



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado


Trabajo Fin de Máster

**ACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE
LOS ACEITES DE OLIVA VÍRGENES EN LA
EXPRESIÓN DEL CD36 EN UN MODELO
CELULAR HUMANO DE CÁNCER DE MAMA.**

Alumno/a: Dantas da Silva, Brunna

Tutor/a: Dr. Cristina Sánchez Quesada
Dpto: Inmunología (Centro de Estudios Avanzados
de Aceite de Oliva y Olivar)

Julio, 2017



ACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LOS
ACEITES DE OLIVA VÍRGENES EN LA
EXPRESIÓN DEL CD36 EN UN MODELO
CELULAR HUMANO DE CÁNCER DE MAMA.

Esta memoria constituye el Trabajo Fin de Máster y se presenta a la Comisión Evaluadora en Jaén a 05 de 07 del año 2017.

Fdo. Brunna Dantas da Silva

CRISTINA SÁNCHEZ QUESADA, INVESTIGADORA DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DEL CENTRO DE ESTUDIOS AVANZADOS DE ACEITE DE OLIVA Y OLIVAR.

Como **TUTORA** de Dña. Brunna Dantas da Silva, en el Máster Universitario en Olivar y Aceite de Oliva, durante el curso 2016-2017

INFORMA: Que el presente trabajo fin de máster, *Acción de compuestos bioactivos de los aceites de oliva vírgenes en la expresión del CD36 en un modelo celular humano de cáncer de mama*, ha sido realizado en el Laboratorio de Inmunología por la Licenciada Dña. Brunna Dantas da Silva, para la obtención del Título de Máster Universitario en Olivar y Aceite de Oliva, por la Universidad de Jaén, bajo la dirección de los Dres. Dña. Cristina Sánchez Quesada y D. José Juan Gaforio Martínez.

Jaén, julio de 2017

Fdo.: Cristina Sánchez

Fdo. José Juan Gaforio

AGRADECIMIENTOS

Primero de todo, me gustaría agradecer a mis padres por sus sabios consejos, comprensión, apoyo y amor. Además, me gustaría dar las gracias a Cristina Sánchez Quesada y a José Juan Gaforio por sus valiosas enseñanzas. También agradezco a mis amigos (Anna Carla Alberto, André Bentes, Bruno Chiavelli y Claudio Silveira), fue un honor encontrarlos en mi camino “*no outro lado do oceano*”.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
1.1 RESUMEN	1
1.2 ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 CÁNCER	3
2.1.2 Cáncer de mama.....	4
2.1.3 Metástasis	5
2.2 CD36	6
2.3 ACEITES DE OLIVA VÍRGENES	7
2.3.1 Generalidades y composición	7
2.3.2 Ácido oleico	8
2.3.3 Compuestos minoritarios.....	9
2.3.3.1 Hidroxitirosol.....	10
2.3.3.2 Escualeno.....	10
3. HIPOTESIS Y OBJETIVO	12
3.1 HIPOTESIS	12
3.2 OBJETIVO.....	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1 REACTIVOS.....	13
4.2 CULTIVO CELULAR	13
4.3 MARCACIÓN DE MEMBRANA CON EL ANTICUERPO CD36	13
4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	14
5. RESULTADOS EXPERIMENTALES	15
5.1 AO	15
5.2 HT	15
5.3 SQ	16
6. DISCUSIÓN	18
7. CONCLUSIONES	22
8. BIBIOGRAFÍA	23

1. RESUMEN

1.1 RESUMEN

Actualmente el cáncer es una de las enfermedades más frecuentes en nuestra sociedad, con una elevada morbilidad y mortalidad. Entre los diversos tipos de cáncer, el de mama se destaca por ser el más frecuente entre las mujeres. Esta enfermedad presenta una variación de su incidencia en las distintas regiones del mundo y la metástasis es responsable de la mayoría de sus muertes. Recientemente, la aparición de metástasis se ha relacionado con una mayor expresión del CD36, que es una proteína multifuncional y, entre sus funciones, está la de transportar lípidos dentro de las células. Estudios previos apuntan a una asociación entre el consumo de grasas saturadas y el aumento de la incidencia en distintos tipos de cáncer, mientras que otros sugieren que un consumo frecuente de Aceites de Oliva Vírgenes (AOVs) protege frente al cáncer de mama mediante la acción de sus compuestos bioactivos. Por ello, ya que la principal fuente de grasa de la dieta mediterránea son los AOVs (mayoritariamente grasas monoinsaturadas) en el presente estudio se pretende evaluar la acción de tres compuestos bioactivos del mismo (Ácido oleico (AO), Hidroxitirosol (HT) y Escualeno (SQ)) en la expresión del CD36 en células humanas de cáncer de mama altamente metastásicas (MDA-MB-231), entendiéndose que no hay ningún estudio al respecto sobre esto. Los resultados obtenidos demuestran que los compuestos bioactivos de los AOVs pueden reducir la expresión del CD36 en MDA-MB-231 dependiendo de la concentración empleada.

Palabras claves: cáncer de mama, CD36, metástasis, Aceites de Oliva Vírgenes (AOV), compuestos bioactivos.

1.2 ABSTRACT

Nowadays cancer is one of the most frequent diseases in our society, being characterized by high morbidity and mortality. Among the different types, breast cancer is noted for being the most frequent among women. This disease presents different incidence in distinct geographical zones and the metastasis is responsible for most of the deaths. In recent studies, metastasis has been correlated with a greater CD36 expression, which is a multifunctional protein that transports lipids inside the cells. Previous studies show that there is a relationship between saturated fats consumption of virgin olive oils (VOOs) and incidence of many types of cancer, while VOOs intakes also provide protection against breast cancer throughout the action of its bioactive compounds. Because of VOOs (composed by monoinsaturated fats mainly) is the main source of fat in the Mediterranean diet the aim of this study is to evaluate three bioactive compounds, oleic acid (AO), hydroxytyrosol (HT) and squalene (SQ) in the CD36 expression in highly invasive human cancer cells (MDA-MB-231). There are not previous studies on this subject. The results showed that VOOs bioactive compounds have an effect on CD36 gene expression possibly reducing it in MDA-MB-231 cells depending on the concentration tested.

Key words: breast cancer, CD36, metastasis, virgin olive oils (VOOs), bioactive compounds.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 CÁNCER

El cáncer es un proceso descontrolado de crecimiento y propagación celular, que puede surgir prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. Las células cancerígenas tienen un rápido proceso de multiplicación, forman tumores y suelen invadir partes adyacentes o propagarse a otros órganos, en un proceso que se denomina metástasis (Niederhuber *et al.*, 2013).

Según el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017), Actualmente el cáncer se destaca como una de las enfermedades más frecuentes en nuestra sociedad, siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. En 2015 se atribuyeron a esta enfermedad 8,8 millones de defunciones. Los cánceres de pulmón, hepático, colorrectal, gástrico y mamario son los que provocan un mayor número de muertes. Incluso, se estima que, en las dos siguientes décadas, el número de nuevos casos aumente aproximadamente en un 70%.

No obstante, se sabe que un gran número de cánceres humanos son inducidos por factores cancerígenos presentes en el medio ambiente. Otro de los factores clave en el desarrollo de un tumor es el tipo de dieta consumida. De hecho, cerca de un tercio de las muertes por cáncer son asociadas a los siguientes principales factores de riesgo dietéticos y conductuales: elevado índice de masa corporal, bajo consumo de frutas y verduras, inactividad física y consumo excesivo de tabaco y de alcohol (GLOBOCAN, 2012).

Por todo ello, existe el consenso general de considerar la dieta como un componente importante en la prevención del cáncer. Según las autoridades sanitarias internacionales las conductas a seguir son: evitar la obesidad, tener una ingesta adecuada de vegetales (hortalizas, legumbres, etc.), frutas y cereales, limitar el consumo de alcohol y disminuir el consumo de grasas animales. Estos hábitos de alimentación coinciden con los componentes de la dieta mediterránea tradicional, en la cual el AOV se destaca como el principal alimento fuente de grasas, siendo considerada como una dieta con propiedades preventivas frente a diversas

enfermedades, incluyendo al cáncer de mama (Zamora *et al.*, 2004; González; Calvo, 2016; Toledo *et al.*, 2015).

2.1.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama es caracterizado por el crecimiento descontrolado y anómalo de células mamarias, que forman tumores malignos, los cuales tienen un comportamiento biológico diverso y de gran variabilidad clínica, existiendo así muchos tipos de cáncer de mama, clasificados según su localización en el seno y su histopatología, algunos tienen un desarrollo rápido y otros más lentos. Todavía, la mayoría presenta una buena respuesta al tratamiento cuando son diagnosticados y tratados desde su fase inicial (Perou *et al.*, 2000; WHO, 2007).

Epidemiológicamente el cáncer de mama es el más frecuente en las mujeres en todo el mundo, su incidencia y mortalidad varía mucho en las distintas regiones del planeta, presentando una mayor incidencia en América del Norte y Norte de Europa. Mientras que la incidencia más baja se encuentra en la mayoría de los países africanos. Todavía es notable que el índice de mortalidad es más elevado en países menos desarrollados, conforme demuestra la Figura 2.1.

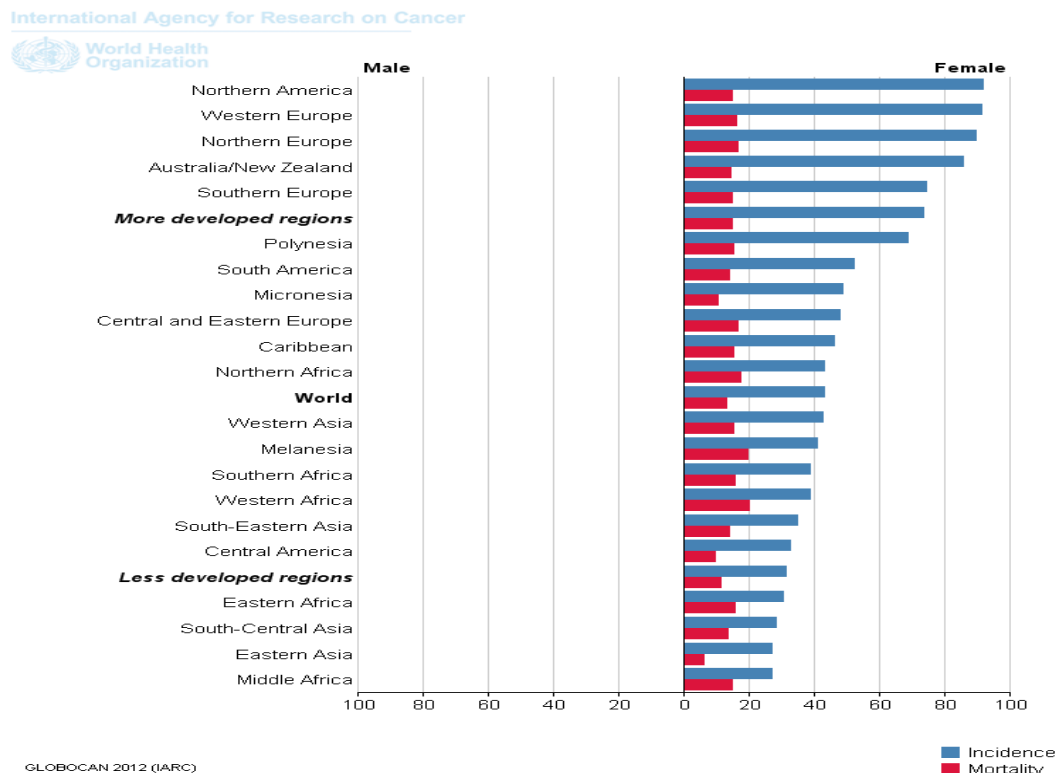


Fig. 2.1. Incidencia y mortalidad del cáncer de mama en las distintas regiones del mundo. Las cifras están expresadas por 100.000. Imagen extraída del GLOBOCAN, 2012.

Esta diferencia de incidencia y mortalidad del cáncer de mama en distintas regiones del mundo puede deberse a la presencia de factores de riesgo dietéticos, poca o nula actividad física y factores de riesgo heredofamiliares que influyen notablemente en el desarrollo de esa enfermedad, pues el cáncer de mama es asociado tanto a factores de riesgos no modificables, así como a factores de riesgos modificables (Peto, 2001; Horn *et al.*, 2014).

No obstante, es posible reducir los factores de riesgos modificables del cáncer de forma individual con pequeños cambios alimentarios y de estilo de vida. Además, actualmente se conoce que más allá de presentar efectos positivos en la prevención del cáncer de mama, evitar el exceso de peso con una dieta adecuada y con ejercicio diario también mejora el pronóstico, la supervivencia y la calidad de vida frente esa enfermedad (San Felipe *et al.*, 2013).

Siendo así, varios estudios apuntan que los AOVs, mayoritariamente compuestos por grasa monoinsaturada, tienen en su composición compuestos con efectos preventivos frente la proliferación de células mamarias cancerígenas (López-Biedma *et al.*, 2016, Sánchez-Quesada *et al.*, 2015). Por otro lado, también existen estudios que demuestran que el consumo de grasas saturadas, así como el exceso de peso, son factores que predisponen para la progresión del cáncer debido a la promoción de la metástasis (Bonilla-Fernandez *et al.*, 2013; Pascual *et al.*, 2016).

2.1.3 Metástasis

La metástasis es la principal causa de enfermedades malignas y responsable de la mayoría de las muertes por cáncer (Mehlen, Puisieux, 2006). Es definida como un proceso de migración de células cancerígenas de un tumor primario a otra parte del cuerpo, esa migración puede ocurrir vía sistema sanguíneo o linfático y el potencial metastásico de las células presenta una relación directa con la expresión de genes que desembocan en el desarrollo de la metástasis (Pani *et al.*, 2010).

Estas células estarían programadas mediante la expresión de determinados genes y de otros factores: como el origen celular, propiedades intrínsecas del tumor primario y afinidades del tejido para colonizar no sólo órganos específicos, sino para

determinar el curso temporal y la proporción de la metástasis (Chiang; Massague, 2008; Nguyen *et al.*, 2009).

Sin embargo, durante el proceso de metástasis, el metabolismo de los ácidos grasos es una importante fuente de energía para las células cancerosas, casi todos los tumores adquieren la capacidad de sintetizar ácidos grasos de cadena larga, mediante la regulación positiva de la expresión de la ácido graso sintasa (Kuhajda, 2006). Además de constituir una fuente de producción de energía, también participan en la estructura de las membranas lipídicas (Zaugg *et al.*, 2011).

No obstante, a lo largo de muchos años, diversos estudios han demostrado una relación directa de la grasa de la dieta, así como alguno de los componentes de la misma, con un aumento del riesgo de padecer ciertos tipos de cánceres, especialmente de mama, colon y recto, próstata y ovarios (Armstrong; Doll, 1975; Carroll, 1991; Bonilla-Fernandez *et al.*, 2003). Todavía, ciertos estudios sugieren que no es la cantidad sino la calidad de la grasa lo que realmente presenta una relación con el desarrollo de esta enfermedad (Bartsch *et al.*, 2002).

Recientemente, un ensayo realizado con ácido palmítico, que es un ácido graso saturado, apuntó que altos niveles de grasas en la sangre aumentan el número de focos metastásicos, mediante la mayor expresión del CD36, que es una molécula que se encuentra en la superficie de las células tumorales y tiene la función de capturar y transportar los ácidos grasos al interior de las células, lo que les aportarían una energía extra que utilizarían para incentivar su proceso metastásico (Pascual *et al.*, 2016).

2.2 CD36

El CD36 (cluster of differentiation 36) es una proteína multifuncional que pertenece a la familia de las glicoproteínas formada por un péptido con una cadena de 472 aminoácidos. Está presente en las membranas de células de diversos tejidos del cuerpo humano, principalmente donde hay un importante flujo de lípidos, como en el tejido adiposo, cardíaco y glándulas mamarias, pues desempeña una importante función de transportador de ácidos grasos al interior de las células (Harmon; Abumrad, 1993; Van Nieuwenhoven *et al.*, 1995; Clezardin *et al.*, 1995; Hoosdally *et al.*, 2009).

El CD36 también se expresa en el tejido hematopoyético, a través de las membranas de monocitos, macrófagos, plaquetas y células endoteliales microvasculares (Febbraio *et al.*, 2001). Se cree que está involucrado en muchos procesos fisiológicos y patológicos en el organismo humano como la inmunidad innata, angiogénesis, trombosis, aterogénesis y obesidad (Martin *et al.*, 2011).

En los procesos inflamatorios, el CD36 que pertenece a la familia de los receptores *scavenger* de clase B, se expresa en macrófagos y tiene gran afinidad por las lipoproteínas, como las lipoproteínas de alta (HDL) y baja densidad (LDL), aunque también puede actuar como receptor no solamente para los ácidos grasos, sino también para la trombospondina, el colágeno, los fosfolípidos polianiónicos y las células apoptóticas (Viñals *et al.*, 2004).

Otros estudios demostraron que se produce un aumento de la expresión de CD36 por fenómenos de adhesión, lipoproteínas nativas y modificadas (LDL oxidadas), colesterol celular, factor estimulador de colonias de macrófagos e interleucina (Meade *et al.*, 1999). En cambio, su expresión se ve reducida por corticoides, el factor de crecimiento de transformación (TGF) β 1 y el lipopolisacárido. (Febbraio *et al.*, 2001).

Actualmente, un ensayo describió la relación del CD36 con la metástasis, en ese estudio utilizaron el ácido palmítico (que es un ácido graso saturado) en una dieta rica en grasa en ratones, y observaron que esa dieta incrementaba el número de CD36 y producía más metástasis. Los autores suponen que el CD36 puede ser una molécula clave en el desarrollo del cáncer y la metástasis (Pascual *et al.*, 2016). Por ello, es importante evaluar los efectos de otros tipos de grasas, como los AOVs, en la expresión de esa proteína.

2.3 ACEITES DE OLIVA VÍRGENES

2.3.1 Generalidades y composición

Los AOVs pertenecen en nuestra dieta al grupo de lípidos o grasas y son clasificados como macronutrientes porque son componentes mayoritarios en la alimentación, así como los carbohidratos y las proteínas. Los lípidos son esenciales para un buen funcionamiento del organismo, desempeñando funciones fisiológicas y

bioquímicas importantes, de las cuales se destacan las siguientes: son componentes de las membranas celulares, participan del transporte de vitaminas liposolubles, formación de hormonas y son fuentes de ácidos grasos esenciales (Messía *et al.*, 2013).

Además, su principal función es la de proporcionar energía para nuestro cuerpo aportando 9 Kcal/g. Los AOVs son grasas formadas por una molécula de glicerol y tres ácidos grasos, es un zumo oleoso obtenido del fruto del olivo (*Olea europaea* L.) en perfectas condiciones de madurez, procedentes de un olivo sano, evitando todo tratamiento o manipulación mecánica, física y térmica que altere la naturaleza química de sus componentes y que no hayan tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado (COI, 2017). Esa grasa tiene un consumo muy difundido en países como España, Italia y Grecia, siendo un alimento protagonista en la dieta mediterránea (Martínez; Villarino, 2005).

Los AOVs han sido asociados, debido principalmente a sus compuestos bioactivos, a prevención de diferentes enfermedades, por ejemplo diferentes tipos de cáncer y trastornos cardiovasculares. Así como, su ingesta también puede favorecer el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales, como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Escrich *et al.*, 2011; Estruch *et al.*, 2013).

Los AOVs son compuestos en su mayoría por triacilglicéridos (98-99%) que componen su fracción saponificable y contienen AO, el cual es monoinsaturado, como el ácido graso más abundante. El resto de su composición (entre un 1-2%) lo constituyen los denominados componentes minoritarios, entre los que aproximadamente podemos distinguir unos 230 compuestos distintos (Sánchez-Quesada, 2014).

2.3.2 Ácido oleico

El ácido oleico (cis-9-Octadecenoico) (18:1 ω 9) (AO) se encuentra en la fracción saponificable de los AOVs y es su ácido graso mayoritario, representando del 68 al 81,5%. Es por este ácido graso por lo que se identifica a los AOVs como ricos en grasas monoinsaturadas, lo que les diferencia de otras grasas vegetales y animales (Gutiérrez; Carretero, 2009).

Este compuesto viene demostrando acciones protectoras frente a enfermedades cardiovasculares y cáncer, destacándose en cáncer de mama (Wahle

et al., 2004). En esa enfermedad, el AO en concentraciones superiores a 25 µg/mL parece inhibir el desarrollo de células tumorales (Rose; Connolly, 1990).

Además, en cáncer de mama, se ha demostrado que el AO es capaz de inhibir la sobreexpresión del oncogen *Her-2/neu*, característico de los tumores mamarios, actuando de forma sinérgica con la inmunoterapia utilizada para activar la apoptosis de las células cancerosas (Menéndez *et al.*, 2005).

El AO actuando junto con la alfa-lactoalbúmina también parece ejercer efectos positivos en la quimioprevención, inhibiendo el crecimiento y promoviendo la apoptosis en líneas celulares humanas de cáncer de mama (Zhong *et al.*, 2015).

2.3.3 Compuestos minoritarios

Los compuestos minoritarios son la fracción insaponificable de los AOVs, las diversas clases de esos constituyentes menores pueden clasificarse en dos grupos. El primer grupo consta de derivados de ácidos grasos, tales como fosfolípidos, ceras y ésteres de esteroides. El segundo grupo incluye clases de compuestos que no están químicamente relacionados con los ácidos grasos. Son hidrocarburos, alcoholes alifáticos, esteroides libres, tocoferoles, clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos (Gutiérrez; Carretero, 2009).

Esos diferentes compuestos son importantes para evaluar la calidad, así como para identificar fraudes de mezclas de los AOVs con otros aceites. Además, son esenciales para que el aceite presente buenas características sensoriales, mayor resistencia frente a la oxidación y propiedades nutricionales saludables (Boskou, 2006).

Entre los compuestos con propiedades saludables, se encuentran los compuestos fenólicos (entre los que se encuentra el HT) que poseen una importante capacidad antioxidante y son los que proporcionan el sabor amargo a los AOVs (Gutiérrez-Rosales *et al.*, 2003). Otra importante clase de compuestos presentes en la porción minoritaria de los AOVs son los hidrocarburos (entre los que se encuentra el SQ) (Gutiérrez; Carretero, 2009). Varios estudios demuestran una importante acción antitumoral de esos compuestos de la fracción minoritaria de los AOVs (Newmark, 1997; Warleta *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2009; Warleta *et al.*, 2011).

2.3.3.1 Hidroxitirosol

El hidroxitirosol (hidroxitirosol 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol) (HT) es el componente fenólico de los AOVs más antioxidante. La variedad autóctona de Jaén (variedad Picual) tiene una concentración medio/alta de HT (300 ppm) (Brenes *et al.*, 1999). Ese compuesto presenta una gran propiedad antioxidante debido a su habilidad de neutralizar los radicales libres de oxígeno y nitrógeno, así como de impedir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad y de prevenir el daño ejercido al ADN (Warleta *et al.*, 2011).

El HT podría contribuir a una menor incidencia de cáncer de mama en las poblaciones que consumen AOVs debido a su actividad antioxidante y su protección contra el daño oxidativo al ADN en las células mamarias (Warleta *et al.*, 2011).

Además, numerosos estudios describieron que el HT poseía propiedades anticancerígenas frente a diversos tipos de cáncer, indujo apoptosis en células tumorales de colon y leucemias mieloides (Ragione *et al.*, 2000), se describió su capacidad de disminuir la proliferación celular de una línea celular tumoral de mama humana cuando se empleó en concentraciones de 50 µg/mL, así como la inducción de la apoptosis en estas mismas células (Han *et al.*, 2009).

2.3.3.2 Escualeno

El escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,20-tetracosahexano) (SQ) es un hidrocarburo insaturado de treinta átomos de carbono (C₃₀H₅₀) y es un precursor bioquímico en la biosíntesis de los esteroides. Está presente en todos los aceites y grasas vegetales, especialmente en los AOVs, donde es el componente más abundante de la materia insaponificable (Gutiérrez; Carretero, 2009).

Está demostrado que el SQ contenido en los AOVs reduce el riesgo de diversos tipos de cáncer (Newmark *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1998), e inhibe el crecimiento tumoral, pudiendo ejercer como adyuvante frente al cáncer (Gregory *et al.*, 1999).

Además, actuando sinérgicamente con el HT, ese compuesto demostró efectos antitumorales importantes sobre las células cancerosas mamarias humanas, reduciendo la proliferación celular, los niveles de especies reactivas del oxígeno

(EROs) en condiciones de estrés oxidativo inducido, más allá de promover la apoptosis (Santiago, 2016).

3. HIPOTESIS Y OBJETIVO

3.1 HIPOTESIS

Numerosos estudios apuntan una asociación entre el consumo de grasas saturadas y el aumento de la metástasis en distintos tipos de cáncer, correlacionado a su vez con una mayor expresión de la proteína CD36.

Existen evidencias científicas que demuestran que una dieta saludable, como la Dieta Mediterránea, con un consumo frecuente de AOVs, son factores protectores frente al cáncer de mama. Por lo que el consumo de esta grasa podría favorecer la disminución de la expresión de CD36 y por tanto del desarrollo del cáncer de mama y su metástasis.

3.2 OBJETIVO

Evaluar la acción de tres compuestos bioactivos presentes en los AOVs (AO, HT y SQ) sobre la expresión de la proteína CD36 en células tumorales de mama humanas altamente metastásicas (MDA-MB-231).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 REACTIVOS

El Hidroxitirosol (HT) (3,4-dihidroxifeniletanol) fue obtenido de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EEUU). El Anticuerpo humano CD36 fue adquirido del Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, ALEMANIA); Los siguientes reactivos fueron obtenidos del Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EEUU): El ácido oleico (AO) (pureza ≥ 99 (diluído en 2 mL de DMSO), el Escualeno (SQ) (2, 6, 10, 15, 23-hexametil-2, 6, 10, 14, 18, 20-tetracosahexano); Piruvato de sodio; Aminoácidos no esenciales (Non-essential aminoacids (NEAA)); Hepes Buffer. El Suero bovino fetal fue adquirido de PAA Laboratories GmbH (Pasching, AUSTRIA). El TrypLE Express, y el *minimum essential medium* (MEM) fueron obtenidos de Gibco® Life Technologies Ltd (Paisley, REINO UNIDO). El dimetil sulfóxido (DMSO), y el tampón fosfato salino (PBS) fueron adquiridos del AppliChem GmbH (Darmstadt, ALEMANIA). Las placas de cultivo fueron obtenidas de Starlab (Hamburgo, ALEMANIA).

4.2 CULTIVO CELULAR

Para todos los ensayos, se utilizaron células procedentes de la línea celular tumoral de mama humana MDA-MB-231, las cuales fueron adquiridas de la colección de cultivos tipo americana (American Type Culture Collection ATCC, Manassas, VA, EEUU). Las células crecieron en monocapa con MEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de piruvato de sodio, 1% de hepes buffer y 1% de NEAA. Las células se mantuvieron a 37 °C bajo una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ y una vez que alcanzaron un 95% de confluencia fueron usadas para todos los ensayos.

4.3 MARCACIÓN DE MEMBRANA CON EL ANTICUERPO CD36

Las células con 95% de confluencia fueron despegadas con TrypLE Express y centrifugadas en PBS frío (300xg 10' 4 °C), se ajustó la cantidad de MDA-MB-231 para 5 x 10⁴ / mL. Más tarde, fueron sembradas en placas de cultivo de 12 pocillos,

con un volumen de 1000 μ L de la suspensión celular por pocillo. Después de 24 horas de cultivo para permitir el crecimiento celular, se añadieron las siguientes concentraciones para los tratamientos: 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M de AO, HT y SQ.

Posteriormente, se añadió 1 mL de MEM a los pocillos controles y 1 mL de cada tratamiento al pocillo correspondiente. Tras incubar 24 horas a 37 °C, las células fueron despegadas con 500 μ L de TrypLE Express y centrifugadas en 1 mL de PBS (300 xg 10' 4°C). Los sobrenadantes fueron descartados y se añadió 100 μ L de Buffer y anticuerpo a cada tubo. A continuación, se incubó en oscuridad total durante 15 minutos, se añadió 400 μ L de PBS y se midió la fluorescencia con el citómetro de flujo MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, ALEMANIA). Este ensayo fue realizado tres veces de manera independiente. Los resultados están expresados como el porcentaje respecto al control de la media de la cantidad de fluorescencia recogida por el citómetro de las tres réplicas independientes.

4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de todos los tratamientos se presentan como el porcentaje de la media de 3 ensayos independientes \pm error estándar de la media (\pm SEM), y son expresados frente al control sin tratar. El estudio estadístico de los ensayos fue realizado con una prueba ANOVA. El método empleado para discriminar entre las medias fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% ($p < 0.05$) al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0. El programa empleado para este análisis fue el Statgraphics Centurion XVI.

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

5.1 AO

El siguiente gráfico (Gráfico 1) presenta los resultados del ensayo obtenidos tras los tratamientos de 1 μM , 10 μM y 100 μM de AO en la línea celular tumoral de mama humana MDA-MB-231 y tras realizar un análisis estadístico de los datos con una prueba ANOVA, por medio del programa Statgraphics Centurion XVI.

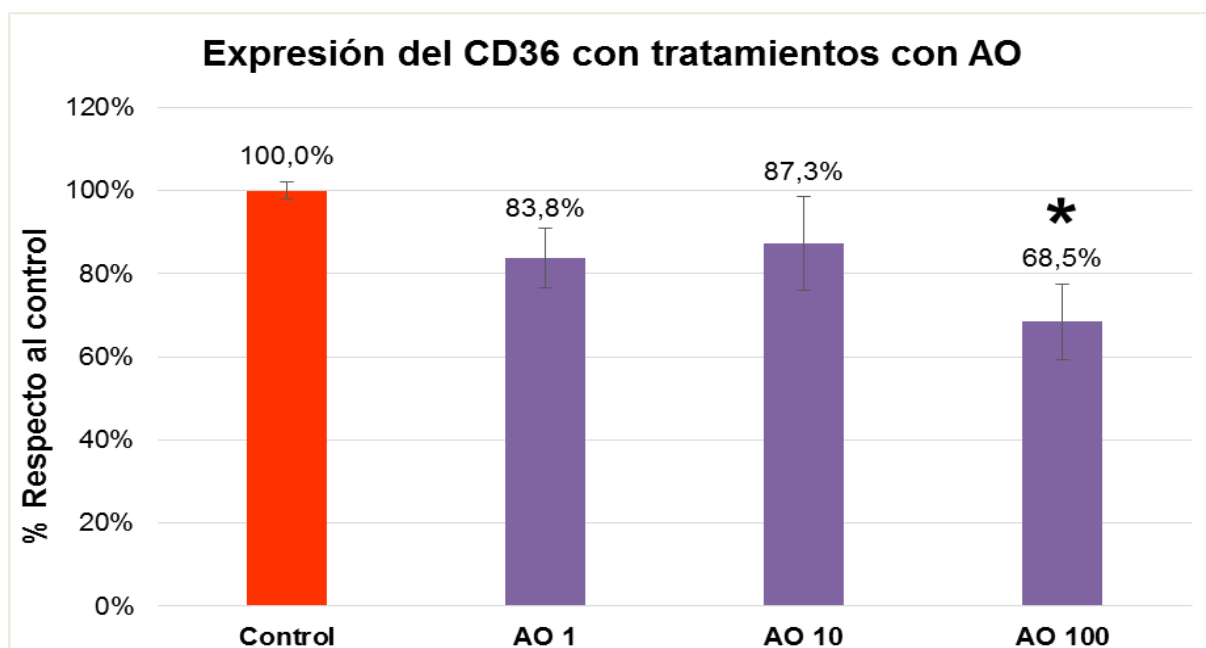


Gráfico 1. Expresión del CD36 tras tratamientos con AO. Porcentaje de la expresión del CD36 en la línea celular MDA-MB-231, tras tratar con 1 μM , 10 μM y 100 μM de AO. Los valores son representados por porcentajes de las medias de expresión del CD36 con respecto al control \pm error estándar de la media, de tres ensayos independientes. Valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) son representados con (*).

Existe una diferencia significativa entre las células tratadas con 100 μM de AO frente al control sin tratamiento, presentando una menor media de expresión del CD36. Los tratamientos con 1 μM y 10 μM de AO también demostraron una disminución de la expresión del CD36, a pesar de no representar resultados estadísticamente significativos.

5.2 HT

En el siguiente gráfico (Gráfico 2) se muestra los resultados del ensayo obtenidos tras los tratamientos de 1 μM , 10 μM y 100 μM de HT en las células de la línea tumoral de mama humana MDA-MB-231 y tras realizar el análisis estadístico

de los datos con una prueba ANOVA, por medio del programa Statgraphics Centurion XVI.

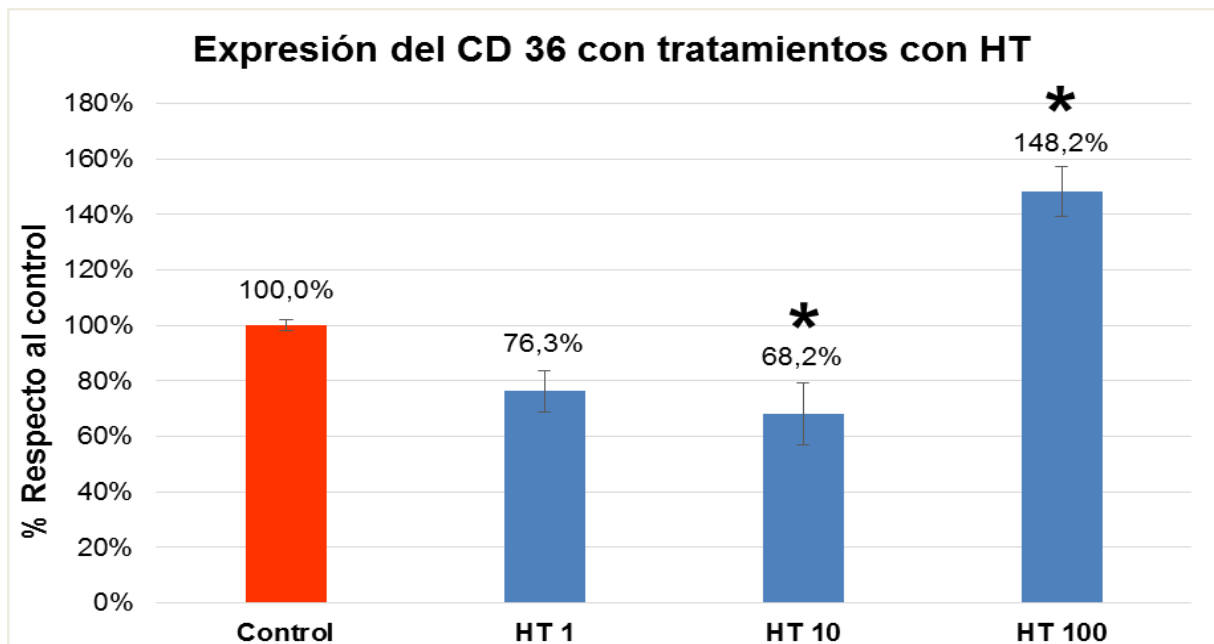


Gráfico 2. Expresión del CD36 tras tratamientos con HT. Porcentaje de la expresión del CD36 en la línea celular MDA-MB-231, tras tratar con 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M de HT. Los valores son representados por porcentajes de las medias de expresión del CD36 con respecto al control \pm error estándar de la media, de tres ensayos independientes. Valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) son representados con (*).

Los resultados demuestran una diferencia significativa entre las células tratadas con 10 μ M de HT frente el control sin tratamiento, presentando una menor media de expresión del CD36. En cuanto que el tratamiento con 100 μ M de HT presentó una mayor expresión ($p < 0,05$) del CD36 frente las células controles.

5.3 SQ

En el siguiente gráfico (Gráfico 3) se presenta los resultados del ensayo obtenidos con los tratamientos de 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M de SQ en las células de la línea tumoral de mama humana MDA-MB-231, tras análisis estadístico de los datos con una prueba ANOVA, por medio del programa Statgraphics Centurion XVI.

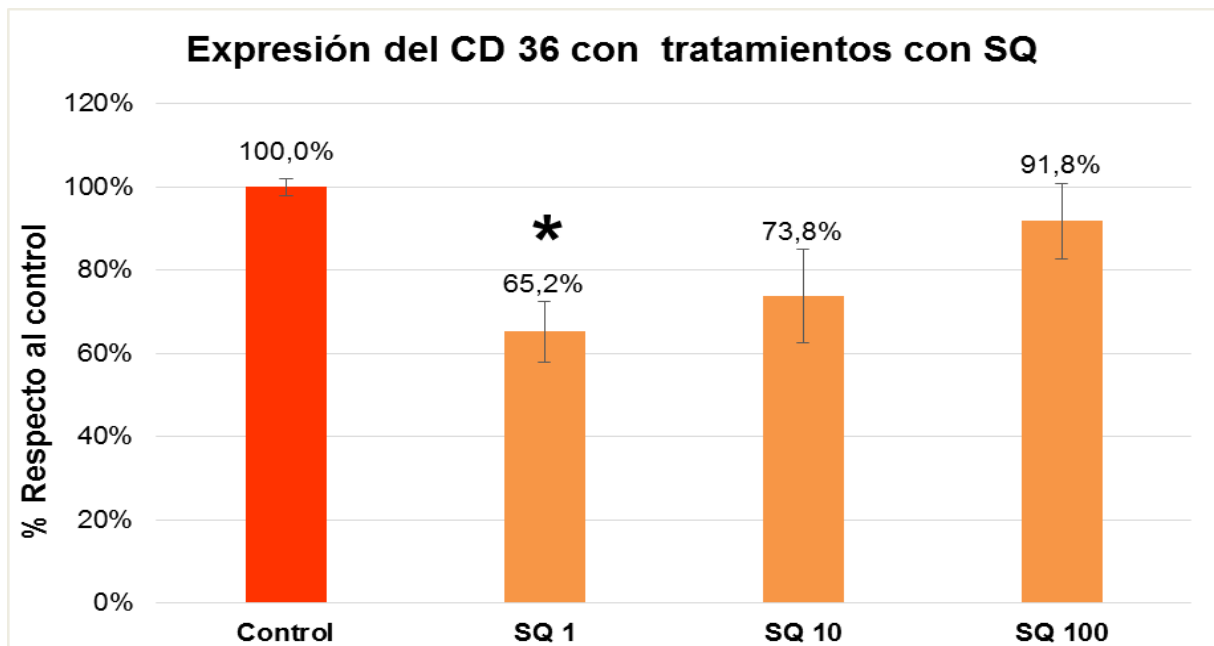


Gráfico 3. Expresión del CD36 tras tratamientos con SQ. Porcentaje de la expresión del CD36 en la línea celular MDA-MB-231, tras tratar con 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M de SQ. Los valores son representados por porcentajes de las medias de expresión del CD36 con respecto al control \pm error estándar de la media, de tres ensayos independientes. Valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) son representados con (*).

Según esos resultados hay una diferencia significativa entre las células tratadas con 1 μ M de SQ frente el control sin tratamiento, presentando una menor media de expresión del CD36. También se notó una tendencia de aumento de la expresión del CD36 con la elevación de las concentraciones de SQ empleadas, la siguiente figura (Fig. 4.1) demuestra la expresión del CD36 con las diferentes concentraciones del SQ empleadas frente el control.

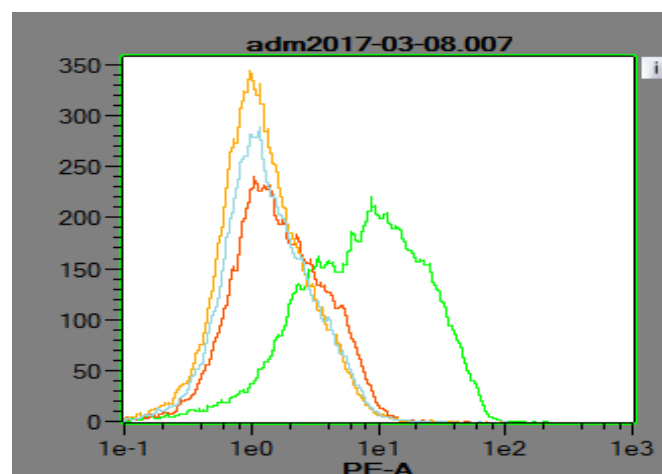


Fig. 4.1 Ejemplo de expresión del CD36 en una de las réplicas, mediante citometría de flujo, con las concentraciones de 1 μ M (naranja), 10 μ M (azul) y 100 μ M (rojo) de SQ frente control (verde).

6. DISCUSIÓN

Actualmente existe una discusión por parte de la comunidad científica acerca de la asociación del consumo de grasas saturadas con el aumento de la metástasis en distintos tipos de cáncer, por la correlación del consumo de este tipo de grasa con una mayor expresión del CD36 (Pascual *et al.*, 2016; Nath; Chan, 2015). Así como hay evidencias acerca de los efectos beneficiosos para la salud de los compuestos bioactivos presentes en los AOVs (grasa mayoritariamente monoinsaturada) e incluso el efecto protector de su consumo frente al cáncer de mama (Escrich *et al.*, 2011).

Por tanto, los diferentes tipos de grasas presentes en la dieta pueden tener efectos distintos en el organismo humano y así actuar de diferentes formas en la protección o desarrollo de enfermedades (Bartsch *et al.*, 2001). De ahí surge el interés por investigar cual es la relación de los compuestos bioactivos de los AOVs con la expresión del CD36 en cáncer de mama.

En primer lugar, se observó que en las células de la línea tumoral MDA-MB-231 tratadas con 100 μ M de AO hubo una menor expresión del CD36 frente al control. Además, se notó una tendencia a disminuir la expresión del CD36 en todas las concentraciones empleadas en dichas células, aunque no fuesen estadísticamente significativas (Gráfico 1).

Ese resultado se contrapone al encontrado en un estudio realizado en el Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona (IRB), dónde evaluaron los efectos de una dieta rica en lípidos en ratones inoculados con células tumorales. Aquí los autores describen que el consumo de ácido palmítico (ácido graso saturado) provocó una mayor expresión del CD36, con un consecuente desarrollo de la metástasis (Pascual *et al.*, 2016).

Pero algunos estudios anteriores demuestran que cuando hay en la dieta niveles elevados de ácidos grasos monoinsaturados, y un contenido moderado de ácidos grasos más saturados, como ocurre en los AOVs, se puede tener un efecto protector frente al desarrollo de tumores cancerígenos debido a que las dietas ricas en grasas saturadas pueden presentar efectos procarcinogénicos (Escrich *et al.*, 2006; Granados, 2006; López-Miranda *et al.*, 2010).

Aunque no existen estudios disponibles en la comunidad científica que evalúen la acción del AO en la expresión del CD36 en modelos humanos de células mamarias cancerígenas, se demostró que los ácidos grasos son moléculas claves en la expresión del CD36 y éste, a su vez, puede presentar una importante correlación con la metástasis (Pascual *et al.*, 2016; Nath; Chan, 2015).

Además, han sido descritos diferentes mecanismos de acción por los cuales el AO puede intervenir en el desarrollo del cáncer de mama, como un estudio que evaluó la acción de un complejo preparado con AO y alfa-lactoalbumina, en diferentes concentraciones (25 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM y 400 μM) en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 de cáncer de mama y demostró que ese complejo puede inhibir e inducir la apoptosis en dichas células (Zhong *et al.*, 2015).

En contraposición hay estudios que encontraron efectos protumorales del AO frente a la proliferación celular en cáncer de mama, como un ensayo que utilizó 400 μM de AO en células de distintas líneas tumorales, promoviendo la metástasis en células cancerígenas altamente metastásicas, como la MDA-MB-231, mientras que presentaban efectos inhibidores en las células tumorales que no poseían tal característica (Li *et al.*, 2014). La estimulación de las células de la línea MDA-MB-231 de cáncer de mama con 200 μM de OA induce un aumento de la secreción de MMP-9 (matrix metallopeptidase 9), promoviendo así el poder invasivo de dichas células (Soto-Guzman *et al.*, 2010). Por lo tanto, parece que la concentración de los compuestos utilizados puede ser clave para el estudio de los efectos antitumorales de este compuesto.

En el presente estudio también se observó una disminución significativa de la expresión del CD36 en las células tumorales tratadas con 10 μM de HT (Gráfico 2). Tampoco hay estudios en bibliografía que evalúen los efectos del HT en la expresión del CD36 en modelos celulares humanos de cáncer de mama. Pero puede estar relacionado con el poder antioxidante de este compuesto, bien conocido por la comunidad científica, que relaciona su poder antioxidante con la acción protectora frente a la aparición de cáncer debido a diferentes mecanismos de acción, todos relacionados con su característica antioxidante (Warleta *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2009; Ragione *et al.*, 2000).

Además, con la misma población de estudio del presente estudio y con la concentración de 10 μM , se observó que el HT no alteró el perfil del ciclo celular, así como, en otras concentraciones, no alteró la proliferación celular o la apoptosis y

previno el daño oxidativo en células no tumorales de mama, lo que sugiere que ese compuesto puede contribuir a la baja incidencia de cáncer de mama en países con consumo frecuente de AOVs (Warleta *et al.*, 2011).

Investigaciones anteriores, también identificaron efectos antiproliferativos y apoptóticos del HT en células tumorales humanas de cáncer de mama de la línea MCF-2 (Han *et al.*, 2009; Sirianni *et al.*, 2010).

Aun así, en el presente estudio, con la concentración de 100 μM , hay un gran aumento de la expresión del CD36 (Gráfico 2), un 48,2% más de expresión frente al control. Esta elevación probablemente esté asociada a un efecto prooxidante que puede surgir cuando se emplea altas concentraciones de antioxidantes, como el HT (Carocho; Ferreira, 2013) y por tanto podría promover el crecimiento y aumentar la capacidad metastásica de estas células.

Sabiendo que el CD36 es una proteína multifuncional e investigando su expresión en la arterosclerosis, un estudio evaluó los efectos del HT, sobre la expresión del receptor CD36, y se observó que en concentraciones de 10 μM y 75 μM , este compuesto puede reducir la expresión del CD36 en monocitos, en presencia de LDL nativa (Granados *et al.*, 2012).

En tercer lugar, en el presente estudio, se observó que las células tratadas con 1 μM de SQ presentaban una disminución de la expresión del CD36 (Gráfico 3), este fue el tratamiento que demostró una menor expresión significativa del CD36 entre todos los utilizados en esta investigación.

Así como ocurre con el AO y con el HT, no hay estudios disponibles que evalúen la acción del SQ en la expresión del CD36 en modelos celulares humanos de cáncer de mama. Entretanto, una investigación anterior, demostró que el SQ empleado a esta misma concentración, en condiciones de estrés oxidativo provocado por la adición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), sobre la línea celular MDA-MB-231 presentó reducción de las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) (Santiago, 2016).

Además, en la misma investigación se describió que el SQ en concentraciones de 10 μM y 100 μM también presentaba la característica de reducir las EROs (Santiago, 2016). Aunque en el presente estudio al emplear el SQ en estas concentraciones, no ocurrió una disminución significativa de la expresión del CD36.

También se demostró que el SQ puede actuar como un agente protector frente el daño oxidativo en células epiteliales mamarias (MCF10A), mientras que no presentó el mismo efecto en células humanas de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF-7), sugiriendo que este compuesto puede ser uno de los responsables de la baja incidencia de cáncer de mama en países con una Dieta Mediterránea y un elevado consumo de AOVs, ya que esa grasa tiene un gran contenido de SQ (Warleta et al., 2010).

Los efectos del SQ sobre la expresión del receptor CD36 fue únicamente estudiado por Granados *et al.* En 2012, dónde se evaluó su efecto en la modulación de la arterosclerosis, y se observó que en concentraciones de 10 μ M, 75 μ M y 200 μ M, este compuesto puede reducir la expresión del CD36 en monocitos o macrófagos. Todavía el mecanismo por el que el SQ puede modular la expresión del CD36 es desconocido (Granados *et al.*, 2012).

7. CONCLUSIONES

Como conclusiones finales, se puede afirmar que:

- El AO disminuyó la expresión del CD36 en un el modelo celular humano de cáncer de mama, cuando fué empleado a 100 μ M.
- El HT ha reducido la expresión del CD36 en MDA-MD-231 a baja concentración (10 μ M).
- El SQ a la concentración de 1 μ M fue el tratamiento que presentó una mayor disminución de la expresión del CD36 de todos los empleados en el presente estudio.
- Una dieta equilibrada con un consumo de AOVs, los cuales aportan compuestos bioactivos, podría disminuir la expresión de la proteína CD36 en células tumorales humanas de cáncer de mama.

8. BIBIOGRAFÍA

Armstrong, B.; Doll, R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer*, 1975, 15:617-631.

Bartsch, H.; Nair, J.; Owen, R. W. Exocyclic DNA adducts as oxidative stress markers in colon carcinogenesis: potential role of lipid peroxidation, dietary fat and antioxidants. *Biol Chem*, 2002; 383:915-921.

Bonilla-Fernandez, P.; Lopez-Cervantes, M.; Torres-Sanchez, L. E.; Tortolero-Luna, G.; Lopez-Carrillo, L. Nutritional factors and breast cancer in Mexico. *Nutr Cáncer*, 2003; 45:148-55.

Boskou, D. Olive oil: chemistry and technology. Second ed. American Oil Chemists' Society. 248 p. 2006.

Brenes, M.; Garcia, A.; Garcia, P.; Rios, J.J.; Garrido, A. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J. Agric. Food Chem*, 1999, 47, 3535–3540.

Carocho, M., Ferreira. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 2013, 51, 15-25.

Carroll, K. K. Dietary fats and cancer. *Am J Clin Nutr*, 1991; 53:1064S-1067S.

Chiang, A. C.; Massague, J. Molecular basis of metastasis. *N. Engl.J.Med.*, 2008, 359(26), 2814-2823.

Clezardin, P.; Frappart, L.; Clerget, M.; Pechoux, C.; Delmas, P. D. Expression of thrombospondin (TSP1) and its receptors (CD36 and CD51) in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast. *Cancer Res*, 1993; 53:1421–30.

COI, 2017. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/83-designations-and-definitions-of-olive-oils>

Escrich, E.; Moral, R., y Solanas, M. Olive oil, an essential component of the Mediterranean diet, and breast cancer. *Public Health Nutr.*, 2011, 14(12A), 2323-2332.

Escrich, E.; Solanas, M.; Moral, R.; Costa, I.; Grau L. Are the olive oil and other dietary lipids related to cancer? Experimental Evidence. *Clin Transl Oncol*, 2006; 8(12): 868- 883.

Estruch, R.; Ros, E.; Salas-Salvado, J.; Covas, M. I.; Corella, D.; Aros, F.; Gómez-Gracia, E.; Ruíz Gutiérrez, V.; Fiol, M.; Lapetra, J.; Lamuela-Raventos, R. M.; Serra-Majem, L.; Pinto, X.; Basora, J.; Muñoz, M. A.; Sorli, J. V.; Martínez, J. A.; Martínez-González, M. A.; y PREDIMED Study Investigators. (2013). Primary prevention of

cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N. Engl.J.Med.*, 368(14), 1279-1290.

Febbraio, M.; Hajjar, D. P.; Silverstein, R. L.; CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*, 2001; 108:785-91.

GLOBOCAN. (2012). Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base V1, N°. 11. Lyon, France: Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

Gonzalez, M. M. A.; Calvo, M. N. Mediterranean diet and life expectancy; beyond olive oil, fruits, and vegetables. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2016, 19:401–407.

Granados, S.; Quiles, J. L.; Gil, A.; Ramírez-Tortosa, M. C. Lípidos de la dieta y cáncer. *Nutr Hosp*, 2006, 21: 44-54.

Granados, S.; Quiles, J. L.; Ramirez-Tortosa, C. L.; Ochoa-Herrera, J.; Perez-Lopez, P.; Pulido-Moran, M.; Ramirez-Tortosa, M. C. Squalene ameliorates atherosclerotic lesions through the reduction of CD36 scavenger receptor expression in macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.* 2012, 56, 733–740 DOI 10.1002/mnfr.201100703

Gregory, S., Kelly, N. D. Squalene and it's Potencial Clinical Uses. *Alternative Medicine Reviews*, 1999, 4: 29-36.

Gutiérrez, A. F.; Carretero, A. S. El aceite de oliva virgen: tesoro de Andalucía. Málaga, 2009.

Gutierrez-Rosales, F.; Rios, J. J.; Gomez-Rey, M L. Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 2003, 24;51(20):6021-5.

Han, J.; Talorete, T.P.; Yamada, P.; Isoda, H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*, 2009, 59, 45-53 doi: 10.1007/s10616-009-9191-2.

Harmon, C. M.; Abumrad, N. A. Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids. *J Membr Biol*, 1993; 133:43–9.

Hoosdally, S. J.; Andress, E. J.; Wooding, C.; Marin, C. A.; Linton, K. J. The human scavenger receptor CD36; glycosylation status and its role in trafficking and function. *J Biol Chem*, 2009; 284: 16277–16288.

Horn, J.; Opdahl, S.; Engstrom, M. J.; Romundstad, P. R.; Tretli, S.; Haugen, O. A.; Bofin, A. M.; Vatten, L. J.; Asvold, B. O. Reproductive history and the risk of molecular breast cancer subtypes in a prospective study of Norwegian women. *Cancer Causes Control*, 2014, 25(7), 881-889.

Kuhajda, F. P. Fatty Acid Synthase and Cancer: New Application of an Old Pathway. *Cancer Res*, 2006, 66, 5977–5980.

Li, S.; Zhou, T.; Li, C.; Dai, Z.; Che D. High Metastatic gastric and Breast Cancer Cells Consume Oleic Acid in an AMPK Dependent Manner. *PLoS ONE*, 2014, 9(5): e97330. doi: 10.1371/journal.pone.0097330

López Miranda, J.; Pérez-Jiménez, F.; Ros, E.; De Caterina, R.; Badimón, L.; Covas M.I.; *et al.* "Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008". *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2010; 20: 284-294.

López-Biedma, A.; Sánchez-Quesada, C.; Beltrán, G.; Delgado-Rodríguez, M.; Gaforio, J. J. Phytoestrogen (+)-pinoresinol exerts antitumor activity in breast cancer cells with different oestrogen receptor statuses. *Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 16:350 DOI 10.1186/s12906-016-1233-7

Martin, C.; Chevrot, M.; Poirier, H.; Passilly-Degrace, P.; Niot, I.; Besnard, P. CD36 as a lipid sensor. *Physiology & Behavior*, 2011, 105: 36–42.

Martínez, A. J. R.; Villarino, M. A. El aceite de oliva en España. Una breve historia, en el aceite de oliva y la dieta mediterránea. *Nutrición y Salud*. 2005. Vol. 7; 7-25.

Meade, E. A.; McIntyre, T. M.; Zimmerman, G. A.; Prescott, S. M. Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem*, 1999; 274:8328-34.

Mehlen, P.; Puisieux, A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 6, 2006, 449–458.

Menéndez, J. A.; Vellón, L.; Colomer, R.; Lupu, R. Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erbB-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification. *Ann Oncol*, 2005, 16:359-371.

Messía, F. P; Gutiérrez, A. M.; Quero, J. V.; Navarrete, G. R. El olivar y su aceite. 2013.

Nath, A.; Chan, C. Genetic alterations in fatty acid transport and metabolism genes are associated with metastatic progression and poor prognosis of human cancers. *Nature*, 2015. 6:18669 DOI: 10.1038/srep18669.

Newmark, H. L. Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 1997, 6: 1101-1103.

Nguyen, D. X.; Bos, P. D.; Massague, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat.Rev.Cancer*, 2009, 9(4), 274-284.

Niederhuber, J. E.; Armitage, J. O.; Doroshow, J. H.; Kastan, M. B.; Tepper, J. E. *Abeloff's Clinical Oncology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Churchill Livingstone; 2013.

OMS. Organización Mundial de la Salud. Informe Cáncer. 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Pani, G.; Galeotti, T.; Chiarugi, P. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev.*, 2010, 29(2), 351-378.

Pascual, G.; Avgustinova, A.; Mejetta, S.; Martín, M.; Castellanos, A.; Attolini, C.; Berenguer, A.; Prats, N.; Toll, A.; Hueto, J. A.; Bescós, C.; Di Croce, L.; Benitah, S. A. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature*, 2016, 5:541(7635):41-45.

Perou, C. M.; Sørlie, T.; Eisen, M. B.; Van de Rijn, M.; Jeffrey, S. S.; Rees, C. A.; et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*, 2000; 406: 747-752.

Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*, 2001, 411, 390–5.

Ragione, D.; Cucciolla, V.; Borriello, A.; Della Pietra, V.; Manna, C.; Galletti, P.; Zappia, V. Pyrrolidine dithiocarbamate induces apoptosis by a cytochrome c-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 24;268(3):942-6.

Rao, C. V.; Newmark, H. L.; Reddy, B. S. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*, 1998, 19(2):287-90.

Rose, D. P.; Connolly, J. M. Effects of fatty acids and inhibitors of eicosanoid synthesis on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Research*, 1990, 50: 7139-7144.

San Felipe, M. J. R.; Martín, A. A.; Keenoy, B. M. Influencia del peso corporal en el pronóstico de las supervivientes de cáncer de mama; abordaje nutricional tras el diagnóstico. *Nutr Hosp*, 2013; 28(6):1829-1841.

Sánchez-Quesada, C. 2014. Tesis Doctoral: "Estudio de las propiedades antitumorales, antioxidantes y antiinflamatorias de los principales triterpenos del Aceite de Oliva Virgen utilizando modelos experimentales celulares de mama".

Sánchez-Quesada, C.; López-Biedma, A; Gaforio, J. J. Oleanolic Acid, a Compound Present in Grapes and Olives, Protects against Genotoxicity in Human Mammary Epithelial Cells. *Molecules*, 2015, 20, 13670-13688; doi:10.3390/molecules200813670

Santiago, F. G. 2016. Trabajo de fin de grado: "Estudio de la capacidad antitumoral del hidroxitirosol y el escualeno en células tumorales de mama humanas".

Sirianni, R.; Chimento, A.; De Luca, A.; Casaburi, I. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Mol. Nutr. Food Res*, 2010, 54, 833–840.

Soto-Guzman, A.; Navarro-Tito, N.; Castro-Sanchez, L.; Martinez-Orozco, R.; Salazar, E. P. Oleic acid promotes MMP-9 secretion and invasion in breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis*, 2010, 27:505–515 DOI 10.1007/s10585-010-9340-1.

Toledo, E.; Salas-Salvado, J.; Donat-Vargas, C.; Buil-Cosiales, P.; Estruch, R.; Ros E.; et al. Mediterranean diet and invasive breast cancer risk among women at high cardiovascular risk in the PREDIMED Trial: a randomized clinical trial. *JAMA Intern Med*, 2015;175(11):1752–60.

Van Nieuwenhoven, F. A.; Verstijnen, C. P.; Abumrad, N. A.; Willemsen, P. H.; Van Eys, G. J.; Van der Vusse, G. J.; et al. Putative membrane fatty acid translocase and cytoplasmic fatty acid-binding protein are co-expressed in rat heart and skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995; 207:747–52.

Viñals, M.; Bermúdez, I.; Laguna, J. C. El ácido acetilsalicílico incrementa la expresión de CD36 en macrófagos THP-1 de forma independiente del receptor activado por proliferadores peroxisómicos gamma. *Clin Invest Arterioscl*, 2004;16(2):61-7.

Wahle, K. W.; Caruso, D.; Ochoa, J. J.; Quiles, J. L. Olive oil and modulation of cell signaling in disease prevention. *Lipids*, 2004, 39:1223-1231.

Warleta, F.; Campos, M.; Allouche, Y.; Sanchez-Quesada, C.; Ruiz-Mora, J.; Beltran, G.; Gaforio, J.J. Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol*, 2010, 48, 1092-1100 doi: 10.1016/j.fct.2010.01.031.

Warleta, F.; Quesada, C. S.; Campos, M.; Allouche, Y.; Beltran, G.; Gaforio, J.J. Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients*, 2011, 3, 839-857 doi: 10.3390/nu3100839.

WHO (2007). Cancer control: knowledge into action: WHO guide for effective programmes: early detection.

Zamora Ardoy, M. A.; Báñez Sánchez, F.; Alaminos García P. Aceite de oliva: influencia y beneficios sobre algunas patologías. *Ann Med Interna*, 2004; 21(3).

Zaugg, K.; et al. Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev* 25, 2011, 1041–1051.

Zhong, S.; et al. Cytotoxicity and Apoptosis Induction of Bovine Alpha-lactalbumin-oleic Acid Complex in Human Breast Cancer Cells. *Food Science and Technology Research*, 2015, 21 (1), 103-110 doi: 10.3136/fstr.21.103