultados de este estudio animal mostraron que aun estudiando la cinética de RSV desde 0,5 horas tras su consumo, no se detecta RSV en forma libre (tan solo en algún animal y en cantidades trazas).

Otro hecho que debemos destacar es la importancia que tiene el uso de concentraciones y formas moleculares a la cuales se encuentran los compuestos que alcanzan los tejidos diana para poder llevar a cabo diseños *in vitro* de forma más realista que permitan evaluar su actividad biológica. Por tanto y teniendo en cuenta la distribución sanguínea en tejido mamario sano (Mankoff et al., 2002), los resultados obtenidos en este estudio de farmacocinética sugieren que una mezcla de RSV 3-glur, RSV 3-sulf y DH-RSV 3-glur a 10 µM sería plausible con lo que se observa *in vivo*, aunque las proporciones de cada metabolito puedan variar según la especie.

Como conclusión, pese a que el presente estudio de farmacocinética en plasma y tejido mamario se realizó en ratas y sería poco riguroso extrapolar esta disposición cinética tal cual al tejido mamario de humanos, podemos afirmar con las precauciones necesarias, que hemos podido responder a diferentes cuestiones respecto a la disposición en tejido mamario de compuestos fenólicos y metilxantinas de la dieta. En definitiva, es muy probable que mayores concentraciones de estos compuestos de la dieta puedan alcanzar el tejido mamario a tiempos más cortos, aunque no en su forma libre. Además, respecto a la biodisponibilidad de las metilxantinas, se ha confirmado que es mayor a la de los compuestos fenólicos, al menos cuando se consumen de manera conjunta ambos. También, se ha descrito que compuestos fenólicos como RSV, modifican su absorción si se administran de forma aislada o en una mezcla que contenga otros compuestos fenólicos que podemos consumir de la dieta.

Por último, junto a las conclusiones anteriores, este estudio ha permitido establecer una base sólida para poder diseñar de forma más realista estudios preclínicos en modelos celulares de mama, contribuyendo a evitar aquellos estudios que investigan actividades biológicas en modelos *in vitro* donde se emplean extractos vegetales o polifenoles sin tener en cuenta su biodisponibilidad y distribución en tejidos.

CAPÍTULO 6

Actividad antiproliferativa y estrogénica/antiestrogénica de metabolitos fenólicos derivados de la dieta y de sus conjugados de Fase-II en células tumorales de mama

Ávila-Gálvez, M.Á., Espín, J.C. and González-Sarrías, A. Physiological relevance of the antiproliferative and estrogenic effects of dietary polyphenol aglycones versus their phase-II metabolites on breast cancer cells: A call of caution. *J Agric Food Chem*, **2018**, 66, 8547-8555.

Actividad antiproliferativa y estrogénica/antiestrogénica de metabolitos fenólicos derivados de la dieta y de sus conjugados de Fase-II en células tumorales de mama

RESUMEN

Varios estudios preclínicos han descrito el efecto quimiopreventivo de diferentes compuestos fenólicos de la dieta frente al cáncer de mama. Sin embargo, la evidencia en humanos todavía es incierta, en gran medida debido a la enorme brecha que existe entre los estudios *in vitro* y los estudios *in vivo* que ha contribuido a la falta de una evidencia clínica clara. Esta distancia entre *in vivo* e *in vitro* se ha debido principalmente al ensayar compuestos fenólicos en la forma que se encuentran en la dieta (alimentos, bebidas, extractos, y/o derivados), sin tener en cuenta su biodisponibilidad en el organismo ni su distribución en los tejidos sistémicos. Por tanto, la extrapolación del efecto quimiopreventivo, así como otras actividades biológicas, frente al cáncer de mama que se ha atribuido a algunos compuestos fenólicos derivados de la dieta en los estudios *in vitro*, todavía genera hoy en día mucha incertidumbre. Además, también se han realizado otros estudios *in vitro* de dudosa relevancia clínica con modelos celulares de cáncer de mama en los cuales se han ensayado metabolitos derivados de estos compuestos fenólicos en su forma libre, es decir, sin tener en cuenta el metabolismo que sufren en el organismo.

Hay que tener en cuenta que los compuestos fenólicos que se consumen en la dieta son metabolizados, principalmente por la microbiota intestinal y por acción de las enzimas de Fase-II, dando lugar a diferentes metabolitos conjugados (glucurónidos, sulfatos, etc.). Previamente, se ha descrito en la presente Tesis Doctoral que las formas moleculares derivadas de compuestos fenólicos de la dieta que llegan al tejido tumoral mamario

(TTM) humano son principalmente metabolitos conjugados de Fase-II en forma de glucurónidos y sulfatos (**Capítulo 4**).

Dados estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio *in vitro* utilizando dos modelos celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), para evaluar: 1) la actividad antiproliferativa a corto plazo de diferentes metabolitos conjugados de Fase-II derivados de compuestos fenólicos de la dieta que son relevantes en el tejido TTM y, comparar el efecto de estos mismos metabolitos pero en su forma libre (resveratrol (RSV), dihidroresveratrol (DH-RSV), urolitinas y hesperetina (HP)) y; 2) la actividad estrogénica y/o antiestrogénica de estos mismos metabolitos conjugados de Fase-II y comparar sus efectos frente a su forma libre.

Los resultados mostraron que mientras las formas libres ejercen actividad antiproliferativa y también actividad estrogénica/antiestrogénica de manera dosis-dependiente, sus conjugados de Fase-II carecían de ellas. Además, se detectaron diferencias en el efecto ejercido de los compuestos en forma libre entre una línea celular y otra. Este hecho pudo explicarse debido al metabolismo de Fase-II que se observó por parte de las células MCF-7 sobre los compuestos en forma libre, mientras que éste fue escaso o nulo por la línea celular MDA-MB-231.

Podemos concluir que el metabolismo de Fase-II limita la actividad antiproliferativa, así como también la actividad estrogénica y antiestrogénica de diferentes compuestos fenólicos derivados de la dieta, en estos dos modelos celulares diferentes de cáncer de mama. Por tanto, estos resultados abogan por lo que podría considerarse como una "llamada de atención" que reafirma la necesidad de evitar el uso de compuestos fenólicos en formas moleculares sin una relevancia fisiológica demostrada para estudiar el efecto quimiopreventivo de compuestos fenólicos frente al cáncer de mama.

1. INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado en el **Capítulo 1**, los compuestos fenólicos de la dieta se encuentran en los alimentos principalmente en forma de glicósidos (asociados a un azúcar como glucosa, ramnosa, rutinosa, etc.) y/o formas oligoméricas que son muy poco o nada biodisponibles y, por tanto, no son capaces de llegar como tales a los tejidos sistémicos (González-Sarrías et al., 2017a). Tras su consumo, los compuestos fenólicos sufren una serie de biotransformaciones en el organismo. En el tracto intestinal son hidrolizados (eliminando el azúcar asociado) y/o metabolizados en otras moléculas por la microbiota intestinal. Por tanto, el resultado son formas libres (comúnmente llamadas "agliconas") procedentes de los fenólicos ingeridos o de los metabolitos de la microbiota. Estas formas libres, tras su absorción intestinal, se conjugan mediante enzimas de Fase-II, dando lugar a metabolitos conjugados como son glucurónidos, sulfatos y/o compuestos metilados, los cuales pasan al torrente sanguíneo pudiendo alcanzar tejidos sistémicos en humanos, como se ha descrito en diversos estudios clínicos (González-Sarrías et al., 2010; Bolca et al., 2010a; Núñez-Sánchez et al., 2014; Espín et al., 2017).

Con el fin de conocer qué ocurre *in vivo* con estos compuestos para poder evaluar posibles mecanismos y efectos frente al cáncer de mama con metabolitos fisiológicamente relevantes, se llevó a cabo el estudio clínico POLYSEN en pacientes con cáncer de mama (**Capítulo 4**). Como se ha descrito anteriormente, este estudio evidenció que los compuestos que llegan al tejido TTM tras el consumo de diferentes compuestos fenólicos son metabolitos conjugados de Fase-II, fundamentalmente glucurónidos y sulfatos. Entre los diferentes metabolitos detectados en el tejido TTM se identificaron conjugados derivados de compuestos fenólicos producidos por la microbiota intestinal como son DH-RSV, HP y diferentes urolitinas, así como metabolitos

conjugados de Fase-II directamente de compuestos fenólicos consumidos como fue el caso de RSV (**Capítulo 4**).

En estudios anteriores con diferentes modelos de cáncer e inflamación, se ha indicado que los metabolitos derivados de compuestos fenólicos en forma conjugada son menos activos que sus formas libres (Aires et al., 2013; Giménez-Bastida et al., 2012; 2016; González-Sarrías 2014). Las formas libres pueden ejercer actividad antiproliferativa en modelos celulares de cáncer de mama como ocurre con RSV (Sinha et al., 2016) o HP (Palit et al., 2015), así como también actividad estrogénica/antiestrogénica descrita en el caso de las urolitinas (Uro-A y Uro-B) (Larrosa et al., 2006). Sin embargo, la actividad de sus metabolitos conjugados de Fase-II no ha sido descrita.

En este sentido, actualmente existen escasos estudios en modelos celulares de cáncer de mama donde se compare la actividad antiproliferativa de metabolitos conjugados frente a su forma libre, y en lo que respecta a la actividad estrogénica/antiestrogénica de estos compuestos los estudios que encontramos muestran cómo los metabolitos conjugados derivados de isoflavonas carecen o tienen un efecto estrogénico menor que sus formas libres (**Capítulo 1**, **Tabla 1.6**).

Por tanto, teniendo en cuenta todos los antecedentes anteriores, el objetivo de este trabajo fue comparar la actividad antiproliferativa a corto plazo (hasta 72 horas) y actividad estrogénica/antiestrogénica de diferentes metabolitos conjugados de Fase-II (glucurónidos y sulfatos) derivados de compuestos fenólicos que alcanzan el TTM humano, frente a las ejercidas por sus formas libres (RSV, DH-RSV, Uro-A, IsoUro-A, Uro-B y HP). Para ello, se ensayaron dos modelos celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) con características diferentes que permitieron evaluar si el metabolismo de Fase-II podría limitar la actividad biológica de las formas libres.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Patrones y reactivos

Los metabolitos derivados de compuestos fenólicos y sus conjugados de Fase-II fueron los siguientes: RSV, DH-RSV, Uro-A, IsoUro-A, Uro-B y HP, como metabolitos en forma libre y; RSV 3-glur, RSV 3-sulf, RSV 4'-sulf, DH-RSV 3-glur, Uro-A 3-glur, Uro-A 8-glur, Uro-A sulf, IsoUro-A 3-glur, IsoUro-A 9-glur, Uro-B 3-glur, Uro-B 3-sulf, HP 3'-glur, HP 7-glur, HP 3'-sulf y HP 7-sulf como sus correspondientes conjugados de Fase-II. Estos metabolitos, así como otros reactivos y disolventes orgánicos empleados en los distintos experimentos, se obtuvieron como se describe en el **Capítulo 3**, **apartado 1**.

2.2. Condiciones de los cultivos celulares y tratamientos

La línea celular de cáncer de mama MCF-7 expresa receptores estrogénicos (RE+) y se utilizó para evaluar tanto la actividad antiproliferativa como la actividad estrogénica/antiestrogénica de los metabolitos conjugados de Fase-II y de sus formas libres. Las condiciones de cultivo y mantenimiento de esta línea celular se detallan en el **Capítulo 3**, **apartado 5.1.1**.

La otra línea celular de cáncer de mama utilizada fue MDA-MB-231. Esta línea no expresa receptores estrogénicos (RE-) y solamente se utilizó para evaluar la actividad antiproliferativa de los metabolitos conjugados de Fase-II y de sus formas libres. Las condiciones de cultivo y mantenimiento de esta línea celular se detallan en el **Capítulo 3**, **apartado 5.1.2**.

Los metabolitos empleados se solubilizaron en DMSO y filtraron por 0,22 µm antes de añadirlos al medio de cultivo a las concentraciones ensayadas (1, 10 y 50 µM), siempre

a una concentración final <0,5% de DMSO. En paralelo, siempre se ponía el correspondiente control de células (0,5% DMSO) para poder evaluar los cambios producidos por los tratamientos.

2.3. Actividad antiproliferativa de metabolitos conjugados y de sus formas libres

Para medir la actividad antiproliferativa de los metabolitos conjugados de Fase-II y de sus formas libres (los llamaremos de aquí en adelante tratamientos) las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 2.500 y 3.000 células por pocillo (MDA-MB-231 y MCF-7, respectivamente). Tras 24 horas de incubación, las células se trataron a 1, 10 y 50 µM y se incubaron con los diferentes tratamientos durante 48 y 72 horas. Finalmente, la proliferación celular se determinó utilizando el método colorimétrico del XTT, detallado en el **Capítulo 3**, **apartado 5.2.2** para las células MCF-7 y el método del MTT, detallado en el **Capítulo 3**, **apartado 5.2.1** para las MDA-MB-231.

Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de inhibición de la proliferación respecto al control tratado con DMSO. Los ensayos se realizaron al menos 3 veces (n=12 pocillos por tratamiento en cada réplica).

2.4. Actividad estrogénica/antiestrogénica de metabolitos conjugados y de sus formas libres determinadas mediante el ensayo E-SCREEN

La actividad estrogénica y antiestrogénica se evaluó en la línea celular MCF-7 (RE+). El ensayo E-SCREEN, utilizado para determinar estas actividades, ha sido detallado en el **Capítulo 3**, **apartado 5.2.3**. En resumen, la actividad estrogénica se evaluó midiendo

el incremento de proliferación de las células tratadas con los distintos tratamientos frente al control de células tratadas con 1 nM de 17β-estradiol; mientras que la actividad antiestrogénica se evaluó como la disminución de la proliferación de las células co-tratadas con los tratamientos en presencia de 1 nM de 17β-estradiol frente a células control (tratadas solamente con 1 nM de 17β-estradiol).

Los resultados obtenidos se expresaron como el porcentaje de proliferación respecto a los correspondientes controles. Los ensayos se realizaron al menos 3 veces (n=12 pocillos por tratamiento en cada réplica).

2.5. Evaluación del metabolismo de Fase-II en MCF-7 y MDA-MB-231

Para determinar la estabilidad y metabolismo de los metabolitos conjugados y sus formas libres en ambas líneas celulares, se recogieron alícuotas de los medios de cultivo durante los tratamientos. Las alícuotas se recogieron a 0, 24, 48 y 72 horas. Los medios de cultivo se almacenaron y procesaron utilizando el protocolo descrito en el **Capítulo 3**, **apartado 5.7**, y posteriormente se analizaron mediante UPLC-ESI-QTOF-MS, como se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 6.2**.

2.6. Análisis estadístico

Todos los datos se muestran como la media ± DE. Los análisis estadísticos se realizaron usando el software SPSS versión 23.0 (SPSS Science; Chicago, EE. UU.), tal como se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 7**.

Las figuras se realizaron utilizando el programa Sigma Plot versión 13.0 (Systat Software; California, EE. UU.). Los valores de $P<0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3. RESULTADOS

3.1. Actividad antiproliferativa de los metabolitos derivados de compuestos fenólicos conjugados de Fase-II y de sus formas libres

Los resultados en las dos líneas celulares mostraron una reducción de la proliferación celular, mayoritariamente sobre la línea celular MDA-MB-231, con algunos tratamientos empleados a 50 µM tras 72 horas de tratamiento (**Tabla 6.1**), mientras que a las 48 horas no se observó ningún efecto (resultados no mostrados). Por otro lado, tampoco se observó con ninguno de los tratamientos a 1 µM efectos en la proliferación de ambas líneas celulares (resultados no mostrados).

Los porcentajes de proliferación celular respecto al control (0,5% DMSO) a 72 horas en cada línea celular se muestran en la **Tabla 6.1**. Los resultados indican que ninguno de los tratamientos empleados a 10 µM ejercía efecto antiproliferativo en ninguna de las dos líneas celulares, obteniendo porcentajes de proliferación similares al control (>90%). La única excepción fue el tratamiento con RSV a 10 µM que mostró una ligera, pero significativa ($P<0,05$), disminución de la proliferación (15%) respecto al control en la línea celular MDA-MB-231.

Tabla 6.1. Porcentajes de proliferación respecto al control (100%) en MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con diferentes metabolitos conjugados de Fase-II derivados de fenólicos y sus formas libres (10 y 50 µM) tras 72 horas de tratamiento.

Metabolitos	MCF-7		MDA-MB-231	
	50 µM	10 µM	50 µM	10 µM
RSV	91,9 ± 10,2	99,9 ± 8,4	57,0 ± 18,2[a]	84,9 ± 11,0[a]
RSV 3-glur	96,8 ± 8,5	104,3 ± 8,6	86,9 ± 14,5[b]	94,8 ± 9,9
RSV 3-sulf	102,1 ± 7,7	102,7 ± 6,6	107,6 ± 11,0[b]	105,6 ± 7,8
RSV 4'-sulf	98,5 ± 8,4	98,4 ± 6,8	111,0 ± 7,5[b]	99,6 ± 12,1
DH-RSV	97,8 ± 7,7	94,8 ± 9,6	82,7 ± 5,7[a]	105,4 ± 4,6
DH-RSV 3-glur	100,8 ± 8,8	103,5 ± 5,9	102,1 ± 6,9[b]	102,7 ± 9,6
Uro-A	85,6 ± 5,8[a]	98,4 ± 2,8	67,6 ± 6,7[a]	109,0 ± 0,8
Uro-A 3-glur	104,5 ± 8,7[b]	104,8 ± 6,6	75,9 ± 8,8[a]	99,5 ± 10,2
Uro-A 8-glur	103,1 ± 4,9[b]	102,7 ± 5,5	73,5 ± 1,9[a]	94,7 ± 16,4
Uro-A sulf	97,1 ± 6,0[b]	98,2 ± 8,8	97,4 ± 8,3	102,2 ± 3,1
IsoUro-A	69,8 ± 7,3[a]	94,9 ± 9,2	42,8 ± 1,3[a]	93,5 ± 7,1
IsoUro-A 3-glur	100,2 ± 3,5[b]	101,1 ± 5,4	75,5 ± 11,9[a,b]	99,5 ± 13,4
IsoUro-A 9-glur	104,4 ± 7,2[b]	103,4 ± 8,8	72,7 ± 7,8[a,b]	98,8 ± 8,9
Uro-B	96,1 ± 7,3	98,2 ± 6,1	77,4 ± 10,6[a]	99,5 ± 8,3
Uro-B 3-glur	104,0 ± 10,2	103,4 ± 5,5	85,1 ± 13,2[a]	91,4 ± 11,2
Uro-B 3-sulf	99,4 ± 9,2	101,4 ± 5,6	105,9 ± 7,2[b]	106,4 ± 5,8
HP	96,1 ± 3,8	108,2 ± 7,7	81,2 ± 5,0[a]	100,2 ± 6,1
HP 3'-glur	94,5 ± 9,2	103,0 ± 5,5	97,8 ± 8,2	103,4 ± 4,8
HP 7-glur	101,1 ± 10,1	100,4 ± 6,8	104,7 ± 5,6	97,8 ± 7,1
HP 3'-sulf	98,4 ± 8,2	97,8 ± 8,8	99,4 ± 8,0	98,4 ± 6,6
HP 7-sulf	97,2 ± 7,3	96,9 ± 11,2	101,1 ± 11,9	100,4 ± 11,1

Los valores (expresados como %) corresponden a la media ± DE (n=3; 12 pocillos en cada una de las 3 réplicas). [a]Diferencias significativas (P<0,05) respecto al control (100%). [b]Diferencias significativas (P<0,05) respecto a su metabolito en forma libre.

En cuanto a las diferencias entre las dos líneas celulares, se observó que la línea MDA-MB-231 fue más sensible que MCF-7 con todos los tratamientos ensayados a 50 µM (**Tabla 6.1**).

Los tratamientos ensayados pertenecían a tres grupos de familias de compuestos fenólicos diferentes. En un grupo se encontraban los derivados del estilbeno RSV, siendo los tratamientos de este grupo el mismo RSV y su metabolito microbiano DH-RSV como

formas libres, así como los conjugados Fase-II de ambos compuestos. Otro grupo lo formaron las urolitinas. Estos derivados fueron Uro-A, IsoUro-A y Uro-B (formas libres) y diferentes conjugados Fase-II de cada una de las urolitinas. Un último grupo lo constituyó la forma libre HP, metabolito microbiano derivado de la flavanona hesperidina, además de sus conjugados de Fase-II (glucurónidos y sulfatos).

Respecto al efecto ejercido por los tres grupos diferentes de tratamientos a 50 µM en la línea celular MDA-MB-231, el grupo de HP fue el que menor efecto antiproliferativo mostró. Este efecto solo se observó al tratar las células con la forma libre de HP, ejerciendo una reducción de un 20% en la proliferación celular frente al control. En cambio, las urolitinas en forma libre, así como alguno de sus conjugados, mostraron los mayores efectos en la reducción de la proliferación en esta línea celular, variando desde un 23% a un 57% dependiendo de la urolitina. Centrándonos en las formas libres del grupo de urolitinas, la actividad antiproliferativa observada siguió el orden de IsoUro-A>Uro-A>Uro-B (**Tabla 6.1**). A destacar, el análisis de la proliferación mostró que los metabolitos conjugados Fase-II de urolitinas, aunque solo glucurónidos y no sulfatos, ejercieron efecto antiproliferativo respecto al control de forma significativa (P<0,05). Este efecto antiproliferativo de los glucurónidos fue similar en el caso de los derivados de IsoUro-A y Uro-A, mientras que Uro-B 3-glur mostró un efecto menor. Por último, los metabolitos conjugados Fase-II del grupo de RSV no mostraron ningún efecto antiproliferativo respecto al control, pero en cambio sí ejercieron este efecto de forma significativa (P<0,05) respecto al control las formas libres de DH-RSV y RSV, este último incluso a 10 µM (**Tabla 6.1**).

En el caso de la línea celular MCF-7, los grupos de tratamientos empleados a 50 µM no mostraron reducción de la proliferación celular respecto al control, ni siquiera las formas libres. Simplemente se observó una leve reducción, aunque significativa (P<0,05)

frente al control, con las formas libres de Uro-A e IsoUro-A, siendo la reducción de la proliferación celular de un 14% y un 30%, respectivamente (**Tabla 6.1**).

3.2. Actividad estrogénica/antiestrogénica de los metabolitos derivados de compuestos fenólicos conjugados de Fase-II y de sus formas libres (Ensayo E-SCREEN)

Como se ha descrito en el **Capítulo 1**, existe un tipo de cáncer de mama cuya proliferación celular es dependiente de la presencia de estrógenos, de ahí el elegir la línea celular MCF-7 (RE+) para llevar a cabo el ensayo E-SCREEN. También se ha comentado en el **Capítulo 4**, **apartado 3.5**, la analogía estructural de derivados fenólicos con el 17β-estradiol (**Figura 4.10**), por lo que ambas circunstancias hacen relevante el estudio de la posible actividad estrogénica/antiestrogénica de metabolitos derivados de fenólicos que llegan al TTM humano.

En la **Figura 6.1** se representa la actividad estrogénica y en la **Figura 6.2** la actividad antiestrogénica que ejerció cada metabolito perteneciente a cada grupo de tratamiento (RSV, urolitinas y HP).

Los resultados mostraron tal como se esperaba, que el tratamiento con 17β-estradiol (1 nM) produjo una inducción significativa (P<0,05) de la proliferación celular (alrededor de 3 veces superior) respecto al control (**Figuras 6.1** y **6.2**).

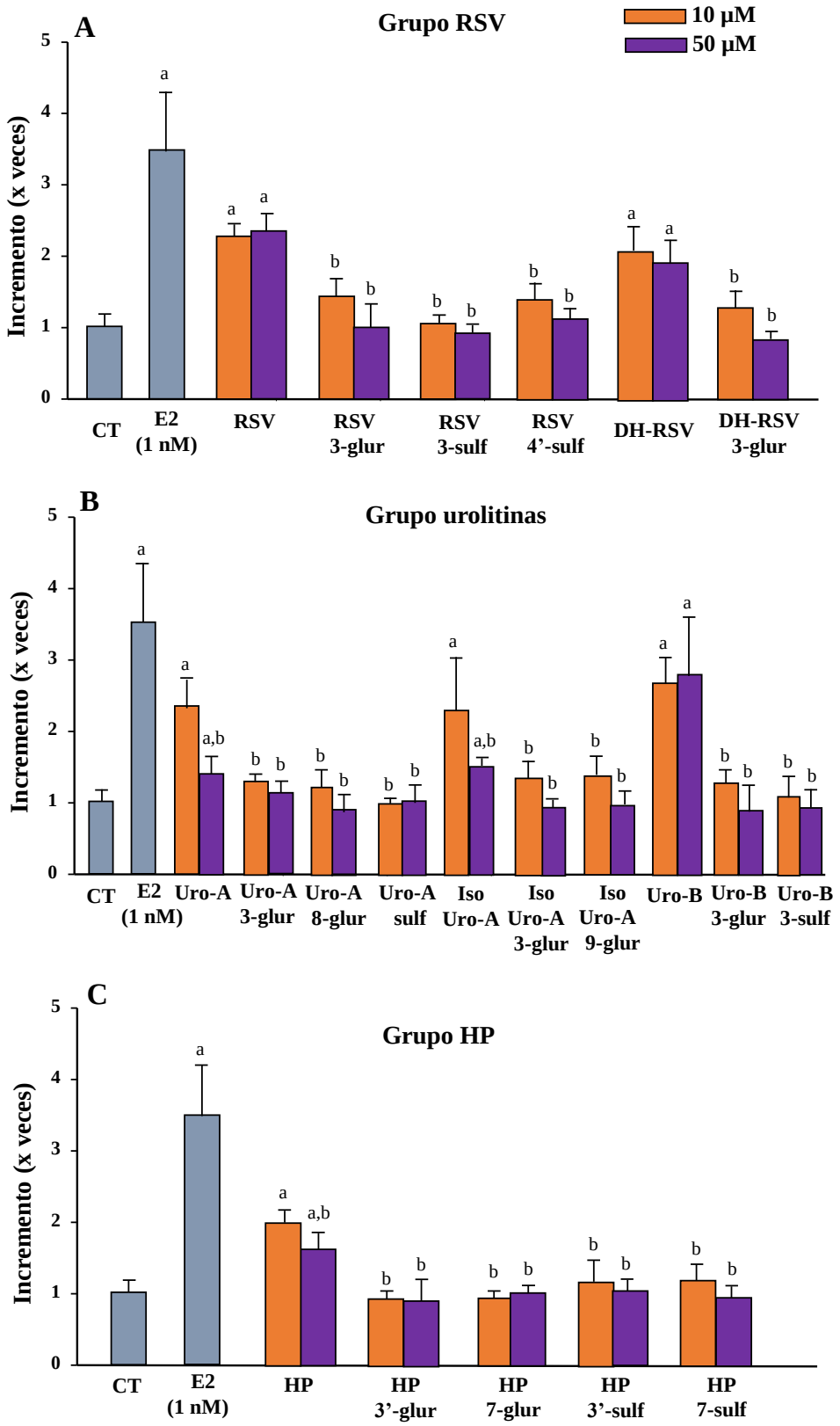


Figura 6.1. Actividad estrogénica en MCF-7 de diferentes metabolitos derivados de fenólicos. (**A**) Grupo de metabolitos derivados de RSV, (**B**) grupo de metabolitos derivados de urolitinas y (**C**) grupo de metabolitos derivados de HP. [a]Diferencias significativas (P<0,05) respecto al control, **CT**. [b]Diferencias significativas (P<0,05) respecto al 17β-estradiol (**E2**).

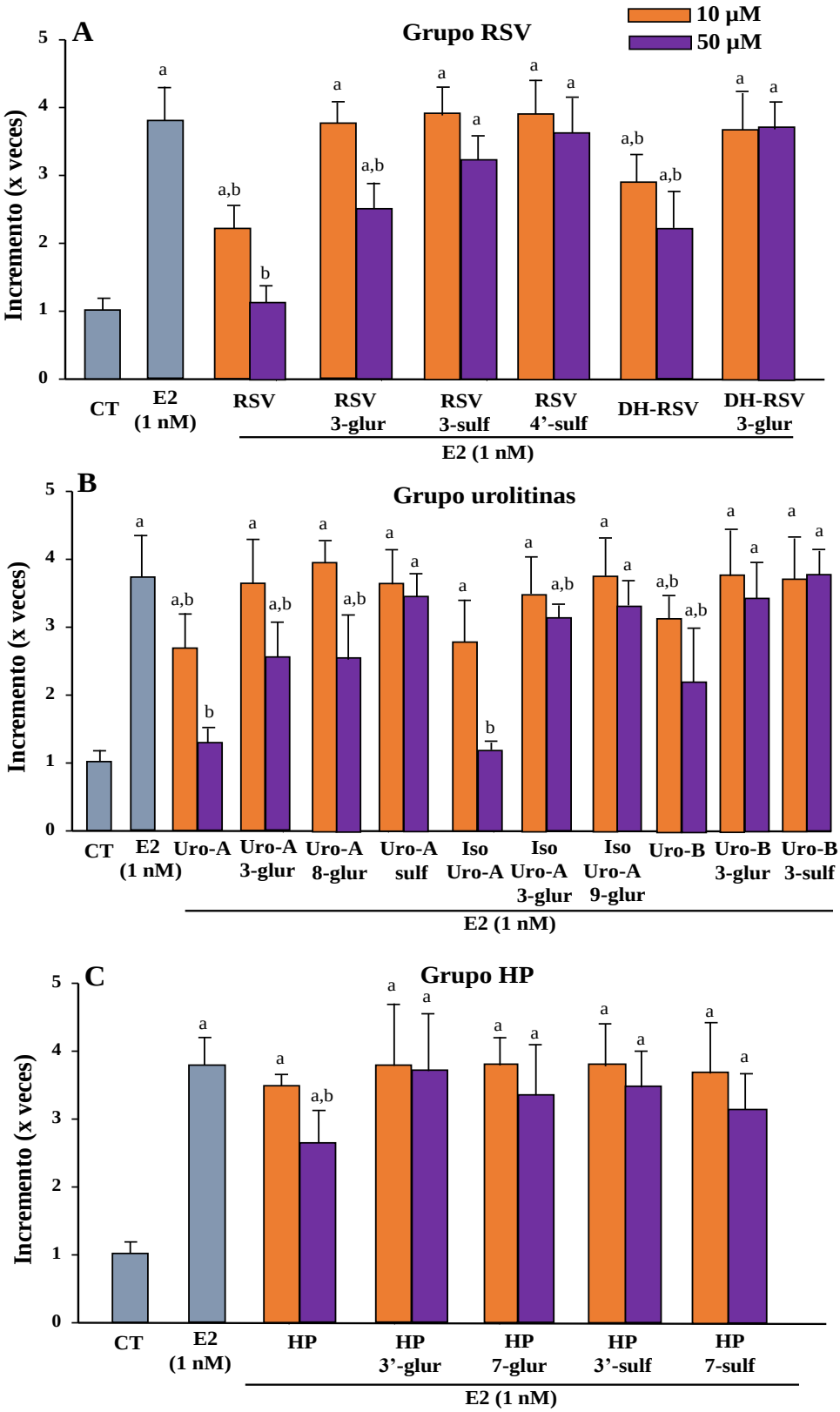


Figura 6.2. Actividad antiestrogénica en MCF-7 de diferentes metabolitos derivados de fenólicos. (**A**) Grupo de metabolitos derivados de RSV, (**B**) grupo de metabolitos derivados de urolitinas y (**C**) grupo de metabolitos derivados de HP. [a]Diferencias significativas (P<0,05) respecto al control, **CT**. [b]Diferencias significativas (P<0,05) respecto al 17β-estradiol (**E2**).

Respecto a los tratamientos con los metabolitos, todos en su forma libre mostraron actividad estrogénica de manera significativa (P<0,05). Sin embargo, ninguno de los metabolitos conjugados incrementó la proliferación celular respecto al control, indicando que carecían de esta actividad estrogénica a las concentraciones ensayadas (10 y 50 µM) (**Figura 6.1A-C**). Entre los diferentes grupos, en el grupo de RSV la forma libre de RSV mostró un incremento en la proliferación de 1,5 veces superior respecto a la del control, mientas que su metabolito microbiano DH-RSV presentó un incremento algo menor, aunque en ambos casos estadísticamente significativos (P<0,05), pero sin ser en ninguno de los dos casos dosis-dependiente (**Figura 6.1A**). En relación con el grupo de urolitinas, fue el tratamiento con Uro-B el que mostró el mayor incremento en la proliferación celular respecto al control (alrededor de 2 veces superior; P<0,05), seguido de Uro-A e IsoUro-A que mostraron unos valores muy similares, reflejándose en un incremento de la proliferación en torno a 1,5 veces con 10 µM y en torno a 0,6 veces con 50 µM respecto al valor del control (P<0,05) (**Figura 6.1B**). Finalmente, HP incrementó la proliferación celular aproximadamente el doble respecto del control (P<0,05), pero tampoco se observó efecto dosis-dependiente entre 10 y 50 µM (**Figura 6.1C**).

Cabe destacar de manera general la ausencia de dosis-dependencia entre los tratamientos a 10 y 50 µM para todas las formas libres, siendo en algunos casos el efecto estrogénico observado menor a 50 µM, como por ejemplo con Uro-A e IsoUro-A (**Figura 6.1B**). Esta ausencia de dosis-dependencia puede explicarse por la actividad antiproliferativa que ejercen las formas libres de Uro-A e IsoUro-A a 50 µM en la línea celular MCF-7 (**Tabla 6.1**).

Respecto a la actividad antiestrogénica de cada tratamiento, considerada como la reducción de la proliferación celular inducida con la co-incubación de los metabolitos en presencia de 17β-estradiol (1 nM), solamente las formas libres ejercieron esta actividad,

pero no sus conjugados a la concentración más baja ensayada (10 µM) (**Figura 6.2**). No obstante, a diferencia de la actividad estrogénica, se debe señalar que algunos conjugados de Fase-II como RSV 3-glur, Uro-A 3-glur, Uro-A 8-glur e IsoUro-A 3-glur a dosis de 50 µM sí ejercieron una ligera, aunque estadísticamente significativa (P<0,05), disminución de la proliferación respecto a la inducida por 1 nM de 17β-estradiol (**Figura 6.2**). En general, se puede destacar que entre los conjugados de Fase-II solo los glucurónidos mostraron actividad antiestrogénica, ya que ninguno de los sulfatos ensayados ejerció tal efecto a ninguna de las concentraciones ensayadas.

En cuanto al efecto de las formas libres, en el grupo de RSV, la forma libre de RSV mostró una proliferación de alrededor 3 veces inferior respecto al control de 17β-estradiol a 50 µM (P<0,05), mientas que su metabolito microbiano DH-RSV presentó una reducción menor de 1,5 veces (P<0,05) (**Figura 6.2A**). Respecto al grupo de urolitinas, fue el tratamiento con Uro-B el que mostró menor efecto antiestrogénico, seguido de Uro-A e IsoUro-A que mostraron unos valores muy similares a 10 y 50 µM (**Figura 6.2B**). Finalmente, HP ejerció una ligera disminución de la proliferación celular (en torno a 1,3 veces), siendo solo estadísticamente significativa a 50 µM (P<0,05) respecto al 17β-estradiol (**Figura 6.2C**).

Por último, al igual que lo observado con la actividad estrogénica, hay que considerar que el ligero efecto antiproliferativo ejercido, principalmente por urolitinas a 50 µM, podría contribuir a la reducción de la proliferación observada en combinación con 17β-estradiol, incrementando así el efecto antiestrogénico detectado a esta concentración.

3.3. Metabolismo de los metabolitos derivados de compuestos fenólicos en células tumorales de mama

En primer lugar, se evaluó la estabilidad de todos los metabolitos ensayados, conjugados de Fase-II y sus formas libres, mediante UPLC-ESI-QTOF-MS. Los resultados mostraron que todos eran estables en el medio de cultivo de ambas líneas celulares, en ausencia de células, a los tiempos de incubación ensayados (resultados no mostrados).

Respecto al metabolismo celular de los compuestos, ningún conjugado de Fase-II, ni glucurónido ni sulfato, incubados con MCF-7 y MDA-MB-231 sufrió desconjugación ni degradación en los tiempos de ensayo (resultados no mostrados). Además, en el caso de la línea celular MDA-MB-231 tampoco se observó metabolismo de las formas libres, tan solo fueron detectadas trazas de conjugados en forma de sulfato a las 72 horas de incubación, con la excepción de RSV del que no se observó ningún metabolito conjugado (resultados no mostrados). En cambio, en la línea celular MCF-7 sí se observó metabolismo de Fase-II tras incubar las formas libres, principalmente vía sulfatación.

En la **Figura 6.3** y **Figura 6.4** se muestra como todas las formas libres de los compuestos fenólicos ensayadas, se transformaron de manera tiempo-dependiente en sulfatos, y en menor medida glucurónidos. Sin embargo, hay que reseñar que está conjugación no fue completa tras las 72 horas de incubación, y la mayor o menor conjugación de las formas libres dependió de cada metabolito.

En el grupo de las urolitinas, el mayor metabolismo de la forma libre a conjugados de Fase-II se observó para Uro-A (**pico 8**, **Figura 6.3A**), seguida de IsoUro-A (**pico 7**, **Figura 6.3B**) y por último Uro-B (**pico 10**, **Figura 6.3C**), detectándose un 70, 75 y 80% de la forma libre de cada una de ellas, respectivamente, tras 72 horas de incubación.

En el caso del grupo de RSV, el propio RSV (**pico 8**, **Figura 6.4A**) fue metabolizado principalmente a RSV 3-sulf (**pico 4**, **Figura 6.4A**) y en pequeñas cantidades a RSV 3-glur (**pico 1**, **Figura 6.4A**), observándose este metabolismo con claridad a las 48 horas, aunque sin observarse mayor diferencia a 72 horas, quedando finalmente un 75% de la forma libre inalterada. A diferencia del RSV, su metabolito microbiano DH-RSV fue altamente metabolizado por las células MCF-7, detectándose solo un 15% de la forma libre sin metabolizar tras 72 horas de incubación (**pico 10**, **Figura 6.4B**). El metabolito DH-RSV, al igual que RSV, se transformó principalmente vía sulfatación, encontrándose dos isómeros sulfatados (**pico 2** y **pico 5**, **Figura 6.4B**), y un glucurónido (**pico 3**, **Figura 6.4B**).

Finalmente, la línea celular MCF-7 metabolizó HP (**pico 12**, **Figura 6.4C**) en diferentes conjugados Fase-II que fueron: HP 7-glur (**pico 6**, **Figura 6.4C**); HP 3'-glur (**pico 7**, **Figura 6.4C**); HP 3'-sulf (**pico 9**, **Figura 6.4C**) y HP 7-sulf (**pico 11**, **Figura 6.4C**), detectándose aproximadamente un 65% de HP en forma libre tras 72 horas de incubación.

4. DISCUSIÓN

Pese a que diferentes estudios preclínicos han demostrado que muchos fitoquímicos presentes en alimentos de origen vegetal, incluyendo los compuestos fenólicos, ejercen una actividad quimiopreventiva frente al cáncer de mama, en la mayoría de estos estudios no se ha contemplado su biodisponibilidad, así como tampoco su transformación por parte de la microbiota, la cual juega un papel fundamental en el metabolismo de estos compuestos (**Capítulo 1**; Espín et al., 2017).

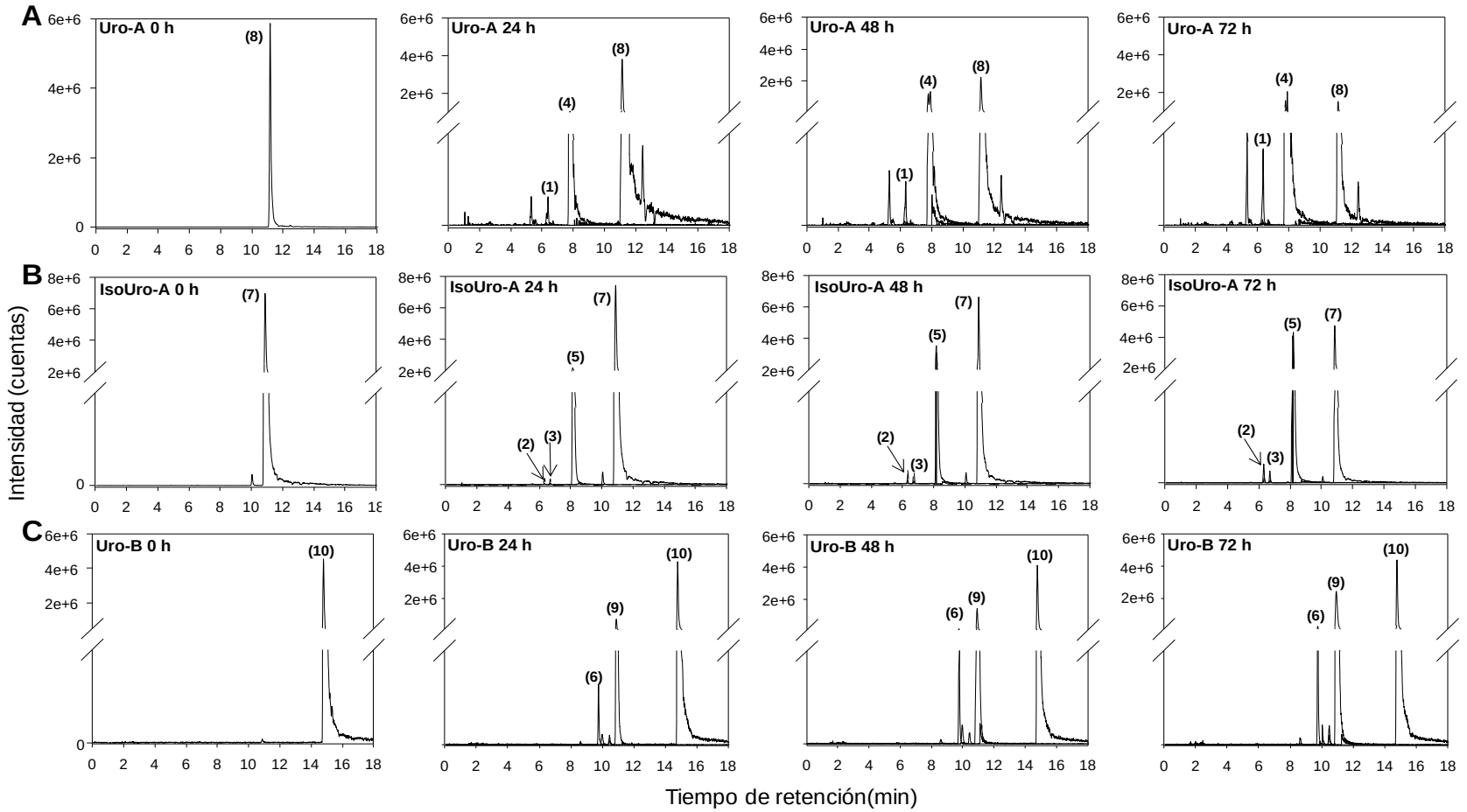


Figura 6.3. **EICs** en medio celular de la línea celular MCF-7 tras incubar con las formas libres de las distintas urolitinas: Uro-A (**A**), IsoUro-A (**B**), Uro-B (**C**) a 10 µM durante 0, 24, 48 y 72 horas mostrando los metabolitos producidos a cada tiempo. Picos cromatográficos: **1**, Uro-A 3-glur y Uro-A 8-glur (co-eluyen); **2**, IsoUro-A 9-glur; **3,** IsoUro-A 3-glur; **4**, Uro-A sulf; **5**, IsoUro-A sulf; **6**, Uro-B 3-glur; **7**, IsoUro-A; **8**, Uro-A; **9**, Uro-B 3-sulf; **10**, Uro-B

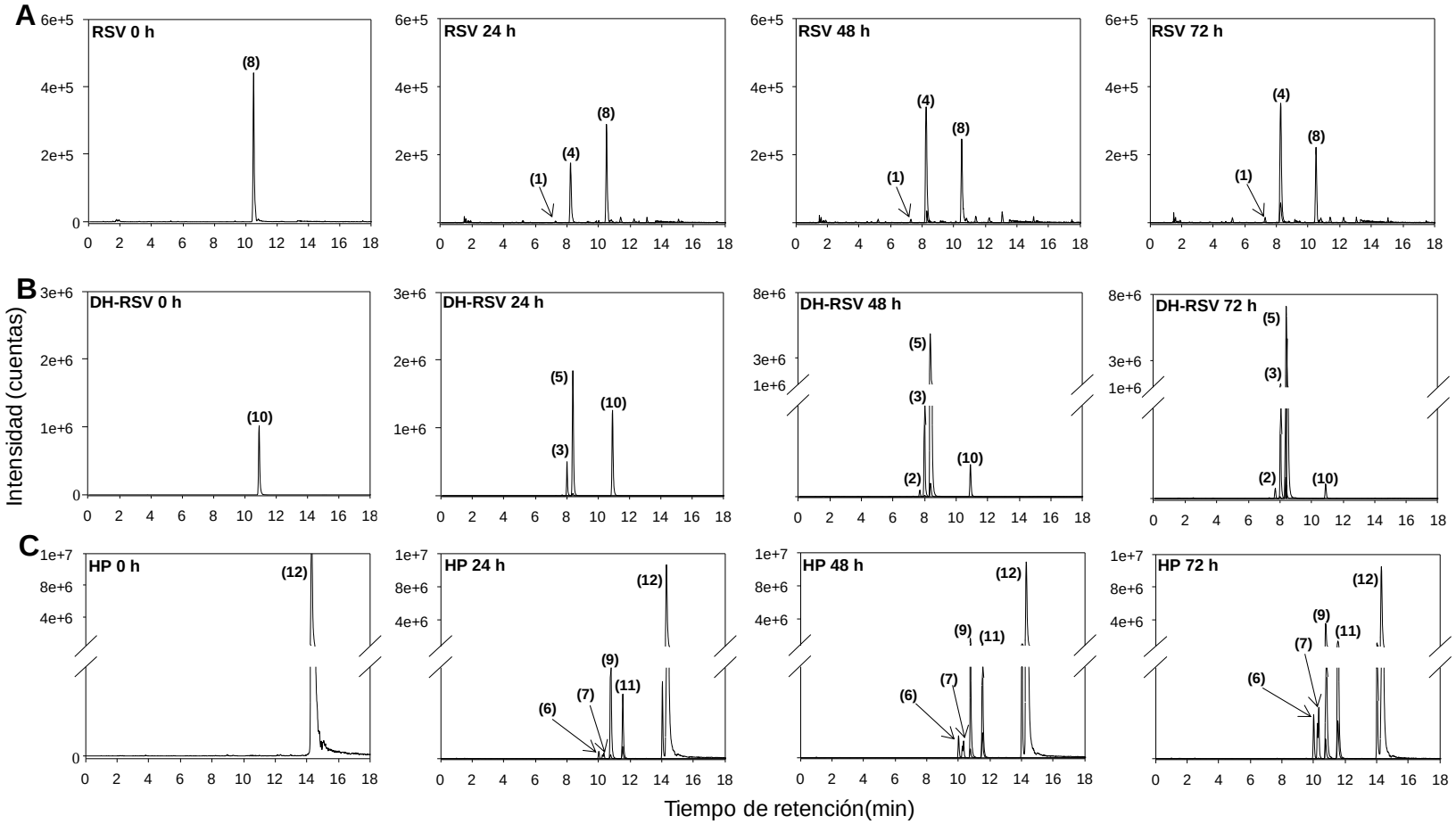


Figura 6.4. **EICs** en medio celular de la línea celular MCF-7 tras incubar con las formas libres de RSV: RSV (**A**), DH-RSV (**B**) y; con la flavanona HP (**C**) a 10 µM durante 0, 24, 48 y 72 horas mostrando los metabolitos producidos a cada tiempo. Picos cromatográficos: **1**, RSV 3-glur; **2**, DHR sulf (isómero-1); **3**, DH-RSV 3-glur; **4**, RSV 3-sulf; **5**, DHR sulf (isómero-2); **6**, HP 7-glur; **7**, HP 3'-glur; **8**, RSV; **9**, HP 3'-sulf; **10**, DH-RSV; **11**, HP 7-sulf; **12**, HP.

En estudios clínicos se ha observado que son los metabolitos de Fase-II (principalmente glucurónidos y sulfatos) de compuestos fenólicos y sus metabolitos microbianos las moléculas que realmente llegan a diferentes tejidos sistémicos humanos (González-Sarrías et al., 2010; Núñez-Sánchez et al., 2014), incluyendo TTM (**Capítulo 4**).

Tal como se comentó en el **Capítulo 1**, existen dos estudios en voluntarias sanas que consumieron lúpulo o isoflavonas de soja (según el estudio) los días previos a someterse a una intervención quirúrgica de reducción mamaria. Tras el análisis de los tejidos mamarios de estas voluntarias después del consumo de estos flavonoides se detectaban principalmente glucurónidos derivados de los fenólicos consumidos en el rango de pmol/g tejido (Bolca et al., 2010a; 2010b). Sin embargo, está descrito que las isoflavonas en forma de glucurónidos carecen de actividad biológica (Kinjo et al., 2004; Pritchett et al., 2008). Por tanto y ante estos antecedentes, se hacía necesario evaluar en modelos celulares de cáncer de mama la posible actividad quimiopreventiva frente a esta enfermedad de los metabolitos conjugados de Fase-II derivados de compuestos fenólicos, que son los metabolitos clínicamente relevantes, y además, identificar si había diferencias frente a la posible actividad ejercida por sus formas libres.

En este trabajo, se ha observado en dos líneas celulares de cáncer de mama con diferentes características (MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-)) que, mientras los metabolitos en su forma libre según la concentración ejercen actividad antiproliferativa así como también actividad estrogénica/antiestrogénica en la mayoría de casos, sus metabolitos de Fase-II carecían de ellas o eran prácticamente nulas. Estos resultados son acordes con la baja actividad antiproliferativa descrita para diferentes glucurónidos de urolitinas frente a sus formas libres en células humanas de cáncer de colon (González-Sarrías et al., 2014; 2017b). Otro ejemplo de la escasa actividad biológica que tienen los

conjugados frente a sus formas libres, como el caso de la limitada actividad antiproliferativa de RSV 3-sulf y nula de sus glucurónidos frente al RSV en forma libre, descritas también en células humanas de cáncer de colon (Aires et., al 2013).

En relación con las formas libres que tuvieron efecto antiproliferativo, este fue claramente mayor en la línea celular MDA-MB-231 que en MCF-7, aunque estos efectos se produjeron empleando altas concentraciones (50 µM) de los tratamientos. Esto coincide con lo observado previamente para HP y RSV en forma libre, donde el efecto antiproliferativo de ambos metabolitos a concentraciones entre 50-200 µM fue menor en la línea celular MCF-7 que en MDA-MB-231 (Pozo-Guisado et al., 2002; Palit et al., 2015). En el mismo sentido, el presente estudio muestra que las urolitinas y el metabolito DH-RSV a 50 µM ejercen actividad antiproliferativa en MDA-MB-231, mientras que es escasa (solo con Uro-A e IsoUro-A) o nula en MCF-7. En lo que se refiere a los resultados observados dentro del grupo de urolitinas, la actividad antiproliferativa de estos fue Uro-A≈IsoUro-A>Uro-B, que está de acuerdo con lo descrito en estudios previos (González-Sarrías et al., 2014; 2016).

Debemos señalar que las diferencias a la sensibilidad de los tratamientos que se han observado entre ambas líneas celulares podrían explicarse por sus diferencias genéticas, pero también por su diferente capacidad metabólica, la cual se ha evaluado en este estudio. Así, el análisis mediante UPLC-ESI-QTOF-MS indicó que la línea celular MDA-MB-231 tiene una escasa capacidad de metabolizar las formas libres de compuestos fenólicos, sin embargo, la línea celular MCF-7 sí los transforma a metabolitos de Fase-II, principalmente sulfatos, explicándose así el menor efecto antiproliferativo de las formas libres observado frente a MCF-7. Estas diferencias podrían deberse a los diferentes niveles de expresión de enzimas implicadas con el metabolismo Fase-II, entre ambas líneas celulares. En este sentido se ha descrito que mientras la línea celular MCF-7

expresa genes implicados en el metabolismo de Fase-II de compuestos (sulfatación y glucuronidación) como *SULT2B1* y *UGT2B27*, la línea MDA-MB-231 carece de expresión o presenta niveles mucho más bajos (Hevir et al., 2011).

Los resultados obtenidos mediante el ensayo E-SCREEN en la línea MCF-7 mostraron que los conjugados de Fase-II no inducían incremento de la proliferación (actividad estrogénica), ni reducción de la misma en presencia de 1 nM de 17β-estradiol (actividad antiestrogénica), pero sí lo hicieron las formas libres. Nuestros resultados estuvieron de acuerdo, parcialmente, con lo descrito en un estudio *in silico* anterior en el que se comparaba la capacidad potencial de diferentes conjugados de urolitinas frente a sus formas libres de unirse a REα y REβ (Dellafiora et al., 2013). Este estudio indicó que las formas libres fueron las únicas que mostraron afinidad por los receptores estrogénicos. Sin embargo, en nuestro estudio se ha observado una leve actividad antiestrogénica con diferentes urolitinas conjugadas (Uro-A 3-glur, Uro-A 8-glur e IsoUro-A 3-glur), aunque mucho menor que la mostrada por sus formas libres.

En nuestro estudio, RSV 3-glur también mostró una leve actividad antiestrogénica. Sin embargo, Ruotolo et al. (2013) previamente describieron, a concentraciones similares a las de nuestro estudio, que el metabolito RSV 3-sulf, pero no los glucurónidos de RSV (RSV 3-glur y RSV 4'-glur), ejercían actividad antiestrogénica en MCF-7. No obstante, debemos señalar que el ensayo usado para evaluar la actividad estrogénica/antiestrogénica de este otro estudio fue diferente al nuestro, ya que transfectaron MCF-7 con el gen de luciferasa y emplearon para la detección de la actividad estrogénica/antiestrogénica la técnica del doble híbrido en levadura (Ruotolo et al., 2013).

En general los resultados de nuestro estudio muestran cómo el metabolismo de Fase-II limita la actividad biológica de diferentes metabolitos derivados de fenólicos. Está

demostrado que el metabolismo de Fase-II es una ruta de inactivación y/o eliminación de xenobióticos, produciéndose metabolitos menos reactivos y más solubles para poder eliminarlos a través de la excreción urinaria, lo cual puede suponer un mecanismo de quimiorresistencia en diferentes tipos de cáncer (Jana y Mandlekar, 2009; Pathania et al., 2018).

En general, los resultados de este estudio apoyan que el metabolismo de Fase-II limita la actividad biológica de los compuestos derivados de fenólicos, incluso utilizando concentraciones superiores de las detectadas *in vivo*. La actividad antiproliferativa, así como la actividad estrogénica/antiestrogénica, de diferentes formas libres de metabolitos fenólicos se han corroborado en los resultados de este estudio, aunque son dependientes del modelo celular en el caso de la actividad antiproliferativa. Desafortunadamente, estos efectos no se han observado con sus metabolitos de Fase-II que son los que realmente llegan al TTM, por lo que estos resultados reafirman la "llamada de atención" para dejar de evaluar las actividades biológicas de formas moleculares de compuestos fenólicos que no se detecten en los tejidos sistémicos. No obstante, hay que añadir que aunque en este estudio no se haya observado desconjugación de los metabolitos de Fase-II en ninguna de las dos líneas celulares empleadas, no se puede descartar que ocurra *in situ* en tejidos sistémicos, ya que se ha descrito, tal como se ha comentado en el **Capítulo 4**, para diferentes fenólicos como luteolina en plasma (Shimoi et al., 2001) o Uro-A en diferentes tejidos (Ávila-Gálvez et al., 2019) tras administración de LPS en ratas. Esta desconjugación también se ha visto en estudios *in vitro* con la transformación de RSV sulfato a RSV en forma libre, aunque este hecho fue dependiente del tipo de línea celular (Patel et al., 2013).

Considerando lo anterior, los metabolitos conjugados de Fase-II podrían ser un potencial reservorio de sus formas libres, las cuales podrían detectarse en algún momento

en tejidos sistémicos como TTM, aunque presumiblemente en bajas concentraciones. Esta posibilidad debe impulsar a realizar estudios que contemplen otros mecanismos de acción quimiopreventiva, quizás a más largo plazo, y donde también pudieran ejercer actividad los metabolitos conjugados como glucurónidos o sulfatos, como podría ser la inducción de senescencia en células tumorales.

CAPÍTULO 7

Metabolitos de Fase-II de resveratrol inducen senescencia en células tumorales de mama mediante las rutas de p53/p21 y p16/Rb, precisando de transportadores ABC

Giménez-Bastida, J.A., Ávila-Gálvez, M.Á., Espín, J.C. and González-Sarrías, A. Conjugated physiological resveratrol metabolites induce senescence in breast cancer cells: role of p53/p21 and p16/Rb pathways, and ABC transporters. *Mol Nutr Food Res*, **2019**, 1900629.

Metabolitos de Fase-II de resveratrol inducen senescencia en células tumorales de mama mediante las rutas de p53/p21 y p16/Rb, precisando de transportadores ABC

RESUMEN

Como se ha descrito anteriormente en la presente Tesis Doctoral, los metabolitos que llegan al TTM humano (**Capítulo 4**) y al TSM en animales (**Capítulo 5**), tras el consumo de diferentes compuestos fenólicos, son principalmente derivados conjugados de Fase-II (glucurónidos y sulfatos). Además, se identificó que a partir de la mezcla de compuestos (de diferentes extractos vegetales) consumidos en los estudios *in vivo* de los dos capítulos anteriores, la mayoría de metabolitos de Fase-II detectados en el tejido mamario, así como las concentraciones más altas de los mismos, fueron derivados de RSV. A continuación, como se describe en el **Capítulo 6**, se evaluó la posible actividad antiproliferativa a corto plazo (hasta 72 horas) y actividad estrogénica/antiestrogénica de RSV y sus metabolitos derivados que alcanzan el TTM, en dos modelos celulares diferentes de cáncer de mama. Sin embargo, los resultados mostraron que bajo estas condiciones de ensayo los metabolitos conjugados de Fase-II de RSV no ejercían estas actividades, a diferencia de RSV libre. Pese a esto, no descartamos que estos metabolitos pudieran ejercer un efecto quimiopreventivo frente al cáncer de mama mediante otros mecanismos de acción que quizás requieran tiempos más largos de exposición, como por ejemplo mediados por inducción de senescencia en células tumorales.

Por tanto, en el presente estudio *in vitro* nos planteamos investigar si los metabolitos de Fase-II derivados de RSV detectados en TTM, y también en forma libre como comparativa, pueden inducir senescencia en células tumorales de mama. Para ello, se emplearon dos líneas celulares tumorales de mama humanas (MCF-7 (RE+, p53 silvestre)

y MDA-MB-231 (RE-, p53 mutado)) y una línea no tumoral de tejido mamario humano (MCF-10A). Estas líneas celulares se trataron con las formas libres de RSV y DH-RSV, y con sus respectivos metabolitos de Fase-II (RSV 3-glur , RSV 3-sulf, RSV 4'-sulf y DH-RSV 3-glur) para evaluar: 1) su actividad antiproliferativa a tiempos largos de exposición (dos semanas) y su efecto sobre el ciclo celular e inducción de apoptosis; 2) su capacidad de incrementar la actividad del marcador β-galactosidasa asociada a senescencia celular (SA-β-Gal); 3) su capacidad para aumentar el contenido celular de diferentes marcadores moleculares asociados con senescencia como p53, $p21^{Cip1/Waf1}$ (p21), $p16^{INK4a}$ (p16), y el estado de fosforilación del retinoblastoma (pRb/tRb) y 4) explorar la implicación del receptor de estrógenos (RE) y/o transportadores dependientes de ATP (transportadores ABC) en el transporte de RSV, DH-RSV y sus metabolitos de Fase-II al interior celular donde pudieran ejercer su acción quimiopreventiva.

Los resultados mostraron que RSV y DH-RSV, así como sus metabolitos conjugados de Fase-II, no ejercen efecto sobre la línea no tumoral MCF-10A ni tampoco en la línea tumoral MDA-MB-231 (p53 mutado), pero sí son capaces de ejercer un efecto antiproliferativo a más largo plazo, reduciendo la formación de colonias en la línea MCF-7 (p53 silvestre). Además, estos metabolitos indujeron senescencia celular mostrando un incremento de SA-β-Gal y bloqueo del ciclo celular en fase G_2/M, pero sin inducción de apoptosis. Estos resultados se acompañaron de un incremento de la expresión de p53/p21 y/o p16, dependiendo del metabolito, y adicionalmente se observó que requerían de transportadores ABC, pero no de RE, para inducir la senescencia.

Como novedad en este estudio, se destaca que por primera vez hemos descrito que metabolitos de Fase-II de RSV que son relevantes en TTM humano, son capaces de reducir la proliferación celular a tiempos largos de exposición mediante la inducción de senescencia en células tumorales de mama a través de las rutas de p53/p21 y p16/Rb.

Estos resultados sugieren que los metabolitos derivados de RSV que se detectan en el organismo tras su consumo podrían tener un efecto quimiopreventivo a largo plazo frente al cáncer de mama.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los compuestos bioactivos presentes en alimentos vegetales y derivados (como por ejemplo en uvas, bayas, cacahuetes o vino tinto) del que se ha estudiado ampliamente su actividad quimiopreventiva frente al cáncer de mama es el RSV (Tomé-Carneiro et al., 2013; Avtanski y Poretsky, 2018). No obstante, aunque los efectos *in vitro* de numerosos compuestos fenólicos, incluyendo RSV, han sido prometedores frente a la prevención del cáncer de mama, la evidencia clínica todavía es escasa (Tomé-Carneiro et al., 2013; Losada-Echeberría et al., 2017). Esta falta de evidencia clínica se debe fundamentalmente a que han sido ensayados en estudios *in vitro* sin considerar su biodisponibilidad, metabolismo y/o distribución en tejidos y, por tanto, sin evaluar si los metabolitos que alcanzan el TTM ejercen la actividad quimiopreventiva.

En diferentes estudios clínicos y también animales, se ha demostrado que RSV tiene una baja biodisponibilidad y se elimina rápidamente del organismo. Tras su consumo se metaboliza de manera rápida, principalmente por la acción de enzimas de Fase-II como son UDP-glucuronil transferasas y sulfotransferasas, dando como resultado conjugados de Fase-II (glucurónidos y sulfatos). Además, RSV también puede ser transformado a nivel intestinal por acción de la microbiota en su metabolito microbiano DH-RSV, el cual también es metabolizado por estas enzimas de Fase-II (Walle et al., 2004; Azorín- Ortuño et al., 2011).

El estudio clínico POLYSEN, llevado a cabo en pacientes con lesión tumoral de mama (**Capítulo 4**), ha permitido demostrar que los metabolitos derivados del consumo de RSV

que realmente llegan al TTM humano son conjugados de Fase-II (glucurónidos y sulfatos). Estos resultados concuerdan con otros estudios clínicos, donde se ha descrito la presencia de conjugados en tejido mamario no tumoral tras el consumo de otros compuestos fenólicos como son las isoflavonas (Bolca et al., 2010a) o los prenilflavonoides presentes en el lúpulo (Bolca et al., 2010b).

Por otro lado, en la presente Tesis Doctoral hemos demostrado que las formas libres de RSV y DH-RSV son capaces de ejercer efecto antiproliferativo (dependiente de la concentración y la línea celular) en células de tumorales de mama a corto plazo (hasta 72 horas). Sin embargo, sus metabolitos de Fase-II que son fisiológicamente relevantes no ejercían este efecto (**Capítulo 6**). No obstante, la ausencia de esta actividad quimiopreventiva podría explicarse porque los tiempos de incubación de los compuestos con las células no fueron suficientes para observar un efecto, siendo necesarios ensayos que contemplaran tiempos más largos de exposición, como pudiera ser el ensayo de formación de colonias (Sumantran, 2011). Junto a este posible efecto a largo plazo (de hasta dos semanas), no se puede descartar la actividad quimiopreventiva mediada por otro mecanismo de acción, como por ejemplo la inducción de senescencia. En este sentido, se ha descrito que glucurónidos y sulfatos de RSV pueden ejercer una actividad quimiopreventiva a través de la inducción de senescencia en células tumorales de cáncer de colon (Patel et al., 2013). Además, este mismo efecto se ha descrito en células tumorales de mama para RSV en forma libre (Heiss et al., 2007; Filippi-Chiela et al., 2013; Ji et al., 2018), pero no ha sido evaluado para sus metabolitos conjugados ni para los de su metabolito microbiano DH-RSV.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este estudio se ha evaluado por primera vez si metabolitos de Fase-II que llegan al TTM, tanto de RSV (RSV 3-glur, RSV 3-sulf, RSV

4’-sulf) como de su metabolito microbiano DH-RSV (DH-RSV 3-glur), son capaces de inducir senescencia en células tumorales de mama.

Para investigar este efecto, se persiguieron los siguientes objetivos centrados en la evaluación de: 1) el efecto antiproliferativo a largo plazo de estos metabolitos en la capacidad para inhibir la formación de colonias en varios modelos celulares de mama (tumorales y no tumoral); 2) la inducción de senescencia mediante el incremento de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-Gal); 3) las alteraciones del ciclo celular; 4) diferentes proteínas implicadas en rutas relacionadas con la senescencia celular y 5) si estos metabolitos requieren de receptores estrogénicos y/o de transportadores ABC para inducir senescencia.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Patrones y reactivos

RSV, DH-RSV, así como sus metabolitos conjugados de Fase-II (RSV 3-glur, RSV 3-sulf, RSV 4’-sulf y DH-RSV 3-glur) que se emplearon en los tratamientos, además de otros reactivos y disolventes orgánicos utilizados en los diferentes ensayos de este estudio, se obtuvieron como se describe en el **Capítulo 3**, **apartado 1**.

2.2. Condiciones de los cultivos celulares y tratamientos

Las líneas celulares tumorales de mama MCF-7 que expresa receptores estrogénicos (RE+) y p53 silvestre, y MDA-MB-231, la cual no expresa receptores estrogénicos (RE-) y tiene p53 mutada, se mantuvieron y cultivaron como se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 5.1.1** y **apartado 5.1.2**, respectivamente.

Además, se empleó también la línea celular humana no tumoral de mama MCF-10A. Esta línea se mantuvo y cultivó como se detalla **Capítulo 3**, **apartado 5.1.3**.

Los metabolitos empleados se solubilizaron en DMSO y filtraron por 0,22 µm antes de añadirlos al medio de cultivo a las concentraciones ensayadas, siempre a una concentración final <0,5% de DMSO. Todos los metabolitos (RSV, DH-RSV, RSV 3-glur, RSV 3-sulf, RSV 4'-sulf y DH-RSV 3-glur) se ensayaron individualmente a las concentraciones de 0,5, 1 y 10 µM (según el ensayo). También se ensayó una mezcla representativa de los metabolitos conjugados de Fase-II de RSV ("MIX") detectados en TTM de las pacientes del estudio POLYSEN (**Tabla 4.8**, **Capítulo 4**). Este "MIX" solo se ensayó a una concentración final de 10 µM y los porcentajes aportados por cada metabolito fueron: 12% de RSV 3-glur, 46% de DH-RSV 3-glur, 38% de RSV 3-sulf y 4% de RSV 4'-sulf. Esta mezcla que simulaba lo observado *in vivo* se utilizó para evaluar el posible efecto sinérgico, aditivo o antagonista en la inducción de senescencia celular entre los metabolitos individuales.

En paralelo y en todos los ensayos, siempre se evaluaba el correspondiente control de células (0,5% DMSO) para poder identificar los cambios producidos por los tratamientos.

2.3. Actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa de los tratamientos se evaluó en las dos líneas tumorales (MCF-7 y MDA-MB-231), así como en la línea no tumoral (MCF-10A). Para ello, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 2.000 células por pocillo. Tras 48 horas de incubación, las células se trataban con RSV, DH-RSV o sus metabolitos conjugados de Fase-II a la concentración máxima ensayada de 10 µM. Las líneas celulares se incubaban con los tratamientos durante 5 días y tras ese tiempo se determinó la proliferación celular utilizando el método colorimétrico del XTT, detallado

en el **Capítulo 3**, **apartado 5.2.2** para las células MCF-7 y el método del MTT, detallado en el **Capítulo 3**, **apartado 5.2.1** para las MDA-MB-231 y MCF-10A. Los ensayos se realizaron al menos 3 veces (n=6 pocillos por tratamiento en cada réplica).

2.4. Ensayo de clonogenicidad

La actividad antiproliferativa de RSV, DH-RSV y sus metabolitos de Fase-II se evaluó a largo plazo con el ensayo de clonogenicidad o de formación de colonias, que ha sido descrito en el **Capítulo 3**, **apartado 5.2.4**. Para este ensayo se emplearon las tres líneas celulares de mama, las tumorales (MCF-7 y MDA-MB-231) y la no tumoral (MCF-10A). Las células se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 250 células por pocillo. Una vez sembradas, se incubaron 48 horas y posteriormente se trataron con los distintos tratamientos a 0,5, 1 y 10 µM. El medio celular se renovó con el correspondiente tratamiento cada 3-4 días durante las 2 semanas que duró el experimento de clonogenicidad. Al finalizar el ensayo, las células se fijaban con cristal violeta (CV) tal como se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 5.2.5** y, a continuación, cada pocillo se fotografiaba para cuantificar el área e intensidad de las colonias formadas mediante el uso del programa ImageJ, como se ha detallado en el **Capítulo 3**, **apartado 5.2.4**. Los ensayos con cada tratamiento y a las diferentes concentraciones se realizaron de 3 a 5 veces, mostrándose los resultados como la media ± DE (n=3–5).

2.5. Análisis del ciclo celular

La distribución de las distintas fases del ciclo celular tras los tratamientos a dosis de 10 µM se evaluó a los 3 y 5 días de tratamiento en las dos líneas de células tumorales (MCF-7 y MDA-MB-231), mediante citometría de flujo como se ha descrito en el **Capítulo 3**, **apartado 5.3**. Los resultados del análisis del ciclo celular se expresan como

los porcentajes de las células en fase G_0/G_1, fase S o en G_2/M comparados con las células control tratadas solo con 0,5% de DMSO. El análisis con cada tratamiento a 3 y 5 días se realizó 3 veces (n=2 pocillos por tratamiento en cada réplica).

2.6. Evaluación de apoptosis

La inducción de apoptosis por parte de los diferentes tratamientos a la concentración de 10 µM se evaluó en las dos líneas de células tumorales mediante el ensayo de Anexina V/IP descrito en el **Capítulo 3**, **apartado 5.4.1**. El ensayo se realizó 3 veces con cada tratamiento (n=2 pocillos por tratamiento en cada réplica).

Adicionalmente, la inducción de apoptosis se evaluó también por microscopía de fluorescencia, utilizando la tinción de Hoechst 33258, como se ha detallado en el **Capítulo 3**, **apartado 5.4.2**.

Con ambos métodos empleados para evaluar la apoptosis se utilizó como control positivo el anticancerígeno proapoptótico estaurosporina a 5 µM.

2.7. Medida de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-Gal)

La SA-β-Gal se determinó mediante dos ensayos diferentes: 1) por microscopía óptica con el ensayo X-gal (descrito en el **Capítulo 3**, **apartado 5.5.1**) y 2) por fluorescencia con el ensayo FDG (descrito en el **Capítulo 3**, **apartado 5.5.2**). Ambos ensayos se realizaron en las dos líneas celulares tumorales.

Para determinar SA-β-Gal con el ensayo X-gal, las células (MCF-7 y MDA-MB-231) se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 10.000 células por pocillo y, tras 48 horas de incubación, se trataron con los tratamientos a 10 µM durante 5 días. Al

finalizar el tratamiento, las células se fijaban y posteriormente se incubaban con una solución de tinción (descrita en el **Capítulo 3**, **apartado 5.5.1**) durante 5 horas. Tras la tinción, se tomaron imágenes con el microscopio óptico de 5 a 7 zonas de manera aleatoria en cada pocillo. El análisis de estas imágenes se hizo mediante el programa de análisis de imagen ImageJ. Los valores obtenidos corresponden a los porcentajes de los valores del área teñida de azul (células senescentes) entre el total de células de dicha área (100%).

Como se ha comentado anteriormente, SA-β-Gal también se determinó mediante fluorescencia con el ensayo FDG. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 2.000 células por pocillo. Tras 48 horas, las células se trataron con los diferentes tratamientos a 0,5, 1 y 10 µM de manera individual y con la mezcla representativa de los metabolitos de Fase-II ("MIX") (solo a 10 µM) durante 1, 3 y 5 días. Después de los correspondientes días de tratamiento, se midió la fluorescencia para determinar SA-β-Gal como se ha descrito previamente en el **Capítulo 3**, **apartado 5.5.2**. Tras medir la SA-β-Gal, las células se fijaban y posteriormente se teñían con CV para medir la absorbancia siguiendo el protocolo descrito en el **Capítulo 3**, **apartado 5.2.5**. La medida de absorbancia nos permitió determinar cómo cada tratamiento afectaba a la proliferación celular y así poder normalizar los valores obtenidos de fluorescencia para cuantificar realmente el efecto asociado a senescencia.

Además, en la línea celular MCF-7 también se utilizó el ensayo FDG para evaluar si la senescencia inducida por los tratamientos estaba mediada a través de receptores estrogénicos y/o de transportadores ABC. Para ello, se realizaron co-incubaciones de cada tratamiento a 10 µM durante 5 días con un antagonista del receptor de estrógenos (fulvestrant, fulv) a 0,1 µM, o por el contrario, en combinación con uno de los tres inhibidores selectivos utilizados de diferentes transportadores ABC a 1 µM: CP100356

(Cp) como inhibidor de P-gp; Ko143 (Ko) como inhibidor de BCRP o probenecid (Prob) como inhibidor de MRP.

Ambos ensayos, con cada tratamiento y concentración, se repitieron al menos 3 veces (n=6 pocillos por tratamiento en cada réplica). Los resultados se expresan como la media ± DE de los valores de fluorescencia normalizados con los valores obtenidos tras la tinción con CV.

2.8. Análisis de proteínas mediante Western-Blot

Para el análisis de proteínas, las dos líneas celulares tumorales se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad celular de 45.000 o 40.000 células por pocillo (MCF-7 y MDA-MB-231, respectivamente). Tras 48 horas de incubación, las células se trataban con concentraciones de 10 µM de los distintos tratamientos. Finalmente, a los 5 días de tratamiento las células se lisaban para extraer la proteína, tal como se ha descrito en el **Capítulo 3**, **apartado 5.6.1**. Una vez cuantificada la cantidad de proteína total de cada muestra, se realizaba la electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, cargando siempre la misma cantidad de proteína en todas las muestras (20 µg). Los geles se transferían a membranas de nitrocelulosa para incubar con los diferentes anticuerpos primarios de las proteínas analizadas (p53, p16, p21, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), fosfo-Rb (pRb) y total-Rb (tRb)), y posteriormente con los anticuerpos secundarios (anti-ratón o anti-conejo), dependiendo del anticuerpo primario utilizado. Todas las condiciones empleadas en la electroforesis como en el análisis por Western-Blot, así como diluciones empleadas de cada anticuerpo se encuentran detalladas en el **Capítulo 3**, **apartado 5.6.2**.

2.9. Estabilidad y metabolismo de los tratamientos en MCF-7

Para evaluar la estabilidad y/o metabolismo de todos los metabolitos ensayados (RSV, DH-RSV y conjugados de Fase-II de ambos) por las células MCF-7, se recogieron alícuotas del medio de cultivo al inicio (0 días) y a los 5 días de tratamiento. Posteriormente, los medios de cultivo se procesaron como se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 5.7** y se analizaron mediante UPLC-ESI-QTOF-MS como está descrito en el **Capítulo 3**, **apartado 6.2**.

2.10. Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media ± DE del total de réplicas en cada ensayo. Los análisis estadísticos para comparar los efectos de los diferentes tratamientos se analizaron mediante ANOVA usando el software SPSS versión 23.0 (SPSS Science; Chicago, EE. UU.), tal como se detalla en el **Capítulo 3**, **apartado 7**.

Las gráficas y figuras se realizaron utilizando el programa Sigma Plot versión 13.0 (Systat Software; California, EE. UU.).

3. RESULTADOS

3.1. Actividad antiproliferativa y de reducción de formación de colonias de RSV y sus metabolitos

En el **Capítulo 6** se ha descrito que tanto RSV y DH-RSV como sus metabolitos conjugados Fase-II no ejercen actividad antiproliferativa a una concentración de 10 µM en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, con la excepción de RSV que ejerció un leve efecto antiproliferativo en MDA-MB-231 tras 3 días de tratamiento. En el presente estudio *in vitro* esta actividad antiproliferativa se ha evaluado en estas dos líneas celulares

tumorales de mama como también en la línea no tumoral MCF-10A, a una concentración de 10 µM y durante 5 días. En este sentido, los resultados reflejaron que las concentraciones empleadas en todas las líneas celulares no ejercieron tampoco efectos citotóxicos tras un tiempo mayor de incubación, siendo los porcentajes de proliferación superiores al 90% en todos los tratamientos al compararlos con las células control (100%).

Por otro lado, la capacidad antiproliferativa que tenían RSV, DH-RSV y sus conjugados Fase-II (a 0,5, 1 y 10 µM) se determinó a tiempos todavía más largos de exposición (hasta dos semanas), evaluando la capacidad de reducir la formación de colonias en las células tumorales (MCF-7 y MDA-MB-231) y en la línea no tumoral (MCF-10A) mediante el ensayo de clonogenicidad.

Como era de esperar, los resultados de este ensayo fueron diferentes según la línea celular, así como el tratamiento y la concentración ensayada.

En primer lugar, respecto a la línea de mama no tumoral MCF-10A, ninguno de los tratamientos a las concentraciones ensayadas (0,5, 1 y 10 µM) mostró reducción en la formación de colonias. En la **Figura 7.1** se puede ver la ausencia de efecto a la dosis más alta ensayada (10 µM) para cada tratamiento.

Por otro lado, respecto a las dos líneas celulares de cáncer de mama, solo el tratamiento con RSV a 10 µM fue capaz de reducir la formación de colonias en las células MDA-MB-231 (**Figura 7.2**). Cabe destacar que esta reducción en la formación de colonias fue significativa ($P<0,05$) frente al control, siendo la formación de colonias un 50% menor con el tratamiento de RSV que en las células control (**Figura 7.2B**).

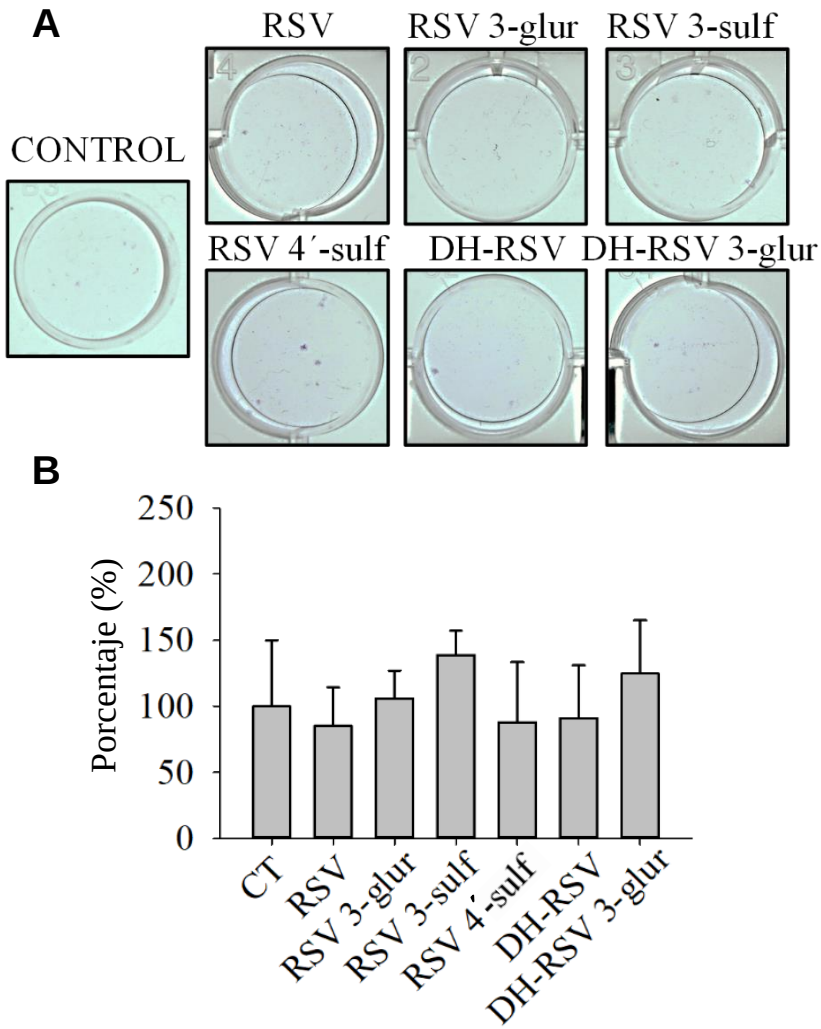


Figura 7.1. Efectos de RSV, DH-RSV y sus metabolitos de Fase-II en la formación de colonias de la línea no tumoral MCF-10A. **A**) Imágenes representativas de las placas de 12 pocillos de MCF-10A tratadas durante dos semanas con cada metabolito a 10 µM y el respectivo control (**CT**). **B**) Valores expresados como porcentaje de la media ± DE que hace referencia a la intensidad de las colonias formadas después de cada tratamiento, obtenidos mediante análisis de imagen. Glur, (-*O*-glur), glucurónido; sulf, (-*O*-sulf), sulfato.

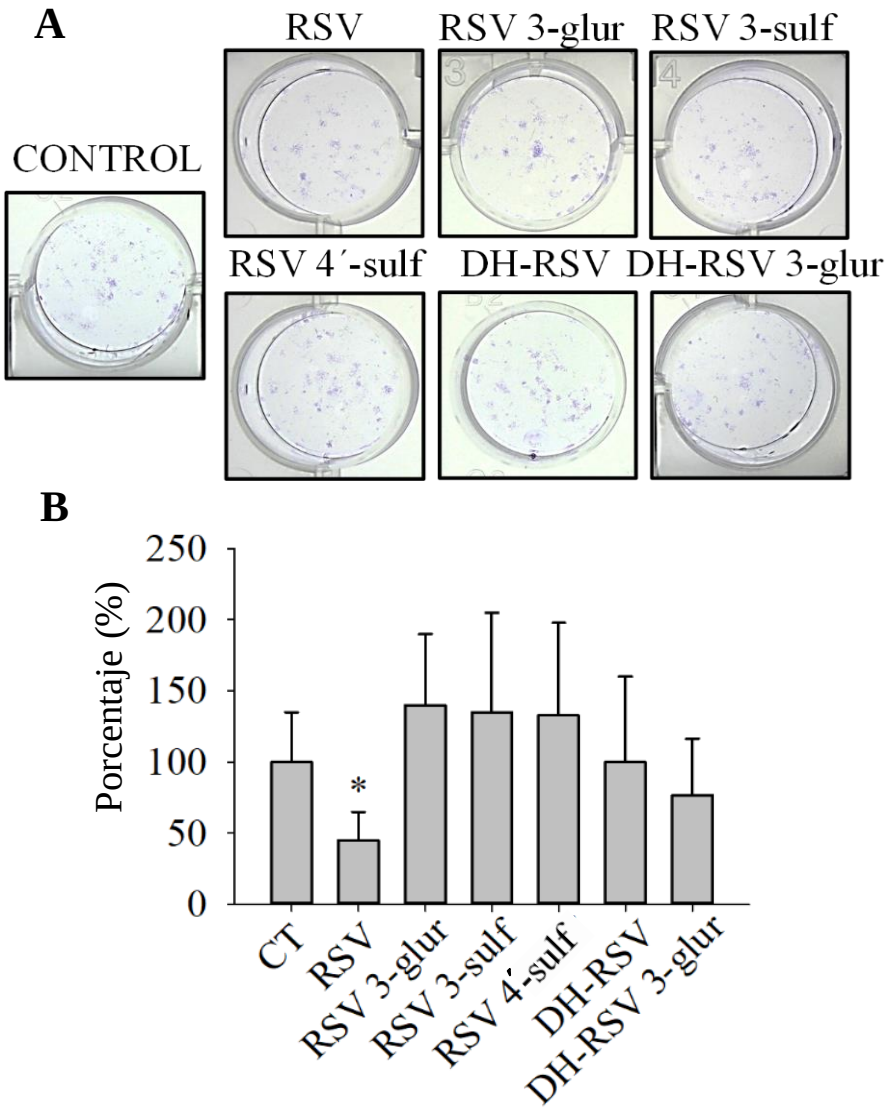


Figura 7.2. Efectos de RSV, DH-RSV y sus metabolitos de Fase-II en la formación de colonias de la línea tumoral MDA-MB-231. **A**) Imágenes representativas de las placas de 12 pocillos de MDA-MB-231 tratadas durante dos semanas con cada metabolito a 10 µM y el respectivo control (**CT**). **B**) Valores expresados como porcentaje de la media ± DE que hace referencia a la intensidad de las colonias formadas después de cada tratamiento, obtenidos mediante análisis de imagen. El asterisco muestra diferencias significativas respecto al CT (**P*<0,05). Glur, (-*O*-glur), glucurónido; sulf, (-*O*-sulf), sulfato.

Sin embargo, la línea tumoral MCF-7 fue mucho más sensible a los tratamientos ensayados a 10 µM que la línea MDA-MB-231, mostrándose una considerable reducción de la formación colonias con el tratamiento de la mayoría de los metabolitos ensayados (**Figura 7.3**).

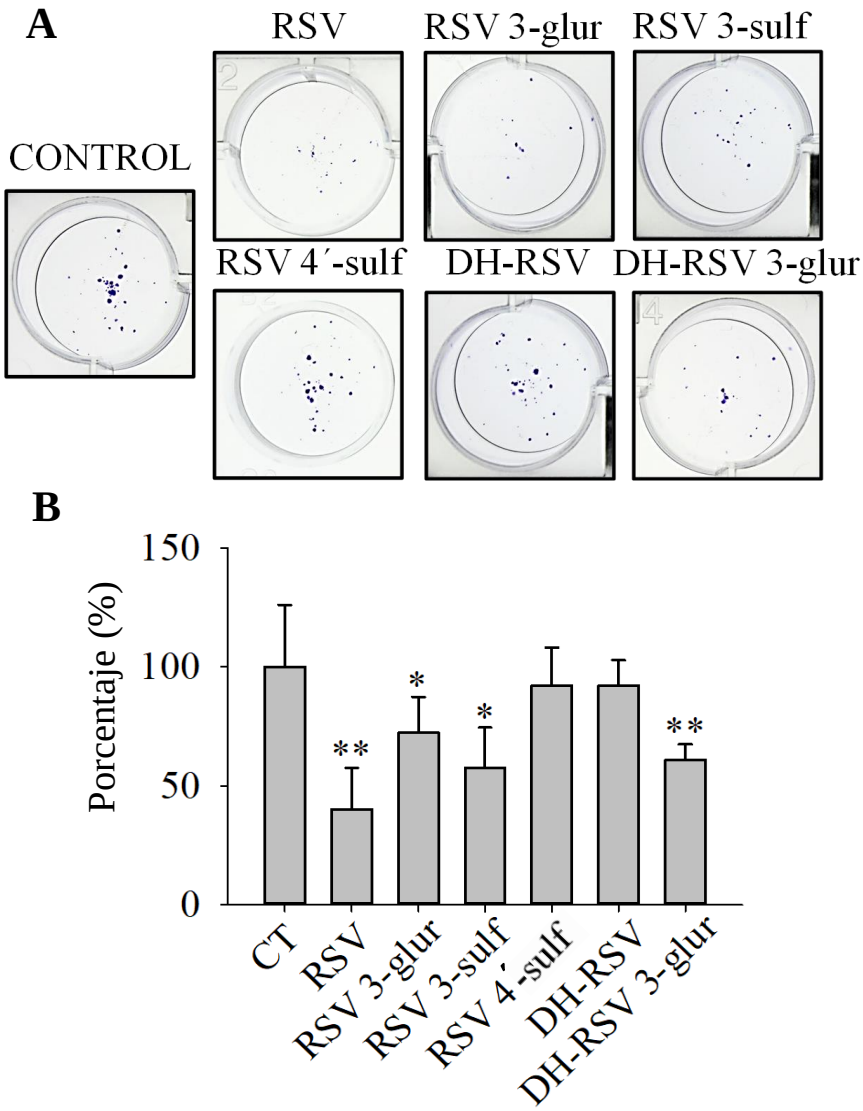


Figura 7.3. Efectos de RSV, DH-RSV y sus metabolitos de Fase-II en la formación de colonias de la línea tumoral MCF-7. **A**) Imágenes representativas de las placas de 12 pocillos de MCF-7 tratadas durante dos semanas con cada metabolito a 10 µM y el respectivo control (**CT**). **B**) Valores expresados como porcentaje de la media ± DE que hace referencia a la intensidad de las colonias formadas después de cada tratamiento, obtenidos mediante análisis de imagen. Los asteriscos muestran diferencias significativas respecto al CT (**P*<0,05; ***P*<0,01). Glur, (-*O*-glur), glucurónido; sulf, (-*O*-sulf), sulfato.

Como se observa en la **Figura 7.3** el metabolito que ejerció el mayor efecto en la reducción del tamaño y número de colonias fue RSV, reduciéndose un 59,9 ± 17,3% respecto al control (*P*<0,01) a la mayor concentración ensayada (10 µM). Debemos destacar que diferentes metabolitos conjugados de Fase-II de RSV a 10 µM redujeron de

forma significativa la formación de colonias en MCF-7, aunque fue menor que el efecto observado con RSV, siendo los porcentajes de reducción de 27,8 ± 15,1% (P<0,05) para RSV 3-glur y de 42,4 ± 16,9% (P<0,05) para RSV 3-sulf a la concentración de 10 µM (**Figura 7.3B**). Sin embargo, el conjugado RSV 4'-sulf no mostró efectos significativos (**Figura 7.3**).

Respecto al metabolito microbiano DH-RSV, su tratamiento no redujo la formación de colonias tras el tratamiento a 10 µM, pero es de destacar que su metabolito conjugado, DH-RSV 3-glur, a esta concentración, sí fue capaz de ejercer una reducción de un 39,1 ± 6,5% (P<0,01), respecto al control.

Además, los metabolitos conjugados de Fase-II, RSV 3-glur y DH-RSV 3-glur, a la concentración de 1 µM, siguieron ejerciendo efecto inhibitorio en la formación de colonias en la línea celular MCF-7 (**Figura 7.4**). Esta reducción estadísticamente significativa (P<0,05) fue de 33,1 ± 2,0% en el caso de RSV 3-glur y de 21,5 ± 10,9% para DH-RSV 3-glur, respecto al control. Se debe destacar también, que el tratamiento con DH-RSV a 1 µM ejerció una reducción significativa (P<0,05) de la formación de colonias de un 34,6 ± 24,6% respecto al control (**Figura 7.4B**), efecto que no se observó a 10 µM (**Figura 7.3B**).

Por último, no se observó disminución en la formación de colonias de MCF-7 tras la incubación con la concentración más baja ensayada de los tratamientos (0,5 µM) (resultados no mostrados).

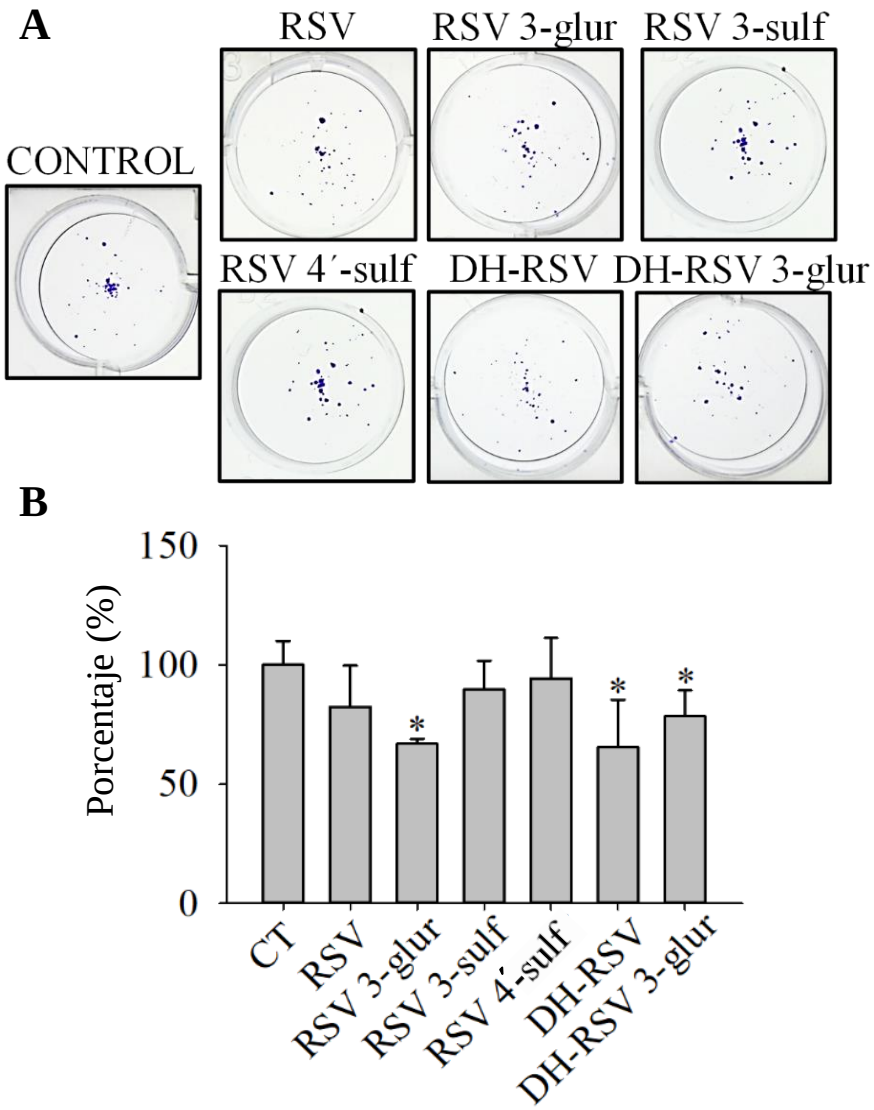


Figura 7.4. Efectos de RSV, DH-RSV y sus metabolitos de Fase-II en la formación de colonias de la línea tumoral MCF-7. **A**) Imágenes representativas de las placas de 12 pocillos de MCF-7 tratadas durante dos semanas con cada metabolito a 1 µM y el respectivo control (**CT**). **B**) Valores expresados como porcentaje de la media ± DE que hace referencia a la intensidad de las colonias formadas después de cada tratamiento, obtenidos mediante análisis de imagen. El asterisco muestra diferencias significativas respecto al CT (**P*<0,05). Glur, (-*O*-glur), glucurónido; sulf, (-*O*-sulf), sulfato.

3.2. Efectos de RSV y sus metabolitos derivados, en el ciclo celular e inducción de apoptosis en células tumorales de mama

Tras comprobar que los tratamientos con RSV o con sus metabolitos derivados (microbianos y conjugados de Fase-II) ejercían un efecto antiproliferativo a largo plazo, reduciendo la formación de colonias en MCF-7, el siguiente objetivo fue evaluar los

posibles mecanismos por los que se estaba produciendo este efecto. Además, y pese a que solo RSV a dosis de 10 µM redujo la formación de colonias en la línea MDA-MB-231, esta línea tumoral se utilizó en paralelo en los siguientes ensayos para poder comparar los resultados, motivado por las diferencias existentes entre ellas. Por el contrario, debido a que ningún tratamiento redujo la formación de colonias en la línea no tumoral MCF-10A, a ninguna de las concentraciones ensayadas no se utilizó para el resto de los ensayos llevados a cabo.

Así pues, la distribución del ciclo celular se evaluó con los distintos metabolitos a 10 µM para ver si alteraban alguna de las fases del ciclo celular a 3 y 5 días de incubación en ambas líneas tumorales.

El análisis del ciclo celular mostró que los tratamientos a 3 días no ejercían ninguna alteración en las distintas fases del ciclo celular en ninguna de las líneas celulares tumorales (**Figura 7.5**). Por el contrario, en el caso de la línea celular MCF-7, tras 5 días de tratamiento se observó un aumento significativo (6–14%, $P<0,05$) de las células en fase G_2/M acompañado de un descenso significativo ($P<0,05$) en las fases G_0/G_1 y/o S, dependiendo del metabolito ensayado (**Figura 7.6**).

Los resultados en la línea MCF-7 tras 5 días de tratamiento mostraron que RSV, seguido por DH-RSV, ejercieron un bloqueo en la fase G_2/M del ciclo celular, observándose un incremento del 14% y 10% ($P<0,05$) respecto al control, respectivamente (**Figura 7.6**). Por otra parte, cabe destacar que todos los metabolitos Fase-II de ambos compuestos (RSV y DH-RSV) también ejercieron bloqueo del ciclo celular en fase G_2/M tras 5 días de tratamiento, incrementando la distribución celular en esta fase entre un 6 y 8 % ($P<0,05$), respecto a la del control (**Figura 7.6**).

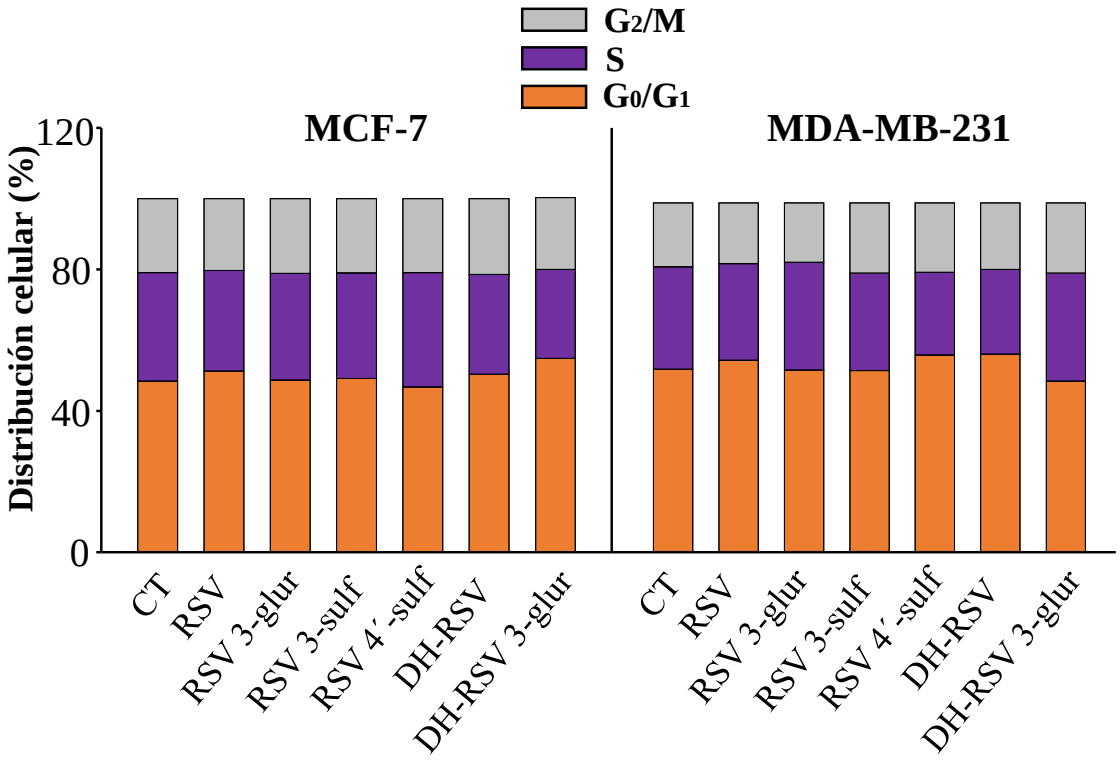


Figura 7.5. Distribución celular de MCF-7 y MDA-MB-231 en las distintas fases del ciclo celular tras los tratamientos a 10 µM de RSV, DH-RSV y sus metabolitos de Fase-II durante 3 días, además del respectivo control (**CT**). Glur, (-*O*-glur), glucurónido; sulf, (-*O*-sulf), sulfato.

Por el contrario, en la línea celular MDA-MB-231, tras 5 días de tratamiento, solamente RSV indujo bloqueo en fase G_2/M (10%) de forma significativa (P<0,05), acompañado de una reducción también estadísticamente significativa en la fase S (P<0,05) (**Figura 7.6**).

A continuación, una vez observado el efecto sobre el ciclo celular de los metabolitos tras 5 días de tratamiento en las células MCF-7, se quiso determinar si este efecto observado se acompañaba de muerte celular o apoptosis. Además, se evaluó en paralelo la línea MDA-MB-231.

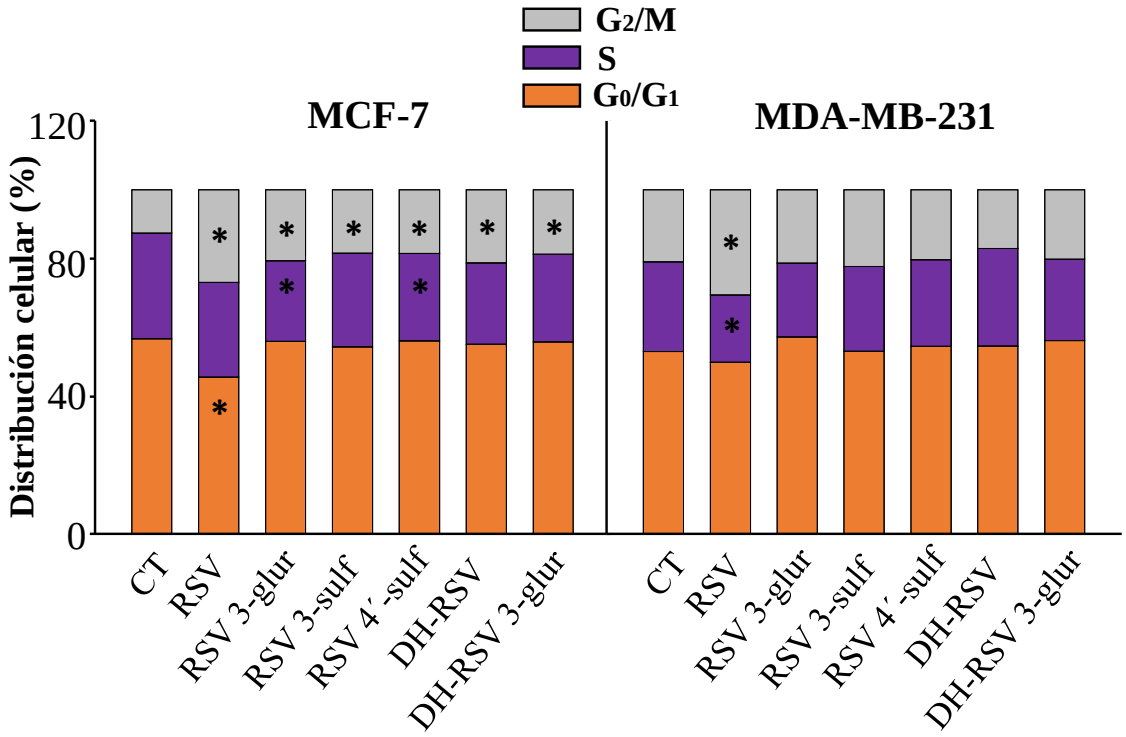


Figura 7.6. Distribución celular de MCF-7 y MDA-MB-231 en las distintas fases del ciclo celular tras los tratamientos a 10 µM de RSV, DH-RSV y sus metabolitos de Fase-II durante 5 días, además del respectivo control (**CT**). Los asteriscos muestran diferencias significativas respecto al CT (**P*<0,05). Glur, (-*O*-glur), glucurónido; sulf, (-*O*-sulf), sulfato.

En primer lugar, la evaluación de apoptosis se determinó mediante microscopía de fluorescencia realizando una tinción de células con el colorante Hoechst 33258. Tras esta tinción se observó el nulo efecto que ejercían los tratamientos en la inducción de apoptosis frente al control (resultados no mostrados). Esta ausencia de efecto se corroboró mediante citometría de flujo con el ensayo Anexina V/IP, que permite diferenciar entre células en un proceso de apoptosis temprana o tardía. Tal como se muestra en la **Figura 7.7**, ni RSV, ni DH-RSV, ni ninguno de sus metabolitos conjugados de Fase-II indujo apoptosis tras 5 días de tratamiento en ninguna de las líneas tumorales de mama.

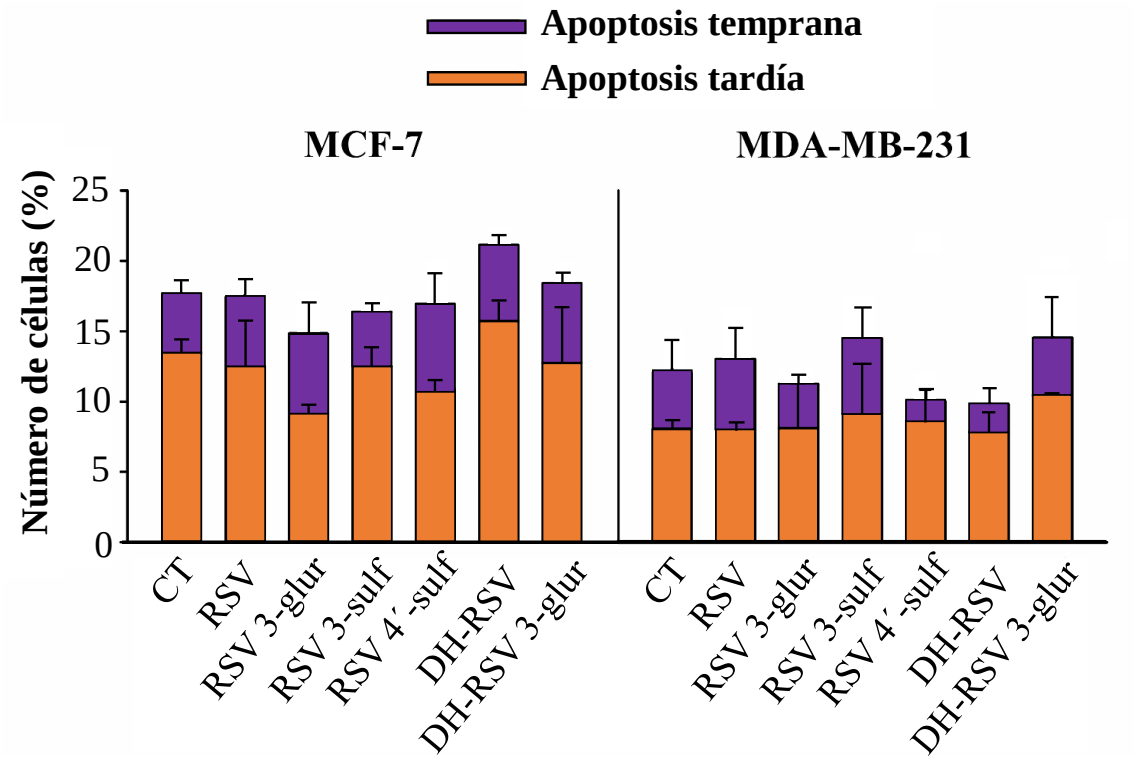


Figura 7.7. Evaluación de apoptosis temprana y tardía tras el tratamiento con 10 µM de RSV, DH-RSV y sus metabolitos de Fase-II, además del control (**CT**), durante 5 días en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. Glur, (-*O*-glur), glucurónido; sulf, (-*O*-sulf), sulfato.

3.3. Incremento de SA-β-Gal tras el tratamiento con RSV y sus metabolitos

A continuación, se evaluó si el efecto antiproliferativo a largo plazo observado podía estar mediado por senescencia celular. Para ello, se determinó SA-β-Gal mediante dos técnicas diferentes en las dos líneas tumorales tras los tratamientos a 10 µM de RSV, DH-RSV y sus metabolitos de Fase-II durante 5 días de incubación.

En primer lugar, SA-β-Gal se evaluó mediante microscopía óptica, con el ensayo X-gal. Con este ensayo, se pueden visualizar las células senescentes (teñidas de azul) frente a las no senescentes (no teñidas) (**Figura 7.8A**,**C**). De cada pocillo tratado se fotografiaron de 5 a 7 áreas diferentes. A continuación, las células teñidas o no, se cuantificaron con el software ImageJ con el que se evaluaba el total de células teñidas del

área fotografiada frente al total de células en esa área (100%). Los valores obtenidos se reflejan como los porcentajes de senescencia asociados a la actividad de la enzima β-galactosidasa en la **Figura 7.8B**,**D**.

La cuantificación de las imágenes mostró que ninguno de los tratamientos empleados producía un incremento de SA-β-Gal en la línea celular MDA-MB-231 (**Figura 7.8C**-**D**). Por el contrario, en la línea celular MCF-7 todos los tratamientos mostraron un incremento en SA-β-Gal respecto del control, aunque este incremento solo fue estadísticamente significativo (P<0,05) para RSV (3,6 veces superior), RSV 3-sulf (3 veces superior) y DH-RSV 3-glur (3,1 veces superior) (**Figura 7.8A**-**B**). Sin embargo, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, los tratamientos con RSV 3-glur, RSV 4'-sulf y DH-RSV incrementaron la SA-β-Gal respecto al control entre 1,8 y 2,2 veces (**Figura 7.8B**).

Por otro lado, el incremento de SA-β-Gal inducida por estos metabolitos a 10 μM también se evaluó mediante el ensayo de fluorescencia FDG. Con este ensayo, SA-β-Gal se determinó tras 1, 3 y 5 días, pudiendo identificar si la inducción de senescencia era tiempo-dependiente en el caso de la línea MCF-7. Sin embargo, debido a la ausencia de incremento en SA-β-Gal observada con el ensayo X-gal tras los tratamientos en las células MDA-MB-231, solo se evaluó tras 5 días de tratamiento, para comparar con lo observado en las células MCF-7.

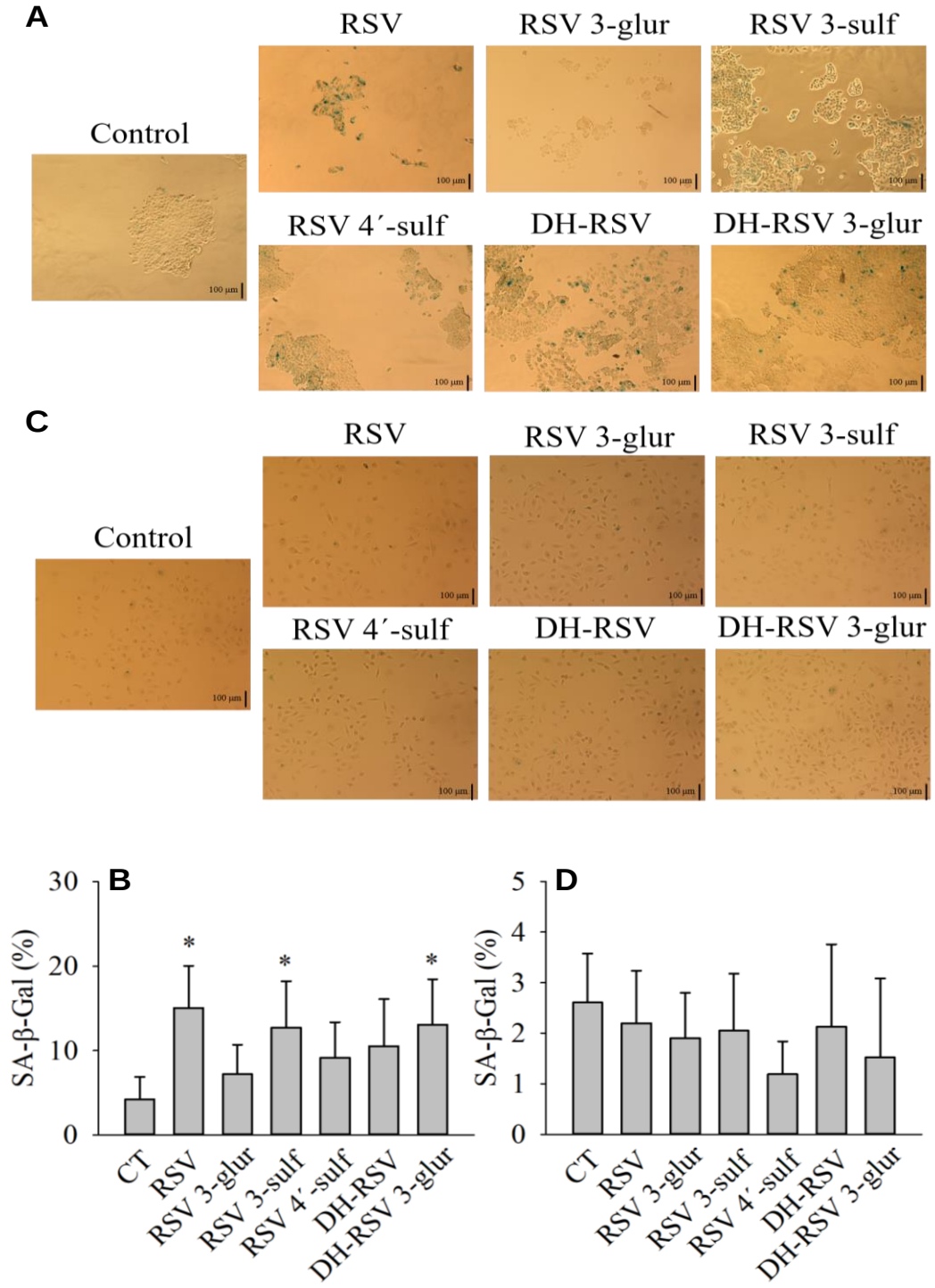


Figura 7.8. Inducción de senescencia asociada al incremento de β-galactosidasa en células tumorales medida con el ensayo X-gal, tras el tratamiento con 10 µM de RSV, DH-RSV y sus metabolitos de Fase-II, además del control (**CT**). Imágenes representativas que muestran las células senescentes (células teñidas en azul) con cada tratamiento en MCF-7 (**A**) y MDA-MB-231 (**C**). Las gráficas de barras muestran los valores de la media ± DE (en %) de SA-β-Gal en tres réplicas diferentes (y en cada una de ellas el valor medio de 5–7 imágenes) para MCF-7 (**B**) y MDA-MB-231 (**D**). Los asteriscos muestran diferencias significativas respecto al CT(**P*<0,05). Glur, (-*O*-glur), glucurónido; sulf, (-*O*-sulf), sulfato.

Como era de esperar, en la línea MDA-MB-231 no se vio ningún incremento de SA-β-Gal con los metabolitos ensayados respecto al control (resultados no mostrados). Por el contrario, sí se observaron efectos en la inducción SA-β-Gal en la línea celular MCF-7 con cada uno de los metabolitos respecto al control tras 1, 3 y 5 días de tratamiento, algunos de ellos de manera tiempo-dependiente, tal como se muestra en la **Figura 7.9**.

En general, la inducción de SA-β-Gal se observó de forma más acusada a los 5 días. El tratamiento con RSV mostró un incremento significativo (P<0,05) de SA-β-Gal a los 5 días de tratamiento (1,8 ± 0,4 veces superior), mientras que su glucurónido (RSV 3-glur), aunque también mostró un incremento a los 5 días, no fue estadísticamente significativo (**Figura 7.9B**). En el caso de los sulfatos, RSV 3-sulf mostró un incremento significativo (P<0,05) de 1,3 ± 0,3 veces superior respecto al control tras 5 días de tratamiento. En cambio, RSV 4'-sulf mostró un incremento significativo (P<0,05) a 3 y 5 días (1,4 ± 0,3 y 1,6 ± 0,4 veces superior, respectivamente).

Respecto al tratamiento con el metabolito microbiano DH-RSV, es destacable que a los 3 días de tratamiento SA-β-Gal mostró un incremento significativo (P<0,05) de 1,6 ± 0,1 veces superior respecto al control. Sin embargo, tras el tratamiento a 5 días, aunque se observó un incremento de la actividad enzimática, no llegó a ser estadísticamente significativo (**Figura 7.9E**). Por último, hay que resaltar que el conjugado de este metabolito (DH-RSV 3-glur) sí mostró incrementos significativos (P<0,05) de 1,6 ± 0,4 y 1,4 ± 0,3 respecto al control tras 3 y 5 días de tratamiento, respectivamente.

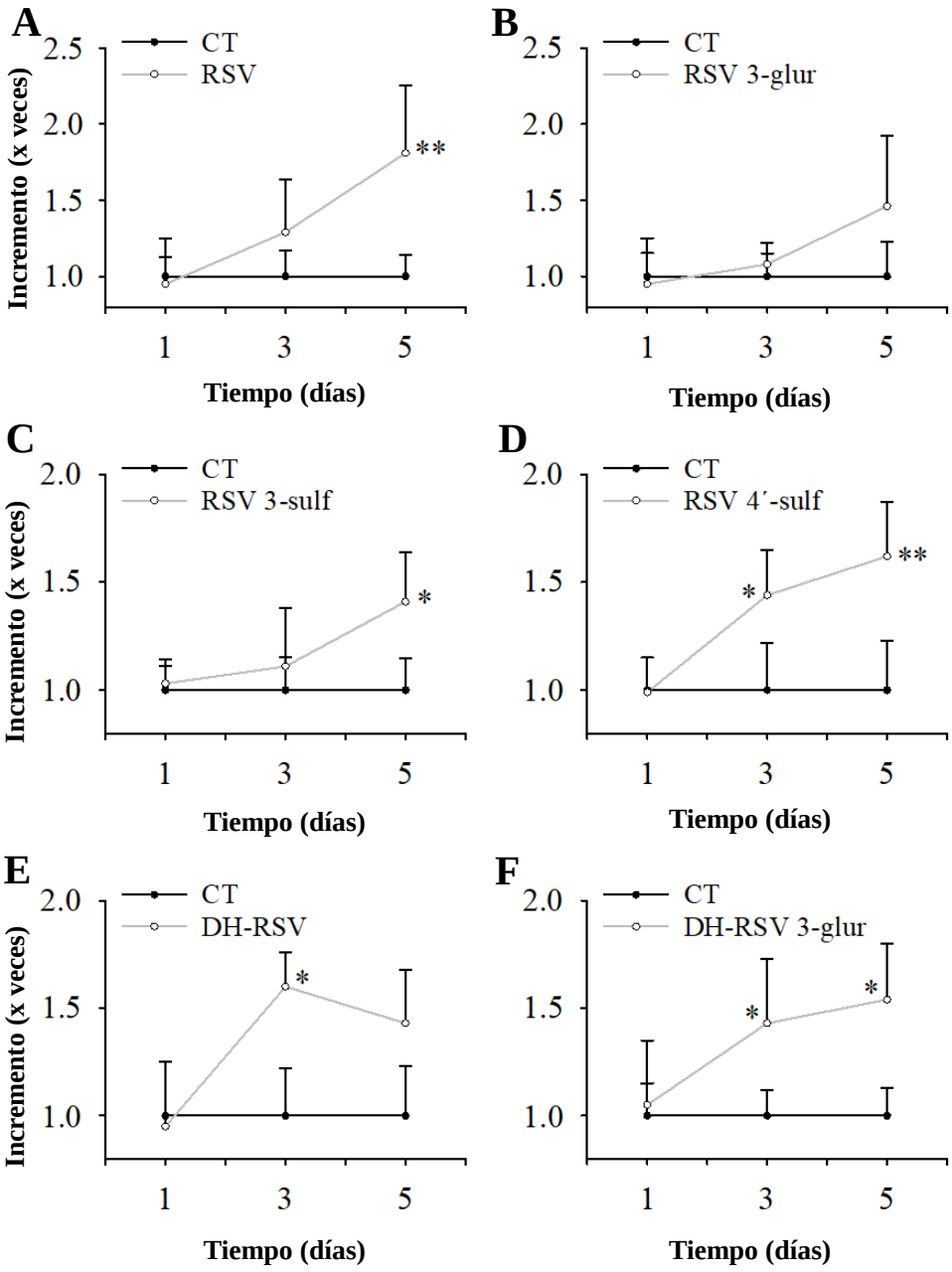


Figura 7.9. Inducción de senescencia asociada al incremento de β-galactosidasa (SA-β-Gal) en MCF-7 detectada con el ensayo FDG, tras el tratamiento con 10 µM de RSV, DH-RSV y sus metabolitos de Fase-II, además del respectivo control (**CT**) durante 1, 3 y 5 días. Los resultados se muestran como la media ± DE de los valores de fluorescencia normalizados con los valores de absorbancia medidos tras el cristal violeta de un total de 5 ensayos (n=5; 6 pocillos en cada réplica). El asterisco muestra diferencias significativas respecto al CT (**P*<0,05). Glur, (-*O*-glur), glucurónido; sulf, (-*O*-sulf), sulfato.

En definitiva, considerando todos estos resultados, el efecto inhibitorio sobre la formación de colonias tras los tratamientos con RSV, DH-RSV y sus metabolitos de Fase-

II a 10 µM observado en la línea celular MCF-7, es compatible con la inducción de senescencia celular.

3.4. Análisis de proteínas asociadas a senescencia celular

Basándonos en los resultados anteriores, el siguiente objetivo fue evaluar mecanismos moleculares que corroboraran la inducción de senescencia celular ejercida por RSV, DH-RSV y por sus metabolitos de Fase-II en la línea celular MCF-7. Para ello, tras el tratamiento durante 5 días con cada metabolito a 10 µM y en las dos líneas, MCF-7 y MDA-MB-231, se evaluaron mediante Western-Blot las proteínas p53, p21, p16 y Rb, las cuales han sido ampliamente descritas por su participación en dos rutas diferentes de señalización (p53/p21 y p16/Rb) que desencadenan la senescencia celular.

Tras el análisis mediante Western-Blot de estas proteínas en los lisados celulares de MCF-7, se observó un aumento de p53 tras el tratamiento con todos los metabolitos, a excepción de RSV 3-glur (**Figura 7.10A**). Los incrementos observados, cuantificados por densitometría, respecto al control fueron significativos (P<0,05) en el caso de RSV (2,3 ± 0,7 veces), de RSV 3-sulf (2,1 ± 0,9 veces) y RSV 4'-sulf (2,4 ± 0,8 veces). Sin embargo, aunque los tratamientos con DH-RSV y su conjugado DH-RSV 3-glur mostraron un incremento de p53, no llegó a ser estadísticamente significativo (**Figura 7.10A**). Por otro lado, el aumento de p53 se acompañó con un consecuente incremento de p21, el cual fue significativo (P<0,05) tras los tratamientos con RSV, RSV 3-sulf, RSV 4'-sulf, y DH-RSV (**Figura 7.10B**).

Respecto a la modulación de proteínas implicadas en la ruta de p16/Rb, también se observaron cambios tras los tratamientos en la línea MCF-7. Centrándonos en p16, su aumento fue estadísticamente significativo (P<0,05) tras tratamiento con RSV 3-glur (2,0 ± 0,6 veces), RSV 3-sulf (2,3 ± 0,3 veces) y RSV 4'-sulf (1,8 ± 0,3 veces) (**Figura 7.10C**).

Además, el incremento de p16 se acompañó de una reducción del estado de fosforilación de Rb, siendo esta reducción significativa (P<0,05) con RSV (0,6 ± 0,2 veces), RSV 3-sulf (0,2 ± 0,2 veces) y DH-RSV 3-glur (0,3 ± 0,2 veces) (**Figura 7.10D**). Como ya se ha comentado anteriormente, como comparativa también se evaluó el contenido celular de estas proteínas tras los tratamientos en la línea celular MDA-MB-231 (p53 mutada). Como era de esperar, en general no se observaron cambios en los marcadores analizados asociados con las diferentes rutas implicadas en la senescencia celular. Los resultados obtenidos con la línea celular MDA-MB-231 se pueden ver en la **Figura 7.11**.

En definitiva, se confirma que RSV, DH-RSV y los metabolitos de Fase-II de ambos, pueden inducir senescencia en las células de cáncer de mama MCF-7 (con p53 silvestre), dado su efecto en regulación de las rutas p53/p21 y p16/Rb, implicadas en senescencia celular.

3.5. Implicación de los transportadores ABC y de los receptores estrogénicos en la inducción de senescencia celular

Para evaluar la implicación de los transportadores ABC, así como de los receptores estrogénicos, se utilizó nuevamente el ensayo FDG para medir SA-β-Gal mediante fluorescencia.

En primer lugar, se determinó de manera individual que el tratamiento con los diferentes inhibidores de transportadores ABC (Cp, Ko y Prob) a 1 µM no afectara a la proliferación celular ni indujeran senescencia celular, para poder co-incubarlos con RSV y sus metabolitos. Los resultados indicaron que ninguno de los inhibidores afectó la proliferación celular ni indujo senescencia respecto a las células control (0,5% DMSO) (datos no mostrados).

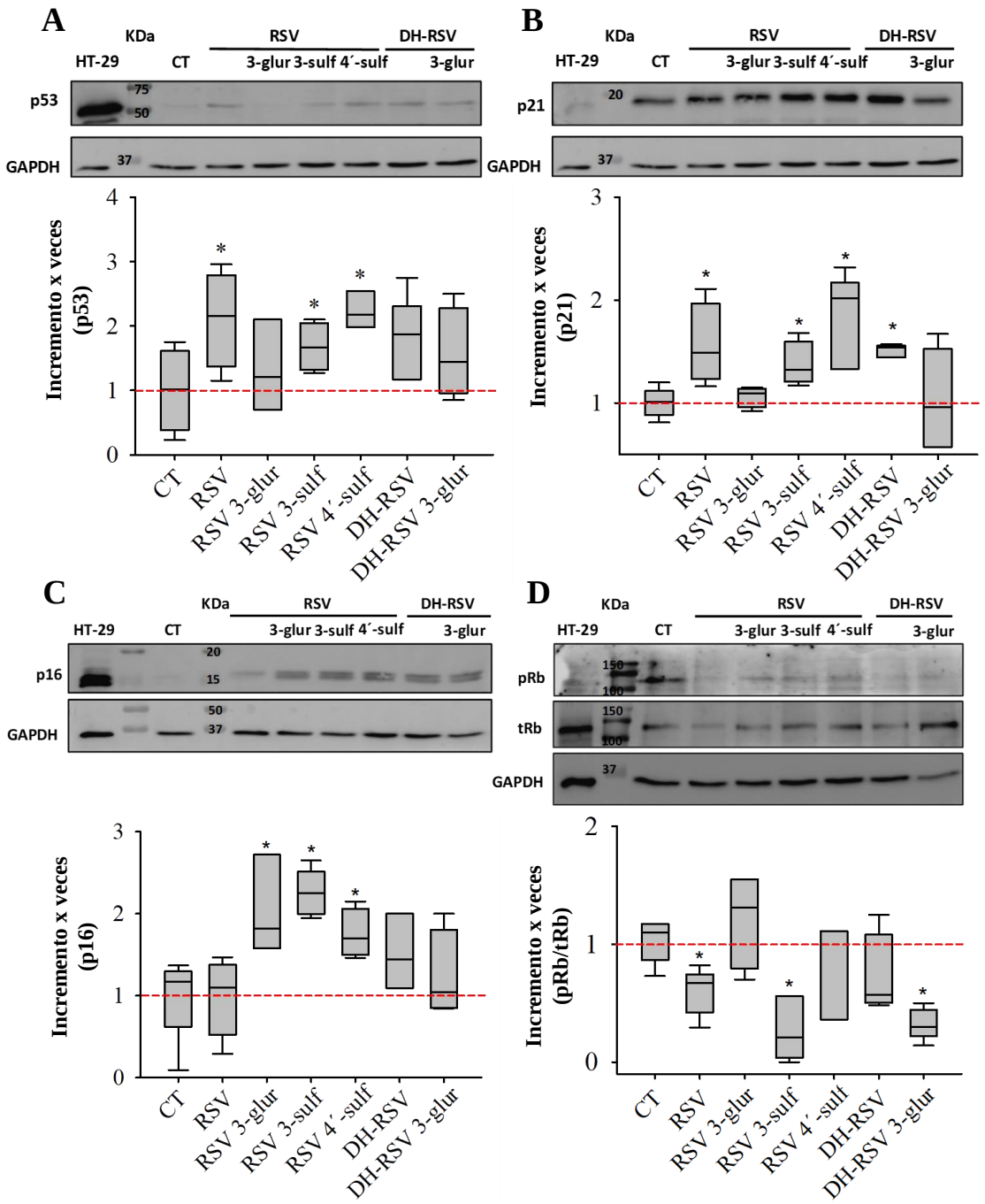


Figura 7.10. Análisis de p53 (**A**), p21 (**B**), p16 (**C**) y estado de fosforilación del retinoblastoma (pRb/tRb) (**D**) mediante Western-Blot en lisados celulares de la línea celular MCF-7 tras 5 días de tratamiento. Como control positivo se usó lisado proteico de la línea celular HT-29. En cada membrana se analizó el contenido de GAPDH para verificar la carga de proteína y normalizar los valores. Cada diagrama de cajas muestra los valores entre el percentil 25-75 y la mediana se muestra como la línea negra en el interior de cada caja. Cada ensayo se realizó 3-4 veces. El asterisco muestra diferencias significativas respecto al control (**CT**) (**P*<0,05). Glur, (-*O*-glur), glucurónido; sulf, (-*O*-sulf), sulfato.

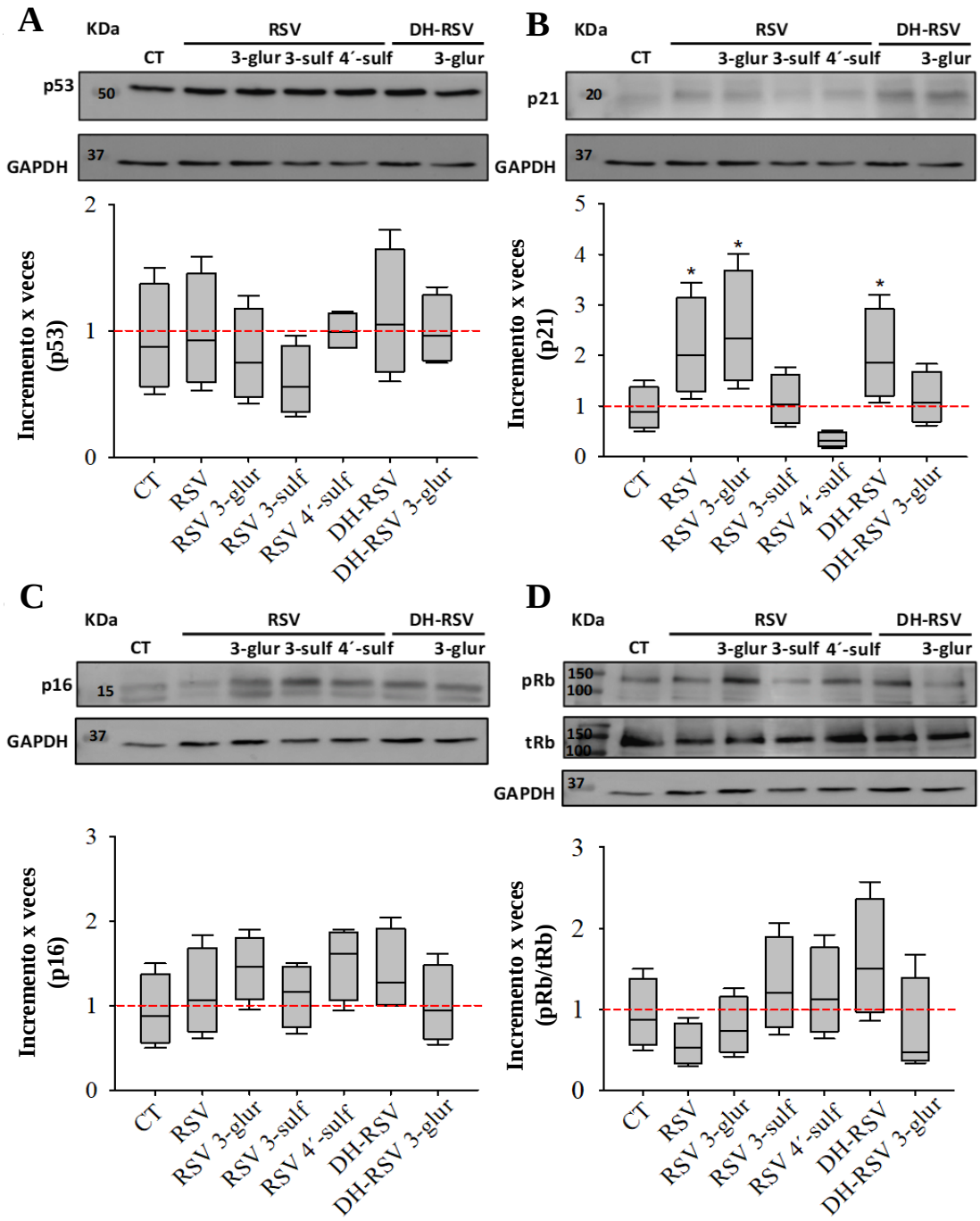


Figura 7.11. Análisis de p53 (**A**), p21 (**B**), p16 (**C**) y estado de fosforilación del retinoblastoma (pRb/tRb) (**D**) mediante Western-Blot en lisados celulares de la línea celular MDA-MB-231 tras 5 días con los distintos tratamientos. Como control positivo se usó lisado proteico de la línea celular HT-29. En cada membrana se analizó el contenido de GAPDH para verificar la carga de proteína y normalizar los valores. Cada diagrama de cajas muestra los valores entre el percentil 25-75 y la mediana se muestra como la línea negra en el interior de cada caja. Cada ensayo se realizó 3-4 veces. El asterisco muestra diferencias significativas respecto al control (**CT**) (**P*<0,05). Glur, (-*O*-glur), glucurónido; sulf, (-*O*-sulf), sulfato.

Una vez comprobada la ausencia de inducción de senescencia por parte de los inhibidores-ABC de manera individual, estos se co-incubaron con cada uno de los metabolitos ensayados en el estudio (RSV, DH-RSV y sus conjugados Fase-II), así como también de la mezcla representativa de conjugados de Fase-II ("MIX") detallada en el **apartado 2.2** de este capítulo. La **Figura 7.12** muestra que la co-incubación tanto de RSV como de sus metabolitos con cada inhibidor específico inhibía la inducción de la senescencia celular que ejercen los tratamientos de manera individual tras 5 días de tratamiento. Estos datos sugieren que los transportadores ABC podrían desempeñar un papel esencial en el transporte de RSV y sus metabolitos derivados al interior celular y así, desencadenar la senescencia. Por otro lado, al igual que la posible implicación de los transportadores ABC, se evaluó si la interacción de RSV y sus metabolitos con RE estaban implicados en la inducción de senescencia celular en MCF-7.

De nuevo, primero se evaluó si el antagonista del RE fulvestrant (Fulv) a 0,1 µM afectaba la proliferación celular o inducía senescencia por sí solo. Los resultados del tratamiento con Fulv a 0,1 µM mostraron una gran reducción de la proliferación celular respecto del control, pero no inducción de senescencia (resultados no mostrados). Respecto a las co-incubaciones de Fulv con cada metabolito de RSV, mostraron que la inducción de senescencia tras 5 días de tratamiento con RSV o con sus metabolitos más 0,1 µM de Fulv, no se veía afectada en ningún caso (**Figura 7.12**). Esto sugiere, que el RE no está implicado en el desencadenamiento de la inducción de senescencia en MCF-7 por RSV y sus metabolitos.

Por último, es importante destacar que el tratamiento con la mezcla representativa de metabolitos conjugados de Fase-II de RSV ("MIX"), que recrea lo observado en TTM humano, no ejerció un incremento en la inducción de SA-β-Gal tras 5 días de tratamiento en MCF-7. Además, este "MIX" tampoco indujo senescencia cuando se co-incubó con

los diferentes inhibidores de transportadores ABC, ni con el antagonista de RE (**Figura 7.12G**).

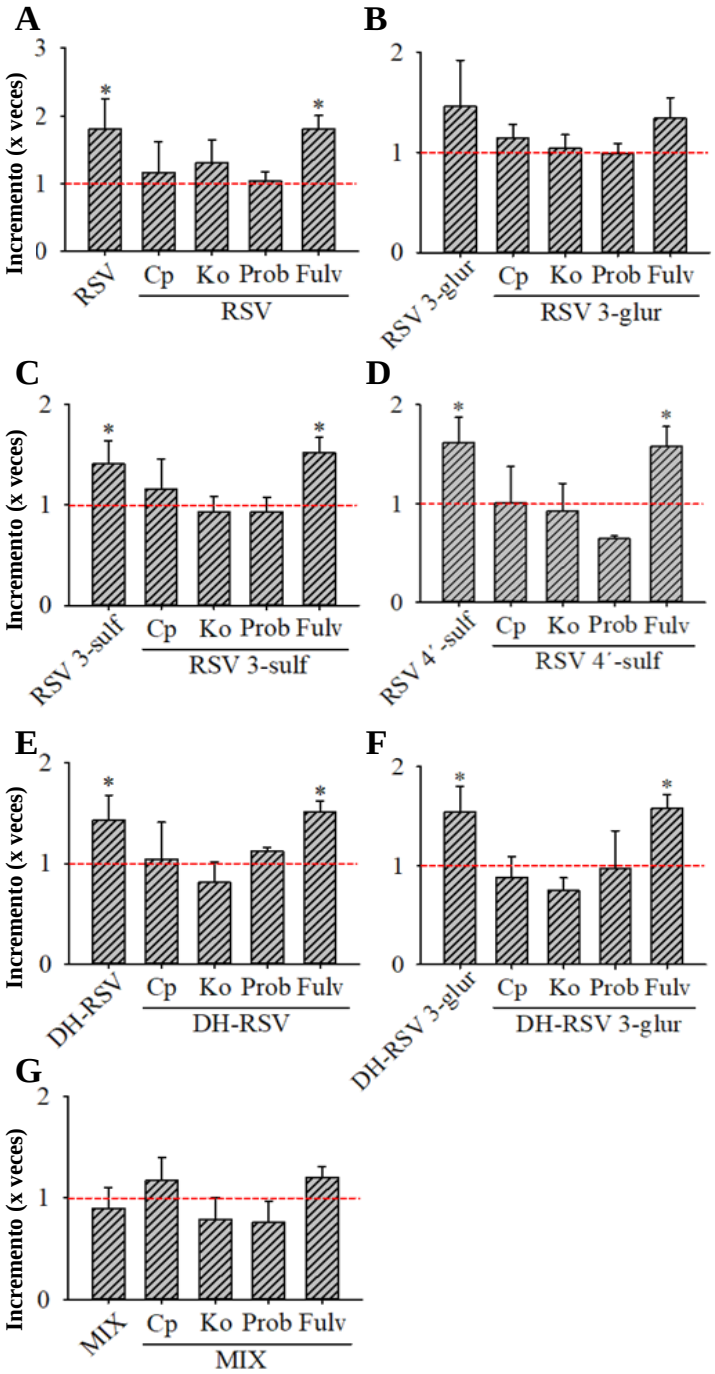


Figura 7.12. Inducción de SA-β-Gal en MCF-7 detectada con el ensayo FDG, tras el tratamiento con 10 µM de RSV, DH-RSV, sus conjugados de Fase-II, y con un "MIX" de estos conjugados de forma individual y co-incubados con el antagonista del receptor de estrógenos (Fulv a 0,1 µM) o con los inhibidores de los transportadores ABC (Cp, Ko o Prob a 1 µM). Las gráficas representan la media ± DE de un total de 3 réplicas (n=3; 6 pocillos por cada réplica). El asterisco muestra diferencias significativas respecto al control (**CT**) (*P<0,05). Glur, (-*O*-glur), glucurónido; sulf, (-*O*-sulf), sulfato.

3.6. Estabilidad y metabolismo de RSV, DH-RSV, y sus metabolitos conjugados de Fase-II por MCF-7

En primer lugar, se determinó la estabilidad de todos los compuestos mediante el análisis por UPLC-ESI-QTOF-MS de los correspondientes medios de cultivo (en ausencia de células) incubados con los diferentes tratamientos durante 5 días, confirmando que todos los compuestos eran estables a 37 ºC durante este periodo de incubación.

Respecto al metabolismo de estos metabolitos, previamente en el **Capítulo 6**, se ha descrito que la línea celular MCF-7 es capaz de metabolizar las formas libres de compuestos fenólicos (entre los que se encontraban RSV y DH-RSV) mediante metabolismo de Fase-II, principalmente por sulfatación. Este hecho se había descrito a 3 días, por lo que en el presente este estudio se evaluó hasta los 5 días de incubación a 10 µM, tal como se muestra en la **Figura 7.13**.

Los resultados del análisis cromatográfico reflejan cómo los metabolitos conjugados de Fase-II no sufrieron desconjugación ni degradación tras 5 días de incubación con las células MCF-7. En cambio, y como era de esperar, las formas libres de RSV y del metabolito microbiano DH-RSV se metabolizaron principalmente vía sulfatación. Este metabolismo supuso que a los 5 días de tratamiento quedara un 35% de forma libre de RSV (**pico 6**, **Figura 7.13**) y en torno a un 10% de forma libre de DH-RSV (**pico 7**, **Figura 7.13**).

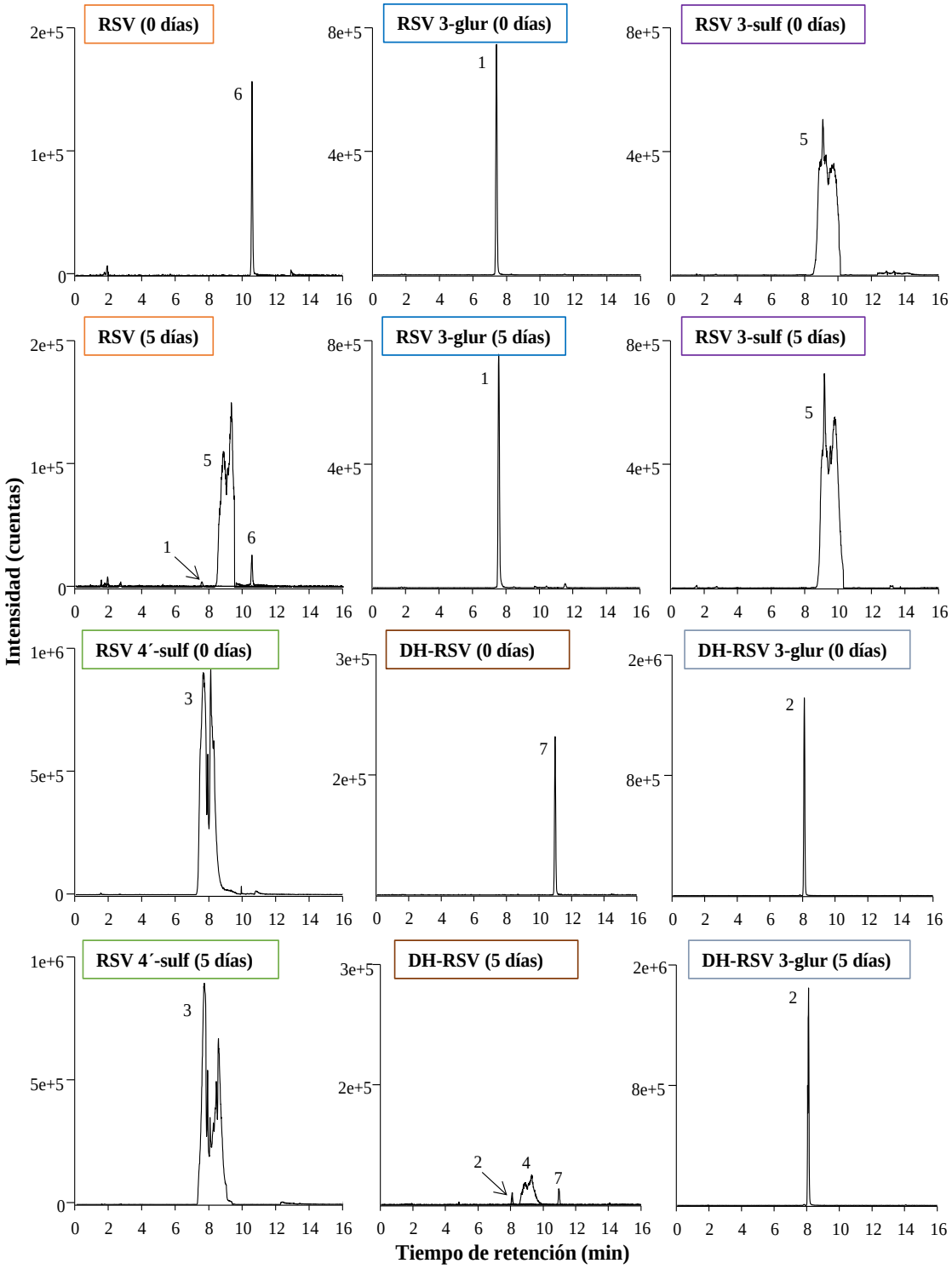


Figura 7.13. **EICs** en medio celular de la línea celular MCF-7 tras incubar con las formas libres de RSV, DH-RSV y sus metabolitos conjugados de Fase-II durante 0 y 5 días. Picos cromatográficos: **1**, RSV 3-glur; **2**, DH-RSV 3-glur; **3,** RSV 4'-sulf; **4**, DH-RSV sulf; **5**, RSV 3-sulf; **6,** RSV y **7**, DH-RSV. Glur, (-*O*-glur), glucurónido; sulf, (-*O*-sulf), sulfato.

4. DISCUSIÓN

La quimioprevención se define como el uso de agentes farmacológicos o naturales para detener la progresión y/o desarrollo de un cáncer antes de que sea invasivo o produzca metástasis (Mukhtar y Ahmad, 1999). En este sentido, RSV es un compuesto natural al que se le han atribuido numerosas actividades biológicas, entre las que se encuentra su actividad como quimiopreventivo frente al cáncer de mama. Sin embargo, todas estas actividades biológicas tienen una evidencia escasamente extrapolable a nivel clínico. Esto es debido a que, a día de hoy, el potencial beneficio de RSV sobre la salud se basa en estudios preclínicos, principalmente *in vitro* y en menor medida estudios animales, los cuales no han tenido en cuenta la biodisponibilidad de RSV, su metabolismo y/o su transformación en el organismo por parte de la microbiota intestinal. Así, se han ensayado *in vitro* concentraciones y/o formas moleculares de RSV sin ningún tipo de relevancia clínica. Además, en muchos de estos estudios preclínicos, la metodología empleada en las condiciones de ensayo ha sido poco adecuada (tiempos de exposición, modelo inapropiado, etc.).

En este contexto y en relación con el cáncer de mama, como se ha demostrado en la presente Tesis Doctoral, los metabolitos derivados del consumo de RSV que realmente llegan al TTM humano son conjugados de Fase-II, principalmente glucurónidos y sulfatos (**Capítulo 4**), pudiendo incluso detectarse concentraciones en tejido mamario dentro del rango micromolar a tiempos más cortos tras su consumo (**Capítulo 5**). Desafortunadamente, como también se ha descrito en esta Tesis Doctoral, el metabolismo de Fase-II de los conjugados de RSV limita su actividad quimiopreventiva a corto plazo en modelos celulares de cáncer de mama (**Capítulo 6**), de acuerdo con lo descrito previamente para estos conjugados en otros modelos celulares, como por ejemplo, en células de cáncer de colon (Aires et al., 2013).

Sin embargo, antes de descartar el papel quimiopreventivo de compuestos fenólicos de la dieta, en este caso concreto de RSV, se deben reconsiderar los posibles mecanismos de acción, usando diferentes condiciones de ensayo. Así, la combinación de estudios *in vitro* a corto y largo plazo permite determinar tanto las concentraciones adecuadas como el tiempo necesario para observar posibles actividades biológicas que pudieran tener extrapolación *in vivo*.

Por tanto, considerando todo lo anterior, aquí se evaluó por primera vez el posible efecto quimiopreventivo de conjugados de RSV que alcanzan el TTM, a tiempos largos de exposición (hasta dos semanas), en células tumorales de mama (pues no se habían observado efectos antiproliferativos a corto plazo). Este efecto se evaluó mediante el ensayo de clonogenicidad en distintas líneas celulares tratadas con diferentes dosis de RSV, su metabolito microbiano DH-RSV y los conjugados Fase-II de ambos (RSV 3-glur, RSV 3-sulf, RSV 4'-sulf y DH-RSV 3-glur).

Los resultados obtenidos para el tratamiento con RSV estuvieron de acuerdo con la capacidad de RSV para reducir la formación de colonias en MCF-7 y MDA-MB-231 descrita previamente (Rai et al., 2016). Sin embargo, la novedad de este estudio fue identificar que diferentes metabolitos conjugados de Fase-II de RSV (RSV 3-glur, RSV 3-sulf y DH-RSV 3-glur), fisiológicamente relevantes en TTM, son capaces de reducir la formación de colonias en la línea tumoral de mama MCF-7 a concentraciones entre 10 y 1 µM. Por tanto, estos resultados sugieren un potencial efecto quimiopreventivo a largo plazo del RSV frente al cáncer de mama. Además, los resultados muestran que este efecto quimiopreventivo podría ser dependiente del tipo de cáncer, dadas las diferencias observadas entre las líneas tumorales de mama empleadas (MDA-MB-231 y MCF-7). A esto hay que añadir la ausencia de efecto citotóxico observado en la línea no tumoral de mama (MCF-10A), utilizada en el presente estudio.

La senescencia celular es considerada como un mecanismo de defensa frente al cáncer, ya que en un estado de senescencia las células dejan de dividirse de manera irreversible y por tanto su proliferación se limita. Este mecanismo puede ser inducido en las células por diferentes estímulos de estrés o por distintos agentes, iniciándose a nivel celular fenómenos de disfunción telomérica, daño en el ADN o activación de oncogenes (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007; Nardella et al., 2011).

En este estudio, se ha identificado mediante diferentes ensayos que el efecto antiproliferativo (observado en el ensayo de clonogenicidad) ejercido por RSV y sus metabolitos en la línea celular MCF-7 está mediado por senescencia celular. Esto se apoya en que los metabolitos ejercieron bloqueo del ciclo celular en fase G_2/M, pero no inducción de apoptosis, tras 5 días de tratamiento.

Siguiendo con la senescencia, se ha descrito que no todas las células senescentes presentan unas mismas características, y estas pueden depender de cada línea celular en particular. No obstante, la inmensa mayoría de células senescentes presentan una característica fenotípica muy relevante que es el incremento de la actividad β-galactosidasa. Así, la medida de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia celular (SA-β-Gal) se considera un marcador clave y es ampliamente utilizado en ensayos *in vitro* para evaluar senescencia (Price et al., 2002; Matthews et al., 2006).

En este estudio, SA-β-Gal se ha evaluado mediante dos ensayos, un ensayo citoquímico y otro de fluorescencia, para minimizar las posibles limitaciones de cada técnica en los resultados, incrementando por tanto la fiabilidad de los mismos.

Además de la actividad anticlonogénica de RSV en células MCF-7 descrita en estudios previos (Rai et al., 2016; Gao y Tollefsbol, 2018), los resultados del presente estudio también concuerdan con los efectos pro-senescentes de RSV reportados en otros estudios (Heiss et al., 2007; Filippi-Chiela et al., 2013; Ji et al., 2018), aunque las dosis empleadas

en estos otros estudios fueron superiores de hasta 100 µM. Desafortunadamente, en estos estudios no se evaluaron los efectos de los metabolitos conjugados de Fase-II de RSV, ni tampoco de sus derivados microbianos DH-RSV y DH-RSV 3-glur.

Como se apuntaba en los resultados del capítulo anterior (**Capítulo 6**), la línea celular MCF-7 es capaz de metabolizar las formas libres de RSV y DH-RSV a conjugados de Fase-II, frente a la nula capacidad que tiene de hacerlo la línea celular MDA-MB-231. Por tanto, el metabolismo de la línea MCF-7 apoya el efecto de los conjugados sobre la inducción de senescencia. Además, en el presente estudio, tanto la estabilidad como el metabolismo tras 5 días de incubación se ha evaluado mediante UPLC-ESI-QTOF-MS, mostrándose que tras este tiempo no existía desconjugación de ningún metabolito Fase-II de RSV (hasta ahora descrito a 3 días, **Capítulo 6**), reiterando que la actividad observada corresponde a los metabolitos conjugados.

Respecto a la caracterización molecular de marcadores relacionados con la senescencia, en el presente estudio se han evaluado cuatro marcadores claves, p53, p21, p16 y el estado de fosforilación del retinoblastoma (pRb/tRb). Todos ellos se encuentran ampliamente descritos como marcadores moleculares relacionados con la senescencia celular, cuyos cambios en su expresión dan como resultado un bloqueo irreversible del ciclo celular, acompañado de cambios morfológicos y funcionales en las células (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007; van Deursen et al., 2014; Mária y Ingrid, 2017).

Debemos señalar la mayor sensibilidad a los tratamientos con RSV y sus metabolitos Fase-II en la línea celular MCF-7 (genotipo silvestre p53) frente a lo observado en la línea celular MDA-MB-231 (genotipo mutado p53). Esta diferencia de sensibilidad entre ambas líneas concuerda con lo descrito para otros fenólicos como el caso de la diosmina, que se ha descrito que ejercía senescencia en MCF-7 con un concomitante incremento de p53, mientras que no ejercía efecto en MDA-MB-231 (Lewinska et al., 2017).

Los resultados del presente estudio apoyan el efecto de RSV y sus metabolitos sobre la proteína supresora de tumores p53, implicada en una de las rutas de inducción a senescencia celular. Este hecho se hace evidente al observar: 1) inducción de senescencia celular por parte del RSV y sus metabolitos en MCF-7 a 10 µM acompañada de aumento de p53; 2) RSV 3-glur no indujo senescencia celular en MCF-7 a 10 µM pero tampoco tuvo efectos en la regulación de p53 y 3) ausencia de inducción de senescencia por parte de RSV y sus metabolitos en MDA-MB-231 a 10 µM sin aumentar tampoco p53.

Otro de los marcadores moleculares analizados en este estudio ha sido p21, ampliamente descrito también por ser una proteína inhibidora de quinasas dependientes de ciclinas. Además, está bien establecido el hecho de que una activación de p53 estimula la transcripción de p21, promoviendo la senescencia celular (Rayess et al., 2012). En este sentido, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran un incremento de p21 con todos los tratamientos que activaron p53 en la línea celular MCF-7. Sin embargo, hay que indicar que la proteína p21 también puede aumentar sin la necesidad de p53 (Han et al., 2012), lo cual puede explicar el aumento de p21 en la línea MDA-MB-231 con RSV, RSV 3-glur y DH-RSV, sin observarse cambios en p53.

Otra ruta involucrada en la senescencia celular es la ruta p16/Rb, donde la proteína p16 desencadena una reducción del estado de fosforilación del Rb, promoviendo la senescencia celular (Ben-Porath y Weinberg, 2005). Respecto a los resultados obtenidos tras el análisis de los marcadores de esta ruta, el tratamiento de RSV 3-sulf, RSV 4'-sulf y RSV 3-glur activaron p16 en MCF-7. Sin embargo, la reducción de fosforilación de Rb solo se observó de manera significativa (P<0,05) con la forma libre de RSV, RSV 3-sulf y DH-RSV 3-glur.

En definitiva, los resultados obtenidos sobre estos marcadores están de acuerdo con en estudios *in vitro* previos que han descrito que RSV incrementa p53, p21 y/o p16,

relacionadas con bloqueo del ciclo celular, apoptosis y/o senescencia en diferentes células tumorales (Heiss et al., 2007; Luo et al., 2013; Gire y Dulic, 2015; Ji et al., 2018). Sin embargo, aunque la actividad de RSV en forma libre está descrita ampliamente en la literatura sobre diferentes líneas tumorales, el efecto de sus metabolitos es mucho más escaso. Podemos destacar un único estudio en el que describieron que los tratamientos con RSV 3-sulf y RSV 4'-sulf a dosis de 75 μM en la línea de cáncer de colon HT-29, y no en células colónicas no tumorales, inducían senescencia celular mostrando un incremento de p21 y de SA-β-Gal (Patel et al., 2013). Por tanto, este estudio, aunque fue realizado en un modelo de cáncer de colon, apoyaría los resultados obtenidos en el presente estudio frente a células tumorales de mama.

También hay que añadir el papel de los transportadores ABC en la inducción de senescencia celular. Estos transportadores son proteínas de membrana que se encargan de incorporar sustancias de distinta índole al interior celular. Tras realizar co-incubaciones con los tratamientos y tres inhibidores de diferentes transportadores (Cp, Ko y Prob), se inhibió la inducción de senescencia que ejercían los tratamientos en ausencia de inhibidores. Por tanto, esto sugiere que RSV y sus metabolitos necesitan ser transportados al interior de la célula, mediante los transportadores ABC, para poder desencadenar la senescencia celular.

Por otro lado, es importante destacar la ausencia de inducción de senescencia tras el tratamiento de una mezcla representativa de conjugados Fase-II de RSV ("MIX") que pueden detectarse en TTM humano. La ausencia de efecto por parte del "MIX" se observó al ensayarlo tanto de manera individual como co-incubando con los diferentes inhibidores de transportadores ABC. Este hecho podría explicarse por un fenómeno de competencia por los transportadores entre los diferentes metabolitos, lo que podría jugar un papel fundamental en el contexto de uno de los mecanismos más ampliamente descritos en la

resistencia de fármacos en cáncer de mama, como es la sobreexpresión de transportadores ABC que incrementa el eflujo de los fármacos (Doyle et al., 1998). En este sentido, además del potencial efecto quimiopreventivo mediante la inducción de senescencia que hemos descrito para los metabolitos conjugados de RSV, cabe destacar su capacidad para unirse con transportadores ABC, lo que podría ayudar a minimizar la quimiorresistencia en células de cáncer de mama a diferentes drogas. Obviamente, se trata de una hipótesis y serían necesarios más estudios para poder confirmarla.

Para finalizar, se puede afirmar que se ha descrito por primera vez una actividad quimiopreventiva mediante inducción de senescencia en células de cáncer de mama tras el tratamiento con metabolitos de RSV fisiológicamente relevantes en TTM humano. Esta actividad quimiopreventiva está justificada al constatar: 1) la reducción de la proliferación celular tras el tratamiento con RSV y sus metabolitos a tiempos largos de exposición; 2) RSV y sus metabolitos inducen senescencia en células tumorales de mama, pero no en células no tumorales, de una manera tanto dosis- como tiempo-dependiente; 3) estos metabolitos han demostrado bloquear el ciclo celular en la fase G_2/M, pero sin inducir apoptosis; 4) RSV y sus metabolitos regulan la ruta (dependiendo del metabolito) p53/p21 y en menor medida p16/Rb, ambas rutas relacionadas con la senescencia celular; y 5) mientras que RSV y sus metabolitos no necesitan de receptores estrogénicos para inducir senescencia celular, sí requieren de transportadores ABC para entrar en la célula e inducir dicha senescencia.

En definitiva, nuestros resultados, junto con otros descritos previamente en animales, apoyan que el consumo habitual de RSV podría ejercer una actividad quimiopreventiva frente al cáncer de mama, lo que sirve de hipótesis sólida para la realización de estudios clínicos.

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

La incidencia creciente de las ENT observada en las últimas décadas acarrea un grave problema de salud entre la población, además de suponer un enorme impacto social y económico a nivel mundial ("*Institute for Health Metrics and Evaluation*" (IHME), 2018). En este sentido, la OMS establece que la vigilancia de las ENT y la intervención temprana sobre sus factores de riesgo son una estrategia clave para prevenir y controlar estas enfermedades (OMS, 2013). Entre las ENT, el cáncer ha sufrido un incremento preocupante en su incidencia, pasando de 14,1 millones de nuevos casos en 2012 (Ferlay et al., 2015) a 18,1 millones de nuevos casos en 2018 (Bray et al., 2018). Aunque el incremento en la incidencia viene en gran parte derivado por la mejora en los programas preventivos y los métodos diagnósticos, también ha repercutido en un aumento de la mortalidad a nivel mundial, pasando de 8,2 millones de muertes anuales en 2012 (Ferlay et al., 2015) a 9,6 millones en 2018 (Bray et al., 2018). Si bien es cierto que los países desarrollados pueden cuadruplicar la incidencia de cáncer frente a los no desarrollados, la mortandad es parecida o incluso superior (como en el caso concreto del cáncer de mama), por lo que el cáncer mata mucho más en los países pobres (Bray et al., 2018).

Entre estas cifras alarmantes, el cáncer de mama se sitúa como el cáncer más diagnosticado entre mujeres de todo el mundo y la primera causa de mortalidad por cáncer en mujeres a nivel mundial (Bray et al., 2018).

El cáncer de mama es una patología compleja y heterogénea cuya aparición puede deberse a distintas causas incluyendo tanto factores modificables como hereditarios. Sin embargo, los casos de cáncer de mama hereditarios representan entre un 10-15% del total, lo cual implica que la gran mayoría se debe a factores de riesgo que pueden modificarse (Campeau et al., 2008).

DISCUSIÓN GENERAL

Como se ha comentado en el **Capítulo 1**, la principal estrategia para el tratamiento de ENT, como es el cáncer de mama, es su prevención. Así pues, mantener unos hábitos dietéticos saludables se considera como una norma esencial para la prevención del cáncer ya que, entre un 30-35% del total de casos de cáncer diagnosticados podrían evitarse con unos hábitos alimentarios adecuados, entre los que se encuentran un incremento en el consumo de frutas y verduras (Irigaray et al., 2007; Catsburg et al., 2015; Li et al., 2017).

En este sentido, durante los últimos años, la evidencia obtenida de meta-análisis, estudios observacionales y epidemiológicos sugiere que el consumo de alimentos vegetales por su contenido en compuestos fenólicos tiene un potencial efecto quimiopreventivo frente al cáncer de mama (Farvid et al., 2016; Rothwell et al., 2017; Grosso et al., 2017). Sin embargo, aunque en numerosos estudios preclínicos los compuestos fenólicos han demostrado tener un amplio abanico de mecanismos de acción que explicarían su papel protector frente al cáncer de mama (Pan et al., 2015; Losada-Echeberría et al., 2017), la evidencia en humanos resulta todavía escasa y controvertida.

En general, esta falta de evidencia se debe fundamentalmente a la falta de estudios clínicos que relacionen los posibles efectos beneficiosos de los compuestos fenólicos frente al cáncer de mama. A esto se suma que son escasos aquellos estudios preclínicos que utilizan una metodología y condiciones fisiológicas adecuadas que permitan extrapolar sus resultados a un contexto clínico. Otro factor crucial a considerar sobre los compuestos fenólicos es su conocida baja biodisponibilidad, en contraposición a su alta capacidad de ser metabolizados por acción de la microbiota intestinal y por enzimas de Fase-II, lo que puede limitar sus efectos quimiopreventivos frente al cáncer de mama. Este factor hace que sea necesario conocer las formas moleculares y concentraciones de los compuestos que realmente llegan al TTM para dilucidar su efecto quimiopreventivo frente a este cáncer. Gracias a esta determinación se podrá establecer de manera clara

cuáles son los mecanismos de acción a través de los que podrían ejercer su posible efecto protector los compuestos fenólicos detectados en TTM.

En la presente Tesis Doctoral, con el objetivo de responder a las dudas existentes sobre el posible papel beneficioso de los compuestos fenólicos frente al cáncer de mama, se ha pretendido establecer qué compuestos llegan al TTM humano tras el consumo de diferentes extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos. Esto permitiría evaluar su efecto quimiopreventivo frente al cáncer de mama mediante estudios mecanísticos, recreando una situación lo más fiel posible a lo detectado *in vivo* en cuanto a las formas moleculares y concentraciones de estos fenólicos que alcanzan el tejido mamario.

8.1. Resumen de resultados obtenidos

El punto de partida fue realizar un estudio de intervención dietética en pacientes con cáncer de mama, las cuales consumieron una mezcla de diferentes extractos vegetales desde el diagnóstico de la lesión hasta la cirugía (**Capítulo 4**). Este estudio ha permitido identificar y cuantificar un gran número de compuestos fenólicos y metabolitos derivados de compuestos fenólicos, principalmente en forma conjugada (glucurónidos y sulfatos), en TTM (también en tejido sano, plasma y orina) tras el consumo de extractos vegetales representativos de alimentos (frutas y verduras) que se consumen de forma habitual en la dieta. La detección de un perfil de compuestos fenólicos mayoritariamente en forma de conjugados en TTM, coincide con lo obtenido en estudios previos para otros compuestos fenólicos detectados en tejido mamario sano (Bolca et al., 2010a; 2010b), además de las concentraciones detectadas en el rango pmol/g de tejido (Bolca et al., 2010a; 2010b). Sin embargo, en otros estudios recientes en pacientes con cáncer de mama que consumieron suplementos con compuestos fenólicos pocas horas antes de la cirugía (entre 2-5 horas) se detectaron concentraciones superiores en TTM de fenólicos como silibinina (Lazzeroni

et al., 2016) o EGCG (Lazzeroni et al., 2017) pero desafortunadamente, en estos estudios se cuantificó utilizando hidrólisis enzimática sin identificar el posible perfil de metabolitos conjugados derivado de los compuestos ingeridos, más relevante fisiológicamente.

Gracias a los resultados obtenidos en el estudio en pacientes con cáncer de mama de esta Tesis, se han podido diseñar estudios mecanísticos más realistas en modelos de cáncer de mama para investigar el papel quimiopreventivo de compuestos fenólicos y sus metabolitos derivados fisiológicamente relevantes.

Sin embargo, con el objetivo de incrementar el conocimiento *in vivo*, y considerando un aspecto importante como es el de que la biodisponibilidad y el heterogéneo MRT en el organismo de los compuestos fenólicos, se abordó un estudio farmacocinético utilizando un modelo animal (**Capítulo 5**). Así, debido a que la detección de los perfiles cuali- y cuantitativos puede ser diferente en función de cuándo se consumieran los compuestos respecto a la obtención de la muestra, y puesto que una limitación del estudio clínico fue que las pacientes tuvieron que someterse a un periodo de ayuno antes de la intervención (aproximadamente 10-12 horas), resulta evidente que esto podría afectar a los resultados obtenidos.

Por tanto, este estudio farmacocinético realizado en un modelo animal (ratas SD) permitió conocer a tiempos más cortos qué compuestos fenólicos y metabolitos, así como concentraciones de los mismos, podían detectarse en tejido mamario tras el consumo de los mismos extractos vegetales que consumieron las pacientes. Los resultados obtenidos en el estudio animal mostraron valores de C_{max} para algunos metabolitos dentro del rango de micromolar frente al rango nanomolar en el que se cuantificaron en las pacientes. Además de este resultado, también se identificaron metabolitos en tejido mamario con un

MRT inferior a dos horas. Esto confirma que el ayuno de las pacientes limitó la detección de concentraciones más altas y la identificación de un mayor número de compuestos.

Dada la importancia de conocer la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos para evaluar sus posibles actividades biológicas, comparamos la biodisponibilidad, cinética y distribución de RSV, observando que se alcanzan concentraciones dos veces superiores de sus metabolitos derivados en el tejido mamario cuando se consume de manera individual frente a consumirlo en la mezcla con diferentes extractos vegetales. Aunque este hecho podría depender de cada compuesto fenólico, se ha descrito en estudios previos que el consumo conjunto de diferentes fenólicos puede retrasar la absorción de los mismos (Planas et al., 2012).

A continuación, siguiendo la recomendación de "primero *in vivo* y luego *in vitro*" se estudió el posible efecto quimiopreventivo de mezclas representativas de los metabolitos que alcanzan el TTM, utilizando para ello un modelo celular de cáncer de mama (**Capítulo 4**). Además, también se evaluaron los diferentes compuestos fenólicos y metabolitos derivados de forma individual en diferentes modelos celulares de cáncer de mama, a corto tiempo de exposición (hasta 72 horas) (**Capítulo 6**). No obstante, ni las mezclas representativas ni los compuestos individuales (conjugados de Fase-II) que alcanzan el TTM fueron capaces de ejercer actividad antiproliferativa.

Otro posible efecto que se evaluó con la mezcla representativa y los compuestos individuales detectados en TTM fue la actividad estrogénica/antiestrogénica utilizando células de cáncer de mama RE+. Este estudio se realizó debido a que muchos compuestos fenólicos (RSV, isoflavonas y otros) son conocidos por su actividad como fitoestrógenos y por tanto, su consumo podría ejercer un potencial efecto frente al cáncer de mama (principalmente frente a cánceres RE+), como se ha descrito en países asiáticos con dietas altas en soja y productos derivados (ricos en isoflavonas) donde se ha observado un efecto

protector frente al cáncer de mama (Dong y Qin, 2011; Chen et al., 2014). Sin embargo, ni las mezclas representativas ni los compuestos individuales detectados en TTM fueron capaces de ejercer actividad estrogénica/antiestrogénica.

Como comparativa, se evalúo también el efecto antiproliferativo y la actividad estrogénica/antiestrogénica de las formas libres (RSV, DH-RSV, urolitinas y HP) frente a sus metabolitos conjugados, utilizando las mismas condiciones de ensayo (**Capítulo 6**). Los resultados obtenidos mostraron que mientras las formas conjugadas carecen de actividad antiproliferativa y estrogénica/antiestrogénica, las formas libres sí ejercen tales actividades de manera dosis-dependiente.

Estos resultados sugieren que el metabolismo de Fase-II reduce o limita estas actividades biológicas de compuestos y metabolitos derivados de fenólicos, mientras que las formas libres sí las ejercen.

La menor o nula actividad de los metabolitos conjugados detectada frente a sus formas libres está de acuerdo con lo observado en estudios anteriores, como ocurre en el caso de urolitinas (González-Sarrías et al., 2014; 2017b), RSV (Aires et., al 2013) o isoflavonas (Pritchett et al., 2008).

En definitiva, estos resultados deben tenerse en consideración y ser cautos con los de todas las investigaciones *in vitro* que atribuyen diferentes actividades biológicas a través de numerosos mecanismos de acción a compuestos fenólicos en su forma libre y/o como se encuentran en la dieta, sin considerar su transformación en el organismo.

A continuación, con el objetivo de explorar otros posibles mecanismos anticancerígenos, más allá de los tradicionales a corto plazo (de horas a 2-3 días) como el bloqueo del ciclo celular y/o reducción de la proliferación, inducción de apoptosis, etc., se evaluó si estos metabolitos relevantes podrían ejercer efectos anticancerígenos a tiempos más largos de exposición (a partir de 5 días), lo que puede considerarse incluso

más realista al simular un consumo regular de compuestos fenólicos en la dieta. En este sentido, en el **Capítulo 7** se ha demostrado cómo los metabolitos de Fase-II de RSV detectados en TTM humano ejercen un efecto quimiopreventivo mediante la inducción de senescencia en células tumorales de mama a través de un incremento de p53, a tiempos más largos de exposición. El incremento de la proteína supresora de tumores p53, en su forma funcional, se ha relacionado con bloqueo del ciclo celular, inducción de apoptosis y reducción de la capacidad invasiva en diferentes líneas tumorales (Gire y Dulic, 2015; Lewinska et al., 2017; Chen et al., 2019). Además, se han descrito numerosos mecanismos de acción a través de los cuales la modulación de p53 jugaría un efecto protector frente al cáncer de mama (Gasco et al., 2002; McGowan et al., 2018). Por tanto, estos resultados sirven como hipótesis para argumentar que el consumo habitual de RSV podría tener un potencial efecto quimiopreventivo frente al cáncer de mama. Adicionalmente, abren la puerta a explorar la quimioprevención a largo plazo con otros metabolitos de Fase-II que también alcanzan el TTM y, en definitiva, a avanzar en el conocimiento de los mecanismos de acción implicados en la quimioprevención de los compuestos fenólicos.

En los siguientes apartados se discuten limitaciones y problemas de las investigaciones sobre el efecto de los compuestos fenólicos frente al cáncer de mama vinculados a los resultados de la presente Tesis Doctoral. Además, se proponen recomendaciones para implantar en futuros estudios preclínicos y clínicos, con el fin de contribuir a esclarecer el papel que tienen los compuestos fenólicos en el posible efecto beneficioso del consumo de alimentos vegetales frente al cáncer de mama.

8.2. Problemática asociada a los estudios clínicos en pacientes con cáncer de mama

Los estudios clínicos en pacientes con cáncer de mama que apoyan los efectos de compuestos fenólicos descritos en modelos preclínicos son realmente escasos y con resultados dispares (**Tabla 1.7**, **Capítulo 1**). En parte, la dificultad que entrañan estos ensayos clínicos en pacientes con cáncer de mama, permite explicar la escasa comparación existente entre estudios preclínicos y clínicos.

De igual modo, solo un pequeño número de estudios de intervenciones dietéticas en humanos han determinado la biodisponibilidad y distribución tras el consumo de compuestos fenólicos o alimentos ricos en ellos en tejido mamario, y más en concreto en TTM (**Tabla 1.4**, **Capítulo 1**).

Para el diseño de estudios clínicos adecuados se deben abordar y considerar los siguientes puntos críticos:

i) Integración de los investigadores en los equipos multidisciplinares de los hospitales y protocolos de actuación.

Cirujanos, patólogos, enfermeros, etc. son los especialistas que se encargan del diagnóstico, tratamiento clínico y seguimiento de la enfermedad en pacientes, y muchas veces, desbordados por tareas asistenciales, carecen del tiempo o motivación para colaborar con centros de investigación y poder desarrollar estos estudios de manera conjunta. Además, en el caso concreto de las intervenciones dietéticas en pacientes con cáncer de mama, el equipo médico del hospital suele oponerse al uso de concentraciones altas de compuestos fenólicos, sobre todo en pacientes que reciben quimioterapia, por desconocimiento sobre las posibles interacciones entre los compuestos fenólicos y los tratamientos farmacológicos.

Otra problemática añadida son las implicaciones éticas que conlleva la investigación con humanos, ya que cualquiera de estas investigaciones debe ser aprobada previamente, como mínimo, por el comité de ética de investigación clínica del hospital y en la mayoría de las ocasiones es una tarea ardua. Todas las limitaciones y problemas anteriores derivan principalmente en la dificultad de obtener un tamaño muestral relevante. La mayoría de los estudios clínicos antes de una cirugía se llevan a cabo con un número bajo de pacientes debido a lo complejo que resulta reclutar pacientes con patologías graves como es el cáncer de mama. Esta limitación es difícilmente remediable ya que ante la detección de un tumor, los protocolos de intervención a nivel clínico son rápidos con el fin de combatir la enfermedad de manera eficaz. Este hecho explicaría el bajo número de pacientes (entre 8 y 12) que encontramos en la bibliografía, en estudios donde se ha evaluado la distribución de compuestos fenólicos en TTM (**Tabla 1.4**, **Capítulo 1**), y careciendo de un grupo control (Lazzeroni et al., 2016; 2017).

En relación con este punto, debemos señalar que estas limitaciones supusieron una barrera para el reclutamiento de pacientes del estudio descrito en el **Capítulo 4**, aunque finalmente se consiguió una muestra de 27 pacientes (n=8 grupo control), suficiente para tratarse de una intervención dietética donde no se pretendía evaluar ningún efecto clínico. Uno de los inconvenientes que nos impidió evaluar cambios a nivel clínico, derivados del consumo de los extractos ricos en compuestos fenólicos en las pacientes, fueron los pocos días de consumo de los extractos (6 ± 2 días). Este hecho estuvo determinado por el rápido protocolo de actuación en el hospital tras el diagnóstico del tumor y el tiempo que transcurría hasta a la aplicación de tratamiento (ya fuera quirúrgico o sistémico).

ii) Heterogeneidad de los resultados obtenidos.

Otro aspecto crítico que surge en los estudios con humanos es la obtención de muestras biológicas. Concretamente, la obtención de tejido tumoral es un punto limitante, puesto que el tamaño del tumor, tipo de intervención y el criterio del anatomopatólogo serán determinantes a la hora de obtener mayor o menor cantidad de muestra. Como es evidente, el estudio para tratar el cáncer a nivel clínico primará antes que otros estudios y condicionará la cantidad de tejido tumoral disponible para los estudios de investigación con intervenciones dietéticas. Además, la calidad de las muestras biológicas se ve muy influenciada por factores como la cirugía y procesado (Juhl, 2010). Por ejemplo, se ha descrito que los tejidos humanos son altamente susceptibles a sufrir alteraciones durante una intervención quirúrgica (falta de oxígeno, administración de anestesia, temperatura, etc.) (David et al., 2014). Por tanto, además de la inherente variabilidad de la muestra propia de cada individuo (características genotípicas, cumplimiento del protocolo del estudio clínico, horas de ayuno, etc.) hay que añadir la variabilidad de la intervención quirúrgica (tipo, duración, etc.).

Respecto a la variabilidad interindividual que se encuentra en las diferentes muestras quizás sea uno de los aspectos más críticos a considerar para poder establecer conclusiones claras en estudios clínicos realizados en humanos (Thummel y Lin, 2014). La gran variabilidad entre individuos da lugar a una gran heterogeneidad que puede ser la causante de obtener resultados positivos o no. Por ello, sería interesante considerar este punto en las intervenciones en humanos y establecer diferentes grupos de individuos, según características genéticas, metabólicas, fenotípicas, etc. que pudieran correlacionarse con los resultados obtenidos, aunque para ello se debería tener un tamaño muestral suficiente, teóricamente bastante superior al normalmente disponible en este tipo de estudios.

Considerar la variabilidad entre individuos es crucial a la hora de estudiar la biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos, donde factores como polimorfismos genéticos o diferencias en la microbiota darán lugar a la formación de diferentes derivados metabólicos. Lamentablemente, el bajo número de pacientes que suelen reclutarse en este tipo de ensayos hace difícil la posible estratificación de los participantes en función de los factores anteriores.

Para algunos compuestos fenólicos se ha descrito la existencia de diferentes metabotipos en individuos según la producción de unos u otros metabolitos tras el consumo de estos compuestos (Bolca et al., 2013; Espín et al., 2017). Estos metabotipos permiten la estratificación de individuos en función de la composición y funcionalidad de su microbiota intestinal, lo que redunda en la diferente producción cuali- y cuantitativa de metabolitos microbianos que pueden contribuir a la distinta respuesta de los individuos ante el consumo de polifenoles, como es el caso del ácido elágico (EA) (Cortés-Martín et al., 2020) y de isoflavonas (Frankenfeld, 2017).

Las pacientes con cáncer de mama, en el estudio descrito en el **Capítulo 4**, consumieron entre otros extractos vegetales, extracto de granada con alto contenido en EA, y se observaron los 3 metabotipos descritos respecto a la producción de urolitinas tras el consumo de EA: metabotipo A en el 63% de las pacientes, metabotipo B en el 26% y metabotipo 0 en el 11 % de las pacientes, coincidiendo aproximadamente estos porcentajes con lo descrito en voluntarios sanos y en el rango de edad de estas pacientes (Cortés-Martín et al., 2018). Esta diferente producción de metabolitos es de vital importancia a la hora de establecer la actividad biológica de los compuestos fenólicos. En este sentido, en el caso concreto de las urolitinas se ha descrito recientemente que el tratamiento con una mezcla representativa de un metabotipo A, pero no del metabotipo

B, tiene un efecto quimiopreventivo mediante la inducción de senescencia en células de cáncer de colon de manera p53 dependiente (Giménez-Bastida et al., 2020).

Respecto al cáncer de mama, un grupo de compuestos fenólicos de gran interés son las isoflavonas por su actividad como fitoestrógenos. El consumo de alimentos ricos en isoflavonas también se ha asociado con diferentes metabotipos, como por ejemplo la daidzeína que se transforma por acción de la microbiota intestinal en ODMA y/o equol de manera diferente según el individuo (Frankenfeld, 2017). El metabolito equol muestra actividad estrogénica, por lo que tendría especial relevancia el conocer la producción o no de este metabolito en pacientes con cáncer de mama. En este sentido, existe una disminución en la incidencia de cáncer de mama relacionada con un mayor consumo diario de isoflavonas como ocurre en países asiáticos respecto a los países occidentales (Shin et al., 2010; Chen et al., 2014). Por tanto, los metabolitos derivados del consumo podrían ser los responsables del efecto (Cortés-Martín et al., 2020).

Otro aspecto relacionado con la variabilidad interindividual, y relacionado con el consumo de compuestos fenólicos, es la diferencia en la cantidad de producción de metabolitos derivados. Este hecho se muestra en los rangos de concentraciones detectados para los diferentes compuestos y metabolitos fenólicos en las muestras de las pacientes con cáncer de mama (**Tabla 4.8**, **Capítulo 4**). Para muchos compuestos fenólicos se ha descrito un metabolismo muy variable entre individuos, dividiendo a la población según la excreción del compuesto metabolizado en "altos o bajos productores", como por ejemplo ocurre con el metabolismo de hesperidina a hesperetina (Vallejo et al., 2010), de lignanos a enterolignanos (Quartieri et al., 2016) de EA a urolitinas (Tomás-Barberán et al., 2017) o de procianidinas a valerolactonas (Mena et al., 2019; Cortés-Martín et al., 2019).

Todas estas diferencias observadas entre individuos sugieren que el consumo de compuestos fenólicos o alimentos ricos en ellos puede tener diferente efecto frente al cáncer de mama según la persona. Así pues, resulta interesante poder establecer metabotipos y/o diferencias en el metabolismo entre la población que participe en un estudio clínico, que nos permitan establecer asociaciones para dilucidar los compuestos causantes de un posible efecto protector o no frente a la enfermedad.

Confirmar el efecto protector con ciertos metabotipos podría ser interesante a la hora de investigaciones futuras como por ejemplo para inducir un metabotipo concreto que fuera protector frente al cáncer de mama. En este sentido, se ha descrito la conversión de individuos no productores de urolitinas (metabotipo 0) a productores (metabotipo A o metabotipo B) tras un consumo prolongado de extracto de granada rico en elagitaninos (González-Sarrías et al., 2017a). Igualmente, se ha descrito para las isoflavonas que diferentes tipos de dieta (mayor o menor consumo de productos ricos en isoflavonas) se relacionan con una mayor o menor incidencia de productores de equol y/o ODMA (Atkinson et al., 2008).

iii) Dificultad para atribuir el efecto quimiopreventivo a los compuestos fenólicos o su potencial efecto como coadyuvantes en quimioterapia.

La mayoría de los estudios realizados con humanos que pretenden evaluar la actividad quimiopreventiva de los compuestos fenólicos en el cáncer de mama utilizan productos o extractos vegetales que imposibilitan señalar inequívocamente a los compuestos fenólicos como responsables del efecto protector. En este sentido, es importante considerar la diferente composición fenólica que hay en los alimentos vegetales y otros factores que podrían influir en su biodisponibilidad y metabolismo, como son la matriz del alimento, el procesado, la interacción entre diferentes fenólicos y/o otros componentes del alimento

como son proteínas o hidratos de carbono, que incluso podrían interferir, limitando los posibles efectos quimiopreventivos (Tomás-Barberán y Espín, 2019). Aquí reside de nuevo la necesidad de establecer el perfil cuali- y cuantitativo de los metabolitos derivados de fenólicos en el tumor mamario, recalcando la importancia del uso de una metodología adecuada para ello. Cuantificar apropiadamente los compuestos detectados y la necesidad de uniformizar criterios de análisis estandarizados son piezas clave que nos permitirán establecer conclusiones claras con los estudios existentes, evitando la identificación/cuantificación con patrones inadecuados, resultados dispares entre hidrólisis enzimática del tejido mamario *vs* no hidrolisis enzimática, etc.

Por último, a día de hoy, no se ha podido establecer una conclusión clara sobre la interacción de los compuestos fenólicos y los fármacos usados en quimioterapia. A pesar de que numerosos estudios preclínicos apoyan que los compuestos fenólicos podrían ser potenciales coadyuvantes en terapias contra el cáncer de mama (Basu y Maier, 2018; Mbese et al., 2019) solo tres estudios clínicos se han llevado a cabo para evaluar el potencial efecto de la combinación de compuestos fenólicos con agentes quimioterapéuticos: el consumo de semillas de lino (McCann et al., 2014), una mezcla de hidroxitirosol con curcumina (además ácidos omega-3) (Martínez et al., 2019), e isoflavonas (Ferraris et al., 2020) en combinación con diferentes tratamientos farmacológicos en pacientes con cáncer de mama. Esta potencial actividad de los compuestos fenólicos como coadyuvantes del tratamiento con quimioterapia se ha descrito también en pacientes con cáncer colorrectal con el consumo de curcumina en combinación con terapias de fármacos quimioterapéuticos (empleados en distintos tipos de cáncer, como el de mama) (James et al., 2015; Howells et al., 2019). Dada la evidencia preclínica existente y los numerosos mecanismos de acción descritos de los compuestos fenólicos en modelos celulares tumorales existe la necesidad de llevar a cabo estudios

clínicos que permitan respaldar su utilidad como coadyuvantes en los tratamientos contra el cáncer de mama y que permitan conocer la posible interacción de estos compuestos con los tratamientos farmacológicos.

8.3. Aspectos críticos de investigaciones preclínicas en modelos animales *vs* estudios clínicos

Los estudios preclínicos con modelos animales son procedimientos experimentales útiles para evaluar la actividad biológica de compuestos fenólicos frente al cáncer de mama. A diferencia de los estudios clínicos, son numerosos los estudios en modelos animales los que evalúan la distribución de compuestos fenólicos en el tejido mamario (**Tabla 1.5**), así como su efecto quimiopreventivo en modelos tumorales de mama (**Tabla 1.8**). Sin embargo, muchos de ellos utilizan una metodología cuestionable, dificultando una vez más la extrapolación de resultados a lo que ocurre en humanos (Mignini y Khan, 2006).

Entre las limitaciones más comunes que se encuentran en las investigaciones con animales y dificultan su extrapolación a humanos, se encuentran:

i) Estudios con diseños experimentales erróneos.

El uso de dosis inadecuadas, tiempos y regímenes de administración imposibles de realizar a nivel clínico y la ausencia de grupos control o placebo (dependiendo del estudio) para poder comparar los resultados obtenidos, conllevan las principales dificultades de extrapolar resultados a nivel clínico (Bracken, 2009). En el caso concreto de modelos animales de cáncer de mama donde se evalúa el efecto quimiopreventivo de compuestos fenólicos, quizás son dos los problemas adicionales más frecuentes que podemos encontrar: 1) la inducción de tumores mamarios que no reflejan la realidad de

un cáncer. Para causar un tumor en animales se suelen emplear altas dosis de potentes agentes carcinógenos o se producen animales con una mutación concreta bajo condiciones experimentales controladas, situaciones en ambos casos, que no suelen representar el proceso de carcinogénesis en humanos; 2) administración de compuestos fenólicos o extractos vegetales de manera sistémica (por ejemplo, mediante inyección intravenosa, intraperitoneal, o en el mismo tumor) para evaluar su efecto quimiopreventivo, sin tener en cuenta su biodisponibilidad y/o metabolismo y no representando en absoluto lo que sería un contexto dietético.

ii) Diferencias existentes entre especies.

Además de las diferencias entre distintas especies (ratas, ratones, cerdos, etc.), los animales presentan características genéticas y comportamientos muy diferentes a los de la especie humana (Singh et al., 2016). La variedad de cepas existentes de animales de experimentación es inmensa, incluyendo también aquellas cepas que poseen alteraciones genéticas.

En el estudio farmacocinético realizado en un modelo animal de ratas SD (**Capítulo 5**) no se llegaron a detectar los metabolitos derivados de procianidinas como los ácidos 2,5- 2,6- dihidroxibenzoicos y 5-(3',4'-dihidroxifenil)-γ-valerolactona-3'-sulfato, que sí se detectaron, y en cantidades abundantes, en plasma y tejidos mamarios (sano y tumoral) de las pacientes con cáncer de mama. Esto corrobora que las diferencias (en este caso concreto probablemente debidas a la microbiota intestinal) de cada especie afectan al metabolismo de los compuestos fenólicos, lo cual se debe tener en cuenta a la hora de realizar estudios en animales. Por ello, al igual que ocurre en los estudios *in vitro*, se deberían emplear diferentes modelos animales para aproximarse a la variabilidad interindividual existente en humanos (Abdo et al., 2015).

No obstante, pese a los puntos críticos que existen en los estudios preclínicos con animales para poder extrapolarlos a una situación clínica, estos estudios siguen siendo esenciales como etapas previas para poder evaluar la seguridad, actividad biológica o incluso conocer la dosis a ensayar antes de un estudio clínico.

8.4. Escasa extrapolación clínica de la actividad biológica y mecanismos de acción de compuestos fenólicos: *in vitro vs in vivo*

A pesar del progreso en las últimas de décadas por esclarecer la actividad quimiopreventiva de los compuestos fenólicos frente al cáncer de mama, hasta la fecha esta actividad biológica sigue siendo inconcluyente en humanos.

La frase: "nuestros resultados sugieren potenciales efectos beneficiosos para la salud, aunque se requiere de más estudios *in vivo*", es posiblemente la conclusión más repetida en las últimas décadas entre todos los estudios *in vitro* que muestran algún efecto beneficioso o actividad biológica para uno o varios compuestos fenólicos. En este sentido, son innumerables los estudios *in vitro* que encontramos sobre compuestos fenólicos y cáncer de mama (alrededor de 1.000 entradas en Web Of Science para "polyphenols and *in vitro* and breast cancer" correspondientes con investigaciones de la última década). Numerosos mecanismos de acción se han descrito como responsables de la posible actividad quimiopreventiva de los compuestos fenólicos frente al cáncer de mama. Sin embargo, muy pocos estudios realizados en modelos celulares utilizan condiciones fisiológicamente relevantes en cuanto a la forma molecular y la concentración de los compuestos ensayados (**Tabla 1.6**, **Capítulo 1**).

En general, varias razones limitan la extrapolación de los resultados observados en estudios *in vitro* a una situación clínica, y por tanto, la imposibilidad de atribuir los efectos quimiopreventivos descritos para diferentes compuestos fenólicos en modelos celulares

de mama. No obstante, también es cierto que existen limitaciones conocidas de los estudios *in vitro* que difícilmente se podrán superar, siendo la más evidente la de recrear un microambiente celular idéntico al que encontramos *in vivo.* Sin embargo, el problema de los estudios en modelos celulares va más allá de sus limitaciones inherentes, pues las condiciones de ensayo en la bibliografía son recurrentemente poco realistas. La pregunta es: ¿Cómo se puede cambiar esta tendencia? Básicamente, para que las condiciones empleadas en un ensayo *in vitro* sean más relevantes fisiológicamente se deberían tener en cuenta los siguientes puntos:

i) Uso de concentraciones y forma molecular de los compuestos.

Durante décadas (y actualmente se mantiene), un error clásico de los estudios *in vitro* ha sido tratar las células directamente con productos (extractos vegetales o bebidas) ricos en compuestos concretos o bien, con el compuesto como lo encontramos en el alimento. La limitada aproximación fisiológica de esta metodología es obvia, puesto que pueden existir diferentes interacciones entre el modelo celular y la matriz alimentaria empleada. Además, la mayoría de estos estudios tampoco considera la biodisponibilidad, metabolismo por parte de la microbiota intestinal o la distribución en tejidos de los compuestos fenólicos (Espín et al., 2017).

A día de hoy, son muy escasos los estudios *in vitro* que han evaluado la actividad biológica de metabolitos conjugados de Fase-II o metabolitos fenólicos producidos por la microbiota intestinal (**Tabla 1.6**, **Capítulo 1**), aun siendo estos derivados metabólicos los que realmente se detectan en la circulación sanguínea y llegan a diferentes tejidos sistémicos tras el consumo de alimentos o bebidas ricas en compuestos fenólicos (González-Sarrías et al., 2017a).

En el **Capítulo 4** de esta Tesis Doctoral se ha descrito que las formas moleculares detectadas en TTM humano tras el consumo de diferentes extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos fueron metabolitos de Fase-II (glucurónidos y sulfatos), de acuerdo con lo descrito para otros tejidos sistémicos en estudios anteriores (González-Sarrías et al., 2010; Núñez-Sánchez et al., 2014). Además, se cuantificaron las formas conjugadas detectadas (siempre que fue posible) con sus correspondientes patrones para obtener un perfil cuantitativo real de lo detectado en TTM, lo que además se complementó con tratamientos "clásicos" de hidrólisis enzimática. Es cierto, que no siempre se puede disponer de los patrones de cada compuesto o metabolito a cuantificar, y esto es un serio inconveniente. Sin embargo, la cuantificación con hidrólisis enzimática conlleva a sobreestimar las concentraciones de los compuestos, además de reflejar un perfil de compuestos en forma libre que no representa la realidad de lo que llega al tejido mamario. De los estudios en humanos que muestran la distribución de compuestos fenólicos en tejido mamario (**Capítulo 1**, **Tabla 1.4**) encontramos enormes diferencias entre el perfil cuali-cuantitativo detectado. En estos estudios, cuando se analizaron los tejidos mamarios humanos tras hidrólisis enzimática, se observaron formas libres de compuestos fenólicos en concentraciones del rango nanomolar (Pumford et al., 2002; Maubach et al., 2004), incluso en concentraciones µg/g tejido (Maubach et al., 2003); pasando a detectar un perfil mayoritario de metabolitos conjugados en rango picomolar (Bolca et al., 2010a; 2010b) y ng/g tejido (Lazzeroni et al., 2016; 2017), cuando el análisis se realizó sin hidrólisis enzimática de los tejidos mamarios.

También encontramos cada vez más evidencias que muestran cómo el metabolismo de Fase-II reduce, o incluso limita por completo, las potenciales actividades biológicas de los compuestos en su forma libre (comúnmente llamadas "agliconas"). Este hecho, alienta a muchos investigadores a seguir usando compuestos fenólicos no conjugados y así seguir

publicando efectos "potencialmente beneficiosos" frente a los nulos o escasos efectos, aunque fisiológicamente relevantes, derivados del uso de metabolitos conjugados. En definitiva y con este pretexto, en muchos ensayos se siguen utilizando compuestos de cuestionable importancia fisiológica, obteniendo unos "potenciales efectos beneficiosos para la salud humana" atribuidos a cientos de mecanismos de acción y llenando la literatura científica de investigaciones *in vitro* de cuestionable calidad y de muy dudosa relevancia clínica. Por tanto, debe revertirse esta tendencia, primando aquellos estudios que utilicen metabolitos en condiciones (formas moleculares y concentraciones) de mayor relevancia fisiológica.

ii) Efecto de la matriz del alimento y uso de mezclas con diferentes compuestos

La matriz alimentaria tiene gran importancia y suele subestimarse. Los estudios *in vitro* deben tener en cuenta el papel que desempeña el tracto intestinal en la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos, ya que esto afectará drásticamente a su mayor o menor actividad biológica. Componentes presentes en las matrices alimentarias como proteínas, fibras, etc. influyen de manera sustancial en la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos y, por tanto, pueden obstaculizar, e incluso inhibir su actividad biológica.

Del mismo modo, existe una tendencia recurrente en todos los ensayos *in vitro* de estudiar solo un compuesto fenólico o metabolito derivado sin considerar realmente la mezcla que se puede originar *in vivo* tras el consumo del alimento o bebida, un contexto mucho más plausible en la dieta dada la diversa y compleja composición fenólica cuali-cuantitativa de alimentos vegetales. En este sentido, evaluar mezclas fisiológicamente representativas de compuestos fenólicos y/o de sus metabolitos derivados puede

proporcionar información relevante sobre posibles efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos entre los diferentes compuestos o metabolitos.

En este sentido, en el **Capítulo 4** se evaluó la actividad quimiopreventiva de una mezcla representativa con los diferentes compuestos y metabolitos detectados en TTM utilizando diferentes modelos celulares de cáncer de mama. Así mismo y dada la relevancia de los receptores estrogénicos en el cáncer de mama, se exploró la posible actividad estrogénica/antiestrogénica de la mezcla representativa sobre un modelo tumoral de cáncer de mama RE+. En ninguno de los dos casos, la mezcla representativa ejerció efecto antiproliferativo. Por último y dentro de este marco, en el **Capítulo 7** se evaluó la inducción de senescencia en células tumorales de mama tras el tratamiento con una mezcla representativa de los metabolitos derivados de RSV detectados en TTM, la cual también careció de efecto en contraposición a lo observado con el tratamiento de los compuestos conjugados de manera individual.

Sin embargo, estos resultados podrían explicarse por una competencia de los metabolitos por los transportadores ABC lo que podría tener un papel beneficioso en fenómenos de quimiorresistencia a fármacos contra el cáncer de mama, donde se ha descrito que el principal mecanismo vinculado a esta resistencia es la sobreexpresión de diferentes transportadores ABC (Robey et al., 2018), pudiendo prevenir por tanto, los metabolitos fenólicos circulantes la expulsión del fármaco a través de estos transportadores.

iii) Idoneidad del modelo celular y tiempos de duración de los ensayos.

Tanto el uso de unas condiciones fisiológicamente relevantes (formas moleculares y concentraciones) como el uso de una línea celular adecuada, son puntos que se deben tener en cuenta al mismo tiempo. Los compuestos fenólicos o sus metabolitos derivados,

tanto en forma molecular como en concentraciones, no se encuentran por igual en todos los tejidos sistémicos. Por ejemplo, es posible que al consumir un alimento, en el estómago se detecten compuestos no conjugados mientras que aquellos que se detectan en el cerebro sean principalmente conjugados de Fase-II, si es que realmente llegan al tejido cerebral. Esto es de vital importancia a la hora de estudiar la actividad biológica con un modelo celular adecuado. Los metabolitos no conjugados que aparecen en el estómago o en el sistema digestivo se deben ensayar principalmente en modelos celulares de colon, mientras que los metabolitos conjugados de Fase-II se deben usar en modelos celulares sistémicos (cerebro, mama, etc.). Es cierto que la heterogeneidad de un organismo humano no puede reproducirse *in vitro*. Sin embargo, otra norma que se debería implementar para aumentar la calidad de los resultados en los ensayos *in vitro* sería el uso de diferentes líneas celulares de un mismo tejido que tengan características distintas. Si se evita el uso de una única línea celular nos acercaremos más a cubrir la heterogeneidad que podemos encontrar *in vivo*. Además, se debería valorar el uso de co-cultivos con diferentes tipos celulares.

Por ejemplo, en un tejido sistémico como puede ser el mamario existen diferentes tipos de células con características muy diferentes y es un hecho que debería contemplarse en los estudios *in vitro*. Como se ha comentado en el **Capítulo 1**, el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea donde múltiples marcadores pueden estar afectados y existir diferentes mutaciones que comprometan diferentes vías de señalización celular afectando a la regulación normal de la célula. Tener en cuenta el estado de los receptores hormonales y la expresión de diferentes genes son aspectos fundamentales a la hora de evaluar la actividad biológica de compuestos fenólicos con modelos celulares de mama. Por ello, no se debería usar un único modelo celular, sino que se deberían usar líneas tumorales de

mama con diferentes características moleculares que representen los distintos subtipos de cáncer de mama (**Tabla 1.3**).

Para demostrar una actividad biológica sobre un modelo celular es necesario profundizar y describir cuál es el mecanismo de acción mediante el cual ejerce tal actividad. Para ello, se deben plantear diferentes escenarios con el uso de varios modelos celulares (distintas características moleculares) y con diferentes tiempos de exposición (efecto agudo *vs* efecto crónico).

Así pues, aunque no existiera un efecto antiproliferativo de los metabolitos conjugados de diferentes fenólicos a corto plazo (**Capítulo 6**), se exploraron efectos quimiopreventivos a tiempos más largos de exposición (**Capítulo 7**). Para ello se utilizaron diferentes modelos celulares de cáncer de mama (MCF-7, p53 silvestre; MDA-MB-231, p53 mutada) y una línea celular de mama no tumoral (MCF-10A). En estudios anteriores se ha descrito que metabolitos conjugados de RSV (glucurónidos y sulfatos) ejercen un efecto quimiopreventivo a través de la inducción de senescencia sobre células tumorales de colon (Patel et al., 2013), y este mismo efecto se ha descrito para RSV en forma libre en células tumorales de mama (Heiss et al., 2007; Filippi-Chiela et al., 2013; Ji et al., 2018). En el **Capítulo 7** se ha descrito por primera vez que metabolitos de Fase-II de RSV, así como su metabolito microbiano DH-RSV y su glucurónido (detectados en TTM humano), ejercen un efecto quimiopreventivo sobre células de cáncer de mama mediante la inducción de senescencia dependiente de p53. Esto es destacable ya que, hasta la fecha, los estudios *in vitro* que habían descrito un efecto antiproliferativo de compuestos fenólicos mediado por senescencia en células de cáncer de mama utilizaron compuestos como RSV o extractos vegetales (Mileo et al., 2015; Chen et al., 2019), sin considerar el efecto de las formas fisiológicamente relevantes en el tejido mamario.

Los resultados obtenidos en el **Capítulo 7** indican que tanto RSV como sus metabolitos provocan un aumento de la proteína supresora de tumores p53, implicada en una de las rutas de inducción a senescencia celular. En este sentido, nuestros resultados sugieren que, además de un efecto quimiopreventivo por un consumo crónico de RSV, estos metabolitos fenólicos detectados en TTM pueden ser compuestos prometedores como coadyuvantes de quimioterapéuticos, ya que diferentes fármacos antitumorales como antraciclinas o agentes alquilantes empleados para tratar entre otros el cáncer de mama, inducen senescencia en las células tumorales aumentando proteínas como p53 y p16 (Demaria et al., 2017; El-Far et al., 2020). Por el contrario, este efecto no se observó en la otra línea tumoral de mama empleada MDA-MB-231 (p53 mutada), poniendo de manifiesto una vez más la necesidad de evaluar el efecto de los compuestos con el uso de modelos celulares diferentes.

Otro hecho que se debe tener en cuenta es que las líneas celulares obtenidas de cultivos primarios son mucho más representativas que las líneas que se obtienen comercialmente. Las células que provienen directamente del tejido animal tienen su mismo material genético, mientras que las adquiridas comercialmente son líneas que crecen de forma ilimitada y han adquirido diferencias genéticas y morfológicas respecto de la línea original de la que procedían. Esto cobra especial interés en las líneas celulares tumorales, puesto que las que se adquieren comercialmente presentan numerosas mutaciones y diferentes características genéticas frente a la línea original.

Teniendo en cuenta lo anterior hay dos inconvenientes principales para usar cultivos primarios: el primero es la compleja logística que se necesita para poder obtener un cultivo celular primario y el segundo, es que las células que se obtienen de los cultivos primarios tienen una vida útil bastante limitada.

Por otro lado, se encuentran los organoides que son cultivos celulares en 3 dimensiones (3D) y buscan que el comportamiento de las células en cultivo sea lo más parecido al que tienen en su organismo de origen. Los cultivos 3D abren una nueva posibilidad para los ensayos *in vitro* ya que permiten la obtención de resultados con una calidad y cantidad de información muy superiores a los que se obtienen con los clásicos cultivos celulares en ambientes 2D. Los cultivos celulares 3D se componen de múltiples tipos de células inmersas en una matriz extracelular, reproduciendo las interacciones célula-célula y las interacciones de la célula con su matriz extracelular, tal como ocurre *in vivo*. Aunque son numerosas las ventajas que presenta este tipo de cultivos celulares, la dificultad metodológica, así como los costes de material específico para ello suponen que su uso rutinario siga siendo limitado.

En resumen, los estudios *in vitro* son necesarios y útiles para poder dilucidar mecanismos de acción por los cuales un compuesto ejerce su actividad biológica, pero deben realizarse teniendo en cuenta todos los puntos mencionados y utilizando siempre unas condiciones de ensayo que representen un contexto plausiblemente fisiológico, para lo cual es recomendable abordar la secuencia "primero *in vivo*, luego *in vitro*". Aquellos estudios *in vitro* donde no se consideran estos puntos, simplemente alimentan la especulación sobre efectos beneficiosos para la salud de fenólicos, pero con muy dudosa extrapolación clínica.

CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados de la presente Tesis Doctoral han permitido obtener las siguientes conclusiones generales:

Primera: Se han identificado un total de 27 metabolitos fenólicos (algunos de ellos por primera vez), así como 6 metilxantinas, en tejido tumoral mamario de pacientes con cáncer de mama. El perfil metabólico y concentraciones de metabolitos (en el rango pmol/g tejido) en el tejido tumoral mamario fue bastante similar al obtenido en tejido mamario sano.

Segunda: En el caso de los compuestos fenólicos, las formas moleculares más relevantes detectadas en el tejido tumoral mamario fueron metabolitos conjugados de Fase-II (principalmente glucurónidos y sulfatos) mientras que las metilxantinas se detectaron en forma libre. Esta información ha proporcionado las herramientas necesarias para poder llevar a cabo estudios mecanísticos más cercanos a una situación *in vivo*. Esto ha permitido evaluar el efecto quimiopreventivo de compuestos que llegan al tejido tumoral mamario y por tanto, la posible relevancia tras el consumo de alimentos vegetales frente al cáncer de mama.

Tercera: El estudio farmacocinético en un modelo de rata permitió identificar hasta 16 veces más concentración de algún metabolito en el tejido mamario respecto a lo observado en pacientes, así como otros metabolitos no detectados en las pacientes. Esto confirma que el ayuno prolongado previo a la cirugía es una gran limitación en este tipo de estudios y por tanto, se puede subestimar cualitativa- y cuantitativamente la distribución de metabolitos fenólicos en tejidos sistémicos, incluido el mamario.

Cuarta: Se ha demostrado que la absorción de compuestos fenólicos, concretamente en el caso de resveratrol, puede ser diferente según se consuma de forma individual o junto con otros compuestos fenólicos de la dieta, alcanzándose mayores concentraciones a nivel sistémico cuando este consumo se hace de forma individual.

Quinta: El tratamiento con compuestos individuales, así como mezclas representativas de los metabolitos detectados en el tejido tumoral mamario, no ejercieron efecto antiproliferativo a tiempos cortos de exposición en diferentes modelos celulares de cáncer de mama, ni tampoco actividad estrogénica/antiestrogénica, a diferencia de sus formas libres que sí ejercieron dicho efecto. Estos resultados confirman que el metabolismo de Fase-II limita la actividad biológica de compuestos derivados de fenólicos incluso a concentraciones superiores a las alcanzadas *in vivo*.

Sexta: Se ha descrito por primera vez que la exposición a largo plazo de metabolitos de Fase-II de resveratrol detectados en el tejido tumoral mamario humano ejerce un efecto quimiopreventivo en células de cáncer de mama mediante la inducción de senescencia celular, principalmente de manera dependiente de la proteína supresora de tumores p53. Aunque el metabolismo de Fase-II limita la actividad biológica de los compuestos fenólicos en general, este resultado sugiere que un consumo habitual de resveratrol podría tener un efecto quimiopreventivo a largo plazo frente al cáncer de mama. Además, este resultado abre la puerta a estudiar la senescencia celular mediada por otros compuestos fenólicos relevantes en el tejido tumoral mamario y evaluar su efecto quimiopreventivo frente al cáncer de mama tras un consumo crónico.

Observaciones finales y perspectivas futuras

Esta Tesis ha contribuido principalmente a comprender qué metabolitos derivados de compuestos fenólicos tras el consumo de alimentos vegetales llegan al tejido tumoral mamario de pacientes con cáncer de mama y qué posible papel protector frente a este cáncer podrían ejercer. Aunque las formas moleculares y las concentraciones detectadas no son compatibles con un aparente efecto terapéutico, los resultados obtenidos abren nuevas vías de investigación sobre el efecto quimiopreventivo de estos metabolitos,

mediado por senescencia, especialmente en el caso del resveratrol. Este hallazgo podría ser compatible con el consumo crónico de alimentos vegetales como estrategia preventiva frente al cáncer de mama.

La secuencia de estudios recogida en esta Tesis Doctoral es importante para conocer cuál es el contexto fisiológico más plausible de los polifenoles de la dieta o sus derivados metabólicos en el microentorno mamario tras consumir alimentos vegetales. Similar enfoque podría seguirse en otros tejidos sistémicos. Esta aproximación es crucial para optimizar las condiciones experimentales de futuros ensayos in vitro (tiempos de exposición, formas moleculares y concentraciones a ensayar, uso de diferentes modelos celulares, etc.) y así contribuir al conocimiento sobre posibles mecanismos quimiopreventivos de las moléculas que alcanzan el tejido mamario tumoral. Obviar esta premisa quizá solo alimentaría más la publicación de estudios in vitro de dudosa extrapolación fisiológica.

ABSTRACT

REFERENCIAS

Abdo N, Xia M, Brown CC, Kosyk O, Huang R, Sakamuru S, Zhou YH, Jack JR, Gallins P, Xia K, Li Y, Chiu WA, Motsinger-Reif AA, Austin CP, Tice RR, Rusyn I, Wright FA. Population-based in vitro hazard and concentration-response assessment of chemicals: the 1000 genomes high-throughput screening study. *Environ Health Perspect*, **2015**, 123, 458-466.

Abotaleb M, Kubatka P, Caprnda M, Varghese E, Zolakova B, Zubor P, Opatrilova R, Kruzliak P, Stefanicka P, Büsselberg D. Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: an update. *Biomed Pharmacother*, **2018**, 101, 458-477.

Adams LS, Zhang Y, Seeram NP, Heber D, Chen S. Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells in vitro. *Cancer Prev Res (Phila)*, **2010**, 3, 108-113.

Aggarwal BB, Shishodia S, Takada Y, Banerjee S, Newman RA, Bueso-Ramos CE, Price JE. Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. *Clin Cancer Res*, **2005**, 11, 7490-7498.

Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, **2002**, 18, 75-81.

Ahmad DA, Negm OH, Alabdullah ML, Mirza S, Hamed MR, Band V, Green AR, Ellis IO, Rakha EA. Clinicopathological and prognostic significance of mitogen-activated protein kinases (MAPK) in breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*, **2016**, 159, 457-467.

Ahmed S, Sami A, Xiang J. HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer*, **2015**, 22, 101-116.

Aires V, Limagne E, Cotte AK, Latruffe N, Ghiringhelli F, Delmas D. Resveratrol metabolites inhibit human metastatic colon cancer cells progression and synergize with chemotherapeutic drugs to induce cell death. *Mol Nutr Food Res*, **2013**, 57, 1170-1181.

Aiyer HS, Gupta RC. Berries and Ellagic Acid Prevent Estrogen-Induced Mammary Tumorigenesis by Modulating Enzymes of Estrogen Metabolism. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*, **2010**, 3, 727-737.

Albin N, Massaad L, Toussaint C, Mathieu MC, Morizet J, Parise O, Gouyette A, Chabot GG. Main drug-metabolizing enzyme systems in human breast tumors and peritumoral tissues. *Cancer Res*, **1993**, 53, 3541-3546.

Alemán-Jiménez C, Domínguez-Perles R, Medina S, Prgomet I, López-González I, Simonelli-Muñoz A, Campillo-Cano M, Auñón D, Ferreres F, Gil-Izquierdo Á. Pharmacokinetics and bioavailability of hydroxytyrosol are dependent on the food matrix in humans. *Eur J Nutr*, **2020**, Jun 10. doi: 10.1007/s00394-020-02295-0.

Allred CD, Allred KF, Ju YH, Goeppinger TS, Doerge DR, Helferich WG. Soy processing influences growth of estrogen-dependent breast cancer tumors. *Carcinogenesis*, **2004**, 25, 1649-1657.

REFERENCIAS

Allred CD, Allred KF, Ju YH, Virant SM, Helferich WG. Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. *Cancer Res*, **2001**, 61, 5045-5050.

Alshatwi AA, Shafi G, Hasan TN, Al-Hazzani AA, Alsaif MA, Alfawaz MA, Lei KY, Munshi A. Apoptosis-mediated inhibition of human breast cancer cell proliferation by lemon citrus extract. *Asian Pac J Cancer Prev*, **2011**, 12, 1555-1559.

Amatori S, Mazzoni L, Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Gasparrini M, Forbes-Hernandez TY, Afrin S, Errico Provenzano A, Persico G, Mezzetti B, Amici A, Fanelli M, Battino M. Polyphenol-rich strawberry extract (PRSE) shows in vitro and in vivo biological activity against invasive breast cancer cells. *Sci Rep*, **2016**, 6, 30917.

American Cancer Society (ACS). Cirugía para el cáncer de seno. [actualizada el 18 de septiembre de 2019, acceso 20 de abril de 2020]. Disponible en: https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento/cirugia-del-cancer-de-seno.html.

Amir E, Seruga B, Niraula S, Carlsson L, Ocaña A. Toxicity of adjuvant endocrine therapy in postmenopausal breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, **2011**, 103, 1299-1309.

Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res*, **2008**, 25, 2097-2116.

Anantharaju PG, Gowda PC, Vimalambike MG, Madhunapantula SV. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutr J*, **2016**, 15, 99.

Andreani C, Bartolacci C, Wijnant K, Crinelli R, Bianchi M, Magnani M, Hysi A, Iezzi M, Amici A, Marchini C. Resveratrol fuels HER2 and ERα-positive breast cancer behaving as proteasome inhibitor. *Aging (Albany NY)*, **2017**, 9(2), 508-523.

Andrés-Lacueva C, Macarulla MT, Rotches-Ribalta M, Boto-Ordóñez M, Urpí-Sardá M, Rodríguez VM, Portillo MP. Distribution of resveratrol metabolites in liver, adipose tissue, and skeletal muscle in rats fed different doses of this polyphenol. *J Agric Food Chem*, **2012**, 60, 4833-4840.

Appelt LC, Reicks MM. Soy induces Phase II enzymes but does not inhibit dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis in female Rats. *J Nutr*, **1999**, 129, 1820-1826.

Arnaud MJ. Identification, kinetic and quantitative study of [2-14C] and [1-Me-14C]caffeine metabolites in rat's urine by chromatographic separations. *Biochem Med*, **1976**, 16, 67-76.

Arnaud MJ. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. En: Handbook of Experimental Pharmacology. Methylxanthines (Ed. Fredholm BB). Springer Berlin, Heidelberg, (Alemania), **2011**, pp 33-91.

Arnaud MJ, Welsch C. Metabolic pathway of theobromine in the rat and identification of two new metabolites in human urine. *J Agric Food Chem*, **1979**, 27, 524-527.

Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). Acceso 23 de mayo de 2020. Disponible en: https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-mama/prevencion.

Asociación Médica Mundial (AMM). Declaración de Helsinki de la AMM – Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, 64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre **2013**. Disponible en: https://www.wma.net/es/policies-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/

Atkinson C, Newton KM, Bowles EJ, Yong M, Lampe JW. Demographic, anthropometric, and lifestyle factors and dietary intakes in relation to daidzein-metabolizing phenotypes among premenopausal women in the United States. *Am J Clin Nutr*, **2008**, 87, 679-687.

Attia YM, El-Kersh DM, Ammar RA, Adel A, Khalil A, Walid H, Eskander K, Hamdy M, Reda N, Mohsen NE, Al-Toukhy GM, Mansour MT, Elmazar MM. Inhibition of aldehyde dehydrogenase-1 and p-glycoprotein-mediated multidrug resistance by curcumin and vitamin D3 increases sensitivity to paclitaxel in breast cancer. *Chem Biol Interact*, **2020**, 315, 108865.

Aune D, Chan DS, Vieira AR, Rosenblatt DA, Vieira R, Greenwood DC, Norat T. Fruits, vegetables and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat*, **2012**, 134, 479-493.

Ávila-Gálvez MÁ, Giménez-Bastida JA, González-Sarrías A, Espín JC. Tissue deconjugation of urolithin A glucuronide to free urolithin A in systemic inflammation. *Food Funct*, **2019**, 10, 3135-3141.

Avtanski D, Poretsky L. Phyto-polyphenols as potential inhibitors of breast cancer metastasis. *Mol Med*, **2018**, 24, 29.

Azorín-Ortuño M, Yáñez-Gascón MJ, Vallejo F, Pallarés FJ, Larrosa M, Lucas R, Morales JC, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT, Espín JC. Metabolites and tissue distribution of resveratrol in the pig. *Mol Nutr Food Res*, **2011**, 55, 1154-1168.

Bachmeier B, Nerlich AG, Iancu CM, Cilli M, Schleicher E, Vené R, Dell'Eva R, Jochum M, Albini A, Pfeffer U. The chemopreventive polyphenol Curcumin prevents hematogenous breast cancer metastases in immunodeficient mice. *Cell Physiol Biochem*, **2007**, 19, 137-152.

Baghdadi MA, Al-Abbasi FA, El-Halawany AM, Aseeri AH, Al-Abd AM. Anticancer Profiling for Coumarins and Related O-Naphthoquinones from Mansonia gagei against Solid Tumor Cells In Vitro. *Molecules*, **2018**, 23, 1020.

Bai J, Li Y, Zhang G. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. *Cancer Biol Med*, **2017**, 14, 348-362.

Baker JA, Beehler GP, Sawant AC, Jayaprakash V, McCann SE, Moysich KB. Consumption of coffee, but not black tea, is associated with decreased risk of premenopausal breast cancer. *J Nutr*, **2006**, 136, 166-171.

REFERENCIAS

Baliga MS, Meleth S, Katiyar SK. Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells in vitro and in vivo systems. *Clin Cancer Res*, **2005**, 11, 1918-1927.

Band AM, Laiho M. Crosstalk of TGF-β and estrogen receptor signaling in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **2011**, 16, 109-115.

Banerjee S, Bueso-Ramos C, Aggarwal BB. Suppression of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9. *Cancer Res*, **2002**, 62, 4945-4954.

Barnard ME, Boeke CE, Tamimi RM. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. *Biochim Biophys Acta*, **2015**, 1856, 73-85.

Bastos P, Gomes T, Ribeiro L. Catechol-*O*-methyltransferase (COMT): an update on its role in cancer, neurological and cardiovascular diseases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **2017**, 173, 1-39.

Basu AK. DNA damage, mutagenesis and cancer. *Int J Mol Sci*, **2018**, 19, 970.

Basu P, Maier C. Phytoestrogens and breast cancer: in vitro anticancer activities of isoflavones, lignans, coumestans, stilbenes and their analogs and derivatives. *Biomed Pharmacother*, **2018**, 107, 1648-1666.

Bates SE. Clinical Applications of serum tumor markers. *Annals of Internal Medicine*, **1991**, 115, 623.

Bayet-Robert M, Kwiatkowski F, Leheurteur M, Gachon F, Planchat E, Abrial C, Mouret-Reynier MA, Durando X, Barthomeuf C, Chollet P. Phase I dose escalation trial of docetaxel plus curcumin in patients with advanced and metastatic breast cancer. *Cancer Biol Ther*, **2010**, 9, 8-14.

Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr*, **2003**, 133, 3248S-3254S.

Begg CB. On the use of familial aggregation in population-based case probands for calculating penetrance. *J Natl Cancer Inst*, **2002**, 94, 1221-1226.

Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*, **2005**, 37, 961-976.

Berger AK, Cortese GP, Amodeo KD, Weihofen A, Letai A, LaVoie MJ. Parkin selectively alters the intrinsic threshold for mitochondrial cytochrome c release. *Hum Mol Genet*, **2009**, 18, 4317-4328.

Bergman Jungestrom M, Thompson LU, Dabrosin C. Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis, and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts in vivo. *Clin Cancer Res*, **2007**, 13, 1061-1067.

Bernet L, Piñero A, Vidal-Sicart S, Peg V, Giménez J, Algaraf M, Duenas B, Tresserra F, Canoi R, Cordero JM, Navarrok B, Torról B, Pardo R, Martínez Ramos D, Moreno Elola A, Vallejos V, Vázquez C, Alvarez Benitor M, Raya Povedanor JL, Carreira Gómez C, Galobardes Monget J, Iglesias E, Fuster C, Lluch A, Martinez Agulló A. Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Rev Senol Patol Mamar*, **2014**, 27, 43-53.

Bhat KP, Lantvit D, Christov K, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models. *Cancer Res*, **2001**, 61, 7456-7463.

Billingsley HE, Carbone S, Lavie CJ. Dietary fats and chronic noncommunicable diseases. *Nutrients*, **2018**, 10, 1385.

Bimonte S, Barbieri A, Palma G, Rea D, Luciano A, D'Aiuto M, Arra C, Izzo F. Dissecting the role of curcumin in tumour growth and angiogenesis in mouse model of human breast cancer. *Biomed Res Int*, **2015**, 2015, 878134.

Birkved FK, Mortensen A, Peñalvo JL, Lindecrona RH, Sørensen IK. Investigation into the cancer protective effect of flaxseed in Tg.NK (MMTV/c-neu) mice, a murine mammary tumor model. *Genes Nutr*, **2011**, 6, 403-411.

Bishayee A, Mandal A, Bhattacharyya P, Bhatia D. Pomegranate exerts chemoprevention of experimentally induced mammary tumorigenesis by suppression of cell proliferation and induction of apoptosis. *Nutr Cancer*, **2016**, 68, 120-130.

Biswas DK, Shi Q, Baily S, Strickland I, Ghosh S, Pardee AB, Iglehart JD. NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2004**, 101, 10137-10142.

Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, Rugo HS, Sledge G, Aktan G, Ellis C, Florance A, Vukelja S, Bischoff J, Baselga J, O'Shaughnessy J. Overall survival benefit with lapatinib in combination with trastuzumab for patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer: final results from the EGF104900 Study. *J Clin Oncol*, **2012**, 30, 2585-2592.

Bode LM, Bunzel D, Huch M, Cho GS, Ruhland D, Bunzel M, Bub A, Franz CM, Kulling SE. In vivo and in vitro metabolism of *trans*-resveratrol by human gut microbiota. *Am J Clin Nutr*, **2013**, 97, 295-309.

Bolca S, Li J, Nikolic D, Roche N, Blondeel P, Possemiers S, De Keukeleire D, Bracke M, Heyerick A, van Breemen RB, Depypere H. Disposition of hop prenylflavonoids in human breast tissue. *Mol Nutr Food Res*, **2010b**, 54 Suppl 2, S284-294.

Bolca S, Urpí-Sardá M, Blondeel P, Roche N, Vanhaecke L, Possemiers S, Al-Maharik N, Botting N, De Keukeleire D, Bracke M, Heyerick A, Manach C, Depypere H. Disposition of soy isoflavones in normal human breast tissue. *Am J Clin Nutr*, **2010a**, 91, 976-984.

REFERENCIAS

Bolca S, Van de Wiele T, Possemiers S. Gut metabotypes govern health effects of dietary polyphenols. *Curr Opin Biotechnol*, **2013**, 24, 220-225.

Bolca S, Wyns C, Possemiers S, Depypere H, De Keukeleire D, Bracke M, Verstraete W, Heyerick A. Cosupplementation of isoflavones, prenylflavonoids, and lignans alters human exposure to phytoestrogen-derived 17β-estradiol equivalents. *J Nutr*, **2009**, 139, 2293-2300.

Boocock DJ, Faust GE, Patel KR, Schinas AM, Brown VA, Ducharme MP, Booth TD, Crowell JA, Perloff M, Gescher AJ, Steward WP, Brenner DE. Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2007**, 16, 1246-1252.

Borges G, Mullen W, Mullan A, Lean ME, Roberts SA, Crozier A. Bioavailability of multiple components following acute ingestion of a polyphenol-rich juice drink. *Mol Nutr Food Res*, **2010,** 54, Suppl 2, S268-277.

Bowers LW, Lineberger CG, Ford NA, Rossi EL, Punjala A, Camp KK, Kimler BK, Fabian CJ, Hursting SD. The flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside decreases local inflammation, suppresses NFκB signaling, and inhibits mammary tumor growth. *Breast Cancer Res Treat*, **2019**, 173, 545-557.

Boyd NF, Martin LJ, Yaffe MJ, Minkin S. Mammographic density and breast cancer risk: current understanding and future prospects. *Breast Cancer Res*, **2011**, 13, 223.

Bracken MB. Why animal studies are often poor predictors of human reactions to exposure. *J R Soc Med*, **2009**, 102, 120-122.

Bradbury KE, Appleby PN, Key TJ. Fruit, vegetable, and fiber intake in relation to cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Am J Clin Nutr*, **2014**, 100, 394S-398S.

Brancato B, Crocetti E, Bianchi S, Catarzi S, Risso GG, Bulgaresi P, Piscioli F, Scialpi M, Ciatto S, Houssami N. Accuracy of needle biopsy of breast lesions visible on ultrasound: audit of fine needle versus core needle biopsy in 3233 consecutive samplings with ascertained outcomes. *Breast*, **2012**, 21, 449-54.

Braune A, Blaut M. Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. *Gut Microbes*, **2016**, 7, 216-234.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*, **1998**, 56, 317-333.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, **2018**, 68, 394.

Breastcancer.org, [https://www.breastcancer.org/]. Ardmore, (PA). Terapia de radiación [actualizada el 26 de septiembre de 2018; acceso 15 de mayo de 2020]. Disponible en: https://www.breastcancer.org/es/tratamiento/radiacion

Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat*, **2017**, 165, 193-200.

Brooker S, Martin S, Pearson A, Bagchi D, Earl J, Gothard L, Hall E, Porter L, Yarnold J. Double-blind, placebo-controlled, randomised phase II trial of IH636 grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) in patients with radiation-induced breast induration. *Radiother Oncol*, **2006**, 79, 45-51.

Brown VA, Patel KR, Viskaduraki M, Crowell JA, Perloff M, Booth TD, Vasilinin G, Sen A, Schinas AM, Piccirilli G, Brown K, Steward WP, Gescher AJ, Brenner DE. Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Res*, **2010**, 70, 9003-9011.

Burotto M, Chiou VL, Lee JM, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer*, **2014**, 120, 3446-3456.

Burstein HJ. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med*, **2005**, 353, 1652-1654.

Butt G, Shahwar D, Qureshi MZ, Attar R, Akram M, Birinci Y, Karatoprak GS, Gasparri ML, Farooqi AA. Role of mTORC1 and mTORC2 in breast cancer: therapeutic targeting of mTOR and its partners to overcome metastasis and drug resistance. *Adv Exp Med Biol*, **2019**, 1152, 283-292.

Cadoo KA, Fornier MN, Morris PG. Biological subtypes of breast cancer: current concepts and implications for recurrence patterns. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, **2013**, 57, 312-321.

Cai Y, Zhou H, Zhu Y, Sun Q, Ji Y, Xue A, Wang L, Chen H, Li C, Luo T, Deng H. Elimination of senescent cells by β-galactosidase-targeted prodrug attenuates inflammation and restores physical function in aged mice. *Cell Res*, **2020**, 30, 574-589.

Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet*, **2008**, 124, 31-42.

Campisi J, d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Rev Mol Cell Biol*, **2007**, 8, 729-740.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, **2012**, 490, 61-70.

Castelló A, Boldo E, Pérez-Gómez B, Lope V, Altzibar JM, Martín V, Castaño-Vinyals G, Guevara M, Dierssen-Sotos T, Tardón A, Moreno V, Puig-Vives M, Llorens-Ivorra C, Alguacil J, Gómez-Acebo I, Castilla J, Gràcia-Lavedán E, Dávila-Batista V, Kogevinas M, Aragonés N, Amiano P, Pollán M. Adherence to the Western, Prudent and Mediterranean dietary patterns and breast cancer risk: MCC-Spain study. *Maturitas*, **2017**, 103, 8-15.

Castelló A, Pollán M, Buijsse B, Ruiz A, Casas AM, Baena-Cañada JM, Lope V, Antolín S, Ramos M, Muñoz M, Lluch A, de Juan-Ferré A, Jara C, Jimeno MA, Rosado P, Díaz E, Guillem

V, Carrasco E, Pérez-Gómez B, Vioque J, Boeing H, Martín M; GEICAM researchers. Spanish Mediterranean diet and other dietary patterns and breast cancer risk: case-control EpiGEICAM study. *Br J Cancer*, **2014**, 111, 1454-1462.

Castillo-Pichardo L, Cubano LA, Dharmawardhane S. Dietary grape polyphenol resveratrol increases mammary tumor growth and metastasis in immunocompromised mice. *BMC Complement Altern Med*, **2013**, 13, 6.

Castillo-Pichardo L, Dharmawardhane SF. Grape polyphenols inhibit Akt/mammalian target of rapamycin signaling and potentiate the effects of Gefitinib in breast cancer. *Nutr Cancer*, **2012**, 64, 1058–1069.

Castillo-Pichardo L, Martínez-Montemayor MM, Martínez JE, Wall KM, Cubano LA, Dharmawardhane S. Inhibition of mammary tumor growth and metastases to bone and liver by dietary grape polyphenols. *Clin Exp Metastasis*, **2009**, 26, 505-516.

Catsburg C, Kim RS, Kirsh VA, Soskolne CL, Kreiger N, Rohan TE. Dietary patterns and breast cancer risk: a study in 2 cohorts. *Am J Clin Nutr*, **2015**, 101, 817-823.

Cerdá B, Periago PM, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Identification of urolithin A as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds. *J Agric Food Chem*, **2005**, 53, 5571-5576.

Cetó X, Serrano N, Aragó M, Gámez A, Esteban M, Díaz-Cruz JM, Núñez O. Determination of HPLC-UV fingerprints of Spanish paprika (*Capsicum annuum* L.) for its classification by linear discriminant analysis. *Sensors (Basel)*, **2018**, 18, 4479.

Chai Y, Lee HJ, Shaik AA, Nkhata K, Xing C, Zhang J, Jeong SJ, Kim SH, Lu J. Penta-O-galloyl-beta-D-glucose induces G1 arrest and DNA replicative S-phase arrest independently of cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, cyclin-dependent kinase inhibitor 1B and P53 in human breast cancer cells and is orally active against triple negative xenograft growth. *Breast Cancer Res*, **2010**, 12, R67.

Chakravarty D, Nair SS, Santhamma B, Nair BC, Wang L, Bandyopadhyay A, Agyin JK, Brann D, Sun LZ, Yeh IT, Lee FY, Tekmal RR, Kumar R, Vadlamudi RK. Extranuclear functions of ER impact invasive migration and metastasis by breast cancer cells. *Cancer Res*, **2010**, 70, 4092-4101.

Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR, Doerge DR. Mass spectrometric determination of genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr*, **2000**, 130, 1963-1970.

Chang YL, Hsu YJ, Chen Y, Wang YW, Huang SM. Theophylline exhibits anti-cancer activity via suppressing SRSF3 in cervical and breast cancer cell lines. *Oncotarget*, **2017**, 8, 101461-101474.

Chatterjee M, Das S, Janarthan M, Ramachandran HK, Chatterjee M. Role of 5-lipoxygenase in resveratrol mediated suppression of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats. *Eur J Pharmacol*, **2011**, 668, 99-106.

Chen HS, Bai MH, Zhang T, Li GD, Liu M. Ellagic acid induces cell cycle arrest and apoptosis through TGF-β/Smad3 signaling pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Int J Oncol*, **2015**, 46, 1730-1738.

Chen J, Hui E, Ip T, Thompson LU. Dietary flaxseed enhances the inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) in nude mice. *Clin Cancer Res*, **2004**, 10, 7703-7711.

Chen J, Power KA, Mann J, Cheng A, Thompson LU. Dietary flaxseed interaction with tamoxifen induced tumor regression in athymic mice with MCF-7 xenografts by downregulating the expression of estrogen related gene products and signal transduction pathways. *Nutr Cancer*, **2007a**, 8, 162-170.

Chen J, Power KA, Mann J, Cheng A, Thompson LU. Flaxseed alone or in combination with tamoxifen inhibits MCF-7 breast tumor growth in ovariectomized athymic mice with high circulating levels of estrogen. *Exp Biol Med*, **2007b**, 232, 1071-1080.

Chen J, Saggar JK, Corey P, Thompson LU. Flaxseed and pure secoisolariciresinol diglucoside, but not flaxseed hull, reduce human breast tumor growth (MCF-7) in athymic mice. *J Nutr*, **2009**, 139, 2061-2066.

Chen J, Saggar JK, Corey P, Thompson LU. Flaxseed cotyledon fraction reduces tumour growth and sensitises tamoxifen treatment of human breast cancer xenograft (MCF-7) in athymic mice. *Br J Nutr*, **2011**, 105, 339-347.

Chen J, Stavro PM, Thompson LU. Dietary flaxseed inhibits human breast cancer growth and metastasis and downregulates expression of insulin-like growth factor and epidermal growth factor receptor. *Nutr Cancer*, **2002**, 43, 187-192.

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*, **2003**, 228, 951-958.

Chen J, Wang L, Thompson LU. Flaxseed and its components reduce metastasis after surgical excision of solid human breast tumor in nude mice. *Cancer Lett*, **2006**, 234, 168-175.

Chen KY, Chen CC, Chang YC, Chang MC. Resveratrol induced premature senescence and inhibited epithelial-mesenchymal transition of cancer cells via induction of tumor suppressor Rad9. *PLoS One*, **2019**, 14, e0219317.

Chen M, Rao Y, Zheng Y, Wei S, Li Y, Guo T, Yin P. Association between soy isoflavone intake and breast cancer risk for pre- and post-menopausal women: a meta-analysis of epidemiological studies. *PLoS One*, **2014**, 9, e89288.

Chiavaroli L, Viguiliouk E, Nishi SK, Blanco Mejia S, Rahelić D, Kahleová H, Salas-Salvadó J, Kendall CW, Sievenpiper JL. DASH Dietary pattern and cardiometabolic outcomes: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Nutrients*, **2019**, 11, 338.

Chim CS, Fung TK, Wong KF, Lau JS, Law M, Liang R. Methylation of INK4 and CIP/KIP families of cyclin-dependent kinase inhibitor in chronic lymphocytic leukaemia in Chinese patients. *J Clin Pathol*, **2006**, 59, 921-926.

Chin YR, Yoshida T, Marusyk A, Beck AH, Polyak K, Toker A. Targeting Akt3 signaling in triple-negative breast cancer. *Cancer Res*, **2014**, 74, 964-973.

Cho E, Chung EY, Jang HY, Hong OY, Chae HS, Jeong YJ, Kim SY, Kim BS, Yoo DJ, Kim JS, Park KH. Anti-cancer effect of cyanidin-3-glucoside from mulberry via caspase-3 cleavage and DNA fragmentation in vitro and in vivo. *Anticancer Agents Med Chem*, **2017**, 17, 1519-1525.

Choe R, Putt ME, Carlile PM, Durduran T, Giammarco JM, Busch DR, Jung KW, Czerniecki BJ, Tchou J, Feldman MD, Mies C, Rosen MA, Schnall MD, DeMichele A, Yodh AG. Optically measured microvascular blood flow contrast of malignant breast tumors. *PLoS One*, **2014**, 26, 9, e99683.

Choi YE, Park E. Curcumin enhances poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor sensitivity to chemotherapy in breast cancer cells. *J Nutr Biochem*, **2015**, 26, 1442-1447.

Chow HH, Hakim IA. Pharmacokinetic and chemoprevention studies on tea in humans. *Pharmacol Res*, **2011**, 64, 105-112.

Christy J, Priyadharshini L. Differential expression analysis of JAK/STAT pathway related genes in breast cancer. *Meta Gene*, **2018**, 16, 122-129.

Chung FL, Wang M, Rivenson A, Iatropoulos MJ, Reinhardt JC, Pittman B, Ho CT, Amin SG. Inhibition of lung carcinogenesis by black tea in Fischer rats treated with a tobacco-specific carcinogen: caffeine as an important constituent. *Cancer Res*, **1998**, 58, 4096-4101.

Chung H, Jung Y, Shin DH, Lee JY, Oh MY, Kim HJ, Jang KS, Jeon SJ, Son KH, Kong G. Anticancer effects of wogonin in both estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cell lines in vitro and in nude mice xenografts. *Int J Cancer*, **2008**, 122, 816–822.

Ciruelos E, Pascual T, Arroyo Vozmediano ML, Blanco M, Manso L, Parrilla L, Muñoz C, Vega E, Calderón MJ, Sancho B, Cortes-Funes H. The therapeutic role of fulvestrant in the management of patients with hormone receptor-positive breast cancer. *Breast*, **2014**, 23, 201-208.

Cohen LA. Effect of intact and isoflavone-depleted soy protein on NMU-induced rat mammary tumorigenesis. *Carcinogenesis*, **2000**, 21, 929-935.

Constantinou AI, Lantvit D, Hawthorne M, Xu X, van Breemen RB, Pezzuto JM. Chemopreventive effects of soy protein and purified soy isoflavones on DMBA-induced mammary tumors in female Sprague-Dawley rats. *Nutr Cancer*, **2001**, 41, 75-81.

Constantinou AI, White BE, Tonetti D, Yang Y, Liang W, Li W, van Breemen RB. The soy isoflavone daidzein improves the capacity of tamoxifen to prevent mammary tumours. *Eur J Cancer*, **2005**, 41, 647-654.

Cooper GM. Cell Cycle. En: The cell: A molecular approach (eds. Sinauer Associates). Sinauer Associates, Sunderland (MA), **2000**, pp 725-730.

Corremans R, Adão R, De Keulenaer GW, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. Update on pathophysiology and preventive strategies of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **2019**, 46, 204-215.

Cortés-Martín A , García-Villalba R , González-Sarrías A , Romo-Vaquero M , Loria-Kohen V , Ramírez-de-Molina A , Tomás-Barberán FA , Selma MV , Espín JC. The gut microbiota urolithin metabotypes revisited: the human metabolism of ellagic acid is mainly determined by aging. *Food Funct*, **2018**, 9, 4100-4106.

Cortés-Martín A, Selma MV, Espín JC, García-Villalba R. The human metabolism of nuts proanthocyanidins does not reveal urinary metabolites consistent with distinctive gut microbiota metabotypes. *Mol Nutr Food Res*, **2019**, 63, e1800819.

Cortés-Martín A, Selma MV, Tomás-Barberán FA, González-Sarrías A, Espín JC. Where to look into the puzzle of polyphenols and health? The postbiotics and gut microbiota associated with human metabotypes. *Mol Nutr Food Res*, **2020**, 64, e1900952.

Crew KD, Brown P, Greenlee H, Bevers TB, Arun B, Hudis C, McArthur HL, Chang J, Rimawi M, Vornik L, Cornelison TL, Wang A, Hibshoosh H, Ahmed A, Terry MB, Santella RM, Lippman SM, Hershman DL. Phase IB randomized, double-blinded, placebo-controlled, dose escalation study of polyphenon E in women with hormone receptor-negative breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*, **2012**, 5, 1144-1154.

Crew KD, Ho KA, Brown P, Greenlee H, Bevers TB, Arun B, Sneige N, Hudis C, McArthur HL, Chang J, Rimawi M, Cornelison TL, Cardelli J, Santella RM, Wang A, Lippman SM, Hershman DL. Effects of a green tea extract, Polyphenon E, on systemic biomarkers of growth factor signalling in women with hormone receptor-negative breast cancer. *J Hum Nutr Diet*, **2015**, 28, 272-282.

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*, **2009**, 26, 1001-1043.

Crumpton T, Seidler F, Slotkin T. Generation of reactive oxygen species by xanthine derivatives in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, **2001**, 66, 143-146.

Cui T, Zhang S, Sun H. Co-delivery of doxorubicin and pH-sensitive curcumin prodrug by transferrin-targeted nanoparticles for breast cancer treatment. *Oncol Rep*, **2017**, 37, 1253-1260.

Dabrosin C, Chen J, Wang L, Thompson LU. Flaxseed inhibits metastasis and decreases extracellular vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts. *Cancer Lett*, **2002**, 185, 31-37.

d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*, **2008**, 8, 512-522.

Dahabreh IJ, Wieland LS, Adam GP, Halladay C, Lau J, Trikalinos TA. Core needle and open surgical biopsy for diagnosis of breast lesions: an update to the 2009 report. Comparative effectiveness review No. 139. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality, **2014**.

Danielson PB. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab*, **2002**, 3, 561-597.

D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*, **2007**, 43, 348-361.

D'Archivio M, Filesi C, Varì R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int J Mol Sci*, **2010**, 11, 1321-1342.

Das B, Sarkar N, Bishayee A, Sinha D. Dietary phytochemicals in the regulation of epithelial to mesenchymal transition and associated enzymes: a promising anticancer therapeutic approach. *Semin Cancer Biol*, **2019**, 56, 196-218.

Dave B, Eason RR, Till SR, Geng Y, Velarde MC, Badger TM, Simmen RC. The soy isoflavone genistein promotes apoptosis in mammary epithelial cells by inducing the tumor suppressor PTEN. *Carcinogenesis*, **2005**, 26, 1793-1803.

David KA, Unger FT, Uhlig P, Juhl H, Moore HM, Compton C, Nashan B, Dörner A, de Weerth A, Zornig C. Surgical procedures and postsurgical tissue processing significantly affect expression of genes and EGFR-pathway proteins in colorectal cancer tissue. *Oncotarget*, **2014**, 5, 11017-11028.

Davis SR, Wahlin-Jacobsen S. Testosterone in women--the clinical significance. *Lancet Diabetes Endocrinol*, **2015**, 3, 980-992.

Davis VL, Shaikh F, Gallagher KM, Villegas M, Rea SL, Cline JM, Hughes CL. Inhibition of Neu-induced mammary carcinogenesis in transgenic mice expressing ERΔ3, a dominant negative estrogen receptor α variant. *Horm Cancer*, **2012**, 3(5-6), 227-239.

Day JK, Besch-Williford C, McMann TR, Hufford MG, Lubahn DB, MacDonald RS. Dietary genistein increased DMBA-induced mammary adenocarcinoma in wild-type, but not ERαKO, mice. *Nutr Cancer*, **2001**, 39, 226-232.

de Assis S, Warri A, Benitez C, Helferich W, Hilakivi-Clarke L. Protective effects of prepubertal genistein exposure on mammary tumorigenesis are dependent on BRCA1 expression. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*, **2011**, 4, 1436-1448.

DeKeyser JG, Shou M. Species Differences of Drug-Metabolizing Enzymes. En: Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions (Ed. Lyubimov AV). John Wiley & Sons, **2012**.

Delgado L, Fernandes I, González-Manzano S, de Freitas V, Mateus N, Santos-Buelga C. Anti-proliferative effects of quercetin and catechin metabolites. *Food Funct*, **2014**, 5, 797-803.

de Lima E Silva TC, da Silveira LTR, Fragoso MF, da Silva FRM, Martinez MF, Zapaterini JR, Diniz OHG, Scarano WR, Barbisan LF. Maternal resveratrol treatment reduces the risk of mammary carcinogenesis in female offspring prenatally exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Horm Cancer*, **2017**, 8, 286-297.

Dellafiora L, Mena P, Cozzini P, Brighenti F, Del Rio D. Modelling the possible bioactivity of ellagitannin-derived metabolites. In silico tools to evaluate their potential xenoestrogenic behavior. *Food Funct*, **2013**, 4, 1442-1451.

Delman DM, Fabian CJ, Kimler BF, Yeh H, Petroff BK. Effects of flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucosideon preneoplastic biomarkers of cancer progression in a model of simultaneous breast and ovarian cancer development. *Nutr Cancer*, **2015**, 67, 857-864.

Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*, **2013**, 18, 1818-1892.

Demaria M, O'Leary MN, Chang J, Shao L, Liu S, Alimirah F, Koenig K, Le C, Mitin N, Deal AM, Alston S, Academia EC, Kilmarx S, Valdovinos A, Wang B, de Bruin A, Kennedy BK, Melov S, Zhou D, Sharpless NE, Muss H, Campisi J. Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer Discov*, **2017**, 7, 165-176.

Deritei D, Rozum J, Ravasz Regan E, Albert R. A feedback loop of conditionally stable circuits drives the cell cycle from checkpoint to checkpoint. *Sci Rep*, **2019**, 9, 16430.

DeSantis CE, Fedewa SA, Goding Sauer A, Kramer JL, Smith RA, Jemal A. Breast cancer statistics, 2015: convergence of incidence rates between black and white women. *Cancer J Clin*, **2016**, 66, 31-42.

Deshpande SS, Ingle AD, Maru GB. Chemopreventive efficacy of curcumin-free aqueous turmeric extract in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumorigenesis. *Cancer Lett*, **1998**, 123, 35-40.

Dietz BM, Hagos GK, Eskra JN, Wijewickrama GT, Anderson JR, Nikolic D, Guo J, Wright B, Chen SN, Pauli GF, van Breemen RB, Bolton JL. Differential regulation of detoxification enzymes in hepatic and mammary tissue by hops (*Humulus lupulus*) in vitro and in vivo. *Mol Nutr Food Res*, **2013**, 57, 1055-1066.

Dietz BM, Hajirahimkhan A, Dunlap TL, Bolton JL. Botanicals and their bioactive phytochemicals for women's health. *Pharmacol Rev*, **2016**, 68, 1026-1073.

Ding R, Shi J, Pabon K, Scotto KW. Xanthines down-regulate the drug transporter ABCG2 and reverse multidrug resistance. *Mol Pharmacol*, **2012**, 81, 328-337.

Dinicola S, Pasqualato A, Cucina A, Coluccia P, Ferranti F, Canipari R, Catizone A, Proietti S, D'Anselmi F, Ricci G, Palombo A, Bizzarri M. Grape seed extract suppresses MDA-MB231 breast cancer cell migration and invasion. *Eur J Nutr*, **2014**, 53, 421-431.

D'Innocenzo S, Biagi C, Lanari M. Obesity and the Mediterranean Diet: a review of evidence of the role and sustainability of the Mediterranean diet. *Nutrients*, **2019**, 11, 1306.

Do K, Doroshow JH, Kummar S. Wee1 kinase as a target for cancer therapy. *Cell Cycle*, **2013**, 12, 3159-3164.

Dong JY, Qin LQ. Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence. A meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat*, **2011**, 125, 315-323.

D'Orsi J, Sickles EA, Mendelson EB, Morris EA. ACR BI-RADS® Atlas, Breast Imaging Reporting and Data System American College of Radiology, **2013**.

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, 95, 15665-15670.

Du G, Lin H, Wang M, Zhang S, Wu X, Lu L, Ji L, Yu L. Quercetin greatly improved therapeutic index of doxorubicin against 4T1 breast cancer by its opposing effects on HIF-1α in tumor and normal cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, **2010b**, 65, 277-287.

Du G, Lin H, Yang Y, Zhang S, Wu X, Wang M, Ji L, Lu L, Yu L, Han G. Dietary quercetin combining intratumoral doxorubicin injection synergistically induces rejection of established breast cancer in mice. *Int Immunopharmacol*, **2010a**, 10, 819-826.

Du GJ, Song ZH, Lin HH, Han X, Zhang S, Yang Y. Luteolin as a glycolysis inhibitor offers superior efficacy and lesser toxicity of doxorubicin in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **2008**, 372, 497-502.

Duffy MJ, Synnott NC, Crown J. Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker. *Breast Cancer Res Treat*, **2018**, 170, 213-219.

Duffy SW, Yen Ming-Fang A, Chen TH, Chen SL, Chui SY, Fan JJ, Smith RA, Vitak B, Tábar L. Long-term benefits of breast screening. *Breast Cancer Manage*, **2012**, 1, vol1:31-38.

El-Far AH, Darwish NHE, Mousa SA. Senescent colon and breast cancer cells induced by doxorubicin exhibit enhanced sensitivity to curcumin, caffeine, and thymoquinone. *Integr Cancer Ther*, **2020**, 19, 1534735419901160.

Emaus MJ, Peeters PH, Bakker MF, Overvad K, Tjønneland A, Olsen A, Romieu I, Ferrari P, Dossus L, Boutron-Ruault MC, Baglietto L, Fortner RT, Kaaks R, Boeing H, Trichopoulou A, Lagiou P, Trichopoulos D, Masala G, Pala V, Panico S, Tumino R, Polidoro S, Skeie G, Lund E, Weiderpass E, Quirós JR, Travier N, Sánchez MJ, Chirlaque MD, Ardanaz E, Dorronsoro M, Winkvist A, Wennberg M, Bueno-de-Mesquita HB, Khaw KT, Travis RC, Key TJ, Aune D, Gunter M, Riboli E, van Gils CH. Vegetable and fruit consumption and the risk of hormone receptor-defined breast cancer in the EPIC cohort. *Am J Clin Nutr*, **2016**, 103, 168-177.

Engeland K. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death Differ*, **2018**, 25, 114-132.

Escrich E, Moral R, Solanas M. Olive oil, an essential component of the Mediterranean diet, and breast cancer. *Public Health Nutr*, 2011, 14, 2323-2332.

Espín JC, González-Sarrías A, Tomás-Barberán FA. The gut microbiota: a key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. *Biochem Pharmacol*, **2017**, 139, 82-93.

Essmann F, Engels IH, Totzke G, Schulze-Osthoff K, Jänicke RU. Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cells to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase-3 and a caffeine-inhibitable event. *Cancer Res*, **2004**, 64, 7065-7072.

Evans A, Trimboli RM, Athanasiou A, Balleyguier C, Baltzer PA, Bick U, Camps Herrero J, Clauser P, Colin C, Cornford E, Fallenberg EM, Fuchsjaeger MH, Gilbert FJ, Helbich TH, Kinkel K, Heywang-Köbrunner SH, Kuhl CK, Mann RM, Martincich L, Panizza P, Pediconi F, Pijnappel RM, Pinker K, Zackrisson S, Forrai G, Sardanelli F; European Society of Breast Imaging (EUSOBI), with language review by Europa Donna–The European Breast Cancer Coalition. Breast ultrasound: recommendations for information to women and referring physicians by the European Society of Breast Imaging. *Insights Imaging*, **2018**, 9, 449-461.

Ezzat A, Abdelhamid AO, El Awady MK, Abd El Azeem AS, Mohammed DM. The biochemical effects of nano tamoxifen and some bioactive components in experimental breast cancer. *Biomed Pharmacother*, **2017**, 95, 571-576.

Ezzat SM, Shouman SA, Elkhoely A, Attia YM, Elsesy MS, El Senousy AS, Choucry MA, El Gayed SH, El Sayed AA, Sattar EA, El Tanbouly N. Anticancer potentiality of lignan rich fraction of six Flaxseed cultivars. *Sci Rep*, **2018**, 8, 544.

Falah RR, Talib WH, Shbailat SJ. Combination of metformin and curcumin targets breast cancer in mice by angiogenesis inhibition, immune system modulation and induction of p53 independent apoptosis. *Ther Adv Med Oncol*, **2017**, 9, 235-252.

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* (*Shangai*), **2005**, 37, 719-727.

Farvid MS, Chen WY, Michels KB, Cho E, Willett WC, Eliassen AH. Fruit and vegetable consumption in adolescence and early adulthood and risk of breast cancer: population based cohort study. *BMJ*, **2016**, 353, i2343.

Farvid MS, Chen WY, Rosner BA, Tamimi RM, Willett WC, Eliassen AH. Fruit and vegetable consumption and breast cancer incidence: repeated measures over 30 years of follow-up. *Int J Cancer*, **2019**, 144, 1496-1510.

Fauzee NJ. Taxanes: promising anti-cancer drugs. *Asian Pac J Cancer Prev*, **2011**, 12, 837-851.

Feldman NB, Gromovykh TI, Sedyakina NE, Krasnyuk II, Lutsenko SV. Cytotoxic and antitumor activity of liposomal silibinin. *BioNanoScience*, **2018**, 8, 971-976.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, **2015**, 136, E359-386.

Ferraris C, Ballestra B, Listorti C, Cappelletti V, Reduzzi C, Scaperrotta GP, Pulice I, Ferrari EGA, Folli S, Mariani L, Martelli G. Red clover and lifestyle changes to contrast menopausal symptoms in premenopausal patients with hormone-sensitive breast cancer receiving tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat*, **2020**, 180, 157-165.

Filippi-Chiela EC, Thomé MP, Bueno e Silva MM, Pelegrini AL, Ledur PF, Garicochea B, Zamin LL, Lenz G. Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells. *BMC Cancer*, **2013**, 13, 147.

Forghani P, Khorramizadeh MR, Waller EK. Silibinin inhibits accumulation of myeloid-derived suppressor cells and tumor growth of murine breast cancer. *Cancer Med*, **2014**, 3, 215-224.

Frankenfeld CL. Cardiometabolic risk and gut microbial phytoestrogen metabolite phenotypes. *Mol Nutr Food Res*, **2017**, 61(1).

Fritz W. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis*, **1998**, 19, 2151-2158.

Fritz WA, Coward L, Wang J, Lamartiniere CA. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis*, **1998**, 19, 2151-2158.

Gallo D, Giacomelli S, Cantelmo F, Zannoni GF, Ferrandina G, Fruscella E, Riva A, Morazzoni P, Bombardelli E, Mancuso S, Scambia G. Chemoprevention of DMBA-induced mammary cancer in rats by dietary soy. *Breast Cancer Res Treat*, **2001**, 69, 153-164.

Gao Y, Tollefsbol TO. Combinational proanthocyanidins and resveratrol synergistically inhibit human breast cancer cells and impact epigenetic-mediating machinery. *Int J Mol Sci*, **2018**, 19, 2204.

García-Mateos D, García-Villalba R, Marañón JA, Espín JC, Merino G, Álvarez AI. The Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) influences the levels of enterolignans and their metabolites in plasma, milk and mammary gland. *J Funct Foods*, **2017**, 35, 648-654.

García-Quiroz J, García-Becerra R, Santos-Cuevas C, Ramírez-Nava GJ, Morales-Guadarrama G, Cárdenas-Ochoa N, Segovia-Mendoza M, Prado-Garcia H, Ordaz-Rosado D, Avila E, Olmos-Ortiz A, López-Cisneros S, Larrea F, Díaz L. Synergistic antitumorigenic activity of calcitriol with curcumin or resveratrol is mediated by angiogenesis inhibition in triple negative breast cancer xenografts. *Cancers (Basel)*, **2019**, 11, 1739.

Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res*, **2002**, 4, 70-76.

Geraets L, Moonen HJ, Wouters EF, Bast A, Hageman GJ. Caffeine metabolites are inhibitors of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose)polymerase-1 at physiological concentrations. *Biochem Pharmacol*, **2006**, 72, 902-910.

Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, Christoffersson J, Chaabane W, Moghadam AR, Kashani HH, Hashemi M, Owji AA, Łos MJ. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*, **2014**, 112, 24-49.

Gilani GS, Farmer C, Dyck M, Robertson P, Dahiya J, Sepehr E, Fan L, Nicolidakis H, Curran I, Cooke GM. Distribution of isoflavones in samples of serum, liver and mammary glands of rats or pigs fed dietary isoflavones. *Ann Nutr Metab*, **2011**, 58, 171-180.

Giménez-Bastida JA, Ávila-Gálvez MÁ, Espín JC, González-Sarrías A. The gut microbiota metabolite urolithin A, but not other relevant urolithins, induces p53-dependent cellular senescence in human colon cancer cells. *Food Chem Toxicol*, **2020**, 139, 111260.

Giménez-Bastida JA, González-Sarrías A, Larrosa M, Tomás-Barberán F, Espín JC, García-Conesa MT. Ellagitannin metabolites, urolithin A glucuronide and its aglycone urolithin A, ameliorate TNF-α-induced inflammation and associated molecular markers in human aortic endothelial cells. *Mol Nutr Food Res*, **2012**, 56, 784-796.

Giménez-Bastida JA, González-Sarrías A, Vallejo F, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Hesperetin and its sulfate and glucuronide metabolites inhibit TNF-α induced human aortic endothelial cell migration and decrease plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels. *Food Funct*, **2016**, 7, 118-126.

Gire V, Dulic V. Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle*, **2015**, 14, 297-304.

Glaser R, Dimitrakakis C. Testosterone and breast cancer prevention. *Maturitas*, **2015**, 82, 291-295.

GLOBOCAN 2018 (WHO). Graph production: IARC. Disponible en: (http://gco.iarc.fr/today).

Godfray HCJ, Aveyard P, Garnett T, Hall JW, Key TJ, Lorimer J, Pierrehumbert RT, Scarborough P, Springmann M, Jebb SA. Meat consumption, health, and the environment. *Science*, **2018**, 361, eaam5324.

Godwin P, Baird AM, Heavey S, Barr MP, O'Byrne KJ, Gately K. Targeting nuclear factor-kappa B to overcome resistance to chemotherapy. *Front Oncol*, **2013**, 3, 120.

Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem*, **2003**, 36, 79-87.

Golunski G, Woziwodzka A, Piosik J. Potential use of pentoxifylline in cancer therapy. *Curr Pharm Biotechnol*, **2018**, 19, 206-216.

Gómez Hernández J, Soliva Martínez D, Jean Pierre V, Hernández Muñoz L, Catalá Rubio E y Blanco López ME. Carcinoma lobulillar infiltrante de mama: de la sutileza al diagnóstico. *Radiología*, **2018**, 60 (Espec Cong): 943.

González-Sarrías A, Azorín-Ortuño M, Yáñez-Gascón MJ, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT, Espín JC. Dissimilar in vitro and in vivo effects of ellagic acid and its microbiota-derived metabolites, urolithins, on the cytochrome P450 1A1. *J Agric Food Chem*, **2009**, 57, 5623-5632.

González-Sarrías A, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Non-extractable polyphenols produce gut microbiota metabolites that persist in circulation and show anti-inflammatory and free radical scavenging effects. *Trends Food Sci Technol*, **2017a**, 69, 281-288.

González-Sarrías A, Giménez-Bastida J, García-Conesa MT, Gómez-Sánchez MB, García-Talavera N, Gil-Izquierdo A, Sánchez-Álvarez C, Fontana-Compiano LO, Morga-Egea JP, Pastor-Quirante FA, Martínez-Diaz F, Tomás-Barberán FA. Occurrence of urolithins, gut microbiota ellagic acid metabolites, and proliferation markers expression response in human prostate gland upon consumption of walnuts and pomegranate juice. *Mol Nutr Food Res*, **2010**, 54, 311-322.

González-Sarrías A, Giménez-Bastida JA, Núñez-Sánchez MÁ, Larrosa M, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Phase-II metabolism limits the antiproliferative activity of urolithins in human colon cancer cells. *Eur J Nutr*, **2014**, 53, 853-864.

González-Sarrías A, Miguel V, Merino G, Lucas R, Morales JC, Tomás-Barberán F, Alvarez AI, Espín JC. The gut microbiota ellagic acid-derived metabolite urolithin A and its sulfate conjugate are substrates for the drug efflux transporter breast cancer resistance protein (ABCG2/BCRP). *J Agric Food Chem*, **2013**, 61, 4352-4359.

González-Sarrías A, Núñez-Sánchez MÁ, García-Villalba R, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Antiproliferative activity of the ellagic acid-derived gut microbiota isourolithin A and comparison with its urolithin A isomer: the role of cell metabolism. *Eur J Nutr*, **2017b**, 56, 831-841.

González-Sarrías A, Núñez-Sánchez MÁ, Tomé-Carneiro J, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT, Espín JC. Comprehensive characterization of the effects of ellagic acid and urolithins on colorectal cancer and key-associated molecular hallmarks: microRNA cell specific induction of CDKN1A (p21) as a common mechanism involved. *Mol Nutr Food Res*, **2016**, 60, 701-716.

Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, Campisi J, Collado M, Evangelou K, Ferbeyre G, Gil J, Hara E, Krizhanovsky V, Jurk D, Maier AB, Narita M, Niedernhofer L, Passos JF, Robbins PD, Schmitt CA, Sedivy J, Vougas K, von Zglinicki T, Zhou D, Serrano M, Demaria M. Cellular senescence: defining a path forward. *Cell*, **2019**, 179, 813-827.

Griffiths K, Wilson DW, Singh RB, De Meester F. Effect of dietary phytoestrogens on human growth regulation: imprinting in health & disease. *Indian J Med Res*, **2014**, 140, 82-90.

Grosso G, Bella F, Godos J, Sciacca S, Del Rio D, Ray S, Giovannucci EL. Possible role of diet in cancer: systematic review and multiple meta-analyses of dietary patterns, lifestyle factors, and cancer risk. *Nutr. Res*, **2017**, 75, 405-419.

Grupo de Investigación en Cáncer de Mama (GEICAM). Infografía de los 5 pasos de autoexploración de mama. Disponible en: https://www.geicam.org/

Gu JW, Makey KL, Tucker KB, Chinchar E, Mao X, Pei I, Thomas EY, Miele L. EGCG, a major green tea catechin suppresses breast tumor angiogenesis and growth via inhibiting the activation of HIF-1α and NFκB, and VEGF expression. *Vasc Cell*, **2013**, 5, 9.

Gu L, Laly M, Chang HC, Prior RL, Fang N, Ronis MJ, Badger TM. Isoflavone conjugates are underestimated in tissues using enzymatic hydrolysis. *J Agric Food Chem*, **2005**, 53, 6858-6863.

Guzmán C, Bagga M, Kaur A, Westermarck J, Abankwa D. ColonyArea: an ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. *PLoS One*, **2014**, 9, e92444.

Hakkak R, Korourian S, Shelnutt 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, 113-117.

Hakkak R, Shaaf S, Jo CH, Macleod S, Korourian S. Effects of high-isoflavone soy diet vs. casein protein diet and obesity on DMBA-induced mammary tumor development. *Oncol Lett*. **2011**, 2, 29-36.

Han B, Peng X, Cheng D, Zhu Y, Du J, Li J, Yu X. Delphinidin suppresses breast carcinogenesis through the HOTAIR /micro RNA-34a axis. *Cancer Sci*, **2019**, 110, 3089–3097.

Han J, Kim S, Yang J, Nam SJ, Lee JE. TPA-induced p21 expression augments G2/M arrest through a p53-independent mechanism in human breast cancer cells. *Oncol Rep*, **2012**, 27, 517-522.

Haque MM, Desai KV. Pathways to Endocrine Therapy Resistance in Breast Cancer. *Front Endocrinol* (*Lausanne*), **2019**, 10, 573.

Hardman WE, Primerano DA, Legenza MT, Morgan J, Fan J, Denvir J. Dietary walnut altered gene expressions related to tumor growth, survival, and metastasis in breast cancer patients: a pilot clinical trial. *Nutr Res*, **2019**, 66, 82-94.

Haricharan S, Li Y. STAT signaling in mammary gland differentiation, cell survival and tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol*, **2014**, 25, 382, 560-569.

Harrelson JP, Lee MW. Expanding the view of breast cancer metabolism: promising molecular targets and therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther*, **2016**, 167, 60-73.

Hashemi-Niasari F, Rabbani-Chadegani A, Razmi M, Fallah S. Synergy of theophylline reduces necrotic effect of berberine, induces cell cycle arrest and PARP, HMGB1, Bcl-2 family

mediated apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biomed Pharmacother*, **2018**, 106, 858-867.

Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*, **2014**, 2014, 150845.

Hayashi N, Niikura N, Masuda N, Takashima S, Nakamura R, Watanabe K, Kanbayashi C, Ishida M, Hozumi Y, Tsuneizumi M, Kondo N, Naito Y, Honda Y, Matsui A, Fujisawa T, Oshitanai R, Yasojima H, Yamauchi H, Saji S, Iwata H. Prognostic factors of HER2-positive breast cancer patients who develop brain metastasis: a multicenter retrospective analysis. *Breast Cancer Res Treat*, **2015**, 149, 277-284.

Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, **1961**, 25, 585-621.

Heath AK, Muller DC, van den Brandt PA, Papadimitriou N, Critselis E, Gunter M, Vineis P, Weiderpass E, Fagherazzi G, Boeing H, Ferrari P, Olsen A, Tjønneland A, Arveux P, Boutron-Ruault MC, Mancini FR, Kühn T, Turzanski-Fortner R, Schulze MB, Karakatsani A, Thriskos P, Trichopoulou A, Masala G, Contiero P, Ricceri F, Panico S, Bueno-de-Mesquita B, Bakker MF, van Gils CH, Olsen KS, Skeie G, Lasheras C, Agudo A, Rodríguez-Barranco M, Sánchez MJ, Amiano P, Chirlaque MD, Barricarte A, Drake I, Ericson U, Johansson I, Winkvist A, Key T, Freisling H, His M, Huybrechts I, Christakoudi S, Ellingjord-Dale M, Riboli E, Tsilidis KK, Tzoulaki I. Nutrient-wide association study of 92 foods and nutrients and breast cancer risk. *Breast Cancer Res*, **2020**, 22, 5.

Heemskerk-Gerritsen BA, Menke-Pluijmers MB, Jager A, Tilanus-Linthorst MM, Koppert LB, Obdeijn IM, van Deurzen CH, Collée JM, Seynaeve C, Hooning MJ. Substantial breast cancer risk reduction and potential survival benefit after bilateral mastectomy when compared with surveillance in healthy BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a prospective analysis. *Ann Oncol*, **2013**, 24, 2029-2035.

Heiss EH, Schilder YD, Dirsch VM. Chronic treatment with resveratrol induces redox stress-and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells. *J Biol Chem*, **2007**, 282, 26759-26766.

Hevir N, Trošt N, Debeljak N, Rižner TL. Expression of estrogen and progesterone receptors and estrogen metabolizing enzymes in different breast cancer cell lines. *Chem Biol Interact*, **2011**, 191, 206-216.

Hilakivi-Clarke L, Cho E, Cabanes A, DeAssis S, Olivo S, Helferich W, Lippman ME, Clarke R. Dietary modulation of pregnancy estrogen levels and breast cancer risk among female rat offspring. *Clin Cancer Res*, **2002**, 8, 3601-3610.

Hiraoka D, Hosoda E, Chiba K, Kishimoto T. SGK phosphorylates Cdc25 and Myt1 to trigger cyclin B-Cdk1 activation at the meiotic G2/M transition. *J Cell Biol*, **2019**, 218, 3597-3611.

Hirose M, Akagi K, Hasegawa R, Yaono M, Satoh T, Hara Y, Wakabayashi K, Ito N. Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine (PhIP)-induced

mammary gland carcinogenesis by antioxidants in F344 female rats. *Carcinogenesis*, **1995**, 16, 217-221.

Hirose M, Hoshiya T, Akagi K, Futakuchi M, Ito N. Inhibition of mammary gland carcinogenesis by green tea catechins and other naturally occurring antioxidants in female Sprague-Dawley rats pretreated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Cancer Lett*, **1994**, 83(1–2), 149-156.

Hirose M, Masuda A, Fukushima S, Ito N. Effects of subsequent antioxidant treatment on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated carcinogenesis of the mammary gland, ear duct and forestomach in Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis*, **1988**, 9, 101-104.

Hirose M, Nishikawa A, Shibutani M, Imai T, Shirai T. Chemoprevention of heterocyclic amine-induced mammary carcinogenesis in rats. *Environ Mol Mutagen*, **2002**, 39(2–3), 271-278.

Hirsh L, Dantes A, Suh BS, Yoshida Y, Hosokawa K, Tajima K, Kotsuji F, Merimsky O, Amsterdam A. Phosphodiesterase inhibitors as anti-cancer drugs. *Biochem Pharmacol*, **2004**, 68, 981-988.

Hobbs GA, Der CJ, Rossman KL. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci*, **2016**, 129, 1287-1292.

Hollman PC. Unravelling of the health effects of polyphenols is a complex puzzle complicated by metabolism. *Arch Biochem Biophys*, **2014**, 559, 100-105.

Hortobagyi GN, Connolly JL, D'Orsi CJ, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, Weaver DL, Winchester DJ, Giuliano A. Breast. En: Amin MB, editor. American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual. 8th edn. New York: Springer, **2017**, pp 589–636.

Hoshino J, Park EJ, Kondratyuk TP, Marler L, Pezzuto JM, van Breemen RB, Mo S, Li Y, Cushman M. Selective synthesis and biological evaluation of sulfate-conjugated resveratrol metabolites. *J Med Chem*, **2010**, 53, 5033-5043.

Howells LM, Iwuji COO, Irving GRB, Barber S, Walter H, Sidat Z, Griffin-Teall N, Singh R, Foreman N, Patel SR, Morgan B, Steward WP, Gescher A, Thomas AL, Brown K. Curcumin combined with FOLFOX chemotherapy is safe and tolerable in patients with metastatic colorectal cancer in a randomized Phase IIa trial. *J Nutr*, **2019**, 149, 1133-1139.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2017, National Cancer Institute. Bethesda, MD. SEER **2019**. Disponible en: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017

Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, **1998**, 58, 3833-3838.

Huang Y, Fang J, Lu W, Wang Z, Wang Q, Hou Y, Jiang X, Reizes O, Lathia J, Nussinov R, Eng C, Cheng F. A systems pharmacology approach uncovers wogonoside as an angiogenesis inhibitor of triple-negative breast cancer by targeting Hedgehog signaling. *Cell Chem Biol*, **2019**, 26, 1143-1158.

Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*, **2007**, 357, 39-51.

Hui C, Bin Y, Xiaoping Y, Long Y, Chunye C, Mantian M, Wenhua L. Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells in vitro and in vivo. *Nutr Cancer*, **2010**, 62, 1128-1136.

Hydbring P, Malumbres M, Sicinski P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2016**, 17, 280-292.

Ibrahim A, El-Meligy A, Fetaih H, Dessouki A, Stoica G, Barhoumi R. Effect of curcumin and Meriva on the lung metastasis of murine mammary gland adenocarcinoma. *In Vivo*, **2010**, 24, 401-408.

Inano H, Onoda M, Inafuku N, Kubota M, Kamada Y, Osawa T, Kobayashi H, Wakabayashi K. Chemoprevention by curcumin during the promotion stage of tumorigenesis of mammary gland in rats irradiated with gamma-rays. *Carcinogenesis*, **1999**, 20, 1011-1018.

Inano H, Onoda M, Inafuku N, Kubota M, Kamada Y, Osawa T, Kobayashi H, Wakabayashi K. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis*, **2000**, 21, 1835-1841.

Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). Findings from the Global Burden of Disease Study 2017. Seattle, (WA). IHME, **2018**.

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods, a Report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (NIH Publication No. 97-3981), **2003**. Disponible en: https://ntp.niehs.nih.gov/

Ioannides C, Lewis DF. Cytochromes P450 in the bioactivation of chemicals. *Curr Top Med Chem*, **2004**, 4, 1767-1788.

Ip C, Ganther HE. Combination of blocking agents and suppressing agents in cancer prevention. *Carcinogenesis*, **1991**, 12, 365-367.

Irigaray P, Newby JA, Clapp R, Hardell L, Howard V, Montagnier L, Epstein S, Belpomme D. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomed Pharmacother*, **2007**, 61, 640-658.

Ishii K, Morii N, Yamashiro H. Pertuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer: an evidence-based review of its safety, efficacy, and place in therapy. *Core Evid*, **2019**, 14, 51-70.

Islam MA, Bekele R, Vanden Berg JH, Kuswanti Y, Thapa O, Soltani S, van Leeuwen FX, Rietjens IM, Murk AJ. Deconjugation of soy isoflavone glucuronides needed for estrogenic activity. *Toxicol In Vitro*, **2015**, 29, 706-715.

Jain AK, Thanki K, Jain S. Co-encapsulation of tamoxifen and quercetin in polymeric nanoparticles: implications on oral bioavailability, antitumor efficacy, and drug-induced toxicity. *Mol Pharm*, **2013**, 10, 3459-3474.

Jain AK, Thanki K, Jain S. Novel self-nanoemulsifying formulation of quercetin: implications of pro-oxidant activity on the anticancer efficacy. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*, **2014**, 10, 959-969.

Jain S, Garg T, Kushwah V, Thanki K, Agrawal AK, Dora CP. α-Tocopherol as functional excipient for resveratrol and coenzyme Q10-loaded SNEDDS for improved bioavailability and prophylaxis of breast cancer. *J Drug Target*, **2017**, 25, 554–565.

James MI, Iwuji C, Irving G, Karmokar A, Higgins JA, Griffin-Teal N, Thomas A, Greaves P, Cai H, Patel SR, Morgan B, Dennison A, Metcalfe M, Garcea G, Lloyd DM, Berry DP, Steward WP, Howells LM, Brown K. Curcumin inhibits cancer stem cell phenotypes in ex vivo models of colorectal liver metastases, and is clinically safe and tolerable in combination with FOLFOX chemotherapy. *Cancer Lett*, **2015**, 364, 135-141.

Jana S, Mandlekar S. Role of phase II drug metabolizing enzymes in cancer chemoprevention. *Curr Drug Metab*, **2009**, 10, 595-616.

Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, **2010**, 154, 103-16.

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, **1997**, 275, 218-220.

Janssen HG, Davies IG, Richardson LD, Stevenson L. Determinants of takeaway and fast food consumption: a narrative review. *Nutr Res Rev*, **2018**, 31, 16-34.

Jayakumar J, Nirmala P, Praveen Kumar B, Kumar A. Evaluation of protective effect of myricetin, a bioflavonoid in dimethylbenz[a]anthracene-induced breast cancer in female Wistar rats. *South Asian J Cancer*, **2014**, 3, 107.

Ji S, Zheng Z, Liu S, Ren G, Gao J, Zhang Y, Li G. Resveratrol promotes oxidative stress to drive DLC1 mediated cellular senescence in cancer cells. *Exp Cell Res*, **2018**, 370, 292-302.

Jin Z, MacDonald RS. Soy isoflavones increase latency of spontaneous mammary tumors in mice. *J Nutr*, **2002**, 132, 3186-3190.

John EM, Kelsey JL. Radiation and other environmental exposures and breast cancer. *Epidemiol Rev*, **1993**, 15, 157-162.

Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. The next generation of platinum drugs: Targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery, and Pt(IV) prodrugs. *Chem Rev*, **2016**, 116, 3436-3486.

Jonkman JH, van der Boon WJ, Balant LP, Le Cotonnec JY. Food reduces the rate but not the extent of the absorption of theophylline from an aqueous solution. *Eur J Clin Pharmacol*, **1985**, 28, 225-227.

Joshi H, Press MF. Molecular Oncology of Breast Cancer. En: The Breast (Fifth Edition) Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases. (eds. Bland, KI, Edward M, Copeland EM, Klimberg S, Gradishar WJ). Elsevier, **2018**, pp 282-307 e5.

Ju YH, Allred CD, Allred KF, Karko KL, Doerge DR, Helferich WG. Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice. *J Nutr*, **2001**, 131, 2957-2962.

Ju YH, Allred KF, Allred CD, Helferich WG. Genistein stimulates growth of human breast cancer cells in a novel, postmenopausal animal model, with low plasma estradiol concentrations. *Carcinogenesis*, **2006a**, 27, 1292-1299.

Ju YH, Doerge DR, Allred KF, Allred CD, Helferich WG. Dietary genistein negates the inhibitory effect of tamoxifen on growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) cells implanted in athymic mice. *Cancer Res*, **2002**, 62, 2474-2477.

Ju YH, Doerge DR, Woodling KA, Hartman JA, Kwak J, Helferich WG. Dietary genistein negates the inhibitory effect of letrozole on the growth of aromatase-expressing estrogen-dependent human breast cancer cells (MCF-7Ca) in vivo. *Carcinogenesis*, **2008**, 29, 2162-2168.

Ju YH, Fultz J, Allred KF, Doerge DR, Helferich WG. Effects of dietary daidzein and its metabolite, equol, at physiological concentrations on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in ovariectomized athymic mice. *Carcinogenesis*, **2006b**, 27, 856-863.

Juhl H. Preanalytical aspects: a neglected issue. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, **2010**, 242, 63-66.

Jung KJ, Wallig MA, Singletary KW. Purple grape juice inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation. *Cancer Lett*, **2006**, 233, 279-288.

Jung S, Spiegelman D, Baglietto L, Bernstein L, Boggs DA, van den Brandt PA, Buring JE, Cerhan JR, Gaudet MM, Giles GG, Goodman G, Hakansson N, Hankinson SE, Helzlsouer K, Horn-Ross PL, Inoue M, Krogh V, Lof M, McCullough ML, Miller AB, Neuhouser ML, Palmer JR, Park Y, Robien K, Rohan TE, Scarmo S, Schairer C, Schouten LJ, Shikany JM, Sieri S, Tsugane S, Visvanathan K, Weiderpass E, Willett WC, Wolk A, Zeleniuch-Jacquotte A, Zhang SM, Zhang X, Ziegler RG, Smith-Warner SA. Fruit and vegetable intake and risk of breast cancer by hormone receptor status. *J Natl Cancer Inst*, **2013**, 105, 219-236.

Kaeferstein H. Forensic relevance of glucuronidation in phase-II-metabolism of alcohols and drugs. *Leg Med (Tokyo)*, **2009**, 11 Suppl 1, S22-26.

Kaga C, Takagi A, Kano M, Kado S, Kato I, Sakai M, Miyazaki K, Nanno M, Ishikawa F, Ohashi Y, Toi M. Lactobacillus casei Shirota enhances the preventive efficacy of soymilk in chemically induced breast cancer. *Cancer Sci*, **2013**, 104, 1508-1514.

Kakuyama A, Sadzuka Y. Effect of methylxanthine derivatives on doxorubicin transport and antitumor activity. *Curr Drug Metab*, **2001**, 2, 379-395.

Kale A, Gawande S, Kotwal S, Netke S, Roomi MW, Ivanov V, Niedzwiecki A, Rath M. A combination of green tea extract, specific nutrient mixture and quercetin: an effective intervention treatment for the regression of *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU)-induced mammary tumors in Wistar rats. *Oncol Lett*, **2010**, 1, 313-317.

Kang HJ, Lee SH, Price JE, Kim LS. Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB in breast cancer cells and potentiates the growth inhibitory effect of paclitaxel in a breast cancer nude mice model. *Breast J*, **2009**, 15, 223-229.

Kang HK, Choi YH, Kwon H, Lee SB, Kim DH, Sung CK, Park YI, Dong MS. Estrogenic/antiestrogenic activities of a Epimedium koreanum extract and its major components: in vitro and in vivo studies. *Food Chem Toxicol*, **2012**, 50, 2751-2759.

Kang X, Jin S, Zhang Q. Antitumor and antiangiogenic activity of soy phytoestrogen on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors following ovariectomy in Sprague-Dawley rats. *J Food Sci*, **2009**, 74, H237-242.

Karavasiloglou N, Hüsing A, Masala G, van Gils CH, Turzanski Fortner R, Chang-Claude J, Huybrechts I, Weiderpass E, Gunter M, Arveux P, Fournier A, Kvaskoff M, Tjønneland A, Kyrø C, Dahm CC, Vistisen HT, Bakker MF, Sánchez MJ, Chirlaque López MD, Santiuste C, Ardanaz E, Menéndez V, Agudo A, Trichopoulou A, Karakatsani A, La Vecchia C, Peppa E, Palli D, Agnoli C, Panico S, Tumino R, Sacerdote C, Butt ST, Borgquist S, Skeie G, Schulze M, Key T, Khaw KT, Tsilidis KK, Ellingjord-Dale M, Riboli E, Kaaks R, Dossus L, Rohrmann S, Kühn T. Adherence to the World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research cancer prevention recommendations and risk of in situ breast cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *BMC Med*, **2019**, 17, 221.

Kaur S, Greaves P, Cooke DN, Edwards R, Steward WP, Gescher AJ, Marczylo TH. Breast cancer prevention by green tea catechins and black tea theaflavins in the C3(1) SV40 T-antigen transgenic mouse model is accompanied by increased apoptosis and a decrease in oxidative DNA adducts. *J Agric Food Chem*, **2007**, 55, 3378-3385.

Kavanagh KT, Hafer LJ, Kim DW, Mann KK, Sherr DH, Rogers AE, Sonenshein GE. Green tea extracts decrease carcinogen-induced mammary tumor burden in rats and rate of breast cancer cell proliferation in culture. *J Cell Biochem*, **2001**, 82, 387-398.

Ke JY, Banh T, Hsiao YH, Cole RM, Straka SR, Yee LD, Belury MA. Citrus flavonoid naringenin reduces mammary tumor cell viability, adipose mass, and adipose inflammation in obese ovariectomized mice. *Mol Nutr Food Res*, **2017**, 61, 1600934.

Khan G, Penttinen P, Cabanes A, Foxworth A, Chezek A, Mastropole K, Yu B, Smeds A, Halttunen T, Good C, Mäkelä S, Hilakivi-Clarke L. Maternal flaxseed diet during pregnancy or lactation increases female rat offspring's susceptibility to carcinogen-induced mammary tumorigenesis. *Reprod Toxicol*, **2007**, 23, 397-406.

Khan HY, Zubair H, Faisal M, Ullah MF, Farhan M, Sarkar FH, Ahmad A, Hadi SM. Plant polyphenol induced cell death in human cancer cells involves mobilization of intracellular copper ions and reactive oxygen species generation: a mechanism for cancer chemopreventive action. *Mol Nutr Food Res*, **2014**, 58, 437-446.

Khasraw M, Bell R, Dang C. Epirubicin: is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. *Breast*, **2012**, 21, 142-9.

Kil WH, Kim SM, Lee JE, Park KS, Nam SJ. Anticancer effect of silibinin on the xenograft model using MDA-MB-468 breast cancer cells. *Ann Surg Treat Res*, **2014**, 87, 167.

Kim DW, Sovak MA, Zanieski G, Nonet G, Romieu-Mourez R, Lau AW, Hafer LJ, Yaswen P, Stampfer M, Rogers AE, Russo J, Sonenshein GE. Activation of NF-kappaB/Rel occurs early during neoplastic transformation of mammary cells. *Carcinogenesis*, **2000**, 21, 871-879.

Kinjo J, Tsuchihashi R, Morito K, Hirose T, Aomori T, Nagao T, Okabe H, Nohara T, Masamune Y. Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine. *Biol Pharm Bull*, **2004**, 27, 185-188.

Kiskova T, Demeckova V, Jendzelovska Z, Kiktava M, Venglovska K, Bohmdorfer M, Jager W, Thalhammer T. Nocturnal resveratrol administration inhibits chemically induced breast cancer formation in rats. *J Physiol Pharmacol*, **2017**, 68, 867-875.

Kisková T, Ekmekcioglu C, Garajová M, Orendáš P, Bojková B, Bobrov N, Jäger W, Kassayová M, Thalhammer T. A combination of resveratrol and melatonin exerts chemopreventive effects in *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced rat mammary carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev*, **2012**, 21, 163-170.

Kisková T, Jendželovský R, Rentsen E, Maier-Salamon A, Kokošová N, Papčová Z, Mikeš J, Orendáš P, Bojková B, Kubatka P, Svoboda M, Kajo K, Fedoročko P, Jäger W, Ekmekcioglu C, Kassayová M, Thalhammer T. Resveratrol enhances the chemopreventive effect of celecoxib in chemically induced breast cancer in rats. *Eur J Cancer Prev*, **2014**, 23, 506-513.

Korobkova EA. Effect of natural polyphenols on CYP metabolism: implications for diseases. *Chem Res Toxicol*, **2015**, 28, 1359-1390.

Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surg Oncol*, **1993**, 2, 335-340.

Kramer F, Johnson IT, Doleman JF, Lund EK. A comparison of the effects of soya isoflavonoids and fish oil on cell proliferation, apoptosis and the expression of oestrogen receptors α and β in the mammary gland and colon of the rat. *Br J Nutr*, **2008**, 102, 29-36.

Kunihiro AG, Brickey JA, Frye JB, Luis PB, Schneider C, Funk JL. Curcumin, but not curcumin-glucuronide, inhibits Smad signaling in TGFβ-dependent bone metastatic breast cancer cells and is enriched in bone compared to other tissues. *J Nutr Biochem*, **2019**, 63, 150-156.

Laerke HN, Mortensen MA, Hedemann MS, Bach Knudsen KE, Penalvo JL, Adlercreutz H. Quantitative aspects of the metabolism of lignans in pigs fed fibre-enriched rye and wheat bread. *Br J Nutr*, **2009**, 102, 985-994.

Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. En: WHO classification of tumours of the breast 4th edition. Lyon, France. International Agency for Research on Cancer, **2012**.

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, 228-238.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2014**, 15, 178-96.

Langer S, Marshall LJ, Day AJ, and Morgan MR. Flavanols and methylxanthines in commercially available dark chocolate: a study of the correlation with nonfat cocoa solids. *J Agric Food Chem*, **2011**, 59, 8435-8441.

Lapuente M, Estruch R, Shahbaz M, Casas R. Relation of fruits and vegetables with major cardiometabolic risk factors, markers of oxidation, and inflammation. *Nutrients*, **2019**, 11, 2381.

Larkin T, Price WE, Astheimer L. The key importance of soy isoflavone bioavailability to understanding health benefits. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **2008**, 48, 538-552.

Larrosa M, González-Sarrías A, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities. *J Agric Food Chem*, **2006**, 54, 1611-1620.

Lazzeroni M, Guerrieri-Gonzaga A, Gandini S, Johansson H, Serrano D, Cazzaniga M, Aristarco V, Macis D, Mora S, Caldarella P, Pagani G, Pruneri G, Riva A, Petrangolini G, Morazzoni P, DeCensi A, Bonanni B. A presurgical study of lecithin formulation of green tea extract in women with early breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*, **2017**, 10, 363-370.

Lazzeroni M, Guerrieri-Gonzaga A, Gandini S, Johansson H, Serrano D, Cazzaniga M, Aristarco V, Puccio A, Mora S, Caldarella P, Pagani G, Pruneri G, Riva A, Petrangolini G, Morazzoni P, DeCensi A, Bonanni B. A presurgical study of oral silybin-phosphatidylcholine in patients with early breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*, **2016**, 9, 89-95.

Lee CH, Dershaw DD, Kopans D, Evans P, Monsees B, Monticciolo D, Brenner RJ, Bassett L, Berg W, Feig S, Hendrick E, Mendelson E, D'Orsi C, Sickles E, Burhenne LW. Breast cancer screening with imaging: recommendations from the Society of Breast Imaging and the ACR on the use of mammography, breast MRI, breast ultrasound, and other technologies for the detection of clinically occult breast cancer. *J Am Coll Radiol*, **2010**, 7, 18-27.

Lee CJ, Wilson L, Jordan MA, Nguyen V, Tang J, Smiyun G. Hesperidin suppressed proliferations of both human breast cancer and androgen-dependent prostate cancer cells. *Phytother Res*, **2010**, 24 Suppl 1, S15-19.

Lee EJ, Oh SY, Sung MK. Luteolin exerts anti-tumor activity through the suppression of epidermal growth factor receptor-mediated pathway in MDA-MB-231 ER-negative breast cancer cells. *Food Chem Toxicol*, **2012**, 50, 4136-4143.

Lee HH, Jung J, Moon A, Kang H, Cho H. Antitumor and anti-invasive effect of apigenin on human breast carcinoma through suppression of IL-6 expression. *Int J Mol Sci*, **2019**, 20, 3143.

Lee HJ, Seo NJ, Jeong SJ, Park Y, Jung DB, Koh W, Lee HJ, Lee EO, Ahn KS, Ahn KS, Lü J, Kim SH. Oral administration of penta-O-galloyl- -D-glucose suppresses triple-negative breast cancer xenograft growth and metastasis in strong association with JAK1-STAT3 inhibition. *Carcinogenesis*, **2011**, 32, 804-811.

Lee JJ, Loh K, Yap Y. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer Biol Med*, **2015**, 12, 342-354.

Lee S, Medina D, Tsimelzon A, Mohsin SK, Mao S, Wu Y, Allred DC. Alterations of gene expression in the development of early hyperplastic precursors of breast cancer. *Am J Pathol*, **2007**, 171, 252-262.

Lee S, Schmitt CA. The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat Cell Biol*, **2019**, 21, 94-101.

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*, **2011**, 121, 2750-2767.

Lewinska A, Adamczyk-Grochala J, Kwasniewicz E, Deregowska A, Wnuk M. Diosmin-induced senescence, apoptosis and autophagy in breast cancer cells of different p53 status and ERK activity. *Toxicology Letters*, **2017**, 265, 117-130.

Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, **2014**, 6, 6020-6047.

Li F, Chow S, Cheung W, Chan FL, Chen S, Leung LK. The citrus flavonone hesperetin prevents letrozole-induced bone loss in a mouse model of breast cancer. *J Nutr Biochem*, **2013**, 24, 1112-1116.

Li F, Wong TY, Lin SM, Chow S, Cheung WH, Chan FL, Chen S, Leung LK. Coadministrating luteolin minimizes the side effects of the aromatase inhibitor letrozole. *J Pharmacol Exp Ther*, **2014**, 351, 270-277.

Li H, Yang B, Huang J, Xiang T, Yin X, Wan J, Luo F, Zhang L, Li H, Ren G. Naringin inhibits growth potential of human triple-negative breast cancer cells by targeting β-catenin signaling pathway. *Toxicol Lett*, **2013**, 220, 219-228.

Li J, Li K, Gao J, Guo X, Lu M, Li Z, et al. Maternal exposure to an n-3 polyunsaturated fatty acid diet decreases mammary cancer risk of female offspring in adulthood. *Food Funct*, **2018**, 9, 5768-5777.

Li Y, Li S, Meng X, Gan RY, Zhang JJ, Li HB. Dietary natural products for prevention and treatment of breast cancer. *Nutrients*, **2017**, 9, 728.

Li Y, Meeran SM, Patel SN, Chen H, Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenetic reactivation of estrogen receptor-α (ERα) by genistein enhances hormonal therapy sensitivity in ERα-negative breast cancer. *Mol Cancer*, **2013**, 12, 9.

Li Y, Wu Y, Abbatiello TC, Wu WL, Kim JR, Sarkissyan M, Sarkissyan S, Chung SS, Elshimali Y, Vadgama JV. Slug contributes to cancer progression by direct regulation of ERα signaling pathway. *Int J Oncol*, **2015**, 46, 1461-1472.

Liang L, Liu X, He J, Shao Y, Liu J, Wang Z, Xia L, Han T, Wu P. Cyanidin-3-glucoside induces mesenchymal to epithelial transition via activating Sirt1 expression in triple negative breast cancer cells. *Biochimie*, **2019**, 162, 107-115.

Lin YJ, Hou YC, Lin CH, Hsu YA, Sheu JJ, Lai CH, Chen BH, Lee Chao PD, Wan L, Tsai FJ. Puerariae radix isoflavones and their metabolites inhibit growth and induce apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **2009**, 378, 683-688.

Lindahl G, Saarinen N, Abrahamsson A, Dabrosin C. Tamoxifen, flaxseed, and the lignan enterolactone increase stroma- and cancer cell-derived IL-1Ra and decrease tumor Angiogenesis in estrogen-dependent breast cancer. *Cancer Res*, **2011**, 71, 51-60.

Lippman ME. Cáncer de mama. En: Harrison Principios de Medicina Interna. Vol.1, México D.F. Ed. Mc Graw-Hill, **2016**, pp 1150-1058.

Liu B, Edgerton S, Yang X, Kim A, Ordonez-Ercan D, Mason T, Alvarez K, McKimmey C, Liu N, Thor A. Low-dose dietary phytoestrogen abrogates tamoxifen-associated mammary tumor prevention. *Cancer Res*, **2005**, 65, 879-886.

Liu G, Khanna V, Kirtane A, Grill A, Panyam J. Chemopreventive efficacy of oral curcumin: a prodrug hypothesis. *FASEB J*, **2019**, 33, 9453-9465.

Liu W, Xu J, Liu Y, Yu X, Tang X, Wang Z, Li X. Anthocyanins potentiate the activity of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Med Rep*, **2014**, 10, 1921-1926.

Losada-Echeberría M, Herranz-López M, Micol V, Barrajón-Catalán E. Polyphenols as promising drugs against main breast cancer signatures. *Antioxidants (Basel)*, **2017**, 6, 88.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **1951**, 193, 265-275.

Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C,

Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo JP, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nasseri K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA 3rd, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De León FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Yip P, Zabetian A, Zheng ZJ, Lopez AD, Murray CJ, AlMazroa MA, Memish ZA. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, **2012**, 380, 2095-2128.

Lubet RA, Yang CS, Lee MJ, Hara Y, Kapetanovic IM, Crowell JA, Steele VE, Juliana MM, Grubbs CJ. Preventive effects of polyphenon E on urinary bladder and mammary cancers in rats and correlations with serum and urine levels of tea polyphenols. *Mol Cancer Ther*, **2007**, 6, 2022-2028.

Lucas R, Alcantara D, Morales JC. A concise synthesis of glucuronide metabolites of urolithin-B, resveratrol, and hydroxytyrosol. *Carbohydr Res*, **2009**, 344, 1340-1346.

Luijten M, Verhoef A, Dormans JA, Beems RB, Cremers HW, Nagelkerke NJ, Adlercreutz H, Peñalvo JL, Piersma AH. Modulation of mammary tumor development in Tg.NK (MMTV/c-neu) mice by dietary fatty acids and life stage-specific exposure to phytoestrogens. *Reprod Toxicol*, **2007**, 23, 407-413.

Luo H, Yang A, Schulte BA, Wargovich MJ, Wang GY. Resveratrol induces premature senescence in lung cancer cells via ROS-mediated DNA damage. *PLoS One*, **2013**, 8, e60065.

Luo KW, Ko CH, Yue GG, Lee JK, Li KK, Lee M, Li G, Fung KP, Leung PC, Lau CB. Green tea (Camellia sinensis) extract inhibits both the metastasis and osteolytic components of mammary cancer 4T1 lesions in mice. *J Nutr Biochem*, **2014**, 25, 395-403.

Luo LP, Han B, Yu XP, Chen XY, Zhou J, Chen W, Zhu YF, Peng XL, Zou Q, Li SY. Anti-metastasis activity of black rice anthocyanins against breast cancer: analyses using an ErbB2

positive breast cancer cell line and tumoral xenograft model. *Asian Pac J Cancer Prev*, **2014**, 15, 6219-6225.

Luporsi E, André F, Spyratos F, Martin PM, Jacquemier J, Penault-Llorca F, Tubiana-Mathieu N, Sigal-Zafrani B, Arnould L, Gompel A, Egele C, Poulet B, Clough KB, Crouet H, Fourquet A, Lefranc JP, Mathelin C, Rouyer N, Serin D, Spielmann M, Haugh M, Chenard MP, Brain E, de Cremoux P, Bellocq JP. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat*, **2012**, 132, 895-915.

Lv L, Shen Y, Liu J, Wang F, Li M, Li M, Guo A, Wang Y, Zhou D, Guo S. Enhancing curcumin anticancer efficacy through di-block copolymer micelle encapsulation. *J Biomed Nanotechnol*, **2014**, 10, 179-193.

Ma X, Yan W, Dai Z, Gao X, Ma Y, Xu Q, Jiang J, Zhang S. Baicalein suppresses metastasis of breast cancer cells by inhibiting EMT via downregulation of SATB1 and Wnt/β-catenin pathway. *Drug Des Devel Ther*, **2016**, 10, 1419-1441.

Maas P, Barrdahl M, Joshi AD, Auer PL, Gaudet MM, Milne RL, Schumacher FR, Anderson WF, Check D, Chattopadhyay S, Baglietto L, Berg CD, Chanock SJ, Cox DG, Figueroa JD, Gail MH, Graubard BI, Haiman CA, Hankinson SE, Hoover RN, Isaacs C, Kolonel LN, Le Marchand L, Lee IM, Lindström S, Overvad K, Romieu I, Sanchez MJ, Southey MC, Stram DO, Tumino R, VanderWeele TJ, Willett WC, Zhang S, Buring JE, Canzian F, Gapstur SM, Henderson BE, Hunter DJ, Giles GG, Prentice RL, Ziegler RG, Kraft P, Garcia-Closas M, Chatterjee N. Breast Cancer Risk From Modifiable and Nonmodifiable Risk Factors Among White Women in the United States. *JAMA Oncol*, **2016**, 2, 1295-1302.

Mabrok HB, Klopfleisch R, Ghanem KZ, Clavel T, Blaut M, Loh G. Lignan transformation by gut bacteria lowers tumor burden in a gnotobiotic rat model of breast cancer. *Carcinogenesis*, **2012**, 33, 203-208.

Mafuvadze B, Cook M, Xu Z, Besch-Williford CL, Hyder SM. Effects of dietary apigenin on tumor latency, incidence and multiplicity in a medroxyprogesterone acetate-accelerated 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced breast cancer model. *Nutr Cancer*, **2013,** 65, 1184-1191.

Mai Z, Blackburn GL, Zhou JR. Soy phytochemicals synergistically enhance the preventive effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast carcinoma in mice. *Carcinogenesis*, **2007**, 28, 1217-1223.

Malewicz B, Wang Z, Jiang C, Guo J, Cleary MP, Grande JP, Lü J. Enhancement of mammary carcinogenesis in two rodent models by silymarin dietary supplements. *Carcinogenesis*, **2006**, 27, 1739-1747.

Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol*, **2014**, 15, 122.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, **2004**, 79, 727-747.

Mandal A, Bishayee A. Mechanism of Breast Cancer Preventive Action of Pomegranate: Disruption of Estrogen Receptor and Wnt/β-Catenin Signaling Pathways. *Molecules*, **2015**, 20, 22315-22328.

Manjanatha MG, Shelton S, Bishop ME, Lyn-Cook LE, Aidoo A. Dietary effects of soy isoflavones daidzein and genistein on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary mutagenesis and carcinogenesis in ovariectomized Big Blue(R) transgenic rats. *Carcinogenesis* **2006**, 27, 2555-2564.

Mankoff DA, Dunnwald LK, Gralow JR, Ellis GK, Charlop A, Lawton TJ, Schubert EK, Tseng J, Livingston RB. Blood flow and metabolism in locally advanced breast cancer: relationship to response to therapy. *J Nucl Med*, **2002**, 43, 500-509.

Manning AL, Benes C, Dyson NJ. Whole chromosome instability resulting from the synergistic effects of pRB and p53 inactivation. *Oncogene*, **2014**, 33, 2487-2494.

Mária J, Ingrid Ž. Effects of bioactive compounds on senescence and components of senescence associated secretory phenotypes in vitro. *Food Funct*, **2017**, 8, 2394-2418.

Marotti JD, de Abreu FB, Wells WA, Tsongalis GJ. Triple-negative breast cancer. *Am J. Pathol* **2017**, 187, 2133-2138.

Martínez N, Herrera M, Frías L, Provencio M, Pérez-Carrión R, Díaz V, Morse M, Crespo MC. A combination of hydroxytyrosol, omega-3 fatty acids and curcumin improves pain and inflammation among early stage breast cancer patients receiving adjuvant hormonal therapy: results of a pilot study. *Clin Transl Oncol*, **2019**, 21, 489-498.

Martirosyan DM, Singhi J. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? *Functional Foods Health Dis*, **2015**, 5, 209-223.

Marto N, Morello J, Monteiro EC, Pereira SA. Implications of sulfotransferase activity in interindividual variability in drug response: clinical perspective on current knowledge. *Drug Metab Rev*, **2017**, 49, 357-371.

Mason JK, Chen J, Thompson LU. Flaxseed oil–trastuzumab interaction in breast cancer. *Food Chem Toxicol*, **2010**, 48, 2223-2226.

Mason JK, Fu M, Chen J, Thompson LU. Flaxseed oil enhances the effectiveness of trastuzumab in reducing the growth of HER2-overexpressing human breast tumors (BT-474*). J Nutr Biochem*, **2015**, 26, 16-23.

Mason JK, Fu MH, Chen J, Yu Z, Thompson LU. Dietary flaxseed–trastuzumab interactive effects on the growth of HER2-overexpressing human breast tumors (BT-474). *Nutr Cancer*, **2013**, 65, 451-459.

Massarweh S, Schiff R. Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor/growth factor signaling crosstalk. *Endocr Relat Cancer*, **2006**, 13 Suppl 1, S15-24.

Masuelli L, Granato M, Benvenuto M, Mattera R, Bernardini R, Mattei M, d'Amati G, D'Orazi G, Faggioni A, Bei R, Cirone M. Chloroquine supplementation increases the cytotoxic effect of curcumin against Her2/neu overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo in nude mice while counteracts it in immune competent mice. *Oncoimmunology*, **2017**, 6, e1356151.

Matos M, Santana L, Uriarte E, Abreu O, Molina E, Yordi E. Coumarins — An Important Class of Phytochemicals. En: Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health (eds. Rao V and Rao LG). InTech Open: London (UK), **2015**.

Matthews C, Gorenne I, Scott S, Figg N, Kirkpatrick P, Ritchie A, Goddard M, Bennett M. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. *Circ Res*, **2006**, 99, 156-164.

Maubach J, Bracke ME, Heyerick A, Depypere HT, Serreyn RF, Mareel MM, De Keukeleire D. Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **2003**, 784, 137-144.

Maubach J, Depypere HT, Goeman J, Van der Eycken J, Heyerick A, Bracke ME, Blondeel P, De Keukeleire D. Distribution of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids. *Obstet Gynecol*, **2004**, 103, 892-898.

Mayne S, Playdon M, Rock C. Diet, nutrition, and cancer: past, present and future. *Nat Rev Clin Oncol*, **2016**, 13, 504-515.

Mbese Z, Khwaza V, Aderibigbe BA. Curcumin and its derivatives as potential therapeutic agents in prostate, colon and breast cancers. *Molecules*, **2019**, 24, 4386.

McCann SE, Edge SB, Hicks DG, Thompson LU, Morrison CD, Fetterly G, Andrews C, Clark K, Wilton J, Kulkarni S. A pilot study comparing the effect of flaxseed, aromatase inhibitor, and the combination on breast tumor biomarkers. *Nutr Cancer*, **2014**, 66, 566-575.

McDermott F. Risk factors in breast cancer. *Aust Fam Physician*, **1991**, 20, 1455-1460.

McGowan EM, Lin Y, Hatoum D. Good Guy or Bad Guy? The duality of wild-type p53 in hormone-dependent breast cancer origin, treatment, and recurrence. *Cancers (Basel)*, **2018**, 10, 172.

McGrattan AM, McGuinness B, McKinley MC, Kee F, Passmore P, Woodside JV, McEvoy CT. Diet and inflammation in cognitive ageing and Alzheimer's disease. *Curr Nutr Rep*, **2019**, 8, 53-65.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*, **2000**, 321, 624-628.

Meech R, Hu DG, McKinnon RA, Mubarokah SN, Haines AZ, Nair PC, Rowland A, Mackenzie PI. The UDP-Glycosyltransferase (UGT) superfamily: new members, new functions, and novel paradigms. *Physiol Rev*, **2019**, 99, 1153-1222.

Meeran SM, Patel SN, Li Y, Shukla S, Tollefsbol TO. Bioactive dietary supplements reactivate ER expression in ER-negative breast cancer cells by active chromatin modifications. *PLoS One*, **2012**, 7, e37748.

Mena P, Ludwig IA, Tomatis VB, Acharjee A, Calani L, Rosi A, Brighenti F, Ray S, Griffin JL, Bluck LJ, Del Rio D. Inter-individual variability in the production of flavan-3-ol colonic metabolites: preliminary elucidation of urinary metabotypes. *Eur J Nutr*, **2019**, 58, 1529-1543.

Meng J, Guo F, Xu H, Liang W, Wang C, Yang XD. Combination therapy using co-encapsulated resveratrol and paclitaxel in liposomes for drug resistance reversal in breast cancer cells in vivo. *Sci Rep*, **2016**, 6, 22390.

Metzger-Filho O, Sun Z, Viale G, Price KN, Crivellari D, Snyder RD, Gelber RD, Castiglione-Gertsch M, Coates AS, Goldhirsch A, Cardoso F. Patterns of Recurrence and outcome according to breast cancer subtypes in lymph node-negative disease: results from international breast cancer study group trials VIII and IX. *J Clin Oncol*, **2013**, 31, 3083-3090.

Micek A, Godos J, Brzostek T, Gniadek A, Favari C, Mena P, Libra M, Del Rio D, Galvano F, Grosso G. Dietary phytoestrogens and biomarkers of their intake in relation to cancer survival and recurrence: a comprehensive systematic review with meta-analysis. *Nutr Rev*, **2020**, nuaa043.

Mignini LE, Khan KS. Methodological quality of systematic reviews of animal studies: a survey of reviews of basic research. *BMC Med Res Methodol*, **2006**, 6, 10.

Miksits M, Wlcek K, Svoboda M, Kunert O, Haslinger E, Thalhammer T, Szekeres T, Jäger W. Antitumor activity of resveratrol and its sulfated metabolites against human breast cancer cells. *Planta Med*, **2009**, 75, 1227-1230.

Mileo AM, Di Venere D, Abbruzzese C, Miccadei S. Long term exposure to polyphenols of artichoke (*Cynara scolymus* L.) exerts induction of senescence driven growth arrest in the MDA-MB231 human breast cancer cell line. *Oxid Med Cell Longev*, **2015**, 2015, 363827.

Mileo AM, Di Venere D, Linsalata V, Fraioli R, Miccadei S. Artichoke polyphenols induce apoptosis and decrease the invasive potential of the human breast cancer cell line MDA-MB231. *J Cell Physiol*, **2012**, 227, 3301-3309.

Millour J, de Olano N, Horimoto Y, Monteiro LJ, Langer JK, Aligue R, Hajji N, Lam EW. ATM and p53 regulate FOXM1 expression via E2F in breast cancer epirubicin treatment and resistance. *Mol Cancer Ther*, **2011**, 10, 1046-1058.

Moghtaderi H, Sepehri H, Attari F. Combination of arabinogalactan and curcumin induces apoptosis in breast cancer cells in vitro and inhibits tumor growth via overexpression of p53 level in vivo. *Biomed Pharmacother*, **2017**, 88, 582-594.

Mohapatra P, Satapathy SR, Siddharth S, Das D, Nayak A, Kundu CN. Resveratrol and curcumin synergistically induces apoptosis in cigarette smoke condensate transformed breast epithelial cells through a p21Waf1/Cip1 mediated inhibition of Hh-Gli signaling. *Int J Biochem Cell Biol*, **2015**, 66, 75-84.

Montalesi E, Cipolletti M, Cracco P, Fiocchetti M, Marino M. Divergent effects of daidzein and its metabolites on estrogen-induced survival of breast cancer cells. *Cancers (Basel)*, **2020**, 12, 167.

Monteiro J, Alves MG, Oliveira PF, Silva BM. Pharmacological potential of methylxanthines: retrospective analysis and future expectations. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **2019**, 59, 2597-2625.

Mukhopadhyay S, Ballard BR, Mukherjee S, Kabir SM, Das SK. Beneficial effects of soy protein in the initiation and progression against dimethylbenz[a]anthracene-induced breast tumors in female rats. *Mol Cell Biochem*, **2006**, 290(1–2), 169-176.

Mukhtar H, Ahmad N. Cancer chemoprevention: future holds in multiple agents. *Toxicol Appl Pharmacol*. **1999**, 158, 207-210.

Munagala R, Aqil F, Vadhanam MV, Gupta RC. MicroRNA 'signature' during estrogen-mediated mammary carcinogenesis and its reversal by ellagic acid intervention. *Cancer Lett*, **2013**, 339, 175-184.

Murugappan K, Saboo A, Kuo L, Ung O. Paradigm shift in the local treatment of breast cancer: mastectomy to breast conservation surgery. *Gland surgery*, **2018**, 7, 506-519.

Musa MA, Cooperwood JS, Khan MO. A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer. *Curr Med Chem*, **2008**, 15, 2664-2679.

Nandakumar N, Rengarajan T, Balamurugan A, Balasubramanian M. Modulating effects of hesperidin on key carbohydrate-metabolizing enzymes, lipid profile, and membrane-bound adenosine triphosphatases against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced breast carcinogenesis. *Hum Exp Toxicol*, **2014**, 33, 504-516.

Nardella C, Clohessy JG, Alimonti A, Pandolfi PP. Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat Rev Cancer*, **2011**, 11, 503-511.

Narod SA. Early-onset breast cancer: what do we know about the risk factors? A countercurrents series. *Curr Oncol*, **2011**, 18, 204-205.

National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical practice guidelines in Oncology, Breast cancer, Version 3.2020. Disponible en: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx#breast

Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M. Effects of caffeine on human health. *Food Addit Contam*, **2003**, 20, 1-30.

Nemec MJ, Kim H, Marciante AB, Barnes RC, Hendrick ED, Bisson WH, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. Polyphenolics from mango (Mangifera indica L.) suppress breast cancer ductal carcinoma in situ proliferation through activation of AMPK pathway and suppression of mTOR in athymic nude mice. *J Nutr Biochem*, **2017**, 41, 12-19.

Niwa T, Takanobu J, Suzuki K, Sato Y, Yamaguchi Y, Hayashi SI. Characterization of a membrane-associated estrogen receptor in breast cancer cells and its contribution to hormone therapy resistance using a novel selective ligand. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2020**, 201, 105671.

Nkondjock A, Ghadirian P, Kotsopoulos J, Lubinski J, Lynch H, Kim-Sing C, Horsman D, Rosen B, Isaacs C, Weber B, Foulkes W, Ainsworth P, Tung N, Eisen A, Friedman E, Eng C, Sun P, Narod SA. Coffee consumption and breast cancer risk among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Int J Cancer*, **2006**, 118, 103-107.

Núñez-Sánchez MA, García-Villalba R, Monedero-Saiz T, García-Talavera NV, Gómez-Sánchez MB, Sánchez-Álvarez C, García-Albert AM, Rodríguez-Gil FJ, Ruiz-Marín M, Pastor-Quirante FA, Martínez-Díaz F, Yáñez-Gascón MJ, González-Sarrías A, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients. *Mol Nutr Food Res*, **2014**, 58, 1199-1211.

Ono M, Koga T, Ueo H, Nakano S. Effects of Dietary Genistein on Hormone-Dependent Rat Mammary Carcinogenesis Induced by Ethyl Methanesulphonate. *Nutr Cancer*, **2012**, 64, 1204-1210.

Opdahl S, Alsaker MD, Janszky I, Romundstad PR, Vatten LJ. Joint effects of nulliparity and other breast cancer risk factors. *Br J Cancer*, **2011**, 105, 731-736.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Global strategy on diet, physical activity and health. Geneva: **2004**. Disponible en: https://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/

Organización Mundial de la Salud (OMS). Cancer Control: Knowledge into Action: Guide for Effective Programmes: Module 3: Early Detection. Geneva: World Health Organization; **2007**. Disponible en: https://www.who.int/cancer/modules/en/

Organización Mundial de la Salud (OMS). Global Action Plan for the Prevention and Control of NCDs 2013–2020. OMS, **2013**. Disponible en: https://www.who.int/nmh/publications/ncd-action-plan/en/

Organización Mundial de la Salud (OMS), Nota descriptiva, abril **2020**. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/

Osborne CK, Schiff R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med*. **2011**, 62, 233-247.

O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*, **2002**, 109, S121-131.

Othman L, Sleiman A, Abdel-Massih RM. Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants. *Front Microbiol*, **2019**, 10, 911.

Overk CR, Guo J, Chadwick LR, Lantvit DD, Minassi A, Appendino G, Chen SN, Lankin DC, Farnsworth NR, Pauli GF, van Breemen RB, Bolton JL. In vivo estrogenic comparisons of Trifolium pratense (red clover) Humulus lupulus (hops), and the pure compounds isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin. *Chem Biol Interact*, **2008**, 176, 30-39.

Palit S, Kar S, Sharma G, Das PK. Hesperetin induces apoptosis in breast carcinoma by triggering accumulation of ROS and activation of ASK1/JNK pathway. *J Cell Physiol*, **2015**, 230, 1729-1739.

Pan MH, Chiou YS, Chen LH, Ho CT. Breast cancer chemoprevention by dietary natural phenolic compounds: specific epigenetic related molecular targets. *Mol Nutr Food Res*, **2015**, 59, 21-35.

Papoutsis AJ, Selmin OI, Borg JL, Romagnolo DF. Gestational exposure to the AhR agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induces BRCA-1 promoter hypermethylation and reduces BRCA-1 expression in mammary tissue of rat offspring: Preventive effects of resveratrol. *Mol Carcinog*, **2015**, 54, 261-269.

Park K, Choi K, Kim H, Kim K, Lee MH, Lee JH, Kim Rim JC. Isoflavone-deprived soy peptide suppresses mammary tumorigenesis by inducing apoptosis. *Exp Mol Med*, **2009**, 41, 371-81.

Patel KR, Andreadi C, Britton RG, Horner-Glister E, Karmokar A, Sale S, Brown VA, Brenner DE, Singh R, Steward WP, Gescher AJ, Brown K. Sulfate metabolites provide an intracellular pool for resveratrol generation and induce autophagy with senescence. *Sci Transl Med*, **2013**, 5, 205ra133.

Patel KR, Brown VA, Jones DJ, Britton RG, Hemingway D, Miller AS, West KP, Booth TD, Perloff M, Crowell JA, Brenner DE, Steward WP, Gescher AJ, Brown K. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Res*, **2010**, 70, 7392-7399.

Pathania S, Bhatia R, Baldi A, Singh R, Rawal RK. Drug metabolizing enzymes and their inhibitors' role in cancer resistance. *Biomed Pharmacother*, **2018**, 105, 53-65.

Patterson AD, Gonzalez FJ, Perdew GH, Peters JM. Molecular regulation of carcinogenesis: friend and foe. *Toxicol Sci*, **2018**, 165, 277-283.

Paul B, Li Y, Tollefsbol T. The effects of combinatorial genistein and sulforaphane in breast tumor inhibition: role in epigenetic regulation. *Int J Mol Sci*, **2018**, 19, 1754.

Paul B, Royston KJ, Li Y, Stoll ML, Skibola CF, Wilson LS, Barnes S, Morrow CD, Tollefsbol TO. Impact of genistein on the gut microbiome of humanized mice and its role in breast tumor inhibition. *PLoS One*, **2017**, 12, e0189756.

Payne J, Jones C, Lakhani S, Kortenkamp A. Improving the reproducibility of the MCF-7 cell proliferation assay for the detection of xenoestrogens. *Sci Total Environ*, **2000**, 248, 51-62.

Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Steckler T, Würbel H. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, **2020**, 18, e3000410.

Pereira MA, Grubbs CJ, Barnes LH, Li H, Olson GR, Eto I, Juliana M, Whitaker LM, Kelloff GJ, Steele VE, Lubet RA. Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon

azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary cancer in rats. *Carcinogenesis*, **1996**, 17, 1305-1311.

Perez-Vizcaino F, Fraga CG. Research trends in flavonoids and health. *Arch Biochem Biophys*, **2018**, 646, 107-112.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, **2000**, 406, 747-52.

Petrek JA, Sandberg WA, Cole MN, Silberman MS, Collins DC. The inhibitory effect of caffeine on hormone-induced rat breast cancer. *Cancer*, **1985**, 56, 1977-81.

Phillips CM, Chen L-W, Heude B, Bernard JY, Harvey NC, Duijts L, Mensink-Bout SM, Polanska K, Mancano G, Suderman M, Shivappa N, Hébert JR. Dietary inflammatory index and non-communicable disease risk: a narrative review. *Nutrients*, **2019**, 11, 1873.

Pierce BL, Ballard-Barbash R, Bernstein L, Baumgartner RN, Neuhouser ML, Wener MH, Baumgartner KB, Gilliland FD, Sorensen BE, McTiernan A, Ulrich CM. Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. *J Clin Oncol*, **2009**, 27, 3437-3444.

Planas JM, Alfaras I, Colom H, Juan ME. The bioavailability and distribution of trans-resveratrol are constrained by ABC transporters. *Arch Biochem Biophys*, **2012**, 527, 67-73.

Ponder KG, Boise LH. The prodomain of caspase-3 regulates its own removal and caspase activation. *Cell Death Discov*, **2019**, 5, 56.

Porrini M, Riso P. Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: a critical appraisal. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **2008**, 18, 647-50.

Power KA, Chen JM, Saarinen NM, Thompson LU. Changes in biomarkers of estrogen receptor and growth factor signaling pathways in MCF-7 tumors after short- and long-term treatment with soy and flaxseed. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2008**, 112, 13-19.

Power KA, Saarinen NM, Chen JM, Thompson LU. Mammalian lignans enterolactone and enterodiol, alone and in combination with the isoflavone genistein, do not promote the growth of MCF-7 xenografts in ovariectomized athymic nude mice. *Int J Cancer*, **2006**, 118, 1316-1320.

Pozo-Guisado E, Alvarez-Barrientos A, Mulero-Navarro S, Santiago-Josefat B, Fernandez-Salguero PM. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. *Biochem Pharmacol*, **2002**, 64, 1375-1386.

Preibsch H, Baur A, Wietek BM, Krämer B, Staebler A, Claussen CD, Siegmann-Luz KC. Vacuum-assisted breast biopsy with 7-gauge, 8-gauge, 9-gauge, 10-gauge, and 11-gauge needles: how many specimens are necessary? *Acta Radiol*, **2015**, 56, 1078-1084.

Price JS, Waters JG, Darrah C, Pennington C, Edwards DR, Donell ST, Clark IM. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell*, **2002**, 1, 57-65.

Pritchett LE, Atherton KM, Mutch E, Ford D. Glucuronidation of the soyabean isoflavones genistein and daidzein by human liver is related to levels of UGT1A1 and UGT1A9 activity and alters isoflavone response in the MCF-7 human breast cancer cell line. *J Nutr Biochem*, **2008**, 19, 739-745.

Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*, **2011**, 7, 715-726.

Provinciali M, Papalini F, Orlando F, Pierpaoli S, Donnini A, Morazzoni P, Riva A, Smorlesi A. Effect of the silybin-phosphatidylcholine complex (IdB 1016) on the development of mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Cancer Res*, **2007**, 67, 2022-2029.

Provinciali M, Re F, Donnini A, Orlando F, Bartozzi B, Di Stasio G, Smorlesi A. Effect of resveratrol on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Int J Cancer*, **2005**, 115, 36-45.

Pugazhendhi D, Watson KA, Mills S, Botting N, Pope GS, Darbre PD. Effect of sulphation on the oestrogen agonist activity of the phytoestrogens genistein and daidzein in MCF-7 human breast cancer cells. *J Endocrinol*, **2008**, 197, 503-515.

Pumford S, Morton M, Turkes A, Griffiths K. Determination of the isoflavonoids genistein and daidzein in biological samples by gas chromatography–mass spectrometry. *Ann Clin Biochem*, **2002**, 39, 281-292.

Qin L, Jin L, Lu L, Lu X, Zhang C, Zhang F, Liang W. Naringenin reduces lung metastasis in a breast cancer resection model. *Protein Cell*, **2011**, 2, 507-516.

Qin LQ, Xu JY, Tezuka H, Wang PY, Hoshi K. Commercial soy milk enhances the development of 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors in rats. *In Vivo*, **2007**, 21, 667-671.

Qin W, Zhang K, Clarke K, Weiland T, Sauter ER. Methylation and miRNA effects of resveratrol on mammary tumors vs. normal tissue. *Nutr Cancer*, **2014**, 66, 270-277.

Quartieri A, García-Villalba R, Amaretti A, Raimondi S, Leonardi A, Rossi M, Tomás-Barberán F. Detection of novel metabolites of flaxseed lignans in vitro and in vivo. *Mol Nutr Food Res*, **2016**, 60, 1590-1601.

Quereda V, Porlan E, Cañamero M, Dubus P, Malumbres M. An essential role for Ink4 and Cip/Kip cell-cycle inhibitors in preventing replicative stress. *Cell Death Differ*, **2016**, 23, 430-441.

Raffaelli B, Hoikkala A, Leppälä E, Wähälä K. Enterolignans. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **2002**, 777, 29-43.

Rahal OM, Machado HL, Montales MT, Pabona JM, Heard ME, Nagarajan S, Simmen RC. Dietary suppression of the mammary CD29(hi)CD24(+) epithelial subpopulation and its cytokine/chemokine transcriptional signatures modifies mammary tumor risk in MMTV-Wnt1 transgenic mice. *Stem Cell Res*, **2013**, 11, 1149-1162.

Rai G, Mishra S, Suman S, Shukla Y. Resveratrol improves the anticancer effects of doxorubicin in vitro and in vivo models: a mechanistic insight. *Phytomedicine*, **2016**, 23, 233-242.

Rakha EA, Pinder SE, Bartlett JM, Ibrahim M, Starczynski J, Carder PJ, Provenzano E, Hanby A, Hales S, Lee AH, Ellis IO; National Coordinating Committee for Breast Pathology. Updated UK recommendations for HER2 assessment in breast cancer. *J Clin Pathol*, **2015**, 68, 93-99.

Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Richardson AL, Schnitt SJ, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Badve S, Ellis IO. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res*, **2010**, 12, 207.

Ramalingayya GV, Gourishetti K, Nayak PG, Rao CM, Kishore A, Alnaseer SM, Hussain SM, Nandakumar K. Rutin protects against doxorubicin-induced cognitive dysfunction while retaining the anticancer potential of Dox in a murine model of *N*-Methyl-*N*-Nitrosourea-induced mammary carcinoma. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **2019**, 38, 153-163.

Rao GN, Ney E, Herbert RA. Effect of Melatonin and Linolenic Acid on Mammary Cancer in Transgenic Mice with c-neu Breast Cancer Oncogene. *Breast Cancer Res Treat*, **2000**, 64, 287-296.

Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer*, **2012**, 130, 1715-1725.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*, **2008**, 22, 659-661.

Reddy NS, Nirmala P, Chidambaram N, Kumar P, Nagar A. Quercetin in dimethyl benz[a]anthracene-induced breast cancer in rats. *Am J Pharmacol Toxicol*, **2012**, 7, 68-72.

Rein MJ, Renouf M, Cruz-Hernández C, Actis-Goretta L, Thakkar SK, da Silva Pinto M. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *Br J Clin Pharmacol*, **2012**, 75, 588-602.

Rexer BN, Chanthaphaychith S, Dahlman KB, Arteaga CL. Direct inhibition of PI3K in combination with dual HER2 inhibitors is required for optimal antitumor activity in HER2+ breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, **2014**, 16, R9.

Rickard SE, Yuan YV, Chen J, Thompson LU. Dose effects of flaxseed and its lignan on *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in rats. *Nutr Cancer*, **1999**, 35, 50-57.

Rickard SE, Yuan YV, Thompson LU. Plasma insulin-like growth factor I levels in rats are reduced by dietary supplementation of flaxseed or its lignan secoisolariciresinol diglycoside. *Cancer Lett*, **2000**, 161, 47-55.

Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo AT, Bates SE, Gottesman MM. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer*, **2018**, 18, 452-464.

Rodopoulos N, Höjvall L, Norman A. Elimination of theobromine metabolites in healthy adults. *Scand J Clin Lab Invest*, **1996**, 56, 373-383.

Rogers AE, Hafer LJ, Iskander YS, Yang S. Black tea and mammary gland carcinogenesis by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in rats fed control or high fat diets. *Carcinogenesis*, **1998**, 19, 1269-1273.

Romani A, Ieri F, Urciuoli S, Noce A, Marrone G, Nediani C, Bernini R. Health effects of phenolic compounds found in extra-virgin olive oil, by-products, and leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients*, **2019**, 11, 1776.

Rosa M, Mohammadi A, Masood S. The value of fine needle aspiration biopsy in the diagnosis and prognostic assessment of palpable breast lesions. *Diagnostic Cytopathology*, 40, **2010**, 26-34.

Rosendahl AH, Perks CM, Zeng L, Markkula A, Simonsson M, Rose C, Ingvar C, Holly JM, Jernström H. Caffeine and caffeic acid inhibit growth and modify estrogen receptor and insulin-like growth factor I receptor levels in human breast cancer. *Clin Cancer Res*, **2015**, 21, 1877-1887.

Rossi EL, Khatib SA, Doerstling SS, Bowers LW, Pruski M, Ford NA, Glickman RD, Niu M, Yang P, Cui Z, DiGiovanni J, Hursting SD. Resveratrol inhibits obesity-associated adipose tissue dysfunction and tumor growth in a mouse model of postmenopausal claudin-low breast cancer. *Mol Carcinog*, **2018**, 57, 393-407.

Rothwell JA, Knaze V, Zamora-Ros, R. Polyphenols: dietary assessment and role in the prevention of cancers. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **2017**, 20, 512-521.

Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI. The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. *Int J Biochem Cell Biol*, **2013**, 45, 1121-1132.

Rowlands JC. Altered Mammary Gland Differentiation and Progesterone Receptor Expression in Rats Fed Soy and Whey Proteins. *Toxicol Sci*, **2002**, 70, 40-45.

Rowlands JC, He L, Hakkak R, Ronis MJJ, Badger TM. Soy and whey proteins downregulate DMBA-induced liver and mammary gland CYP1 expression in female rats. *J Nutr*, **2001**, 131, 3281-3287.

Roy S, Banerjee S, Chakraborty T. Vanadium quercetin complex attenuates mammary cancer by regulating the P53, Akt/mTOR pathway and downregulates cellular proliferation correlated with increased apoptotic events. *BioMetals*, **2018**, 31, 647-671.

Royt M, Mukherjee S, Sarkar R, Biswas J. Curcumin sensitizes chemotherapeutic drugs via modulation of PKC, telomerase, NF-kappaB and HDAC in breast cancer. *Ther Deliv*, **2011**, 2, 1275-1293.

Ruotolo R, Calani L, Brighenti F, Crozier A, Ottonello S, Del Rio D. Glucuronidation does not suppress the estrogenic activity of quercetin in yeast and human breast cancer cell model systems. *Arch Biochem Biophys*, **2014**, 559, 62-67.

Ruotolo R, Calani L, Fietta E, Brighenti F, Crozier A, Meda C, Maggi A, Ottonello S, Del Rio D. Anti-estrogenic activity of a human resveratrol metabolite. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **2013**, 23, 1086-1092.

Ryan JL, Heckler CE, Ling M, Katz A, Williams JP, Pentland AP, Morrow GR. Curcumin for radiation dermatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of thirty breast cancer patients. *Radiat Res*, **2013**, 180, 34-43.

Ryan Wolf J, Heckler CE, Guido JJ, Peoples AR, Gewandter JS, Ling M, Vinciguerra VP, Anderson T, Evans L, Wade J, Pentland AP, Morrow GR. Oral curcumin for radiation dermatitis: a URCC NCORP study of 686 breast cancer patients. *Support Care Cancer*, **2018**, 26, 1543-1552.

Ryzhov S, McCaleb JL, Goldstein AE, Biaggioni I, Feoktistov I. Role of adenosine receptors in the regulation of angiogenic factors and neovascularization in hypoxia. *J Pharmacol Exp Ther*, **2007**, 320, 565-572.

Saarinen NM, Power K, Chen J, Thompson LU. Flaxseed attenuates the tumor growth stimulating effect of soy protein in ovariectomized athymic mice with MCF-7 human breast cancer xenografts. *Int J Cancer*, **2006**, 119, 925-931.

Saggar JK, Chen J, Corey P, Thompson LU. Dietary flaxseed lignan or oil combined with tamoxifen treatment affects MCF-7 tumor growth through estrogen receptor- and growth factor-signaling pathways. *Mol Nutr Food Res*, **2010a**, 54, 415-425.

Saggar JK, Chen J, Corey P, Thompson LU. The effect of secoisolariciresinol diglucoside and flaxseed oil, alone and in combination, on MCF-7 tumor growth and signaling pathways. *Nutr Cancer*, **2010b**, 62, 533-542.

Sahin K, Tuzcu M, Sahin N, Akdemir F, Ozercan I, Bayraktar S, Kucuk O. Inhibitory effects of combination of lycopene and genistein on 7,12- dimethyl benz[a]anthracene-induced breast cancer in rats. *Nutr Cancer*, **2011**, 63, 1279-1286.

Sakata M, Ikeda T, Imoto S, Jinno H. Prevention of mammary carcinogenesis in C3H/OuJ mice by green tea and tamoxifen. *Asian Pac J Cancer Prev*, **2011**, 12, 5.

Saleem M, Kim HJ, Ali MS, Lee YS. An update on bioactive plant lignans. *Nat Prod Rep*, **2005**, 22, 696-716.

Samy RP, Gopalakrishnakone P, Ignacimuthu S. Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors in rats. *Chem Biol Interact*, **2006**, 164, 1-14.

Sandhu PS, Kumar R, Beg S, Jain S, Kushwah V, Katare OP, Singh B. Natural lipids enriched self-nano-emulsifying systems for effective co-delivery of tamoxifen and naringenin: systematic approach for improved breast cancer therapeutics. *Nanomedicine*, **2017**, 13, 1703-1713.

Santen RJ, Song RX, McPherson R, Kumar R, Adam L, Jeng MH, Yue W. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2002**, 80, 239-256.

Santhalakshmi R, Ramakrishna YG. Protective effect of quercetin against 7, 12 dimethylbenz[a]anthracene induced breast cancer in rats. *Int J Pharm Pharm Sci*, **2015**, 7(1), 8000-8010.

Santo EE, Stroeken P, Sluis PV, Koster J, Versteeg R, Westerhout EM. FOXO3a is a major target of inactivation by PI3K/AKT signaling in aggressive neuroblastoma. *Cancer Res*, **2013**, 73, 2189-2198.

Sartippour MR, Pietras R, Marquez-Garban DC, Chen HW, Heber D, Henning SM, Sartippour G, Zhang L, Lu M, Weinberg O, Rao JY, Brooks MN. The combination of green tea and tamoxifen is effective against breast cancer. *Carcinogenesis*, **2006**, 27, 2424-2433.

Schlachterman A, Valle F, Wall KM, Azios NG, Castillo L, Morell L, Washington AV, Cubano LA, Dharmawardhane SF. Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model. *Transl Oncol*, **2008**, 1, 19-27.

Schneider H, Ma L, Glatt H. Extractionless method for the determination of urinary caffeine metabolites using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **2003**, 789, 227-237.

Sen GS, Mohanty S, Hossain DM, Bhattacharyya S, Banerjee S, Chakraborty J, Saha S, Ray P, Bhattacharjee P, Mandal D, Bhattacharya A, Chattopadhyay S, Das T, Sa G. Curcumin enhances the efficacy of chemotherapy by tailoring p65NFκB-p300 cross-talk in favor of p53-p300 in breast cancer. *J Biol Chem*, **2011**, 286, 42232-42247.

Serini S, Calviello G. Modulation of Ras/ERK and phosphoinositide signaling by long-chain n-3 PUFA in breast cancer and their potential complementary role in combination with targeted drugs. *Nutrients*, **2017**, 9, 185.

Serraino M, Thompson LU. The effect of flaxseed supplementation on the initiation and promotional stages of mammary tumorigenesis. *Nutr Cancer*, **1992**, 17, 153-159.

Serraino MR, Thompson LU, Cunnane SC. Effect of low level flaxseed suplementation on the fatty acid composition of mammary glands and tumors in rats. *Nutr Res*, **1992**, 12, 767–772.

Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr*, **2002**, 132, 3577-3584.

Shahidi F. Nutraceuticals and functional foods: whole versus processed foods. *Trends Food Sci Technol*, **2009**, 20, 376-387.

Sharma P, McClees SF, Afaq F. Pomegranate for prevention and treatment of cancer: an update. *Molecules*, **2017**, 22, 177.

Sharma VR, Gupta GK, Sharma AK, Batra N, Sharma DK, Joshi A, Sharma AK. PI3K/Akt/mTOR Intracellular pathway and breast cancer: factors, mechanism and regulation. *Curr Pharm Des*, **2017**, 23, 1633-1638.

Shen Q, Uray IP, Li Y, Krisko TI, Strecker TE, Kim HT, Brown PH. The AP-1 transcription factor regulates breast cancer cell growth via cyclins and E2F factors. *Oncogene*, **2008**, 27, 366-77.

Sheokand S, Navik U, Bansal AK. Nanocrystalline solid dispersions (NSD) of hesperetin (HRN) for prevention of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced breast cancer in Sprague-Dawley (SD) rats. *Eur J Pharm Sci*, **2019**, 128, 240–249.

Shimoi K, Nakayama T. Glucuronidase deconjugation in inflammation. *Methods Enzymol*, **2005**, 400, 263-272.

Shimoi K, Saka N, Nozawa R, Sato M, Amano I, Nakayama T, Kinae N. Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation. *Drug Metab Dispos*, **2001**, 29, 1521-1524.

Shin HR, Joubert C, Boniol M, Hery C, Ahn SH, Won YJ, Nishino Y, Sobue T, Chen CJ, You SL, Mirasol-Lumague MR, Law SC, Mang O, Xiang YB, Chia KS, Rattanamongkolgul S, Chen JG, Curado MP, Autier P. Recent trends and patterns in breast cancer incidence among Eastern and Southeastern Asian women. *Cancer Causes Control*, **2010**, 21, 1777-1785.

Shostak K, Chariot A. NF-κB, stem cells and breast cancer: the links get stronger. *Breast Cancer Res*, **2011**, 13, 214.

Siddiqui RA, Harvey KA, Walker C, Altenburg J, Xu Z, Terry C, Camarillo I, Jones-Hall Y, Mariash C. Characterization of synergistic anti-cancer effects of docosahexaenoic acid and curcumin on DMBA-induced mammary tumorigenesis in mice. *BMC Cancer*, **2013**, 13, 418.

Simmen RC, Eason RR, Till SR, Chatman L Jr, Velarde MC, Geng Y, Korourian S, Badger TM. Inhibition of NMU-induced mammary tumorigenesis by dietary soy. *Cancer Lett*, **2005**, 224, 45-52.

Singh B, Mense SM, Bhat NK, Putty S, Guthiel WA, Remotti F, Bhat HK. Dietary quercetin exacerbates the development of estrogen-induced breast tumors in female ACI rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, **2010**, 247, 83-90.

Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2019**, 20, 175-193.

Singh VP, Pratap K, Sinha J, Desiraju K, Bahal D, Kukreti R. Critical evaluation of challenges and future use of animals in experimentation for biomedical research. *Int J Immunopathol Pharmacol*, **2016**, 29, 551-561.

Singhal J, Chikara S, Horne D, Salgia R, Awasthi S, Singhal SS. 2'-Hydroxyflavanone inhibits in vitro and in vivo growth of breast cancer cells by targeting RLIP76. *Mol Carcinog*, **2018,** 57, 1751-1762.

Singhal J, Chikara S, Horne D, Salgia R, Awasthi S, Singhal SS. RLIP inhibition suppresses breast-to-lung metastasis. *Cancer Lett*, **2019**, 447, 24-32.

Singletary K, MacDonald C, Iovinelli M, Fisher C, Wallig M. Effect of the beta-diketones diferuloylmethane (curcumin) and dibenzoylmethane on rat mammary DNA adducts and tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis*, **1998**, 19, 1039-1043.

Singletary KW, Meline B. Effect of Grape Seed Proanthocyanidins on Colon Aberrant Crypts and Breast Tumors in a Rat Dual-Organ Tumor Model. *Nutr Cancer*, **2001**, 39, 252-258.

Sinha D, Sarkar N, Biswas J, Bishayee A. Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: preclinical evidence and molecular mechanisms. *Semin Cancer Biol*, **2016**, 40-41, 209-232.

Sirkisoon SR, Carpenter RL, Rimkus T, Anderson A, Harrison A, Lange AM, Jin G, Watabe K, Lo HW. Interaction between STAT3 and GLI1/tGLI1 oncogenic transcription factors promotes the aggressiveness of triple-negative breast cancers and HER2-enriched breast cancer. *Oncogene*, **2018**, 37, 2502-2514.

Slotkin TA, Zhang J, Dancel R, Garcia SJ, Willis C, Seidler FJ. Beta-adrenoceptor signaling and its control of cell replication in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, **2000**, 60, 153-166.

Smith DL, Nolden LK, Mills GB, Lu Y. En: Apoptosis, senescence and cancer. Gewirtz DA, Holt SE, Grant S (eds), **2007**, pp 313−334. Humana Press, New Jersey.

So FV, Guthrie N, Chambers AF, Moussa M, Carroll KK. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr Cancer*, **1996**, 26, 167-181.

Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria (SESPM). Modolell Roig A, Izquierdo Sanz M, Sabadell Mercadal MD, Prats de Puig M (eds). Manual de Práctica Clínica en Senología 2015, 3ª edición. 2º Congreso de la Mama, Madrid, **2015**.

Somasundaram S, Edmund NA, Moore DT, Small GW, Shi YY, Orlowski RZ. Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer. *Cancer Res*, **2002**, 62, 3868-3875.

Somers-Edgar TJ, Scandlyn MJ, Stuart EC, Nedelec MJL, Valentine SP, Rosengren RJ. The combination of epigallocatechin gallate and curcumin suppresses ERα-breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Int J Cancer*, **2008**, 122, 1966-1971.

Sreekumar PG, Hinton DR, Kannan R. The Emerging Role of Senescence in Ocular Disease. *Oxid Med Cell Longev*, **2020**, 2020, 2583601.

Srivastava S, Somasagara RR, Hegde M, Nishana M, Tadi SK, Srivastava M, Choudhary B, Raghavan SC. Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. *Sci Rep*, **2016**, 6, 24049.

Ståhle L, Segersvärd S, Ungerstedt U. Drug distribution studies with microdialysis. II. Caffeine and theophylline in blood, brain and other tissues in rats. *Life Sci*, **1991**, 49, 1843-1852.

Stalmach A, Williamson G, Clifford MN. Dietary hydroxycinnamates and their bioavailability. En: Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function (Spencer JPE, Crozier A, eds). First ed. Boca Raton: CRC Press. **2012**, pp 123-156.

Steiner J, Davis J, McClellan J, Enos R, Carson J, Fayad R, Nagarkatti M, Nagarkatti P, Altomare D, Creek K, Murphy E. Dose-dependent benefits of quercetin on tumorigenesis in the C3(1)/SV40Tag transgenic mouse model of breast cancer. *Cancer Biol Ther*, **2014**, 15, 1456-1467.

Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, Lilja H, Brünner N, Chan DW, Babaian R, Bast RC Jr, Dowell B, Esteva FJ, Haglund C, Harbeck N, Hayes DF, Holten-Andersen M, Klee GG, Lamerz R, Looijenga LH, Molina R, Nielsen HJ, Rittenhouse H, Semjonow A, Shih IeM, Sibley P, Sölétormos G, Stephan C, Sokoll L, Hoffman BR, Diamandis EP; National Academy of Clinical Biochemistry. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clin Chem*, **2008**, 54, e11-79.

Su Y, Eason RR, Geng Y, Till SR, Badger TM, Simmen RCM. In utero exposure to maternal diets containing soy protein isolate, but not genistein alone, protects young adult rat offspring from NMU-induced mammary tumorigenesis. *Carcinogenesis*, **2007**, 28, 1046-1051.

Sugimoto N, Miwa S, Hitomi Y, Nakamura H, Tsuchiya H, Yachie A. Theobromine, the primary methylxanthine found in Theobroma cacao, prevents malignant glioblastoma proliferation by negatively regulating phosphodiesterase-4, extracellular signal-regulated kinase, Akt/mammalian target of rapamycin kinase, and nuclear factor-kappa B. *Nutr Cancer*, **2014**, 66, 419-423.

Suiko M, Kurogi K, Hashiguchi T, Sakakibara Y, Liu MC. Updated perspectives on the cytosolic sulfotransferases (SULTs) and SULT-mediated sulfation. *Biosci Biotechnol Biochem*, **2017**, 81, 63-72.

Sumantran VN. Cellular chemosensitivity assays: an overview. *Methods Mol Biol*, **2011**, 731, 219-236.

Taguchi C, Fukushima Y, Kishimoto Y, Suzuki-Sugihara N, Saita E, Takahashi Y, Kondo K. Estimated dietary polyphenol intake and major food and beverage sources among elderly Japanese. *Nutrients*, **2015**, 7, 10269-10281

Tamimi RM, Spiegelman D, Smith-Warner SA, Wang M, Pazaris M, Willett WC, Eliassen AH, Hunter DJ. Population attributable risk of modifiable and nonmodifiable breast cancer risk factors in postmenopausal breast cancer. *Am J Epidemiol*, **2016**, 184, 884-893.

Tanaka H, Hirose M, Kawabe M, Sano M, Takesada Y, Hagiwara A, Shirai T. Post-initiation inhibitory effects of green tea catechins on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary gland carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett*, **1997**, 116, 47-52.

Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res*, **2019**, 29, 347-364.

Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast cancer: epidemiology and etiology. *Cell Biochem Biophys*, **2015**, 72, 333-338.

Teixeira LL, Costa GR, Dörr FA, Ong TP, Pinto E, Lajolo FM, Hassimotto NMA. Potential antiproliferative activity of polyphenol metabolites against human breast cancer cells and their urine excretion pattern in healthy subjects following acute intake of a polyphenol-rich juice of grumixama (Eugenia brasiliensis Lam.). *Food Funct*, **2017**, 8, 2266-2274.

Terese Winslow LLC. "Breast anatomy female": for the National Cancer Institute, **2011**, U.S.

Teven CM, Schmid DB, Sisco M, Ward J, Howard MA. Systemic therapy for early-stage breast cancer: what the plastic surgeon should know. *Eplasty*, **2017**, 17, e7.

Thangapazham RL, Singh AK, Sharma A, Warren J, Gaddipati JP, Maheshwari RK. Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett*, **2007**, 245(1–2), 232-241.

Thiele W, Rothley M, Teller N, Jung N, Bulat B, Plaumann D, Vanderheiden S, Schmaus A, Cremers N, Göppert B, Dimmler A, Eschbach V, Quagliata L, Thaler S, Marko D, Bräse S, Sleeman JP. Delphinidin is a novel inhibitor of lymphangiogenesis but promotes mammary tumor growth and metastasis formation in syngeneic experimental rats. *Carcinogenesis*, **2013**, 34, 2804-2813.

Thompson LU, Chen JM, Li T, Strasser-Weippl K, Goss PE. Dietary flaxseed alters tumor biological markers in postmenopausal breast cancer. *Clin Cancer Res*, **2005**, 11, 3828-3835.

Thompson LU, Rickard SE, Orcheson LJ, Seidl MM. SHORT COMMUNICATION: flaxseed and its lignan and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **1996**, 17, 1373-1376.

Thomsen AR, Mortensen A, Breinholt VM, Lindecrona RH, Penalvo JL, Sorensen IK. Influence of Prevastein®, an isoflavone-rich soy product, on mammary gland development and tumorigenesis in Tg.NK (MMTV/c-neu) mice. *Nutr Cancer*, **2005**, 52, 176-188.

Thorn CF, Aklillu E, McDonagh EM, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: caffeine pathway. *Pharmacogenet Genomics*, **2012**, 22, 389-395.

Thummel KE, Lin YS. Sources of interindividual variability. *Methods Mol Biol*, **2014**, 1113, 363-415.

Tomás-Barberán FA, Clifford MN. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones--nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, **2000**, 80, 1073-1080.

Tomás-Barberán FA, Espín JC. Phenolic compounds and related enzymes of quality in fruit and vegetables. *J Sci Food Agric*, **2001**, 81, 853-876.

Tomás-Barberán FA, Espín JC. Effect of Food Structure and Processing on (Poly)phenol-Gut Microbiota Interactions and the Effects on Human Health. *Annu Rev Food Sci Technol*, **2019**, 10, 221-238.

Tomás-Barberán FA, González-Sarrías A, García-Villalba R, Núñez-Sánchez MA, Selma MV, García-Conesa MT, Espín JC. Urolithins, the rescue of "old" metabolites to understand a "new" concept: metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. *Mol Nutr Food Res*, **2017**, 61, 10.1002/mnfr.201500901.

Tomé-Carneiro J, Gonzálvez M, Larrosa M, Yáñez-Gascón MJ, García-Almagro FJ, Ruiz-Ros JA, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA, Espín JC. One-year consumption of a grape nutraceutical containing resveratrol improves the inflammatory and fibrinolytic status of patients in primary prevention of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*, **2012**, 110, 356-363.

Tomé-Carneiro J, Larrosa M, González-Sarrías A, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT, Espín JC. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Curr Pharm Des*. **2013**, 19, 6064-6093.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, **2015**, 65, 87-108.

Tripathi S, Kushwah V, Thanki K, Jain S. Triple antioxidant SNEDDS formulation with enhanced oral bioavailability: implication of chemoprevention of breast cancer. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*, **2016**, 12, 1431-1443.

Truan JS, Chen J-M, Thompson LU. Flaxseed oil reduces the growth of human breast tumors (MCF-7) at high levels of circulating estrogen. *Mol Nutr Food Res*, **2010**, 54, 1414-1421.

Truan JS, Chen J-M, Thompson LU. Comparative effects of sesame seed lignan and flaxseed lignan in reducing the growth of human breast tumors (MCF-7) at high levels of circulating estrogen in athymic mice. *Nutr Cancer*, **2012**, 64, 65-71.

Tsao D, Diatchenko L, Dokholyan NV. Structural mechanism of S-adenosyl methionine binding to catechol O-methyltransferase. *PLoS One*, **2011**, 6, e24287.

Ueda M, Niho N, Imai T, Shibutani M, Mitsumori K, Matsui T, Hirose M. Lack of significant effects of genistein on the progression of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Nutr Cancer*, **2003**, 47, 141-147.

Urpi-Sarda M, Morand C, Besson C, Kraft G, Viala D, Scalbert A, Besle JM, Manach C. Tissue distribution of isoflavones in ewes after consumption of red clover silage. *Arch Biochem Biophys*, **2008**, 476, 205-210.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, **2006**, 160, 1-40.

VanderPloeg LC, Wolfrom DM, Welsch CW. Influence of caffeine on development of benign and carcinomatous mammary gland tumors in female rats treated with the carcinogens 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and *N*-methyl-*N*-nitrosourea. *Cancer Res*, **1991**, 51, 3399-3404.

van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature*, **2014**, 509, 439-446.

Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. Review The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2010**, 11, 329-41.

Vallejo F, Larrosa M, Escudero E, Zafrilla MP, Cerdá B, Boza J, García-Conesa MT, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Concentration and solubility of flavanones in orange beverages affect their bioavailability in humans. *J Agric Food Chem*, **2010**, 58, 6516-6524.

Velloso FJ, Bianco AF, Farias JO, Torres NE, Ferruzo PY, Anschau V, Jesus-Ferreira HC, Chang TH, Sogayar MC, Zerbini LF, Correa RG. The crossroads of breast cancer progression: insights into the modulation of major signaling pathways. *Onco Targets Ther*, **2017**, 20, 10, 5491-5524.

Venkata Sairam K, Gurupadayya BM, Chandan RS, Nagesha DK, Vishwanathan B. A review on chemical profile of coumarins and their therapeutic role in the treatment of cancer. *Curr Drug Deliv*, **2016**, 13, 186-201.

Verma AK, Johnson JA, Gould MN, Tanner MA. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene- and *N*-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Res*, **1988**, 48, 5754-5758.

Verschoyle RD, Brown K, Steward WP, Gescher AJ. Consumption of silibinin, a flavonolignan from milk thistle, and mammary cancer development in the C3(1) SV40 T,t antigen transgenic multiple mammary adenocarcinoma (TAg) mouse. *Cancer Chemother Pharmacol*, **2008**, 62, 369-372.

Vieira AF, Schmitt F. An update on breast cancer multigene prognostic tests-emergent clinical biomarkers. *Front Med (Lausanne)*, **2018**, 5, 248.

Vieites B, López-García MÁ, Castilla C, Hernández MJ, Biscuola M, Alfaro L, Atienza MR, Castilla MÁ, Palacios J. CK19 expression in breast tumours and lymph node metastasis after neoadjuvant therapy. *Histopathology*, **2016**, 69, 239-249.

Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, Lichtor T, Decker WK, Whelan RL, Kumara HMCS, Signori E, Honoki K, Georgakilas AG, Amin A, Helferich WG, Boosani CS, Guha G, Ciriolo MR, Chen S, Mohammed SI, Azmi AS, Keith WN, Bilsland A, Bhakta D, Halicka D, Fujii H, Aquilano K, Ashraf SS, Nowsheen S, Yang X, Choi BK, Kwon BS. Immune evasion in cancer: mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*, **2015**, 35, S185-198.

Vissac-Sabatier C, Coxam V, Déchelotte P, Picherit C, Horcajada MN, Davicco MJ, Lebecque P, Bignon YJ, Bernard-Gallon D. Phytoestrogen-rich diets modulate expression of Brca1 and Brca2 tumor suppressor genes in mammary glands of female Wistar rats. *Cancer Res*, **2003**, 63, 6607-6612.

Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: a review. *JAMA*, **2019**, 321, 288-300.

Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE Jr, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*, **2004**, 32, 1377-1382.

Wang B, Xu H, Hu X, Ma W, Zhang J, Li Y, Yu M, Zhang Y, Li X, Ye X. Synergetic inhibition of daidzein and regular exercise on breast cancer in bearing-4T1 mice by regulating NK cells and apoptosis pathway. *Life Sci*, **2020**, 245, 117387.

Wang L, Chen J, Thompson LU. The inhibitory effect of flaxseed on the growth and metastasisof estrogen receptor negative human breast cancer xenograftsis attributed to both its lignan and oil components. *Int J Cancer*, **2005**, 116, 793-798.

Wang N, Ren D, Deng S, Yang X. Differential effects of baicalein and its sulfated derivatives in inhibiting proliferation of human breast cancer MCF-7 cells. *Chem Biol Interact*, **2014**, 221, 99-108.

Wang N, Wang Q, Tang H, Zhang F, Zheng Y, Wang S, Zhang J, Wang Z, Xie X. Direct inhibition of ACTN4 by ellagic acid limits breast cancer metastasis via regulation of β-catenin stabilization in cancer stem cells. *J Exp Clin Cancer Res*, **2017**, 36, 172.

Wang SY, Jiao H. Scavening capacity of Berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *J Agric Food Chem*, **2000**, 48, 5677-5684.

Wang X, Yuan S, Wang J, Lin P, Liu G, Lu Y, Zhang J, Wang W, Wei Y. Anticancer activity of litchi fruit pericarp extract against human breast cancer in vitro and in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol*, **2006**, 215, 168-178.

Wang Y, Lee KW, Chan FL, Chen S, Leung LK. The red wine polyphenol resveratrol displays bilevel inhibition on aromatase in breast cancer cells. *Toxicol Sci*, **2006**, 92, 71-77.

Wang Z, Zhang H, Hou J, Niu J, Ma Z, Zhao H, Liu C. Clinical implications of β-catenin protein expression in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, **2015**, 8, 14989-14994.

Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis*, **2019**, 10, 177.

Washbrook, E. Risk factors and epidemiology of breast cancer. *Women's Health Medicine*, **2006**, 3, 8-14.

Watson KL, Stalker L, Jones RA, Moorehead RA. High levels of dietary soy decrease mammary tumor latency and increase incidence in MTB-IGFIR transgenic mice. *BMC Cancer*, **2015**, 15, 37.

Way TD, Kao MC, Lin JK. Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem*, **2004a**, 279, 4479-4489.

Way TD, Lee HH, Kao MC, Lin JK. Black tea polyphenol theaflavins inhibit aromatase activity and attenuate tamoxifen resistance in HER2/neu-transfected human breast cancer cells through tyrosine kinase suppression. *Eur J Cancer*, **2004b**, 40, 2165-2174.

Whitsett T, Carpenter M, Lamartiniere CA. Resveratrol, but not EGCG, in the diet suppresses DMBA-induced mammary cancer in rats. *J Carcinog*, **2006**, 5, 15.

Williamson G, Clifford MN. Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols. *Biochem Pharmacol*, **2017**, 139, 24-39.

Wolfrom DM, Rao AR, Welsch CW. Caffeine inhibits development of benign mammary gland tumors in carcinogen-treated female Sprague-Dawley rats. *Breast Cancer Res Treat*, **1991**, 19, 269-275.

Wong MY, Chiu GNC. Liposome formulation of co-encapsulated vincristine and quercetin enhanced antitumor activity in a trastuzumab-insensitive breast tumor xenograft model. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*, **2011**, 7, 834-840.

World Cancer Research Fund International/American Institute for Cancer Research (WCRF/AICR). Diet, Nutrition, Physical Activity and Breast Cancer: a Global Perspective. Continuous Update Project Expert Report, **2018**. Disponible en: https://www.wcrf.org/dietandcancer/

Wu B, Kulkarni K, Basu S, Zhang S, Hu M. First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *J Pharm Sci*, **2011**, 100, 3655-3681.

Wu Q, Kroon PA, Shao H, Needs PW, Yang X. Differential Effects of Quercetin and Two of Its Derivatives, Isorhamnetin and Isorhamnetin-3-glucuronide, in Inhibiting the Proliferation of Human Breast-Cancer MCF-7 Cells. *J Agric Food Chem*, **2018a**, 66, 7181-7189.

Wu Q, Needs PW, Lu Y, Kroon PA, Ren D, Yang X. Different antitumor effects of quercetin, quercetin-3'-sulfate and quercetin-3-glucuronide in human breast cancer MCF-7 cells. *Food Funct*, **2018b**, 9, 1736-1746.

Xia L, Tan S, Zhou Y, Lin J, Wang H, Oyang L, Tian Y, Liu L, Su M, Wang H, Cao D, Liao Q. Role of the NFκB-signaling pathway in cancer. *Onco Targets Ther*, **2018**, 11, 2063-2073.

Xiang LP, Wang A, Ye JH, Zheng XQ, Polito CA, Lu JL, Li QS, Liang YR. Suppressive effects of tea catechins on breast cancer. *Nutrients*, **2016**, 8, 458.

Xie W, Mertens JC, Reiss DJ, Rimm DL, Camp RL, Haffty BG, Reiss M. Alterations of Smad signaling in human breast carcinoma are associated with poor outcome: a tissue microarray study. *Cancer Res*, **2002**, 62, 497-505.

Xu P, Yan F, Zhao Y, Chen X, Sun S, Wang Y, Ying L. Green tea polyphenol EGCG attenuates MDSCs-mediated immunosuppression through canonical and non-canonical pathways in a 4T1 murine breast cancer model. *Nutrients*, **2020**, 12, 1042.

Xu ZQ, Zhang Y, Li N, Liu PJ, Gao L, Gao X, Tie XJ. Efficacy and safety of lapatinib and trastuzumab for HER2-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ open*, **2017**, 7, e013053.

Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*, **2018**, 10, 1618.

Yamazaki S, Miyoshi N, Kawabata K, Yasuda M, Shimoi K. Quercetin-3-O-glucuronide inhibits noradrenaline-promoted invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells by blocking β-adrenergic signaling. *Arch Biochem Biophys*, **2014a,** 557, 18-27.

Yamazaki S, Sakakibara H, Takemura H, Yasuda M, Shimoi K. Quercetin-3-O-glucronide inhibits noradrenaline binding to α2-adrenergic receptor, thus suppressing DNA damage induced by treatment with 4-hydroxyestradiol and noradrenaline in MCF-10A cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2014b**, 143, 122-129.

Yan W, Ma X, Zhao X, Zhang S. Baicalein induces apoptosis and autophagy of breast cancer cells via inhibiting PI3K/AKT pathway in vivo and vitro. *Drug Des Devel Ther*, **2018**, 12, 3961-3972.

Yang H, Rouse J, Lukes L, Lancaster M, Veenstra T, Zhou M, Shi Y, Park YG, Hunter K. Caffeine suppresses metastasis in a transgenic mouse model: a prototype molecule for prophylaxis of metastasis. *Clin Exp Metastasis*, **2004**, 21, 719-735.

Yang X, Edgerton SM, Kosanke SD, Mason TL, Alvarez KM, Liu N, Chatterton RT, Liu B, Wang Q, Kim A, Murthy S, Thor AD. Hormonal and dietary modulation of mammary carcinogenesis in mouse mammary tumor virus-c-erbB-2 transgenic mice. *Cancer Res*, **2003**, 63, 2425-2433.

Yang X, Luo E, Liu X, Han B, Yu X, Peng X. Delphinidin-3-glucoside suppresses breast carcinogenesis by inactivating the Akt/HOTAIR signaling pathway. *BMC Cancer*, **2016**, 16, 423.

Yao Y, Zhao K, Yu Z, Ren H, Zhao L, Li Z, Guo Q, Lu N. Wogonoside inhibits invasion and migration through suppressing TRAF2/4 expression in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, **2017**, 36, 103.

Ye L, Chan FL, Chen S, Leung LK. The citrus flavonone hesperetin inhibits growth of aromatase-expressing MCF-7 tumor in ovariectomized athymic mice. *J Nutr Biochem*, **2012**, 23, 1230-1237.

Yokdang N, Nordmeier S, Speirs K, Burkin HR, Buxton IL. Blockade of extracellular NM23 or its endothelial target slows breast cancer growth and metastasis. *Integr Cancer Sci Ther*, **2015**, 2, 192-200.

Yoon JK, Park BN, Paik JY, Jung KH, Ko BH, Lee KH. Effects of theophylline on radioiodide uptake in MCF-7 breast cancer and NIS gene-transduced SNU-C5 colon cancer cells. *Cancer Biother Radiopharm*, **2009**, 24, 201-208.

Youn H, Hee Kook Y, Oh ET, Jeong SY, Kim C, Kyung Choi E, Uk Lim B, Park HJ. 1-Methylxanthine enhances the radiosensitivity of tumor cells. *Int J Radiat Biol*, **2009**, 85, 167-174.

Yu B, Khan G, Foxworth A, Huang K, Hilakivi-Clarke L. Maternal dietary exposure to fiber during pregnancy and mammary tumorigenesis among rat offspring. *Int J Cancer*, **2006**, 119, 2279-2286.

Yu SS, Spicer DV, Hawes D, Tseng CC, Yang CS, Pike MC, Wu AH. Biological effects of green tea capsule supplementation in pre-surgery postmenopausal breast cancer patients. *Front Oncol*, **2013**, 3, 298.

Yuan B, Wang L, Jin Y, Zhen H, Xu P, Xu Y, Li C, Xu H. Role of metabolism in the effects of genistein and its phase II conjugates on the growth of human breast cell lines. *AAPS J*, **2012**, 14, 329-344.

Yuan L, Wagatsuma C, Yoshida M, Miura T, Mukoda T, Fujii H, Sun B, Kim JH, Surh YJ. Inhibition of human breast cancer growth by GCP (genistein combined polysaccharide) in xenogeneic athymic mice: involvement of genistein biotransformation by beta-glucuronidase from tumor tissues. *Mutat Res*, **2003**, 523-524, 55-62.

Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*, **2013**, 138, 103-141.

Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, **2017**, 36, 1461-1473.

Zhang F, Dong W, Zeng W, Zhang L, Zhang C, Qiu Y, Wang L, Yin X, Zhang C, Liang W. Naringenin prevents TGF-β1 secretion from breast cancer and suppresses pulmonary metastasis by inhibiting PKC activation. *Breast Cancer Res*, **2016**, 18, 38.

Zhang GP, Han D, Liu G, Gao SG, Cai XQ, Duan RH, Feng XS. Effects of soy isoflavone and endogenous oestrogen on breast cancer in MMTV-erbB2 transgenic mice. *J Int Med Res*, **2012**, 40, 2073-2082.

Zhang L, Wang X, Sun D, Liu X, Hu X, Kong F. Regulation of zinc transporters by dietary flaxseed lignan in human breast cancer xenografts. *Mol Biol Rep*, **2008**, 35, 595-600.

Zhao M, Yang B, Wang J, Liu Y, Yu L, Jiang Y. Immunomodulatory and anticancer activities of flavonoids extracted from litchi (Litchi chinensis Sonn) pericarp. *Int Immunopharmacol*, **2007**, 7, 162-166.

Zhao T, Sun Q, del Rincon SV, Lovato A, Marques M, Witcher M. Gallotannin imposes S phase arrest in breast cancer cells and suppresses the growth of triple-negative tumors in vivo. *PLoS ONE*, **2014**, 9, e92853.

Zhao X, Wang Q, Yang S, Chen C, Li X, Liu J, Zou Z, Cai D. Quercetin inhibits angiogenesis by targeting calcineurin in the xenograft model of human breast cancer. *Eur J Pharmacol*, **2016**, 781, 60-68.

Zhao Z, Jin G, Ge Y, Guo Z. Naringenin inhibits migration of breast cancer cells via inflammatory and apoptosis cell signaling pathways. *Inflammopharmacology*, **2019**, 27, 1021-1036.

Zhou JR, Yu L, Mai Z, Blackburn GL. Combined inhibition of estrogen-dependent human breast carcinoma by soy and tea bioactive components in mice. *Int J Cancer*, **2004**, 108, 8-14.

Zhou X, Zhao Y, Wang J, Wang X, Chen C, Yin D, Zhao F, Yin J, Guo M, Zhang L, Du L, Zhang B, Yin X. Resveratrol represses estrogen-induced mammary carcinogenesis through NRF2-UGT1A8-estrogen metabolic axis activation. *Biochem Pharmacol*, **2018**, 155, 252-263.

Zhou Y, Chen J, Li Q, Huang W, Lan H, Jiang H. Association between breastfeeding and breast cancer risk: evidence from a meta-analysis. *Breastfeed Med*. **2015**, 10, 175-182.

Zhou Y, Eppenberger-Castori S, Marx C, Yau C, Scott GK, Eppenberger U, Benz CC. Activation of nuclear factor-kappaB (NFkappaB) identifies a high-risk subset of hormone-dependent breast cancers. *Int J Biochem Cell Biol*, **2005**, 37, 1130-1144.

Zhou Y, Liu YE, Cao J, Zeng G, Shen C, Li Y, et al. Vitexins, Nature-Derived Lignan Compounds, Induce Apoptosis and Suppress Tumor Growth. *Clin Cancer Res*, **2009**, 15, 5161-5169.

Zhou Y, Zheng J, Li Y, Xu DP, Li S, Chen YM, Li HB. Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients*, **2016**, 8, 515.

Zydron M, Baranowski J, Baranowska I. Separation, pre-concentration, and HPLC analysis of methylxanthines in urine samples. *J Sep Sci*, **2004**, 27, 1166-1172.

RESUMEN

RESUMEN

El cáncer de mama es el más diagnosticado entre mujeres y supone un 15% de las muertes por cáncer entre la población mundial femenina. Tiene una etiología multifactorial, pero sólo el 10-15% son casos hereditarios. Esto implica que los factores de riesgo modificables son los que se asocian principalmente con su incidencia. Mientras que la obesidad o abuso de alcohol incrementan el riesgo de cáncer de mama, un mayor consumo de alimentos vegetales podría tener posible efecto preventivo.

Numerosos estudios preclínicos con compuestos fenólicos muestran multitud de mecanismos de acción protectores frente al cáncer de mama. Sin embargo, la evidencia en humanos es aún escasa y controvertida. Esta Tesis Doctoral incluye una revisión exhaustiva y crítica de los motivos que hay tras esa evidencia aún inconsistente, incluyendo la falta de i) estudios en pacientes con cáncer de mama que relacionen los efectos beneficiosos con los compuestos fenólicos, ii) estudios preclínicos con metodologías adecuadas para extrapolar sus resultados a un contexto clínico, y iii) estudios que evalúen la biodisponibilidad y distribución en tejidos humanos sistémicos.

Considerando lo anterior, esta Tesis ha tenido como objetivo principal identificar qué compuestos (formas moleculares y concentraciones) llegan al tejido mamario tumoral (TTM) y sano (TSM) en pacientes con cáncer de mama tras el consumo de una mezcla de extractos vegetales, ricos en fenólicos, representativos de la dieta. Este objetivo serviría para abordar estudios mecanísticos *in vitro*, más representativos de la situación *in vivo*, sobre el efecto quimiopreventivo de metabolitos fisiológicamente relevantes en modelos celulares de cáncer de mama.

Para abordar estos objetivos se realizó un estudio clínico en pacientes con cáncer de mama, donde se caracterizó el perfil metabólico de diferentes compuestos fenólicos y sus

metabolitos en TTM y TSM, plasma y orina de estas pacientes, tras consumir una mezcla de extractos vegetales. Además, se estudió en un modelo animal (ratas Sprague Dawley) la farmacocinética en plasma y tejido mamario de fenólicos y metabolitos derivados, tras el consumo de esta mezcla.

El estudio clínico permitió identificar 27 metabolitos fenólicos y 6 metilxantinas en TTM de pacientes con cáncer de mama, siendo la mayoría de las formas moleculares detectadas en TTM, conjugados de Fase-II (glucurónidos y sulfatos). El estudio animal permitió conocer parámetros cinéticos en plasma y tejido mamario de los fenólicos y sus derivados metabólicos, y sirvió para identificar que el ayuno previo a la cirugía en pacientes puede subestimar cualitativa- y cuantitativamente la distribución de metabolitos fenólicos en tejido mamario.

Los metabolitos que llegan al TTM no ejercieron efecto antiproliferativo, ni tampoco actividad estrogénica/antiestrogénica, a tiempos cortos de exposición en diferentes modelos celulares de cáncer de mama. Estudios posteriores revelaron que el metabolismo de Fase-II es crítico para dificultar/abolir la actividad biológica de los metabolitos. Sin embargo, resveratrol y sus metabolitos de Fase-II, detectados en TTM humano, sí ejercieron efecto quimiopreventivo a largo plazo, mediante la inducción de senescencia celular (dependiente de la ruta p53/p21) en la línea tumoral MCF-7 (p53-silvestre) pero no en MDA-MB-231 (p53-mutado). Esto último alienta a investigar el efecto quimiopreventivo de otros fenólicos detectados en TTM mediante la inducción de senescencia, lo que sería plausible con un consumo crónico de alimentos ricos en fenólicos.

En general, esta Tesis ha contribuido a comprender qué compuestos fenólicos y metabolitos llegan al TTM en pacientes con cáncer de mama tras el consumo de alimentos vegetales, y qué posible papel podrían jugar estos compuestos frente al cáncer. Además,

esta Tesis refuerza el concepto de "primero *in vivo*, luego *in vitro*", y establece una posible secuencia de estudios a seguir para caracterizar la actividad anticancerígena de componentes de la dieta en tejidos sistémicos.

ABSTRACT

ABSTRACT

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer in women worldwide. Overall, this disease accounts for 15% of cancer deaths among the female population. Breast cancer has multifactorial etiology, but only 10-15% of cases are hereditary. This means that the vast majority are caused by modifiable factors. Thus, it has been described that while obesity or alcohol consumption increase the risk of breast cancer, the higher consumption of phenolic-rich plant foods could be related to a possible preventive effect. Although many preclinical studies have reported numerous mechanisms of action of phenolics that would explain their protective role against breast cancer, however, evidence remains still scarce and controversial in humans. This Doctoral Thesis reviews comprehensively and critically the reasons that are behind this inconsistent evidence, including i) the low number of clinical trials that report beneficial effects of phenolics against breast cancer, ii) the big gap between preclinical and clinical research due to the assay of non-physiological conditions, and iii) the lack of studies that evaluate the bioavailability and distribution of phenolics and derived metabolites in systemic human tissues.

Considering the above, this Thesis has aimed to identify which compounds (molecular forms and concentrations) can reach malignant (MMT) and normal (NMT) mammary tissues of breast cancer patients after consuming a mixture of phenolic-rich plant extracts, representative of a dietary context. This knowledge could help to design mechanistic studies, illustrative of the *in vivo* situation, to evaluate the potential chemopreventive effect of physiologically relevant phenolic-derived metabolites using different breast cancer cell models.

To address this objective, we conducted a clinical trial with breast cancer patients to characterize the metabolic profile of different dietary phenolics and their derived metabolites in MMT and NMT, plasma, and urine of patients after consuming a mixture of plant extracts. Furthermore, the plasma and tissue pharmacokinetics of phenolics and derived metabolites after consuming the same mixture of plant extracts were evaluated in an animal model (Sprague Dawley rats).

The clinical trial allowed identifying 27 phenolic-derived metabolites and 6 methylxanthines in MMT from breast cancer patients. Phenolic-derived Phase-II conjugated metabolites (mainly glucuronides and sulfates) were the main molecular forms detected in MMT and NMT. Furthermore, the animal study revealed the kinetics of phenolics and derived metabolites in plasma and mammary tissues, and determined that fasting before surgery qualitatively and quantitatively was a critical issue to underestimate the distribution of phenolic-derived metabolites in systemic tissues, including mammary tissue.

The *in vitro* assays showed that phenolic-derived metabolites occurring in MMT, even at much higher concentrations, did not exert antiproliferative, neither estrogenic/antiestrogenic, effects in different breast cancer cell models after short-term exposure. Further cell studies demonstrated that Phase-II conjugation was critical to hamper the chemopreventive effects of phenolics and derived metabolites in breast cancer cell models.

However, resveratrol and their Phase-II metabolites, as detected in human MMT, induced cellular senescence (dependent on the p53/p21 pathway) in MCF-7 breast cancer cells (wild-type p53), but not in MDA-MB-231 cells (mutant p53), after long-term exposure. These results open new research scenarios to explore possible chemopreventive effects of other relevant phenolic-derived metabolites detected in MMT. These beneficial

effects against breast cancer through cellular senescence induction would be plausible with chronic consumption of phenolic-containing foods.

Overall, this Thesis has mainly contributed to understanding what phenolics and derived metabolites reach the MMT in breast cancer patients after consuming plant foods, and what possible protective role against this cancer they could play. Besides, this Thesis claims for the concept 'first *in vivo*, and then, *in vitro*', and establishes a possible sequence of studies to be followed for characterizing the cancer chemopreventive activity of dietary compounds in systemic tissues.

APÉNDICE

(Publicaciones)

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Review

Dietary Phenolics against Breast Cancer. A Critical Evidence-Based Review and Future Perspectives

María Ángeles Ávila-Gálvez, Juan Antonio Giménez-Bastida, Juan Carlos Espín * and Antonio González-Sarrías *

Laboratory of Food and Health, Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Dept. Food Science and Technology, CEBAS-CSIC, P.O. Box 164, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain; mavila@cebas.csic.es (M.Á.Á.-G.); jgbastida@cebas.csic.es (J.A.G.-B.)

* Correspondence: jcespin@cebas.csic.es (J.C.E.); agsarrias@cebas.csic.es (A.G.-S.)

Received: 21 July 2020; Accepted: 8 August 2020; Published: 10 August 2020



Abstract: Breast cancer (BC) is the most common malignancy and the leading cause of cancer-related death in adult women worldwide. Over 85% of BC cases are non-hereditary, caused by modifiable extrinsic factors related to lifestyle, including dietary habits, which play a crucial role in cancer prevention. Although many epidemiological and observational studies have inversely correlated the fruit and vegetable consumption with the BC incidence, the involvement of their phenolic content in this correlation remains contradictory. During decades, wrong approaches that did not consider the bioavailability, metabolism, and breast tissue distribution of dietary phenolics persist behind the large currently existing gap between preclinical and clinical research. In the present review, we provide comprehensive preclinical and clinical evidence according to physiologically relevant in vitro and in vivo studies. Some dietary phenolics such as resveratrol (RSV), quercetin, isoflavones, epigallocatechin gallate (EGCG), lignans, and curcumin are gaining attention for their chemopreventive properties in preclinical research. However, the clinical evidence of dietary phenolics as BC chemopreventive compounds is still inconclusive. Therefore, the only way to validate promising preclinical results is to conduct clinical trials in BC patients. In this regard, future perspectives on dietary phenolics and BC research are also critically discussed.

Keywords: breast cancer; polyphenols; in vitro; animal models; clinical trials; dietary phenolics

1. Breast Cancer: General Aspects

Cancer is one of the world's most substantial health problems and the second leading cause of death globally, with 9.6 million cancer-related deaths in 2018 [1,2]. Among women, breast cancer (BC) is the first cause of cancer-associated death and the most commonly diagnosed malignant tumour worldwide, accounting for 2.1 million new BC diagnoses in 2018 [3]. Although the advances in diagnosis, treatment and intensive research have significantly increased the survival rates among BC subjects in the past years, its incidence has increased worldwide, especially in developing countries. According to U.S. Breast Cancer Statistics, it is estimated that BC impacts nearly 1 in 8 women in their lifetime [4]. Only 10%–15% of all BC cases are hereditary, meaning that the vast majority are caused by modifiable risk factors, playing a central role in cancer prevention through lifestyle improvement, including dietary habits [5,6]. Apart from the dietary and lifestyle habits, other related factors to BC include age, ethnicity, hormonal status, hormonal therapy, ultraviolet radiation, and circadian disruption [7]. Regarding genetic risk factors, some mutations such as breast cancer susceptibility gene 1 (*BCRA1*), *BCRA2*, and *TP53* are generally accepted, although these mutations are rare and only constitute approximately 5%–10% of all BC rates incidences [5,8,9].

Molecular Nutrition & Food Research
www.mnf-journal.com

Metabolic Profiling of Dietary Polyphenols and Methylxanthines in Normal and Malignant Mammary Tissues from Breast Cancer Patients

*María Ángeles Ávila-Gálvez, Rocío García-Villalba, Francisco Martínez-Díaz, Beatriz Ocaña-Castillo, Tamara Monedero-Saiz, Adela Torrecillas-Sánchez, Beatriz Abellán, Antonio González-Sarrías, and Juan Carlos Espín**

Scope: Dietary polyphenols may protect against breast cancer. However, it is unknown whether polyphenols reach human malignant breast tumors in molecular forms and(or) at concentrations likely to act against cancer.
Methods and Results: Ninteen breast cancer patients consumed three capsules daily from biopsy-confirmed diagnosis to surgery (6 ± 2 days). The capsules contained pomegranate, orange, lemon, olive, cocoa, and grapeseed extracts plus resveratrol, providing 37 different phenolics (473.7 mg), theobromine and caffeine (19.7 mg). A total of 101 metabolites are identified in urine, 69 in plasma, 39 in normal (NT), and 33 in malignant (MT) tissues by UPLC-ESI-QTOF-MS. Eight control patients did not consume extracts. Phenolic-derived metabolites in MT and NT are mainly glucuronidated and(or) sulfated. Some representative metabolites detected in MT (median and range, pmol g^{-1}) are urolithin-A-3-*O*-glucuronide (26.2; 3.2—66.5), 2,5-dihydroxybenzoic acid (40.2; 27.7—52.2), resveratrol-3-*O*-sulfate (86.4; 7.8—224.4), dihydroresveratrol-3-*O*-glucuronide (109.9; 10.3—229.4), and theobromine (715.0; 153.9—3,216). Metabolites, as detected in breast tissues, do not exert antiproliferative or estrogenic/antiestrogenic activities in MCF-7 breast cancer cells.
Conclusion: This is the first study that describes the metabolic profiling of dietary phenolics and methylxanthines in MT and NT comprehensively. Although phase-II conjugation might hamper a direct anticancer activity, long-term tumor-senescent chemoprevention cannot be discarded.

1. Introduction

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer in women worldwide and the second leading cause of cancer death. Overall, one in eight women will be diagnosed with breast cancer in their lifetime and prevention through the improvement of lifestyle, including dietary habits, remains as the first-choice strategy.[1,2]

Fruits, vegetables, and derivatives such as tea, olive oil, coffee, and cocoa contain phytochemicals (phenolics, carotenoids, glucosinolates, and others) with potential cancer chemopreventive activity.[3,4] Among them, (poly)phenolic compounds show a broad spectrum of activities (antioxidant, antiinflammatory, cardioprotective, anticancer, etc.).[4,5] There is abundant research in animal models that highlights a significant role of polyphenols and polyphenol-rich plant extracts in the prevention of breast cancer, including resveratrol,[6] ellagic acid,[7] berries,[8,9] pomegranate,[10] and citrus flavanones.[11] However, this evidence remains elusive in humans. The recent Continuous Update Project (CUP) reported the only limited association between breast cancer risk and the intake of fruits, vegetables, tea and coffee, and some phytochemicals such as isoflavones and carotenoids.[12] To date, observational studies provide results suggestive of protection only for vegetable consumption against estrogen receptor-negative (ER-) breast cancer risk, a subtype of cancer more abundant in premenopausal women.[13–15] The explanation could lie in an inaccurate estimation of individuals' exposure to the polyphenol metabolome.[16]

M. Á. Ávila-Gálvez, Dr. R. García-Villalba, T. Monedero-Saiz, Dr. A. González-Sarrías, Prof. J. C. Espín
Laboratory of Food & Health
Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, CEBAS-CSIC
Campus de Espinardo
30100 Murcia, Spain
E-mail: jcespin@cebas.csic.es

Dr. F. Martínez-Díaz, B. Ocaña-Castillo
Reina Sofía University Hospital
Service of Anatomical Pathology
Avda. Intendente Jorge Palacios s/n, 30003 Murcia, Spain

A. Torrecillas-Sánchez
Reina Sofía University Hospital
Service of Breast Unit
Avda. Intendente Jorge Palacios s/n, 30003 Murcia, Spain

Dr. B. Abellán
Reina Sofía University Hospital
Service of Surgery
Avda. Intendente Jorge Palacios s/n, 30003 Murcia, Spain

DOI: 10.1002/mnfr.201801239

 © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Journal of Functional Foods 61 (2019) 103516

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Functional Foods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jff

Kinetic disposition of dietary polyphenols and methylxanthines in the rat mammary tissue

María Ángeles Ávila-Gálvez, María Romo-Vaquero, Antonio González-Sarrías, Juan Carlos Espín*

Laboratory of Food & Health, Research Group on Quality, Safety, and Bioactivity of Plant Foods, CEBAS-CSIC, 30100 Campus de Espinardo, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Mammary tissue
Methylxanthine
Polyphenol
Breast cancer
Resveratrol
Plant extract

ABSTRACT

We recently showed that methylxanthines and conjugated phenolic-derived metabolites reached the mammary tissue (MT) of breast cancer patients after consuming a blend of phenolic-rich extracts. The pre-surgery fasting could prevent the detection of some (including those non-conjugated) metabolites. We investigated here the pharmacokinetics in rat plasma and MT of phenolic-derived metabolites and methylxanthines using the same blend (pomegranate, olive, cocoa, orange, lemon, and grapeseed extracts plus resveratrol; containing 37 phenolics, theobromine, and caffeine). We also compared the pharmacokinetics of resveratrol when administered in the blend or individually. We show for the first time that micromolar levels of methylxanthines and conjugated-derived (but not free) metabolites from resveratrol, dihydroresveratrol, hesperetin, urolithins, and hydroxytyrosol reached the MT. Resveratrol-3-glucuronide and resveratrol-3-sulfate showed shorter T_{max} (plasma and MT) and resveratrol-3-sulfate higher C_{max} (MT) when resveratrol was administered individually. This study could help to conveniently design preclinical studies using physiologically relevant conditions in (breast) cell models.

1. Introduction

The new global cancer data (Bray et al., 2018) reveal that breast cancer is the most commonly diagnosed cancer in women (24.2%), and the leading cause of cancer death in women (15%) (Bray et al., 2018). It is known that the non-hereditary factors are the main drivers of incidence, including long-term endogenous hormonal exposures and exogenous hormone intake, nulliparity, early age at menarche, alcohol intake and obesity (Bray et al., 2018). Regarding protective factors, long-term breastfeeding and physical activity may be beneficial (Brinton, Gaudet, & Gierach, 2018), and some studies also suggest the protection of vegetable consumption against estrogen receptor-negative (ER-) breast cancer risk (Emaus et al., 2016). The recent Continuous Update Project (CUP) only observed a partial protective association between breast cancer risk with the intake of fruits, vegetables, tea, coffee, isoflavones, and carotenoids (WCRF/AICR, 2017). However, it has been suggested that the mixture of phytochemicals found in whole foods, rather than isolated phytochemicals, exerts effects against carcinogenesis (Kapinova et al., 2017). Overall, these observations contrast with the abundant research in animal models that describe the preventive effect of polyphenols and polyphenol-rich plant extracts against breast cancer, including pomegranate (Bishayee, Mandal, Bhattacharyya, & Bhatia, 2016), citrus flavanones (Singhal et al., 2018), resveratrol (Sinha, Sarkar, Biswas, & Bishayee, 2016), berries (Amatori et al., 2016) and ellagic acid (Wang et al., 2012). Besides, a large number of studies in cellular models persist in the testing of plant extracts or polyphenols in molecular forms and(or) concentrations, describing many mechanisms, targets and pathways, when in fact they do not reach the mammary tissue (Ávila-Gálvez, González-Sarrías, & Espín, 2018).

To shed some light on this topic, we recently conducted a clinical study in breast cancer patients that consumed a cocktail of plant extracts (pomegranate, cocoa, lemon, orange, grapeseed, and olive) plus resveratrol from diagnosis to surgical resection (Ávila-Gálvez et al.,

Abbreviations: DHRSV, dihydroresveratrol; DHRSV 3-glur, DHR 3-*O*-glucuronide; EIC, extracted ion chromatogram; HP, hesperetin; HP 7-glur, HP 7-*O*-glucuronide; HP 3′-glur, HP 3′-*O*-glucuronide; HP 7-sulf, HP 7-*O*-sulfate; HPLC-ESI-IT-MS/MS, high performance liquid chromatography-electrospray ionisation-ion trap tandem mass spectrometry; Hytyr glur, hydroxytyrosol glucuronide; MeOH, methanol; MT, mammary tissue; MX, methylxanthine; PBS, phosphate buffered saline; PM, phenolic-derived metabolites; RSV, resveratrol; RSV 3-sulf, RSV 3-*O*-sulfate; RSV 4′-sulf, RSV 4′-*O*-sulfate; RSV 3-glur, RSV 3-*O*-glucuronide; UPLC-ESI-QTOF-MS, ultra-high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionisation quadrupole time-of-flight mass spectrometry; Uro, urolithin; Uro-A 3-glur, Uro-A 3-*O*-glucuronide; Uro-A 3-sulf, Uro-A 3-*O*-sulfate

* Corresponding author.
E-mail address: jcespin@cebas.csic.es (J.C. Espín).

https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103516
Received 30 May 2019; Received in revised form 6 August 2019; Accepted 12 August 2019
Available online 21 August 2019
1756-4646/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

Article

Cite This: J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 8547−8555

pubs.acs.org/JAFC

Physiological Relevance of the Antiproliferative and Estrogenic Effects of Dietary Polyphenol Aglycones versus Their Phase-II Metabolites on Breast Cancer Cells: A Call of Caution

María Ángeles Ávila-Gálvez, Juan Carlos Espín, and Antonio González-Sarrías*

Laboratory of Food and Health, Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS-CSIC, P.O. Box 164, Campus de Espinardo, Murcia 30100, Spain

ABSTRACT: While preclinical studies suggest the breast cancer (BC) chemopreventive effects of dietary polyphenols, the human evidence is still very weak. The huge existing *in vitro*−*in vivo* gap is mainly due to the plethora of potential effects reported by *in vitro* studies that usually assay polyphenols as occurring in the food (beverages, extracts, foods) and/or derived aglycone metabolites with doubtful physiological relevance. Since phase-II metabolites can reach systemic tissues such as malignant breast tumors, we aimed here to compare for the first time the antiproliferative and estrogenic/antiestrogenic effects of dietary polyphenols and microbiota-derived metabolites (i.e., resveratrol, dihydroresveratrol, urolithins (A, B, and Isourolithin A), and the flavanone hesperetin), with those effects exerted by their physiologically relevant glucuronides and sulfates on human BC cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7). Results showed that aglycones exerted dose-dependent antiproliferative and estrogenic/antiestrogenic activities, but both their glucuronide and sulfate conjugates lacked these activities. In addition, aglycones underwent phase-II metabolism in BC cells, mainly via sulfation, which determined the cell-dependent differences in the effects observed. Therefore, phase-II metabolism limits the antiproliferative, estrogenic, and antiestrogenic activities of dietary polyphenols on BC cells. Likewise, as a call of caution, enthusiasm should be limited for publishing effects that are not physiologically relevant.

KEYWORDS: *urolithins, resveratrol metabolites, hesperetin metabolites, breast cancer cells, estrogenic, antiproliferative effect, phase-II metabolism*

INTRODUCTION

Breast cancer (BC) is one of the major causes of cancer-associated death among women worldwide and the most commonly diagnosed cancer in women, accounting for almost 15% of all new cancers deaths and 25% of all new cases diagnosed in 2012.[1,2] Therefore, beyond pharmacological and clinical treatments, preventive strategies such as the promotion of healthy dietary habits are crucial to reduce BC incidence worldwide.[3]

A number of preclinical *in vitro* and animal studies have reported the inverse correlation between the intake of phytochemical-rich vegetables and fruits, and BC risk.[4] Among phytochemicals, dietary polyphenols have shown potential preventive effects against chronic diseases, including BC.[5] However, the evidence that supports this prevention is still very limited.[6] Indeed, *in vitro* studies that describe beneficial effects and mechanisms of phenolic compounds against BC do not usually consider polyphenols' bioavailability and tissue disposition. Dietary phenolics mainly occur in food sources as glycosides (glucosides, rhamnosides, etc.) and/or as complex oligomeric structures that are poorly bioavailable and cannot reach systemic tissues.[7] These phenolics reach the intestinal tract where they are hydrolyzed and/or metabolized by the gut microbiota. Then, the resulting aglycone metabolites are absorbed and undergo extensive phase-II metabolism yielding glucuronide, sulfate, and/or methyl conjugates.[8,9] Therefore, since these circulating phase-II (poly)phenolic metabolites are the potential bioactive molecules that can reach systemic tissues,[10−13] they should be the actual metabolites assayed in cell models of systemic tissues to describe activities and to unravel mechanisms of action. In this regard, conjugated metabolites of different (poly)phenols or their gut microbiota-derived metabolites such as resveratrol,[14] urolithins,[15,16] and hesperetin[17] have been reported to be less active than their aglycone counterparts in different *in vitro* models of cancer and inflammation. Whether the phase-II conjugated metabolites of phenolics can maintain certain biological activity similar to that exerted by their aglycone counterparts such as estrogenic/antiestrogenic activity of urolithins[18] and antitumoral effects of resveratrol and hesperetin, among others,[19,20] remains elusive. To the best of our knowledge, there are only two studies that described lower antitumor effects of conjugated metabolites compared with their aglycone counterparts against human BC MCF-7 cells (i.e., the isoflavones genistein and daidzein,[21] and the flavonol quercetin).[22] With respect to estrogenic effects, there is only one study that compares the effects and describes a limited effect of isoflavone metabolites on the growth of MCF-7 cells.[23]

The aim was to compare the antiproliferative and estrogenic/antiestrogenic activities of dietary polyphenols and derived metabolite aglycones (resveratrol, dihydroresveratrol, urolithins, and hesperetin) with those activities exerted by their

Received: June 14, 2018
Revised: July 16, 2018
Accepted: July 19, 2018
Published: July 19, 2018

ACS Publications © 2018 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.jafc.8b03100
J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 8547−8555

Molecular Nutrition & Food Research
www.mnf-journal.com

Conjugated Physiological Resveratrol Metabolites Induce Senescence in Breast Cancer Cells: Role of p53/p21 and p16/Rb Pathways, and ABC Transporters

Juan Antonio Giménez-Bastida, María Ángeles Ávila-Gálvez, Juan Carlos Espín, and Antonio González-Sarrías**

Scope: Recent evidence demonstrates that resveratrol (RSV) metabolites, but not free RSV, reach malignant tumors (MT) in breast cancer (BC) patients. Since these metabolites, as detected in MT, do not exert short-term antiproliferative or estrogenic/antiestrogenic activities, long-term tumor-senescent chemoprevention has been hypothesized. Consequently, here, for the first time, whether physiologically relevant RSV metabolites can induce senescence in BC cells is investigated.

Methods and Results: Human BC MCF-7 (wild-type p53) and MDA-MB-231 (mutant p53), and non-tumorigenic MCF-10A cells are treated with free RSV and physiological-derived metabolites (RSV 3-*O*-glucuronide, RSV 3-*O*-sulfate, RSV 4′-*O*-sulfate, dihydroresveratrol (DH-RSV), and DH-RSV 3-*O*glucuronide). Cellular senescence is measured by SA-β-gal activity and senescence-associated markers (p53, $p21^{Cip1/Waf1}$, $p16^{INK4a}$, and phosphorylation status of retinoblastoma (pRb/tRb)). Although no effect is observed in MDA-MB-231 and normal cells, RSV metabolites induce cellular senescence in MCF-7 cells by reducing their clonogenic capacity and arresting cell cycle at G_2M/S phase, but do not induce apoptosis. Senescence is induced through the $p53/p21^{Cip1/Waf1}$ and $p16^{INK4a}$/Rb pathways, depending on the RSV metabolite, and requires ABC transporters, but not estrogen receptors.

Conclusions: These data suggest that RSV metabolites, as found in MT from BC patients, are not de-conjugated to release free RSV, but enter the cells and may exert long-term tumor-senescent chemoprevention.

1. Introduction

Breast cancer (BC) is the first cause of cancer-associated death among women worldwide and the most commonly diagnosed malignant tumor in women, accounting 2.1 million new BC diagnoses in 2018.[1] Beyond the approved drugs, natural products (including dietary compounds) offer alternative strategies to reduce BC incidence worldwide.[2] In the last decades, dietary polyphenols have proven preventive effects against chronic diseases, including BC, by playing an important role in a wide range of pleiotropic effects in cancer cells.[3] Resveratrol (RSV), a natural stilbene found in several plant foods (such as grapes, berries, and peanuts), is one of the most relevant molecules to exert anticarcinogenic effects through many different mechanisms of action, including cell proliferation arrest, initiation and progression inhibition, and/or apoptosis induction against various types of cancer, including BC.[4,5] Notwithstanding, despite the promising in vitro effects of many polyphenols showing suppressing actions against BC, the clinical evidence is scarce.[4,6] In this regard, most in vitro studies carried out with polyphenols (and hence RSV) against BC have followed the wrong approach of traditional in vitro assays without considering the polyphenols' bioavailability, metabolic transformations, and tissue disposition to evaluate and attribute their potential anticancer effects.[7]

Animal and human studies have demonstrated low bioavailability and rapid clearance of RSV from the circulation, which is related to its extensive phase-II metabolism catalyzed by enzymes known as transferases, mainly UDP glucuronyl transferases and sulfotransferases (EC number 2.4.1.17 and 2.8.2, respectively), as well as to its microbiota-derived metabolite dihydroresveratrol (DH-RSV).[4,8–10] A recent clinical trial has reported RSV accumulation, mainly as sulfates and glucuronides, in normal and malignant human breast tissues[11] similar to those reported in normal breast tissues for other phenolics such as isoflavones[12] and prenylflavonoids.[13]

Thus, the biological activities of RSV phase-II metabolites have acquired increasing attention as the molecules responsible for the biological effects associated with RSV consumption. However, up to date, a limited number of studies investigating the effect of conjugated metabolites in colonic and, mainly, in

Dr. J. A. Giménez-Bastida, M. Á. Ávila-Gálvez, Prof. J. C. Espín, Dr. A. González-Sarrías
Laboratory of Food and Health
Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods
Department of Food Science and Technology, CEBAS-CSIC
P.O. Box 164, 30100 Campus de Espinardo
Murcia, Spain
E-mail: jcespin@cebas.csic.es; agsarrias@cebas.csic.es

The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under https://doi.org/10.1002/mnfr.201900629

DOI: 10.1002/mnfr.201900629

 © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

Viewpoint

Cite This: J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 7857−7858

pubs.acs.org/JAFC

In Vitro Research on Dietary Polyphenols and Health: A Call of Caution and a Guide on How To Proceed

María Ángeles Ávila-Gálvez, Antonio González-Sarrías, and Juan Carlos Espín*

Laboratory of Food & Health, Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, CEBAS-CSIC, Post Office Box 164, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain



Our results suggest potential health beneficial effects, although further in vivo studies are needed... Perhaps, this is the most repeated conclusion in the *in vitro* studies dealing with dietary (poly)phenols in the last few decades.

Because early epidemiological and observational studies suggested that dietary (poly)phenols could play an important protective role against chronic−degenerative pathologies (cardiovascular and neurodegenerative diseases, cancer, and others), a tsunami of *in vitro* studies filled the scientific literature (around 45 000 entries in the Web of Science) describing a myriad of "potential" beneficial properties and mechanisms of action for these compounds (antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, cardioprotective, neuroprotective, antiviral, prebiotic, etc.). However, despite such a huge output of studies, the unequivocal link between the effects of poly(phenols) and/or their metabolites on human health is still rather weak. In Europe, the European Food Safety Authority (EFSA) health claims have only been authorized for olive oil hydroxytyrosol and cocoa flavanols thus far.[1,2]

Only very few *in vitro* models and for very specific targets mimic *in vivo* conditions very well. However, the vast majority of *in vitro* models cannot fully replicate the *in vivo* situation. With this obvious premise taken as our starting point, the closer the *in vitro* conditions to the *in vivo* context, the greater the relevance of the results obtained. However, despite the well-known limitations of *in vitro* studies to mirror a plausible *in vivo* physiological cell microenvironment, the vast majority of *in vitro* conclusions are based on unreliable assay conditions. How can we change this trend?

For decades (and still persisting), a classical error of *in vitro* studies was the direct exposure of polyphenol-rich products (plant or food extracts) as well as single (poly)phenols as found in food sources to cell cultures. The limited physiological relevance of this approach is obvious because the direct interaction of specific cells with these matrixes is impossible in most cases. Additionally, *in vitro* studies have not usually considered the bioavailability of (poly)phenols nor their interaction with the gut microbiota or their tissue disposition.[3] To date, only a few *in vitro* studies have assayed the conjugated phase II metabolites of different dietary (poly)phenols or their gut-microbiota-derived metabolites that are present in the bloodstream and can reach systemic tissues to evaluate their involvement in the beneficial effects attributed to the (poly)phenol intake.[4]

"First *in vivo* and then *in vitro*"; in other words, let us check the *in vivo* metabolism and effects first, and then let us check the mechanisms of action. Although accurate *in vitro*−*in vivo* extrapolation is not possible, following this key rule will partially overcome the critical limitations in the extrapolation of *in vitro* studies to the physiological context. This approach takes into account a cocktail of variables that should be considered jointly and could provide reliable information for attributing health benefits to dietary (poly)phenols.

(i) Concentration and metabolic form of (poly)phenols and exposition time to cells: There is growing knowledge about the bioavailability, metabolism, and tissue disposition of (poly)-phenols, important information that should be used to assay the right concentration and molecular form of (poly)phenols in *in vitro* studies. This is critical to avoid the tempting pharmacological approach, i.e., to establish conclusions based on the use of very high concentrations but not attainable from a dietary point of view. In addition, it is crucial to avoid the exposure of cells representative of systemic tissues (breast, endothelium, brain, etc.) with physiologically non-relevant (poly)phenols or derived metabolites, i.e., unconjugated metabolites that do not reach those tissues. In this regard, the assay of phase II (poly)phenols and/or their microbial-derived metabolites (mostly also phase II conjugated) that can reach systemic tissues (sometimes after an intense enterohepatic circulation) must be encouraged. Unfortunately, the lack of availability of some of these relevant metabolites is a serious drawback. In addition, it is becoming evident that phase II metabolism drastically limits the "potential" beneficial activities shown by their parent (unconjugated) compounds, which discourages those who prefer to publish always "potential positive effects" instead of those "negative albeit physiologically relevant effects". Therefore, these are perfect excuses used by some to test non-physiological metabolites

Received: June 27, 2018
Published: July 19, 2018

ACS Publications © 2018 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.jafc.8b03377
J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 7857−7858

OTRAS PUBLICACIONES NO INCLUIDAS EN LA TESIS

Journal of Functional Foods 49 (2018) 52–60

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Functional Foods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jff

Physiological concentrations of phytosterols enhance the apoptotic effects of 5-fluorouracil in colon cancer cells

Andrea Álvarez-Sala[a], María Ángeles Ávila-Gálvez[b], Antonio Cilla[a,*], Reyes Barberá[a], Guadalupe Garcia-Llatas[a], Juan Carlos Espín[b], Antonio González-Sarrías[b]

[a] Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 - Burjassot, Valencia, Spain
[b] Laboratory of Food and Health, Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Dept. Food Science and Technology, CEBAS-CSIC, P.O. Box 164, 30100 Campus de Espinardo, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Phytosterols
Colon cancer cells
5-fluorouracil
Cell cycle
Apoptosis
Drug sensitivity

ABSTRACT

Combining natural products as co-adjuvants in 5-fluorouracil (5-FU) chemotherapy might enhance the effectiveness of 5-FU by avoiding a high dosage and/or reducing treatment times. We explored the anticancer efficacy of the phytosterols (PS) at concentrations achievable in the human colon, as well as their potential as sensitizing agents of human colon cancer cells (Caco-2 and HT-29) to 5-FU treatment. Cells proliferation, combination index, cell cycle, apoptosis, caspases activation, ROS production, and ΔΨm were determined. Co-treatment (PS + 5-FU) had an antiproliferative additive effect, and moreover, in general a significantly improved efficacy was observed on cell cycle arrest at S phase, apoptosis induction and increase in caspases activation compared to 5-FU alone, while no significant effects were observed on ROS levels and ΔΨm. Our results suggest, for the first time, the ability of PS to sensitize colon cancer cells to 5-FU chemotherapy and warrant further *in vivo* studies to confirm our preclinical findings.

1. Introduction

Colorectal cancer is the third most common cancer worldwide, accounting for almost 10% of all cancers, with nearly 1.4 million new cases diagnosed in 2012 and it is expected that the number of cases annually will rise to 2.4 million by 2035 (Ferlay et al., 2015). A widely used drug against colorectal cancer is 5-fluorouracil (5-FU). This drug exerts anticancer activity via inhibition of the enzyme thymidylate synthase and incorporation of its fluoronucleotide metabolites into RNA and DNA, events that ultimately activate apoptosis (Longley, Harkin & Johnston 2003). However, relative frequent cancer cells resistance and adverse side effects have been associated with 5-FU drug treatment (Walko & Lindley, 2005). The rates of positive response to 5-FU administration as a single agent in advanced colorectal cancer patients are only 10–15%. However, the combination of 5-FU with other anti-tumor drugs has been reported to improve the response rates by 40–50% (Zhang, Yin, Xu, & Chen, 2008). Therefore, further investigations are warranted to explore the possibility of using other compounds as alternatives for the chemotherapy.

In this regard, bioactive food components such as phytosterols (PS) could be a new tool to complement the chemotherapy against cancer. PS can interfere on several cell signaling pathways, including the alteration of phospholipid membrane composition, cell cycle, apoptosis, proliferation, invasion, angiogenesis and immune system, among others, as previously reported (Bin Sayeed & Ameen, 2015; Bradford & Awad, 2007; Shahzad et al., 2017). However, most of the evidence has been found in studies carried out with cells or animal models. In this context, the antiproliferative activity of PS has been reported in different colon cancer cell lines (Caco-2 and HT-29), particularly for β-sitosterol (β-SIT), within the range of physiological plasma concentrations (8–400 μM) at different times of exposure (1–9 days) (Awad, Chen, Fink, & Hennessey, 1996; Awad, von Holtz, Cone, Fink, & Chen, 1998; Choi et al., 2003; Daly, Aherne, O'Connor, & O'Brien, 2009; López-García, Cilla, Barberá, & Alegría, 2017a; Montserrat-de la Paz, Fernández-Arche, Bermúdez, & García-Giménez, 2015). In addition, previous studies conducted by our research group, reported the

Abbreviations: CAMP, campesterol; CCCP, carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; CI, combination index; DCF, fluorescent 2′,7′-dichlorofluorescein; EtOH, ethanol; FAM, carboxyfluorescein; FBS, fetal bovine serum; 5-FU, 5-fluorouracil; MEM, minimal essential medium; OD, optical density; PBS, phosphate buffered saline; PI, propidium iodide; PS, phytosterols; β-SIT, β-sitosterol; STIG, stigmasterol; ROS, reactive oxygen species; TMRE, tetramethylrhodamine ethyl ester; TMRM, tetramethylrhodamine methyl ester; TNF, tumor necrosis factor; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand; ΔΨm, mitochondrial membrane potential

* Corresponding author.
E-mail address: antonio.cilla@uv.es (A. Cilla).

https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.08.016
Received 18 April 2018; Received in revised form 3 July 2018; Accepted 6 August 2018
Available online 18 August 2018
1756-4646/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Food & Function

COMMUNICATION

View Article Online
View Journal | View Issue

Cite this: *Food Funct.*, 2018, **9**, 2617

Consumption of pomegranate decreases plasma lipopolysaccharide-binding protein levels, a marker of metabolic endotoxemia, in patients with newly diagnosed colorectal cancer: a randomized controlled clinical trial

Received 7th February 2018,
Accepted 7th May 2018

DOI: 10.1039/c8fo00264a

rsc.li/food-function

A. González-Sarrías, [a] M. A. Núñez-Sánchez, [a,b] M. A. Ávila-Gálvez,[a] T. Monedero-Saiz,[a,c] F. J. Rodríguez-Gil,[d] Francisco Martínez-Díaz,[e] M. V. Selma [a] and J. C. Espín *[a]

Gut microbiota dysbiosis alters the intestinal barrier function, increases plasma lipopolysaccharide (LPS) levels, which promotes endotoxemia, and contributes to the onset and development of colorectal cancer (CRC). We report here for the first time the reduction of plasma LPS-binding protein (LBP) levels, a marker of endotoxemia, after pomegranate consumption in newly diagnosed CRC patients.

Introduction

Alterations in the intestinal barrier function promotes the translocation of bacteria or their components such as the endotoxin lipopolysaccharide (LPS) into the bloodstream.[1] The increase of LPS in blood causes the so-called 'metabolic endotoxemia', which triggers a pro-inflammatory cascade signaling that has been linked to an increased cardiovascular risk.[2] When LPS enters the bloodstream, it is bound by the acute-phase reactant LPS-binding protein (LBP), which initiates the immune response through the cluster of differentiation (CD) 14 (CD14) and a number of cell receptors including the toll-like receptor 4 and CD11b/CD18, among others.[3] Since LBP is induced as a response to LPS increase in blood, the determination of circulating LBP levels is considered a valid surrogate biomarker for metabolic endotoxemia.[4] In addition, LPS determination has been reported to show a number of drawbacks such as its short half-life, low sensitivity and high susceptibility to interfering substances that limits its use in clinical practice.[5–7]

Gut microbiota dysbiosis, obesity, insulin resistance, intestinal barrier failure, metabolic endotoxemia and pro-inflammatory status is a consolidated consortium that participates in the increase of cardiovascular risk,[8–10] however, the link between metabolic endotoxemia and CRC has been scarcely studied.

There is growing evidence that associates the gut microbiota and the etiology of CRC.[11–14] The colonic microenvironment in CRC is usually altered, with a significant increase of LPS-producing Gram-negative bacteria, and this intestinal dysbiosis has been acknowledged as a biological driver of metabolic alterations in early CRC.[15] At the time of submission of the present communication, no pre-diagnostic plasma LBP concentrations were associated with CRC incidence.[16] However, it is of note that Zhu *et al.*[17] reported the increase of LPS levels as a causal actor in CRC progression through lymphatic metastasis, and suggested that targeting the decrease of metabolic endotoxemia in CRC patients might have potential clinical applications.[17]

A number of dietary interventions have reported the decrease of metabolic endotoxemia in obesity and metabolic syndrome in both animals[18–20] and humans[21,22] after consumption of polyphenol-rich foodstuffs such as red wine, cranberry, prickly pear, bilberry, cocoa, *etc*. However, to the best of our knowledge, the decrease in metabolic endotoxemia through a dietary intervention in CRC patients has never been addressed. Interestingly, we had previously observed the positive effect of pomegranate extract (PE) supplementation in a dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis rat model.[23] In that study, PE preserved the architecture of the intestinal

[a]*Laboratory of Food & Health, Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS-CSIC, P.O. Box 164, 30100 Campus de Espinardo, Murcia, Spain. E-mail: jcespin@cebas.csic.es*
[b]*APC Microbiome Institute, IE University College Cork, Cork, National University of Ireland, Ireland*
[c]*Nutrition Service, Hospital Reina Sofía, Avda. Intendente Jorge Palacios s/n, Murcia, Spain*
[d]*Digestive Service, Hospital Reina Sofía, Avda. Intendente Jorge Palacios s/n, Murcia, Spain*
[e]*Anatomical Pathology Service, Hospital Reina Sofía, Avda. Intendente Jorge Palacios s/n, Murcia, Spain*

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2018

Food & Function

COMMUNICATION

View Article Online
View Journal

Tissue deconjugation of urolithin A glucuronide to free urolithin A in systemic inflammation†

Cite this: DOI: 10.1039/c9fo00298g

Received 14th February 2019,
Accepted 18th April 2019

DOI: 10.1039/c9fo00298g

rsc.li/food-function

M. A. Ávila-Gálvez, J. A. Giménez-Bastida, A. González-Sarrías and J. C. Espín *

Urolithin A (Uro-A) is an anti-inflammatory and cancer chemopreventive metabolite produced by the gut microbiota from the polyphenol ellagic acid. However, *in vivo* conjugation of Uro-A to Uro-A glucuronide (Uro-A glur) dramatically hampers its activity. We describe here for the first time the tissue deconjugation of Uro-A glur to Uro-A after lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation, which could explain the systemic *in vivo* activity of free Uro-A in microenvironments subjected to inflammatory stimuli.

Introduction

Urolithins are not strictly speaking dietary compounds but catabolic products of ellagitannin (ET) and ellagic acid (EA) metabolism carried out by the gut microbiota.[1] The most relevant urolithin is urolithin A (Uro-A), a non-toxic metabolite[2] that is the final urolithin produced by those subjects belonging to the so-called metabotype-A.[3] Given the extensive and heterogeneous metabolism of ETs and EA in humans, our pioneering studies on urolithins suggested that the plausible *in vivo* active metabolites after ET and EA consumption could be urolithins.[4] To date, many studies have reported a plethora of *in vitro* activities,[1,5] but the causality of urolithins in the systemic *in vivo* activity observed after ET and(or) EA-rich food consumption has not yet been unequivocally proven.[6] Mounting evidence has demonstrated the anti-inflammatory activity,[7] and the preservation of the gut barrier integrity[7,8] in murine models after oral Uro-A administration, which is consistent with the fact that the colon is the organ where the highest concentration of urolithins occurs.[9] Remarkably, Ryu *et al.*[10] reported the increase of muscle function in mice after oral Uro-A administration, but the specific metabolite involved in such an effect in tissues remains elusive.

Laboratory of Food & Health, Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS-CSIC, P.O. Box 164, 30100 Campus de Espinardo, Murcia, Spain. E-mail: jcespin@cebas.csic.es

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c9fo00298g

The phase-II metabolism severely hampers the systemic activity of urolithins, including Uro-A. Oral Uro-A bioavailability and tissue distribution are very low.[11,12] Circulating free Uro-A concentration is negligible since it is extensively conjugated to yield mainly Uro-A glucuronide (Uro-A glur) derivatives in humans.[1,5,13] In contrast to the relevant *in vitro* activity of Uro-A, conjugated derivatives show much lower activity.[14–17]

The low bioavailability, extensive phase-II metabolism and gut microbiota catabolism are common features of dietary phenolic compounds. While the health benefits upon consumption of polyphenols have been widely reported,[18–21] the identification of the final metabolites involved in such effects, especially in systemic tissues, is still under debate. Although some conjugated metabolites (mainly glucuronides and sulphates) can exert certain *in vitro* activity,[14,22–24] the direct involvement of these metabolites in the *in vivo* effects has not yet been fully demonstrated. A plausible explanation for this apparent paradox is the so-called 'deconjugation in inflammation',[25,26] which has been evidenced *in vivo* in the case of luteolin,[25] curcumin,[27] and especially in quercetin.[28–32]

In the present study, our objective was to explore the 'deconjugation in inflammation' hypothesis in the case of urolithins. To illustrate this, we evaluate here for the first time the tissue deconjugation of Uro-A glur to free Uro-A after oral Uro-A administration in a rat model of systemic inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS).

Materials and methods

Materials

Urolithin A (Uro-A) and derived conjugated metabolites (purity > 98%) were obtained as described elsewhere.[33] Lipopolysaccharides (LPS) from *Escherichia coli* serotype O111: B4 were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Ketamine (Imalgene 1000) was obtained from Merial Laboratories (Barcelona, Spain). All chemicals and reagents were of analytical grade. Formic acid and HCl were purchased

Food and Chemical Toxicology 139 (2020) 111260

Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

The gut microbiota metabolite urolithin A, but not other relevant urolithins, induces p53-dependent cellular senescence in human colon cancer cells

Juan Antonio Giménez-Bastida, María Ángeles Ávila-Gálvez, Juan Carlos Espín*, Antonio González-Sarrías*

Laboratory of Food and Health, Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Dept. Food Science and Technology, CEBAS-CSIC, P.O. Box 164, 30100, Campus de Espinardo, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Urolithins
Colon cancer
Cellular senescence
Phase-II metabolism
ABC transporters

ABSTRACT

The promotion of senescence in cancer cells by dietary (poly)phenols gained attention as a promising chemopreventive strategy against colorectal (CRC) and other cancers. Urolithins (Uros) are ellagitannins and ellagic acid-derived gut microbiota metabolites that reach high concentrations in the human colon. They were postulated to be as potential anticancer agents in different CRC models, but their role as promoters of cellular senescence has never been comprehensively evaluated.

We evaluated long-term senescent-mediated chemoprevention of physiologically relevant doses of different Uros and representative mixtures of human urolithin metabotypes in human CRC (HCT-116, Caco-2, and HT-29) and non-tumorigenic (CCD18-Co) cell lines. Our results show that Uro-A (but not Uro-C, IsoUro-A, or Uro-B) leads to a dose-dependent anti-clonogenic effect through the increase of the senescence-associated β–galactosidase activity, rather than by reversible cell cycle arrest and(or) apoptosis which require much higher concentrations. Senescence was accompanied by an elevated p53 and $p21^{Cip1/Waf1}$ expression in HCT-116 cells (p53-wild type), but not in other CRC lines with p53 mutated or non-tumorigenic cells, which suggests that long-term senescence-mediated chemoprevention is a p53-dependent manner. Moreover, the ATP-binding cassette transporters and the phase-II metabolism of Uros limited the induction of senescence, which anticipates lower effects of conjugated Uros against systemic cancers.

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignancies (per incidence), and the second cause of cancer-related death worldwide in both sexes (Bray et al., 2018). Early diagnosis and the promotion of healthy dietary habits have been established as essential measures of primary prevention for CRC development (Shike, 1999; Magalhaes et al., 2012; Grosso et al., 2017). Epidemiological studies have described the inverse correlation between CRC incidence and a high intake of fruits and vegetables rich in phytochemicals, including phenolic compounds (Turati et al., 2015; Bingham et al., 2003). However, despite the abundant preclinical (*in vitro* and animal models) anticarcinogenic activity reported for different individual phenolics and phenolic-rich plant foods, the clinical evidence remains elusive so far (Núñez-Sánchez et al., 2015).

Ellagitannins (ETs) and ellagic acid (EA) are polyphenols occurring in pomegranate, walnuts, and many berries. ETs are not absorbed, and EA shows low bioavailability mainly due to its limited solubility under physiological conditions (González-Sarrías et al., 2015). Consequently, EA is metabolized by the colonic microbiota producing a family of bioavailable metabolites known as urolithins (Uros) (Cerdá et al., 2004; Tomás-Barberán et al., 2017). Remarkably, Uros reach relevant concentrations in the lumen and colonic tissues (malignant and normal) of CRC patients after the intake of an ET-rich pomegranate extract (Núñez-Sánchez et al., 2014).

The gut microbiota composition in humans differentially determines the molecular form, concentration, and bioactivity of Uros. This dissimilar metabolism is linked to the inter-individual variability of the human gut microbiota, which has led to identify three different urolithin metabotypes (UMs), i.e., metabotype A (UM-A) where only urolithin A (Uro-A) is the final urolithin produced, metabotype B (UM-B) that produces Uro-A, isourolithin A (IsoUro-A) and urolithin B (Uro-B), and metabotype 0 (UM-0) that does not produce these final Uros (Tomás-Barberán et al., 2014; Romo-Vaquero et al., 2019).

Uros have been extensively studied in CRC models, showing cell cycle arrest and apoptosis induction via modulation of genes and

* Corresponding authors.
E-mail addresses: jcespin@cebas.csic.es (J.C. Espín), agsarrias@cebas.csic.es (A. González-Sarrías).

https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111260
Received 21 December 2019; Received in revised form 6 March 2020; Accepted 10 March 2020
Available online 13 March 2020
0278-6915/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.