



## **TESIS DE DOCTORADO**

Efectos de una lactancia materna óptima sobre la carcinogénesis  
mamaria en la vida adulta en ratas

### **DOCTORANDO**

Flavia Eliana Santiano

Lic. en Nutrición

Facultad de Ciencias de la Nutrición

Universidad Juan Agustín Maza

#### **DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Rubén Carón

Investigador Independiente, CONICET

#### **CODIRECTORA DE TESIS**

Dra. Constanza López Fontana

Investigador Asistente, CONICET

Laboratorio de Hormonas y Biología del Cáncer

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)

Centro Científico y Tecnológico Mendoza (CCT – Mendoza)

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)

Mendoza, Argentina 2017



*A mis padres, por darme el amor y las herramientas que impulsan mis logros.*

*A mi esposo y a mis hijos, por los cuales todo cobra sentido.*



## INDICE

ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	11
CAPÍTULO I.....	12
INTRODUCCIÓN.....	12
Bases para una lactancia materna óptima.....	12
Lactancia óptima.....	13
Lactancia materna exclusiva durante los primeros seis meses de vida.....	14
Alimentación complementaria.....	14
Beneficios de la lactancia materna.....	15
Beneficios de la lactancia materna a corto plazo.....	16
Beneficios de la lactancia materna a largo plazo.....	16
Beneficios de la lactancia materna exclusiva durante los primeros seis meses de vida.....	18
Beneficios de la lactancia durante la alimentación complementaria.....	18
Causas de abandono de la lactancia materna.....	19
Composición de la leche materna.....	20
Macronutrientes.....	20
Micronutrientes.....	22
Componentes Bioactivos.....	22
Programación del desarrollo.....	24
Efectos epigenéticos de la lactancia materna.....	24
Presencia de ARN en leche de rata.....	28
CAPITULO II.....	29
GLÁNDULA MAMARIA.....	29
Histología de la glándula mamaria.....	29
Desarrollo de la glándula mamaria.....	30
Etapa posnatal y puberal.....	30
Ciclo preñez y lactancia.....	31
TDLU/TEBs.....	32

Glándula mamaria de roedores.....	34
Genes implicados en el proceso de diferenciación de la glándula mamaria.....	35
Transductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT6).....	36
GATA3.....	37
ARN no codificante inducido por la preñez (PINC).....	38
TBX3.....	39
CAPITULO III.....	40
CÁNCER DE MAMA.....	40
Etapas de la Carcinogénesis.....	40
Epidemiología.....	41
Clasificación de los tumores de mama.....	42
Marcadores tumorales.....	43
Marcadores de proliferación.....	44
Marcadores de apoptosis.....	45
Modelo de cáncer de mama en animales.....	48
Consumo de grasas y cáncer de mama.....	49
CAPÍTULO IV.....	52
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	52
Hipótesis.....	52
Objetivo general.....	52
Objetivos específicos.....	52
CAPÍTULO V.....	54
MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
1. Modelos de animales en experimentación.....	54
1.1. Modelo animal de lactancia diferencial con DMBA.....	54
1.2. Modelo animal de lactancia diferencial sin DMBA.....	56
1.2.1. Crías.....	56
1.2.2 Madres.....	57
2. Registro de peso, ingesta y apetencia.....	58
3. Determinación de la concentración hormonal.....	59

4. Metodología relacionada al tumor.....	59
4.1. Medición de parámetros tumorales.....	59
4.2. Análisis de la histología tumoral.....	60
4.3. Inmunohistoquímica.....	61
4.4. Aislamiento de proteínas.....	62
4.5. Electroforesis en gel y transferencia a membrana (SDS-PAGE y Western Blot).....	62
5. Metodología relacionada a la glándula mamaria.....	64
5.1 Extracción de ARN total, retrotranscripción y PCR en tiempo real.....	64
5.2. Montaje completo de la glándula mamaria.....	66
5.3. Extracción y conversión de ADN genómico.....	67
6. Análisis Estadístico.....	69
CAPÍTULO VI.....	71
RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°1.....	71
Peso corporal y validación del modelo experimental.....	71
Producción de leche materna.....	73
Composición de macronutrientes de la leche materna.....	74
Masa grasa abdominal.....	75
La lactancia no afecta la histología tumoral.....	76
La lactancia disminuye la incidencia tumoral.....	77
La lactancia retarda el día de aparición del tumor.....	78
La lactancia materna no afecta significativamente el crecimiento tumoral.....	79
Una lactancia óptima tiende a inducir una mayor sobrevida libre de tumor.....	80
CAPÍTULO VII.....	82
RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°2.....	82
Apetencia.....	83
Consumo alimentario.....	84
Peso corporal.....	85
Masa grasa intraabdominal.....	86
Consumo de macronutrientes y calorías totales.....	87
La dieta grasa no modifica la incidencia tumoral.....	88

La dieta grasa no modifica la latencia tumoral.....	89
Los tumores provenientes de ratas que consumen una dieta grasa no crecen más rápido.....	90
El consumo de una dieta con alto contenido en grasas no modifica la proliferación tumoral.....	91
CAPÍTULO VIII.....	95
RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°3.....	95
Consumo alimentario.....	95
Peso corporal.....	96
Masa grasa intraabdominal.....	97
La lactancia materna óptima disminuye la incidencia tumoral ante una dieta grasa.....	98
La lactancia materna óptima no modifica la latencia tumoral ante una dieta grasa.....	99
La lactancia materna óptima no modifica el crecimiento tumoral ante una dieta grasa.....	100
La lactancia materna óptima no modifica la proliferación tumoral ante una dieta grasa.....	101
CAPÍTULO IX.....	105
RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°4.....	105
Concentración Hormonal.....	105
Los tumores de animales que recibieron una lactancia óptima presentaron mayor apoptosis y menor mitosis.....	107
Los tumores de animales que recibieron lactancia deficiente presentan mayor expresión de PCNA.....	108
Los tumores de animales que recibieron lactancia deficiente presentan una tendencia a tener mayor expresión de Ki67.....	110
La lactancia óptima activa la vía apoptótica extrínseca.....	111
CAPÍTULO X.....	115
RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°5.....	115
La lactancia materna óptima disminuye el número y tamaño de TEBs.....	115
Desarrollo de la glándula mamaria en el día 20 de vida (etapa prepuberal).....	115
Desarrollo de la glándula mamaria en el día 55 de vida (etapa pospuberal).....	118
Una lactancia óptima modifica la expresión mamaria de genes implicados en el proceso de diferenciación.....	121
La expresión relativa del ARNm de <i>STAT6</i> se ve modificada por el peso corporal.....	124

CAPÍTULO XI.....	126
RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N° 6.....	126
Cuantificación del ADN genómico.....	126
PCR específica de metilación.....	127
CAPÍTULO XII.....	130
DISCUSIÓN.....	130
CONCLUSIONES GENERALES.....	138
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	139
REFERENCIAS.....	140

## ABREVIATURAS

ABs	brotos alveolares
AGPI	ácidos grasos poliinsaturados
AGPICL	ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
Apaf1	proteína factor 1 activador de la proteasa apoptótica
CAV1	caveolina 1
CD1	ciclina D1
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
DMBA	7,12-dimetilbenzantraceno
DNMT	ADN metiltransferasa
E2	17- $\beta$ estradiol
FABP4	proteína de unión a ácidos grasos 4
FOXP3	caja P3 de dominio cabeza de horquilla
FTO	proteína asociada a obesidad
GH	hormona del crecimiento
HAP	hidrocarburo aromático policíclico
HT	hormonas tiroideas
IGF1	factor de crecimiento insulínico tipo 1
INS	Insulina
LPL	lipoproteína lipasa
miRNA	microRNA
MSP	PCR específica de metilación
NR4A3	subfamilia del receptor nuclear 4 grupo A miembro 3
NRA4	subfamilia de receptores nucleares 4
NRF2	factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor2

OMS	Organización Mundial de la Salud
OXT	oxitocina
P4	progesterona
PINC	ARN no codificante inducido por la preñez
PPARG2	receptor gamma activado por el proliferador del peroxisoma
PRL	prolactina
PTHrP	proteína relacionada con la hormona paratiroidea
ROS	especies reactivas de oxígeno
SREBP1	proteína de unión al elemento regulador del esterol 1
TDLU	unidad ducto lobulillar terminal
TEBs	brotos extremos terminales
UNICEF	Fondo Internacional de Emergencia de las Naciones Unidas para la Infancia

## RESUMEN

Los factores ambientales durante la vida temprana (prenatal y neonatal) pueden generar modificaciones epigenéticas relacionadas con la diferenciación celular. La lactancia provocaría en la cría cambios epigenéticos que podrían promover la diferenciación mamaria y disminuir el riesgo a desarrollar cáncer de mama en la adultez. Nuestro objetivo fue analizar si una lactancia apropiada protege a las crías frente a la carcinogénesis mamaria en la vida adulta. Para ello utilizamos crías hembras Sprague Dawley agrupadas en camadas de 3 (C3), 8 (C8) y 12 (C12) crías por madre. A los 55 días, la mitad de los animales de cada grupo fueron sacrificados para estudiar la diferenciación mamaria mediante morfología de la glándula mamaria y expresión génica. Por otro lado, el resto de los animales fue tratado con una única dosis de dimetilbenzantraceno (15 mg/rata) para estudiar la latencia, incidencia y progresión tumoral. El número y tamaño de los brotes extremos terminales fueron significativamente menores en C3 *versus* C8 y C12 demostrando su menor potencial para la transformación maligna. Mediante PCR en tiempo real, analizamos la expresión mamaria de los genes *PINC*, *TBX3*, *STAT6*, *GATA3* y *PTEN* que son considerados indicadores de diferenciación. El ARNm de *PINC*, asociado a la inhibición de la diferenciación terminal de células alveolares mamarias, estuvo aumentado C12 con respecto a C3 y C8. La expresión de *TBX3*, una proteína necesaria para el desarrollo normal del epitelio mamario murino, y de *GATA3* y *STAT6*, factores que mantienen la diferenciación mamaria, estuvieron disminuidos en C12 comparado a C3. Observamos una menor incidencia tumoral y una mayor latencia en C3 con respecto a los otros grupos. Estos resultados demuestran una relación directa entre el consumo de leche materna y la capacidad de la glándula mamaria de activar programas génicos asociados a la diferenciación celular, que podrían disminuir la carcinogénesis mamaria.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

La secreción de leche es un rasgo característico de todas las especies de mamíferos, grandes o pequeños, sociales o solitarios, árticos o tropicales (Ofstedal, 2012). El nombre Mammalia (mamífero) fue introducido en 1758 por el taxónomo Carolus Linnaeus para ilustrar la relación de los cuadrúpedos terrestres con delfines y ballenas, reflejando así el hecho de que las hembras de ambos grupos tienen glándulas mamarias (King Wiliam, 1910). La lactancia es exclusiva de los mamíferos ya que ningún otro organismo existente produce secreciones copiosas de las glándulas de la piel para alimentar a sus crías. Estas glándulas forman parte de un sistema de alimentación y crianza que asegura la protección y la formación de vínculos entre los individuos de la especie.

En el caso del ser humano, su formación comienza durante la gestación intrauterina, pero al momento del nacimiento el nivel de madurez físico, cognitivo y social es bajo y se necesita que ese proceso madurativo se complete a lo largo del tiempo, durante la lactancia y la crianza social. Por lo tanto la lactancia es fundamental para la supervivencia de nuestra especie ([http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/manual\\_lactancia\\_materna.pdf](http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/manual_lactancia_materna.pdf)).

### **Bases para una lactancia materna óptima**

El éxito de la lactancia depende del establecimiento y desarrollo de eventos que apoyan y fortalecen la conducta materna. Entre estos eventos se incluyen el estímulo de succión y el reflejo de búsqueda u hociqueo, el reflejo de succión, la respuesta digestiva de las crías a la leche materna (Plessis, 2009; Volpe, 1981) y el acunamiento materno de las crías (posición de amamantamiento) entre otras. Todos estos procesos generan una respuesta materna que es controlada por hormonas que al mismo tiempo regulan la funcionalidad de las células mamarias y en consecuencia la función mamaria. Dichas hormonas se pueden dividir en tres grandes categorías:

**Hormonas reproductivas** que incluyen los estrógenos como el estradiol (E2), la progesterona (P4), la prolactina (PRL), la hormona de crecimiento (GH) y oxitocina (OXT) cuyos

niveles cambian durante el desarrollo o la función reproductiva y actúan directamente sobre la glándula mamaria permitiendo cambios en su desarrollo (mamogénesis) o coordinando la secreción de leche para las crías (lactogénesis) (S. M. Anderson, Rudolph, McManaman, & Neville, 2007; Neville, McFadden, & Forsyth, 2002)

**Hormonas metabólicas** que son responsables de coordinar la respuesta del organismo a cambios metabólicos y al estrés. Dentro de este grupo encontramos las hormonas tiroideas (HT), necesarias para la secreción de leche, y la insulina que es requerida para el desarrollo mamario. Estas hormonas pueden alterar la respuesta mamaria a las hormonas reproductivas, e indirectamente, regular la síntesis y secreción de leche alterando la llegada de nutrientes hacia la glándula mamaria (S. M. Anderson et al., 2007; Neville et al., 2002).

**Hormonas de origen mamario** con posible función autócrina durante la lactancia, ya que la misma glándula mamaria es capaz de sintetizar y secretar GH, péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP), leptina y PRL (Neville et al., 2002).

Además, en el caso de la mujer, para poder lograr una adecuada lactancia materna es necesario el trabajo sostenido de los equipos de salud fomentando y acompañando el inicio temprano de la lactancia como también su continuidad durante la infancia. Es importante que el recién nacido comience a tomar el pecho precozmente, idealmente durante la primera media hora de nacido. El principal estímulo que induce la producción de leche es la succión del niño, por lo tanto, cuantas más veces toma el pecho de la madre, más leche se produce. Por este motivo se recomienda que la lactancia materna sea a libre demanda (Black et al., 2013).

Para que la lactancia materna sea exitosa se requiere de políticas sistemáticas que la favorezcan y de personal de salud capacitado para el apoyo y asesoramiento materno. Además se deben establecer grupos de apoyo a la lactancia materna que puedan guiar a la madre una vez que se retira del hospital o clínica. Por último, resulta de gran importancia la difusión en la comunidad de los beneficios de amantar y los riesgos de su abandono temprano (Black et al., 2013).

## **Lactancia óptima**

Los primeros dos años de vida brindan una ventana de oportunidad crítica para asegurar el apropiado crecimiento y desarrollo de los niños, mediante una alimentación óptima (The World

Bank, 2006). Las recomendaciones de la OMS y el UNICEF (WHO, 2003) para una alimentación infantil óptima son:

### **Lactancia materna exclusiva durante los primeros seis meses de vida**

Significa que el lactante recibe solamente leche del pecho de su madre o de una nodriza, o recibe leche materna extraída del pecho y no recibe ningún tipo de líquidos o sólidos, ni siquiera agua, con la excepción de solución de rehidratación oral, gotas o jarabes de suplementos de vitaminas o minerales o medicamentos (OMS, UNICEF, AED, 2008).

Durante los primeros 6 meses de vida, la leche materna cubre las necesidades de energía y de nutrientes para la gran mayoría de niños (Butte, Lopez-Alaracon, & Garza, 2002). Además, es suficiente para satisfacer la sed del lactante ya que está compuesta por un 88% de agua. Por lo tanto, durante los primeros seis meses de vida no es necesario incorporar otros alimentos ni líquidos, incluso en climas cálidos. Los líquidos adicionales desplazan la leche materna y no incrementan la ingesta total (Sachdev, Krishna, Puri, Satyanarayana, & Kumar, 1991). Sin embargo, el agua y los tés son administrados frecuentemente a los lactantes, muchas veces desde la primera semana de vida. Esta práctica se ha asociado con una duplicación del riesgo de diarrea (Brown, Black, Lopez de Romaña, & Creed de Kanashiro, 1989).

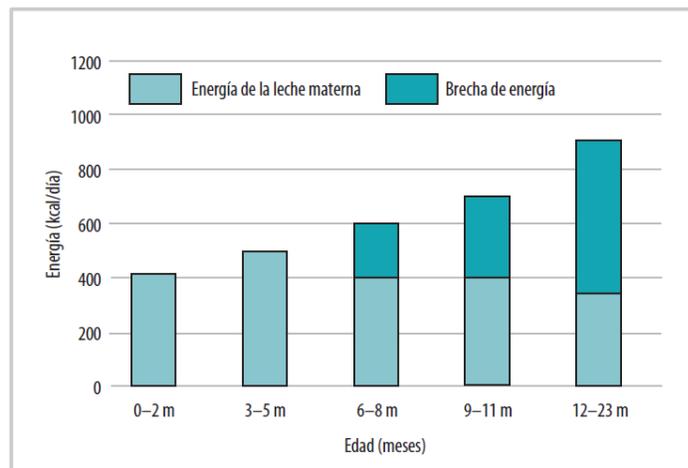
### **Alimentación complementaria**

Alimentación complementaria, adecuada y segura, a partir de los seis meses de edad, manteniendo la lactancia materna hasta los dos años de vida o más. Se inicia cuando la leche materna no es suficiente para cubrir los requerimientos nutricionales del lactante, por lo tanto son necesarios otros alimentos y líquidos, además de la leche materna. Por lo general, la alimentación complementaria es llevada a cabo desde los seis a los veintitrés meses de edad, aunque la lactancia materna debería continuar más allá de los dos años ([http://www.aeped.es/sites/default/files/1-orientacion\\_para\\_la\\_ac.pdf](http://www.aeped.es/sites/default/files/1-orientacion_para_la_ac.pdf)).

A la edad de 6 meses el lactante, generalmente, duplica su peso de nacimiento y se torna más activo. Por sí sola, la lactancia materna ya no es suficiente para cubrir sus requerimientos de energía

y de nutrientes, por lo tanto se deben introducir los alimentos complementarios para completar la diferencia (Fig I.1). Además, en esta edad el sistema digestivo es lo suficientemente maduro para digerir el almidón, proteínas y grasas de una dieta no láctea.

A nivel mundial, se estima que solamente el 34,8% de los lactantes reciben lactancia materna exclusiva durante los primeros seis meses de vida; la mayoría recibe algún otro tipo de alimento o líquido en los primeros meses (<http://www.who.int/nutrition/databases/infantfeeding/en/>). Con respecto a los alimentos complementarios, muchas veces son de baja densidad calórica, no se ofrecen con la frecuencia necesaria o las raciones son muy pequeñas, volviendo vulnerable el estado nutricional del niño (Salud, 2010).



**Figura I.1 Energía que requiere el lactante y el niño pequeño y que proporción cubre la leche materna.** La energía que se requiere, adicionalmente a la leche materna, es de aproximadamente 200 kcal por día, para niños de 6-8 meses; 300 kcal por día para niños de 9-11 meses y 550 kcal por día para niños de 12-23 meses de edad. La cantidad de alimentos que se requiere para cubrir estas brechas se incrementa a medida que el niño tiene mayor edad y que la ingesta de leche materna se reduce. Elaborado por La alimentación del lactante y del niño pequeño. OMS, 2010

## Beneficios de la lactancia materna

La lactancia materna brinda beneficios a corto y a largo plazo, tanto para el niño como para la madre (León-Cava, Lutter, Ross, & Martin, 2002), incluyendo la protección del niño frente a una variedad de patologías agudas y crónicas. Estos beneficios están asociados tanto a la cantidad de

leche materna consumida en forma exclusiva, como a la duración de la lactancia.

### **Beneficios de la lactancia materna a corto plazo**

Los beneficios de la lactancia materna a corto plazo incluyen una menor incidencia de afecciones tales como diarrea (De, Rea, & Martines, 1991), neumonía (Bachrach, Schwarz, & Bachrach, 2003), otitis media (Mårild, Hansson, Jodal, Odén, & Svedberg, 2004), meningitis por *Haemophilus influenzae* (Silfverdal, Bodin, & Olcén, 1999) e infecciones del tracto urinario (Mårild et al., 2004). El menor número de enfermedades que padece el bebé amamantado y la menor gravedad de las mismas disminuyen la probabilidad de morir. En países en desarrollo, los niños que no reciben lactancia materna tienen una probabilidad de seis (Collaborative Study Team, 2000) a diez veces (Bahl et al., 2005) más de morir durante los primeros meses de vida, en comparación con los niños que son alimentados con leche materna. Muchas de estas muertes son causadas por la diarrea y la neumonía. Especial interés recibe la enfermedad diarreica, ya que se presenta con mayor frecuencia entre los niños que reciben alimentación artificial, incluso en situaciones donde existe una higiene adecuada (Howie, Forsyth, Ogston, Clark, & Florey, 1990; M. S. Kramer, 2001)

### **Beneficios de la lactancia materna a largo plazo**

Los niños alimentados de manera artificial tienen un mayor riesgo de padecer enfermedades que tienen una base inmunológica, como el asma y otras condiciones atópicas (Gdalevich, Mimouni, & Mimouni, 2001; Oddy et al., 2004), diabetes tipo 1 (Sadauskaite-Kuehne, Ludvigsson, Padaiga, Jasinskiene, & Samuelsson, 2004), enfermedad celíaca (Akobeng, Ramanan, Buchan, & Heller, 2006), colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn (Klement, Cohen, Boxman, Joseph, & Reif, 2004). La alimentación artificial también ha sido asociada con un mayor riesgo para desarrollar leucemia durante la niñez (Kwan, Buffler, Abrams, & Kiley, 2004). Con respecto a la obesidad desarrollada durante la niñez tardía y la adolescencia, es menos frecuente entre los niños amamantados, existiendo además un efecto dosis-respuesta: a mayor duración de la lactancia materna menor riesgo de obesidad (Burke et al., 2005; Harder, Bergmann, Kallischnigg, & Plagemann, 2005). En relación

a las enfermedades cardiovasculares, se vincula a la alimentación artificial con incremento de la presión sanguínea (Martin, Gunnell, & Smith, 2005); niveles anormales de colesterol en sangre (Owen, Whincup, Odoki, Gilg, & Cook, 2002) y aterosclerosis durante la edad adulta (Martin, Ebrahim, et al., 2005). Un metaanálisis de veinte estudios (J. W. Anderson, Johnstone, & Remley, 1999) sobre la función cognitiva, muestra que los niños que fueron alimentados con lactancia materna tienen en promedio 3,2 puntos más en las pruebas de función cognitiva, en comparación con niños que fueron alimentados con leche artificial comercial. Esta diferencia fue mayor (alrededor de 5,2 puntos) en los niños que tuvieron bajo peso al nacer, ya que tuvieron mayor consumo de leche materna comparado con los niños nacidos a término. El incremento de la duración de la lactancia materna ha sido asociado con mayor inteligencia en la niñez tardía (Daniels & Adair, 2005) y la edad adulta (Mortensen, 2002).

Con respecto al cáncer de mama, sólo unos pocos estudios epidemiológicos (Freudenheim et al., 1994; Martin, Middleton, Gunnell, Owen, & Smith, 2005; Titus-Ernstoff et al., 1998; Weiss et al., 1997b) muestran que la lactancia materna puede reducir el riesgo en el lactante de desarrollar cáncer de mama premenopáusico, mientras que los resultados en mujeres posmenopáusicas son inconsistentes (Freudenheim et al., 1994; N Potischman & Troisi, 1999; Titus-Ernstoff et al., 1998).

Weiss et al. observaron una tendencia de un menor riesgo de cáncer de mama en mujeres amantadas (Weiss et al., 1997a). En coherencia, un estudio de casos y controles mostró una asociación significativa entre haber sido amamantado y un menor riesgo de desarrollar cáncer de mama en la vida adulta (Freudenheim et al., 1994). Además, Titus-Ernstoff et al. informaron que la incidencia de cáncer de mama no fue mayor en mujeres amamantadas aun cuando sus madres desarrollaron carcinoma de mama (Titus-Ernstoff et al., 1998). Middleton et al. realizaron un metaanálisis que revela un menor riesgo de cáncer de mama en mujeres premenopáusicas que habían sido amamantadas (Martin, Middleton, et al., 2005). Los posibles mecanismos por los cuales la lactancia materna podría prevenir la carcinogénesis de la mama en la vida adulta no han sido investigados.

La lactancia materna también tiene beneficios para la madre, tanto a corto como a largo plazo. Se puede reducir el riesgo de hemorragia postparto mediante la lactancia inmediata después del parto (Chua, Arulkumaran, Lim, Selamat, & Ratnam, 1994). También existen pruebas crecientes acerca del menor riesgo de cáncer de mama (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer et al., 2002) y de ovario (Rosenblatt & Thomas, 1993) entre las madres que dan de mamar.

## **Beneficios de la lactancia materna exclusiva durante los primeros seis meses de vida**

La lactancia materna exclusiva presenta beneficios con respecto a la lactancia materna parcial que se reconocen desde el año 1984. Los lactantes que reciben solamente leche del pecho tienen menos riesgo de muerte por diarrea y neumonía (Feachem, 1984; Victora et al., 1987). Un estudio realizado en Dhaka, Bangladesh encontró que se podrían reducir un tercio las muertes por diarrea y neumonía si los lactantes recibiesen lactancia materna exclusiva, en vez de lactancia materna parcial, durante los primeros 4 meses de vida (Arifeen et al., 2001). La lactancia materna exclusiva reduce el riesgo de diarrea (Michael S. Kramer et al., 2003) y de infecciones respiratorias agudas (Chantry, Howard, & Auinger, 2006) si su duración es de 6 meses de vida, en comparación con una duración de tres o cuatro meses respectivamente.

En la madre, la lactancia materna exclusiva puede demorar el reinicio de la fertilidad (Von Hertzen, 1999) y acelerar la recuperación del peso que tenía antes del embarazo (Dewey, Cohen, Brown, & Rivera, 2001).

## **Beneficios de la lactancia durante la alimentación complementaria**

A partir de los seis meses de edad, las necesidades de energía y nutrientes del lactante comienzan a exceder lo aportado por la leche materna; entonces, la alimentación complementaria se vuelve necesaria para llegar a los requerimientos de energía y nutrientes (Dewey & Brown, 2003). Una nutrición incompleta durante este periodo puede generar retraso en el crecimiento debido a la deficiencia de micronutrientes y enfermedades infecciosas (Dewey & Adu-Afarwuah, 2008). Incluso después de la introducción de los alimentos complementarios, la lactancia materna contribuye de manera crítica al aporte de nutrientes para el niño pequeño; aportando el 50% de las necesidades de energía del lactante hasta el año de edad, y hasta un tercio durante el segundo año de vida. Además, los nutrientes aportados por la leche materna son de mayor calidad que los aportados por los alimentos complementarios (OPS/OMS, 2003).

## **Causas de abandono de la lactancia materna**

El abandono del amamantamiento como forma habitual de alimentación puede traducirse en un problema con importantes implicancias personales, sociales y sanitarias. Los principales factores que determinan el abandono de la lactancia materna son los bajos ingresos (Nishioka et al., 2011), el bajo nivel de educación (Inoue, Binns, Otsuka, Jimba, & Matsubara, 2012) y el empleo materno (Valdes, Pugin, Schooley, Catalan, & Aravena, 2000), así como los factores psicosociales, en particular la falta de asistencia de los padres en el cuidado infantil (Inoue et al., 2012) y los síntomas de la depresión posparto (Dennis & McQueen, 2009).

Las madres que presentan depresión y ansiedad dificultan el mantenimiento de la lactancia materna debido al uso de antidepresivos, la privación del sueño, la apatía y el estado de ánimo depresivo (Zauderer Cheryl, 2011). Este comportamiento materno afecta negativamente a sus hijos, generando una interacción madre-niño menos intensa que expone a los bebés a problemas en el desarrollo emocional, conductual y cognitivo, así como a desnutrición y problemas de salud física (Dennis & McQueen, 2009).

Con respecto al empleo materno, estudios recientes muestran que la lactancia materna exclusiva se ve rápidamente afectada cuando las mujeres regresan al trabajo (Do Nascimento et al., 2010; Skafida, 2012) En consecuencia, el permiso por maternidad es un factor protector importante para la lactancia materna.

Las estadísticas sobre lactancia materna en Argentina en el año 2011, según fuentes oficiales del Ministerio de Salud de la Nación y UNICEF muestran que, aun cuando el 95% de los recién nacidos reciben leche materna exclusiva, la incidencia de abandono en el segundo, cuarto y sexto mes fue del 40%, 55% y 70%, respectivamente ([https://www.unicef.org/argentina/spanish/Informe\\_Argentina.pdf](https://www.unicef.org/argentina/spanish/Informe_Argentina.pdf)). Esto demuestra la alta tasa de deserción del amamantamiento y la necesidad imperiosa de identificar los principales factores que conducen al abandono prematuro de la lactancia materna a fin de guiar intervenciones que apunten a mejorar las tasas de lactancia materna exclusiva hasta los seis meses posparto.

## **Composición de la leche materna**

Los nutrientes contenidos en la leche materna derivan de diferentes fuentes. Algunos se originan por síntesis en el lactocito, que es la célula de estirpe epitelial especializada en la lactogénesis. Otros nutrientes tiene origen alimentario y algunos son originados a partir de las reservas maternas. En general, la calidad nutricional de la leche humana es altamente conservada, pero la dieta materna es importante para el aporte de algunas vitaminas (C y E) y ácidos grasos (láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oleico, palmitoleico, AGPI  $\omega$ 3 y AGPI  $\omega$ 6)(Bravi et al., 2016; PRENTICE, 1995).

La composición de la leche humana es dinámica y varía en el transcurso de una alimentación, diurnamente, durante la lactancia y entre madres y poblaciones. Las influencias sobre las diferencias en la composición de la leche humana incluyen factores maternos y ambientales.

### **Macronutrientes**

La composición de macronutrientes de la leche humana varía entre las madres y durante la lactancia, pero se conserva notablemente a través de poblaciones a pesar de las variaciones en el estado nutricional materno (Ballard & Morrow, 2013). La composición promedio de macronutrientes en la leche madura contiene: 0,9 a 1,2 g/dl de proteína, 3,2 a 3,6 g/dl de grasa, 6.7 a 7.8 g/dl de lactosa. La energía aportada oscila entre 65 y 70 kcal/dl, y está estrechamente vinculada al contenido de grasa de la leche humana (Ballard & Morrow, 2013, [http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/manual\\_lactancia\\_materna.pdf](http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/manual_lactancia_materna.pdf)).

Las concentraciones de macronutrientes de la leche humana se encuentran relacionadas con el peso corporal materno referido a la altura, la ingesta de proteínas, la paridad, el retorno de la menstruación, y la frecuencia de lactancia. Además, las madres que producen mayores cantidades de leche tienden a tener menores concentraciones de grasa y proteínas en la leche, pero concentraciones más altas de lactosa (Laurie A. Nommsen, Lovelady, Heinig, Lönnerdal, & Dewey, 1991).

Las proteínas de la leche humana se dividen en las proteínas del suero y las fracciones o complejos de caseína (Gao et al., 2012; Liao, Alvarado, Phinney, & Lonnerdal, 2011). Las proteínas

presentes en cantidades significativas en la fracción de suero de la leche son  $\alpha$ -lactalbúmina, lactoferrina, inmunoglobulina secretora IgA, albúmina de suero y lisozima (Jensen, 1996; Lönnerdal, 2004). Los compuestos no proteicos que contienen nitrógeno, incluyen urea, ácido úrico, creatina, creatinina, aminoácidos y nucleótidos, y representan el 25% de nitrógeno de la leche humana. Esta fracción de la leche materna contiene muchas moléculas bioactivas, como por ejemplo los nucleótidos, nutrientes esenciales durante la vida temprana que realizan funciones clave en diversos procesos celulares, tales como la alteración de las actividades enzimáticas, actuando como mediadores metabólicos (Uauy, Quan, & Gil, 1994). Además, los nucleótidos son conocidos por ser beneficiosos para el desarrollo, la maduración y reparación del tracto gastrointestinal (Uauy et al., 1994), así como el desarrollo de la microbiota (Singhal et al., 2008), y la función inmune (Gutierrez-Castrellon et al., 2007).

La concentración de proteína de la leche humana no se ve afectada por la dieta materna, pero aumenta con el peso corporal materno referido a la altura, y disminuye en las madres que producen mayores cantidades de leche (PRENTICE, 1995).

Los lípidos aportan el 40-55% de la energía total de la leche materna (Koletzko et al., 2001). El 98% de los lípidos secretados son triacilglicéridos. El resto consta predominantemente de diacilglicéridos, monoacilglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos y colesterol. La grasa de la leche humana se caracteriza por un alto contenido de ácidos palmítico y oleico. El perfil de ácidos grasos de la leche humana varía en relación a la dieta materna, en particular, en los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL). La ingesta de AGPICL en el mundo occidental está sesgada hacia los ácidos grasos omega-6, con la ingesta subóptima de ácidos grasos omega-3 (Valentine et al., 2010).

El azúcar principal de la leche humana es el disacárido lactosa. La concentración de lactosa en la leche humana es el menos variable de los macronutrientes, sin embargo las madres que producen mayores cantidades de leche tienen concentraciones más altas de lactosa (Laurie A. Nommsen et al., 1991). La leche materna también está formada por una fracción significativa de oligosacáridos, los cuales no son digeribles por el bebé, su función es nutrir la microbiota gastrointestinal.

## **Micronutrientes**

Muchos micronutrientes en la leche humana varían dependiendo de la dieta y el almacenamiento corporal materno, incluyendo las vitaminas A, B1, B2, B6, B12, D y yodo. Independientemente de la dieta materna, la vitamina K y la vitamina D se producen en baja cantidad en la leche humana. Las recomendaciones pediátricas actuales apuntan a la suplementación de dichas vitaminas en los bebés alimentados con leche materna (Dawodu et al., 2014; Greer, 2001).

## **Componentes Bioactivos**

Los beneficios de la lactancia materna no se limitan a su contenido en nutrientes, ya que además posee una variedad de factores con propiedades medicinales que cumplen un papel preponderante en la supervivencia y salud infantil.

Los componentes bioactivos de los alimentos se definen como elementos que afectan los procesos biológicos y, por lo tanto tienen un impacto en la función corporal y en última instancia en la salud (Siddarth, 2013). El conocimiento de los mecanismos por los cuales la lactancia materna protege y mejora el desarrollo, nos aporta nuevas herramientas para optimizar la prevención y el tratamiento de determinadas patologías.

Algunos de los componentes de la leche materna son capaces de generar cambios en el epigenoma desde edades tempranas, y de esta manera modifican la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades en la vida adulta. La Tabla 1 muestra los principales factores bioactivos presentes en la leche humana y sus respectivas funciones.

**Tabla I. Principales factores bioactivos presentes en la leche humana y sus respectivas funciones.** Adaptado de Clínicas Pediátricas de América del Norte, 2014.

Componente	Función
<b>Células</b>	
Macrófagos	Protegen contra la infección, activan células T
Células madre	Regeneración y reparación
<b>Inmunoglobulinas</b>	
IgA / sIgA	Inhibe la unión de patógenos
IgG	Anti-microbiana, Activa la fagocitosis (IgG1, IgG2, IgG3); anti-inflamatoria, respuesta a los alérgenos (IgG4)
IgM	Aglutinación, activación del complemento
<b>Citoquinas</b>	
IL-6	Estimulación de la respuesta de fase aguda, activación de células B, pro-inflamatoria
IL-7	Aumento del tamaño y la producción del timo
IL-8	Reclutamiento de neutrófilos, pro-inflamatoria
IL-10	Reprime la inflamación tipo Th1, induce la producción de anticuerpos, facilita la tolerancia
Interferón gamma (IFN $\gamma$ )	Pro-inflamatorio, estimula la respuesta inflamatoria Th1 y suprime la respuesta alérgica Th2
Factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ )	Anti-inflamatorio, estimula las células T, regula la reparación de heridas, y previene enfermedades alérgicas
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ )	Estimula la activación inflamatoria inmune
<b>Quimiocinas</b>	
Granulositos y factor estimulante de colonias (G-CSF)	Favorece el desarrollo intestinal y el tratamiento de la sepsis
Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)	Impide el movimiento de macrófagos, aumenta la actividad anti-patógeno de los macrófagos
<b>Inhibidores de citoquinas</b>	
Receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR1 y II)	Inhibe a TNF $\alpha$ , anti-inflamatorio
<b>Factores de Crecimiento</b>	
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	Estimula la proliferación y la maduración celular
Factor de crecimiento similar al EGF uniso a heparina (HB-EGF)	Protege contra el daño de la hipoxia e isquemia
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Promueve la angiogénesis y la reparación de tejido
Factor de crecimiento neuronal (NGF)	Promueve el crecimiento y la maduración de las neuronas
Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)	Estimula el crecimiento y desarrollo, aumenta la eritropoyesis y la hemoglobina
Eritropoyetina	Eritropoyesis, desarrollo intestinal, puede ayudar a proteger contra la transmisión de HIV de madre a hijo, reducir el riesgo de enterocolitis necrotizante y la anemia del prematuro
<b>Hormonas</b>	
Calcitonina	Favorece el desarrollo de las neuronas entéricas
Somatostatina	Regula del crecimiento epitelial gástrico
<b>Anti-microbial</b>	
Lactoferrina	Proteína de fase aguda, forma quelatos de hierro, anti-bacteriana, anti-oxidante
Lactadherina / MFG E8	Anti-viral, previene la inflamación favoreciendo la fagocitosis de células apoptóticas
<b>Hormonas Metabólicas</b>	
Adiponectina	Reducción del índice de masa corporal (IMC) y el peso, pudiendo reducir la incidencia de sobrepeso y obesidad en la edad adulta, anti-Inflamatoria.
Leptina	Regula la conversión energética, el apetito y el IMC infantil
Grelina	Regula la conversión energética y el IMC infantil
<b>Oligosacáridos y Glicanos</b>	
HMOS	Prebiótico, estimula la colonización beneficiosa y la reducción de la colonización por patógenos; reduce la inflamación
Gangliósidos	Desarrollo cerebral; anti-infecciosos
Glicosaminoglicanos	Anti-infecciosos
<b>Mucinas</b>	
MUC1	Bloquea la infección por virus y bacterias
MUC4	Bloquea la infección por virus y bacterias

## **Programación del desarrollo**

El origen del desarrollo de la salud y la enfermedad es un paradigma fundamental para investigar y comprender la etiología de muchas de las patologías metabólicas de los humanos (BARKER, 1998; Gluckman & Hanson, 2004). Los factores ambientales tienen el potencial de alterar las vías de desarrollo de un organismo joven, dando lugar a la fisiología y el metabolismo del adulto que queda de esta manera fuertemente afectado por las señales de la vida temprana. Por lo tanto, la salud de un adulto se configura en gran medida por las circunstancias de la vida temprana, desde el útero hasta la primera infancia. La obesidad, la diabetes, la hipertensión, las enfermedades cardiovasculares, el asma, las alergias y otras afecciones como el cáncer tienen orígenes en la vida pre y posnatal.

Dentro de los factores ambientales a los que está expuesto el ser humano durante la vida temprana, la nutrición resulta de gran interés; tanto sea la alimentación materna durante la gestación como así también el consumo de leche materna durante los primeros meses de vida. La programación del desarrollo a partir de la nutrición pre- y posnatal se centra en la base epigenética (M. H. Vickers, 2014). La leche es el primer estímulo nutricional posnatal de todos los mamíferos desde el inicio de la vida extrauterina hasta el final del período de lactancia. La leche es un producto secretor complejo que representa un regulador materno crítico del desarrollo de la cría (Power & Schulkin, 2013). Los humanos neolíticos difieren en este aspecto, ya que están constantemente expuestos a la leche de otra especie, predominantemente a la leche de vaca. Existe evidencia de que la leche funciona como un transmisor entre el genoma materno de la lactancia y la regulación epigenética de los genes del receptor de la leche, el recién nacido (B. C. Melnik, John, & Schmitz, 2013).

### **Efectos epigenéticos de la lactancia materna**

El principal objetivo de la lactancia materna se centra en el correcto crecimiento y desarrollo del bebé. Sus funciones incluyen una programación de efectos a largo plazo que modifican el riesgo a desarrollar enfermedades no transmisibles en la vida adulta. Las modificaciones epigenéticas podrían asociar el entorno metabólico con las alteraciones en la expresión génica induciendo efectos

persistentes posteriores.

Los procesos epigenéticos son esenciales para determinar cuándo y dónde se expresan genes específicos. Alteraciones en la regulación genética pueden conducir a profundos cambios en el fenotipo. Los principales procesos epigenéticos son la metilación del ADN, la modificación de las histonas, la remodelación de la cromatina y la acción de los microRNAs (miRNAs), (Cutfield, Hofman, Mitchell, & Morison, 2007; Liotto et al., 2009; Tammen, Friso, & Choi, 2013; Waterland & Michels, 2007).

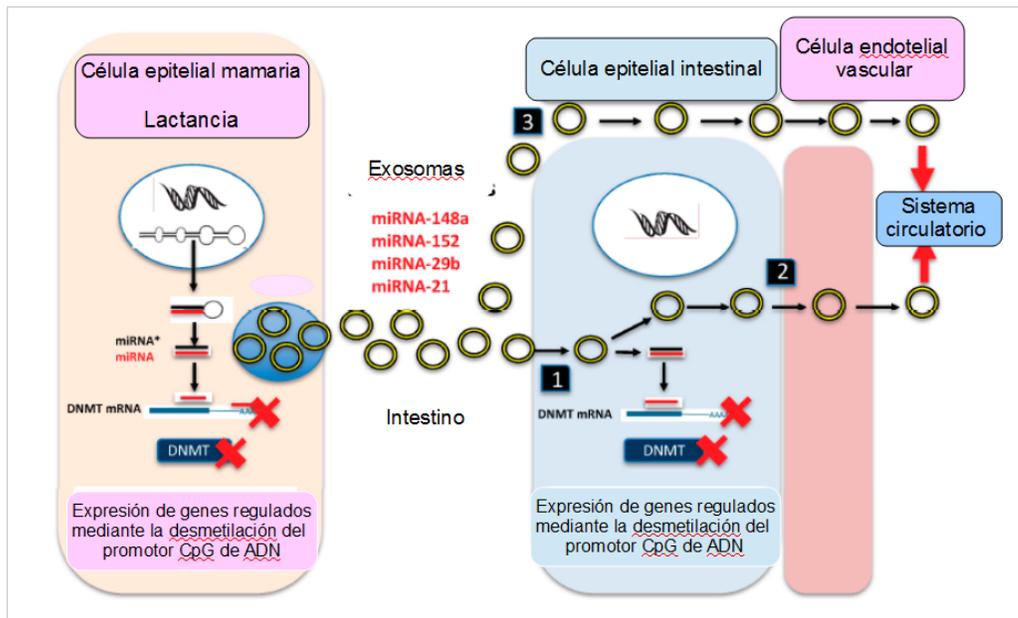
La metilación de la posición 5' de una citosina dentro del genoma se produce por la familia enzimática del ADN metiltransferasas que forman 5-metilcitosina (5-mC), que está presente en aproximadamente un 4% a 6% de las bases de citosina dentro del genoma humano. La mayoría de las metilaciones del ADN se producen dentro de dinucleótidos CpG, aunque también las metilaciones fuera del contexto CpG han sido informadas en los últimos años (Tammen et al., 2013). El genoma humano contiene cerca de 30 millones de dinucleótidos CpG que existen en estado metilado o no metilado. Las islas CpG son densas repeticiones de nucleótidos CpG que se producen a lo largo del genoma. La metilación de las islas CpG localizadas en la región promotora de un gen suele estar inversamente asociada con la transcripción de ese gen debido a la unión de proteínas de unión a metil-CpG, que reclutan las proteínas al promotor del gen, bloqueando de este modo la transcripción. Por lo tanto, la epigenética, es decir, la variación interindividual en los patrones de metilación del ADN y la remodelación de la cromatina, proporcionan una explicación potencial de cómo los factores ambientales (como la nutrición en edades tempranas) pueden modificar el riesgo de desarrollar enfermedades (Cutfield et al., 2007; Liotto et al., 2009). La edad, la genética y el medio ambiente pueden interactuar en conjunto para afectar la regulación epigenética. Varios estudios han demostrado que el medio ambiente y la nutrición, en una etapa temprana o en períodos críticos de desarrollo, puede influir en la expresión de genes con efectos a corto y largo plazo sobre el organismo (Cutfield et al., 2007; Liotto et al., 2009; Waterland & Michels, 2007).

Para cumplir su función como un regulador epigenético, la leche materna transfiere miRNA, que son secretados principalmente por la célula epitelial de la glándula mamaria y se secretan como vesículas extracelulares (Landecker, 2011). Los miRNAs son parte de la maquinaria epigenética y se prevé que regulan casi el 60% de todos los genes humanos (Ambros, 2004; He & Hannon, 2004). La mayoría de los miRNAs derivados de la leche se transportan en exosomas, nanopartículas (30-100 nm) rodeadas por una membrana de bicapa lipídica estable que protege y garantiza la transferencia

de miRNAs a larga distancia (Bakhshandeh, Kamaledin, & Aalishah, 2017). Se han detectado exosomas derivados de la leche en el calostro y en la leche madura de los seres humanos, vacas, búfalos, cabras, cerdos, animales marsupiales y roedores (Admyre et al., 2007; Baddela, Nayan, Rani, Onteru, & Singh, 2016; T. Chen et al., 2014; X. Chen et al., 2010; Gu et al., 2012; Hata et al., 2010; Izumi et al., 2012; Kosaka, Izumi, Sekine, & Ochiya, 2010; Modepalli et al., 2014; Na et al., 2015; Reinhardt, Lippolis, Nonnecke, & Sacco, 2012; Sun et al., 2013; Zhou et al., 2012).

Los miRNA son muy estables, y además, la doble capa lipídica del exosoma les otorga una gran resistencia ante las adversidades, pudiendo así resistir el pH ácido del tracto gastrointestinal, diferentes condiciones de almacenamiento en el hogar, el congelamiento y la ebullición (Baddela et al., 2016; Hata et al., 2010; Pieters et al., 2015). Sin embargo, la pasteurización, la homogeneización y el calentamiento por microondas causan una pérdida de miRNAs de entre el 40-60% (K. M. Howard et al., 2015). La estabilidad de los miRNA exosomales garantiza el traspaso de los mismos a la circulación sistémica del bebé (B. C. Melnik et al., 2016).

Los exosomas pueden ser absorbidos a nivel celular por una variedad de vías endocíticas, incluyendo la endocitosis dependiente de clatrina y las vías independientes de la clatrina, como la captación mediada por caveolina, la macropinocitosis, la fagocitosis y la internalización mediada por balsas lipídicas (Boon & Vickers, 2013; Tian et al., 2013, 2014; Tian, Wang, Wang, Zhu, & Xiao, 2010; K. C. Vickers & Remaley, 2012). Además durante el periodo posnatal existe una alta permeabilidad intestinal, haciendo posible el paso de exosomas provenientes de la leche a través de los espacios intercelulares de la célula epitelial intestinal. Estos mecanismos permiten a los exosomas atravesar fácilmente las barreras del endotelio intestinal y vascular (Ha, Yang, & Nadithe, 2016) y alcanzar la circulación sistémica, donde pueden ejercer funciones reguladoras de genes en el recién nacido (Fig I.2).



**Fig 1.2 Esquema representativo de la transferencia de miRNA exosomal desde la leche materna dirigidos a ADN metiltransferasas (DNMT) del receptor de la leche.** Las células epiteliales de las glándulas mamarias segregan los miRNAs a través de exosomas, que están presentes en (1) células epiteliales intestinales y (2) células endoteliales vasculares (VEC) mediante endocitosis; (3) Los exosomas pueden atravesar fácilmente los espacios intercelulares de la célula intestinal debido a la alta permeabilidad intestinal durante el período postnatal. Una vez que se encuentran en la circulación sistémica, los exosomas de la leche pueden reducir la metilación del ADN de las células diana periféricas. Adaptado de Bodo C. Melnik y Gerd Schmitz. *Diseases*, 5 (1), 12. 2017.

Después de la entrada en la circulación sistémica, los miRNA exosomal provenientes de la leche pueden reducir la metilación del ADN de las células diana periféricas. La leche materna modifica los puntos de control críticos de la regulación epigenética del recién nacido. La supresión de ADN metiltransferasas (DNMT) mediada por miRNA resulta en hipometilación y, por lo tanto, activación de los principales genes del desarrollo importantes para el metabolismo (INS, IGF1, CAV1) y la programación inmunológica (FOXP3, NRA4), adipogénica (FTO, FABP4, CAV1, PPARG2, SREBP1, LPL) miogénica (NR4A3), osteogénica (NRF2) y epidérmica (NRF2), (B. Melnik & Schmitz, 2017).

De esta manera, los beneficios de la lactancia materna contra la colitis entérica necrotizante, las enfermedades infecciosas, las alergias alimentarias, la obesidad y los trastornos relacionados, y el cáncer, podrían explicarse en parte por el modelo epigenético.

## **Presencia de ARN en leche de rata**

El suero de leche de rata también contiene ARN funcionales que presentan cambios de expresión dependientes del tiempo durante la lactancia.

La leche es la única fuente nutricional para los mamíferos recién nacidos, y existen grandes diferencias en los componentes nutricionales de diferentes leches de mamíferos, que están adaptadas para el desarrollo de un tipo específico de descendencia. En general, si el tiempo de desarrollo es corto, la leche es rica en nutrientes (Jensen RG, 1995).

Las ratas crecen más rápido que los humanos y las vacas. Por lo tanto, la gran cantidad de ARN en el suero de leche de rata en comparación con otras especies sugiere que este ARN puede tener algunas funciones fisiológicas en los recién nacidos. Las concentraciones de ARN fueron mucho más altas en el suero de calostro que en suero de leche madura (Izumi et al., 2014). En general, el calostro contiene grandes cantidades de componentes relacionados con el sistema inmune y, por lo tanto, se considera muy importante para los recién nacidos (Goldman, 2007; Newburg & Walker, 2007). Esto sugiere que el ARN de la leche también puede tener un papel importante en el desarrollo inmune neonatal.

Los exosomas derivados de la leche de rata promueven la viabilidad de la célula epitelial intestinal, mejoran la proliferación y estimulan la actividad de las células madre intestinales. Estos hallazgos proporcionan una idea del mecanismo de acción de la leche materna en los intestinos. Esto podría prevenir el desarrollo de afecciones intestinales frecuentes en el recién nacido, como la enterocolitis necrotizante (Hock et al., 2017).

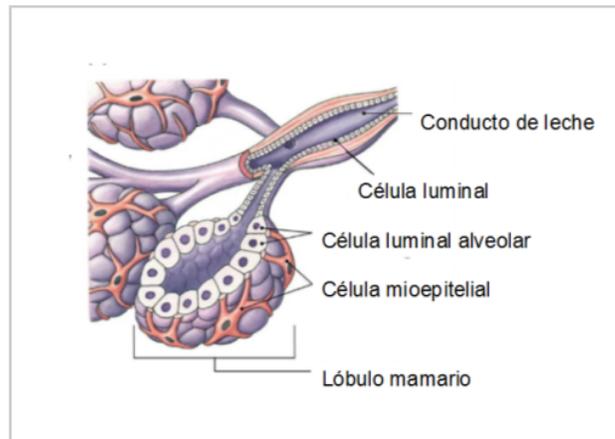
## **CAPITULO II**

### **GLÁNDULA MAMARIA**

La glándula mamaria distingue a los mamíferos de todos los demás animales por ser una estructura anatómica única, capaz de producir y segregar leche para la alimentación del recién nacido.

#### **Histología de la glándula mamaria**

La arquitectura de la glándula mamaria se adapta precisamente a su función. Está formada por parénquima y estroma. El parénquima forma un sistema de ramificación de conductos que eventualmente llevan al desarrollo de acinos secretores; y el estroma se compone principalmente de tejido adiposo, que proporciona el entorno para el desarrollo del parénquima (Forsyth, 1991; Medina, 1996). Dos tipos de células epiteliales son las que principalmente comprenden el parénquima: células basales y lumbales. El epitelio basal se compone de células mioepiteliales, que generan la capa externa de la glándula, y una pequeña población de células madre, que suministran los diferentes tipos de células. El epitelio luminal forma conductos y alvéolos secretores, y contiene poblaciones de células definidas por su estado de receptores hormonales. Junto con el mioepitelio, el epitelio luminal genera una bi-capa, estructura tubular que permite que las células mioepiteliales se contraigan para expulsar la leche del interior de las células lumbales alveolares durante la lactancia (Macias & Hinck, 2012), (Fig II.1).



**Fig II.1 Histología de la glándula mamaria.**

Adaptado de: <http://humanbiologylab.pbworks.com>

## **Desarrollo de la glándula mamaria**

A diferencia de la mayoría de los otros órganos del cuerpo, cuyo desarrollo alcanza cierto nivel de madurez durante la vida embrionaria, la glándula mamaria adquiere su estado de madurez funcional en etapas posteriores al nacimiento. Las etapas claves del desarrollo mamario incluyen el crecimiento fetal, el crecimiento infantil (pre-puberal), la expansión durante la pubertad, la remodelación durante el embarazo y la lactancia, y la involución post-lactancia y post-menopausia (Geddes, 2007; Jose Russo & Russo, 2004).

### **Etapas posnatal y puberal**

En el recién nacido, los conductos presentes en la glándula mamaria son rudimentarios, tienen pequeñas terminales que retroceden poco después del nacimiento (Jose Russo & Russo,

2004). En los seres humanos, los dos primeros años de vida constituyen un período crítico para el desarrollo morfológico y la diferenciación celular del tejido mamario (Javed & Lteif, 2013; Naccarato et al., 2000). Los lactantes presentan amplias variaciones en el grado de desarrollo glandular (ramificación del árbol ductal y formación de acinos) y en la diferenciación funcional de las células que recubren los conductos y acinos (B. A. Howard & Gusterson, 2000). Esas variaciones pueden deberse a diferencias en la nutrición durante el periodo posnatal.

Durante la pubertad, existe una expansión del tejido mamario impulsado por la ovulación y el establecimiento del ciclo menstrual. Los depósitos de tejido adiposo aumentan provocando un incremento del tamaño glandular (Jose Russo, Calaf, Roi, & Russo, 1987). También se observan cambios en el desarrollo epitelial y estromal que son estimulados por el ciclo hormonal ovárico que actúa sobre las células madre mamarias presentes en la capa luminal ductal (E. Anderson & Clarke, 2004; Visvader, 2009). Estos cambios incluyen la elongación de los ductos existentes y la ramificación en ductos secundarios, en cuyos extremos se forman los lóbulos (Jose Russo & Russo, 2004). En cada ciclo menstrual ocurre una mínima remodelación que no retrocede completamente al final del ciclo, generando un desarrollo gradual del epitelio durante la adolescencia y la edad adulta, hasta aproximadamente los treinta y cinco años (J Russo & Russo, 1992; Jose Russo & Russo, 2004).

### **Ciclo preñez y lactancia**

Durante esta etapa se produce la remodelación completa de la mama. El proceso de maduración está principalmente regulado por el aumento de los niveles de hormonas circulantes (E2, P4 y PRL) que inducen la ramificación ductal, la morfogénesis alveolar, y la diferenciación secretora (Hartmann, 2007; Hennighausen & Robinson, 2005). Sin embargo, trabajos de investigación actuales sugieren que varias citoquinas son de importancia crítica para la proliferación oportuna de las células alveolares y su posterior diferenciación (Khaled et al., 2007).

Existen otras hormonas y factores de crecimiento que son también reguladores directos de la expansión del tejido mamario durante el embarazo incluyendo el lactógeno placentario, el factor de crecimiento epidérmico, TGF $\alpha$ , y factores paracrinos del estroma, mientras que la insulina, la GH,

los glucocorticoides y los fibroblastos son factores que están implicados indirectamente en el crecimiento (Czank, Henderson, Kent, Lai, & Hartmann, 2007; Medina, 1996).

Durante el inicio del embarazo se produce la síntesis de nuevos ductos, la elongación de los ductos existentes, y la formación y expansión de los alvéolos en los brotes extremos terminales (TEBs), (Sternlicht et al., 2006).

En el segundo trimestre de embarazo, hay un aumento gradual de los niveles de prolactina circulante que estimula la diferenciación celular en los sitios alveolares, donde las células epiteliales mamarias de la capa luminal se diferencian en lactocitos (Czank et al., 2007). Durante el periodo de lactancia, la mayor concentración de prolactina en circulación provoca la regeneración y diferenciación del epitelio lactante (Hassiotou & Geddes, 2013). Tanto en el embarazo como en la lactancia, las células mamarias se exponen a vías de señalización que inhiben la apoptosis, inducen la proliferación e invocan la diferenciación terminal (Haricharan & Li, 2014).

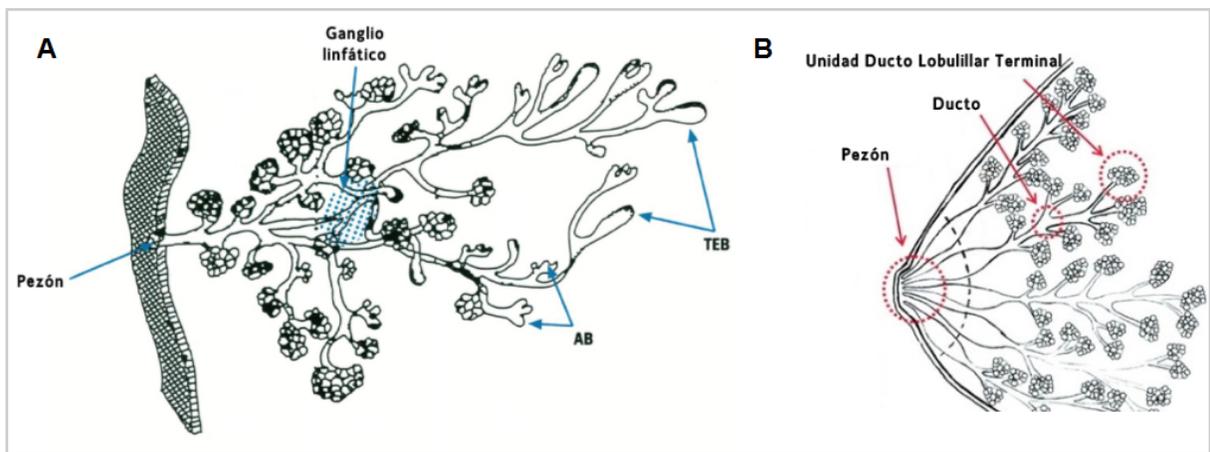
Al momento del destete se produce la involución del tejido mamario, durante el cual la glándula mamaria transita a un estado de reposo (Hurley, 1989). Esta etapa está marcada por el retorno del epitelio mamario a un estado groseramente similar, pero no idéntico, a la glándula mamaria virginal adulta (Haricharan & Li, 2014).

### **TDLU/TEBs**

Existen estructuras ubicadas en las puntas de los ductos en crecimiento denominadas unidades ducto lobulillares terminales (TDLUs). Las TDLUs presentan una alta tasa de proliferación, lo que les permite penetrar el panículo de grasa concomitante. Son las estructuras dentro del seno humano que producen leche y la fuente primaria de la mayoría de los precursores de cáncer de mama (Figueroa et al., 2014). De esta manera se identifican como los sitios de inicio de la carcinogénesis mamaria en la mayoría de las mujeres (Figueroa et al., 2014). Estructuras similares en la glándula mamaria del roedor son los TEBs, que dan lugar a tumores mamarios malignos ante la exposición a un carcinógeno químico (J Russo et al., 1990; J Russo & Russo, 1987). La razón por la que los tumores surgen de los TEBs / TDLUs se relaciona con la alta proliferación celular en estas estructuras (J. Russo & Russo, 1980) que se asocia con un aumento de los niveles de formación de

aductos de ADN y la reducción de la capacidad para reparar el daño del ADN (Fig II.2)

El número de TEBs es máximo cuando la rata tiene veintiún días de vida, después de esta edad los TEBs comienzan a dividirse en tres o cinco pequeños botones o brotes alveolares (ABs). La progresiva diferenciación de TEBs en ABs es acentuado por cada ciclo estral que comienzan cuando los animales tienen entre treinta y cuarenta y dos días (I. H. Russo & Russo, 1996). La alta tasa de proliferación celular que presentan los TEBs se asocia con la corta duración del ciclo celular. Los TEBs de ratas jóvenes vírgenes tienen una duración media de once horas, en comparación con los ABs cuyo ciclo celular dura veintiocho horas. Curiosamente, el TEB es la estructura con la mayor proporción de proliferación y el menor porcentaje de pérdida de células (Jose Russo, 2015). El 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) es metabolizado por células epiteliales mamarias a metabolitos polares, incluyendo epóxidos (J Russo, Tait, & Russo, 1983; L. K. Tay & Russo, 1981; Lee K. Tay & Russo, 1981), que pueden ser responsables de causar daño al ADN.



**Fig II.2 Representación de la glándula mamaria:** A) De rata hembra de 55 días de edad. En la zona distal al pezón contiene la mayoría de los Brotes Extremos Terminales (TEBs). B) De mujer adulta. En la zona distal al pezón se observan las Unidades Ducto Lobulillares Terminales (TDLUs). Adaptado de I H Russo y J Russo. Environ Health Perspect. V 104 (9). 1994.

## **Glándula mamaria de roedores**

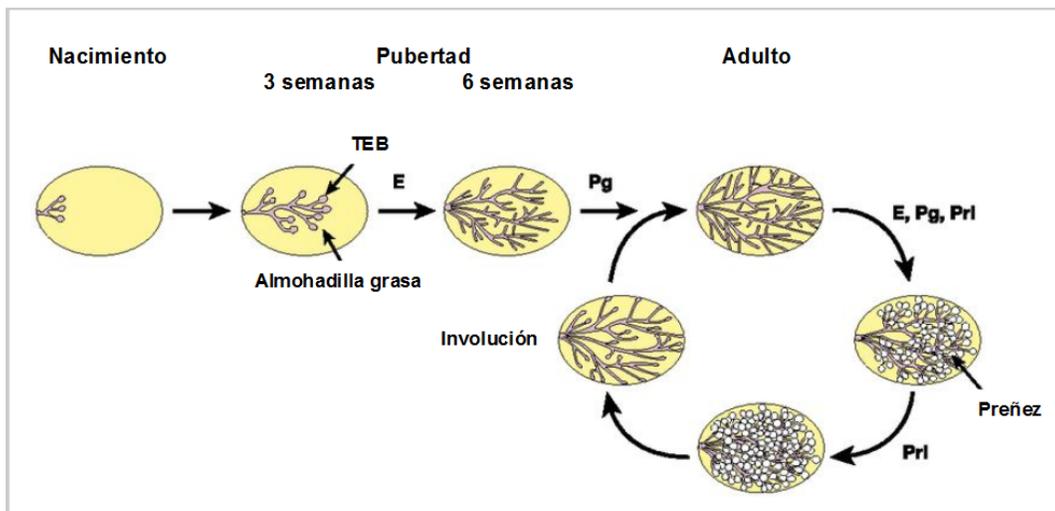
Nuestro conocimiento del desarrollo glandular deriva principalmente de los estudios realizados en roedores, proporcionando una visión de la biología de la mama humana. Aunque hay diferencias arquitectónicas y hormonales entre el ratón y las glándulas mamarias humanas, es frecuentemente utilizado como modelo animal para explorar mecanismos de desarrollo debido a que la glándula es susceptible de sofisticadas manipulaciones *in vivo* e *in vitro*.

Los cambios que experimenta la glándula mamaria en su estructura y funcionalidad, tal como la expansión epitelial durante la pubertad, la diferenciación secretora durante el embarazo y la lactancia, y la regresión durante la involución, ocurren tanto en humanos como en roedores (Rudel, Fenton, Ackerman, Euling, & Makris, 2011). Existen similitudes entre ambas especies tanto en el desarrollo de la glándula mamaria, como así también en la carcinogénesis (Líška et al., 2016). Diversos estudios señalan que el cáncer mamario de roedores imita a los tumores de mama humano, siendo ésta una de las principales razones para el uso de modelos de roedores en la investigación de la carcinogénesis mamaria (Martinez-Hernandez, Fink, & Pierce, 1976; Masso-Welch, Darcy, Stangle-Castor, & Ip, 2000; Thayer & Foster, 2007). Los roedores presentan una corta vida útil, son de fácil manipulación experimental, presentan limitada heterogeneidad genética y permiten mantener un ambiente controlado. Esto vuelve tanto al ratón como a la rata de laboratorio, en especies ampliamente aceptadas como modelo para la investigación de la enfermedad humana (Kikkawa et al., 2012).

La morfogénesis de la glándula mamaria de ratas comienza en el útero y continúa a través de varias etapas tal como sucede en el humano (Jose Russo & Russo, 1978). En el nacimiento, la glándula mamaria se compone de un ducto epitelial rudimentario incrustado en el tejido estromal. Durante la primera semana de vida se forman los TEBs que alcanzan un número máximo a los veintiún días de edad tal como se mencionó anteriormente. Con el inicio de la madurez sexual y la mayor concentración de hormonas circulantes, hay aumento de la ramificación lateral y formación de ABs hasta los sesenta y tres días de edad en la rata. Durante el embarazo, los E2, la P4 y la PRL contribuyen a la ramificación ductal y al desarrollo lobuloalveolar (Conneely & Lydon, 2000; Hovey, McFadden, & Akers, 1999). En las últimas etapas de la preñez y durante la lactancia, la hormona peptídica prolactina juega un papel clave en el establecimiento del estado secretor. Después

de la lactancia, la glándula involuciona y vuelve a un estado que se asemeja a la glándula virgen (Visvader & Stingl, 2014), (Fig II.3).

La exposición a tóxicos ambientales durante la etapa gestacional y posnatal podría actuar sobre las células no diferenciadas de la glándula mamaria, alterando así el desarrollo mamario y aumentando el riesgo de formación de tumores (Foster, Younglai, Boutross-Tadross, Hughes, & Wade, 2004).



**Fig II.3. Morfogénesis mamaria en ratas.** Adaptado de Jane E. Visvader y John Stingl. *Genes Dev.* 28 (11): 1143-58. 2014.

### Genes implicados en el proceso de diferenciación de la glándula mamaria

Durante el desarrollo posnatal de la glándula mamaria se producen cambios tanto en el epitelio como en el estroma circundante que están mediados por la acción de diferentes moléculas de señalización. Durante el embarazo se producen cambios más dramáticos que incluyen un aumento masivo en el número y función de las células epiteliales. En esta etapa, se inicia el desarrollo de un nuevo linaje epitelial, las células alveolares, que forman las estructuras lobuloalveolares productoras de leche. Estas células se vuelven redundantes al final de la lactancia y se eliminan en un proceso

exquisitamente controlado de remodelación de tejido junto con la muerte celular extensa. Todos estos eventos requieren no sólo de la estimulación hormonal, sino también de la señalización secuencial de citoquinas (Khaled et al., 2007; Watson, Oliver, & Khaled, 2011).

Las células se adaptan a su entorno cambiante a través de receptores de membrana que responden a estímulos extracelulares en forma de factores de crecimiento y citoquinas. Las moléculas mediadoras son generalmente quinasas y cuando son activadas son capaces de fosforilar, y por lo tanto, activar factores específicos que están latentes aguas abajo en el citoplasma. Estas moléculas efectoras activadas pueden entonces entrar en el núcleo e instituir un programa transcripcional específico que permita a la célula responder a su nuevo entorno (Haricharan & Li, 2014).

### **Transductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT6)**

Las proteínas de la familia de STAT se encuentran como factores citoplásmicos latentes que permiten a la célula ser adaptable a los constantes cambios. Está implicada en cada etapa del desarrollo de la glándula mamaria y también en la tumorigénesis de mama (Haricharan & Li, 2014).

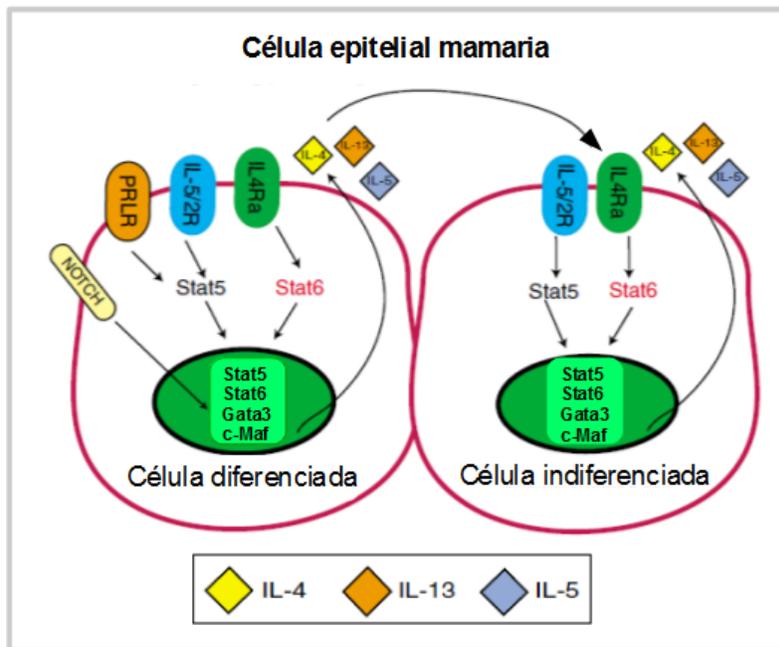
Hasta el momento, se han identificado siete proteínas STAT en células de mamíferos. Se numeraron basándose en el orden de descubrimiento-STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6. STAT6 se requiere para la regulación de células T (Th) durante la respuesta inmune (Shimoda et al., 1996; Takeda et al., 1996) y también ha sido identificado como un regulador de la diferenciación de la glándula mamaria, a través de la inducción de la proliferación y el compromiso de las células luminales a un linaje alveolar (Khaled et al., 2007). La activación de STAT6 ocurre alrededor del día 5 del embarazo y permanece regulada hasta el inicio de la lactancia (Clarkson, Wayland, Lee, Freeman, & Watson, 2004). Esta activación es en respuesta al aumento de citoquinas Th2, IL-4 e IL-13. La activación resultante de STAT6 estimula la diferenciación y proliferación alveolar potencialmente por inducción transcripcional de GATA3 (Khaled et al., 2007).

## **GATA3**

GATA3 pertenece a la familia de factores de transcripción GATA. Es el factor de transcripción más altamente enriquecido en el epitelio mamario de ratones puberales. Se localiza en el cuerpo celular de TEBs y en las células luminales de los ductos mamarios. GATA3 mantiene activamente la diferenciación epitelial en la glándula mamaria adulta, planteando así importantes implicaciones en el desarrollo de cáncer de mama (Kouros-Mehr, Slorach, Sternlicht, & Werb, 2006).

GATA3 y STAT6 juntos reprimen la proteína de dedo de zinc 157 (Zfp157) en el embarazo temprano, permitiendo así la diferenciación del tejido mamario (Oliver, Khaled, Friend, Nichols, & Watson, 2012).

Como se mencionó anteriormente, la activación de STAT6 es en respuesta al aumento de citoquinas IL-4 e IL-13 producidas por las células Th2 residentes (Watson et al., 2011). GATA3 induce un cambio conformacional de la cromatina en el locus de IL-4, IL-13 e IL-5, facilitando la unión de STAT6, STAT5 y c-Maf, incrementando la producción de estas citoquinas desencadenando el proceso de diferenciación en células mamarias germinales (Ansel, Djuretic, Tanasa, & Rao, 2006; Khaled et al., 2007; Watson et al., 2011), ( Fig II.4). Por lo tanto, la producción de citoquinas Th2 está orquestada por la transcripción del gen GATA3 mediada por STAT6 . En ausencia de STAT6, la producción de IL-4, IL-13 e IL-5 disminuye, afectando la señalización parácrina entre células vecinas y retrasando así el desarrollo (Watson et al., 2011).



**Fig II.4 Modelo explicativo de la respuesta mediada por citoquinas Th2 en el proceso de diferenciación mamaria.** Stat6 induce la transcripción de Gata3. Gata3 provoca un cambio conformacional de la cromatina en el locus de IL-4, IL-13 e IL-5, facilitando la unión de Stat6, Stat5 y c-Maf, incrementando la producción de estas citoquinas, desencadenando el proceso de diferenciación en células mamarias germinales. Adaptado de Khaled WT et al. *Development*. 134 (15):2739-50. 2007.

### ARN no codificante inducido por la preñez (PINC)

PINC es un ARN no codificante que se regula positivamente en las células alveolares de la glándula mamaria durante el embarazo. Disminuye en la lactancia temprana, cuando las células alveolares experimentan la diferenciación terminal (Ginger et al., 2006; Shore et al., 2012). Por consiguiente, la expresión de mPINC disminuye significativamente cuando se induce a las células epiteliales mamarias a diferenciarse para producir proteínas de la leche. Esta reducción en los niveles de mPINC puede ser necesaria para el desarrollo de la lactancia, ya que la sobreexpresión de mPINC en las células epiteliales mamarias bloquea la diferenciación lactogénica. Por lo tanto,

mPINC inhibe la diferenciación terminal de las células alveolares durante el embarazo para evitar la producción abundante de leche y la secreción hasta el parto. Adicionalmente, un complejo PRC2 (complejo represivo polycomb 2) que incluye mPINC y a la proteína RbAp46, puede conferir modificaciones epigenéticas en las células epiteliales pospuberales para regular negativamente la diferenciación alveolar mamaria (Shore et al., 2012).

### **TBX3**

Las proteínas T-box son factores de transcripción que se unen al ADN (Rowley, Grothey, & Couch, 2004). Dentro de la familia T-box, Tbx3 es necesaria para el normal desarrollo de la glándula mamaria humana, mientras que los estudios en el ratón han demostrado que Tbx3 junto con Tbx2 juegan un papel importante en la inducción y el mantenimiento de la glándula mamarias y en el crecimiento del árbol ductal mamario. Una importante área no explorada es el papel de estos genes en la glándula mamaria adulta durante el embarazo, la lactancia y la involución. TBX3 está sobreexpresada en cánceres de mama primarios y líneas celulares de cáncer de mama, convirtiéndose en un posible biomarcador pronóstico para el tratamiento del cáncer de mama (Douglas & Papaioannou, 2013).

Se ha demostrado que TBX3 reprime directamente NFκBIB, un inhibidor de la vía NFκB que desempeña un rol en la regulación de la proliferación celular (Liu et al., 2011). Estos antecedentes, junto con el fenotipo hipoplásico observado en mutaciones del gen Tbx3 (Davenport, 2003; Jerome-Majewska et al., 2005), indican la implicancia de Tbx3 en la promoción de la proliferación.

## **CAPITULO III**

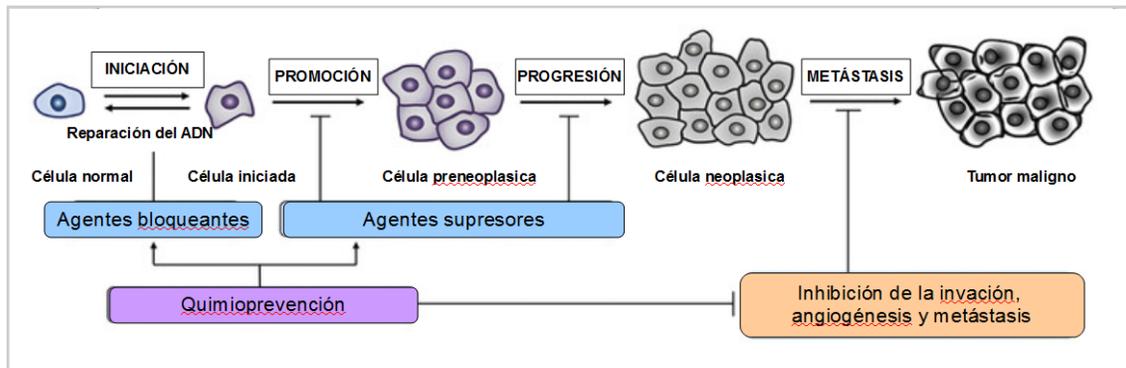
### **CÁNCER DE MAMA**

#### **Etapas de la Carcinogénesis**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al cáncer como un grupo heterogéneo de enfermedades en las que el crecimiento celular anormal con potencial metastásico, toma el control de la homeostasis normal de los tejidos.

La carcinogénesis es un proceso complejo mediante el cual una célula normal se transforma en una célula neoplásica. Este proceso incluye diferentes etapas, entre ellas iniciación, promoción, progresión y metástasis. La fase de iniciación implica la alteración, cambio o mutación de genes que surgen espontáneamente o inducidos por la exposición a un agente cancerígeno. Las alteraciones genéticas pueden resultar en una desregulación en la proliferación, supervivencia y/o diferenciación celular. Se considera que la etapa de promoción es un proceso relativamente largo y reversible en el que se acumulan células iniciadas que proliferan activa y descontroladamente. Dentro de este período, el proceso puede ser alterado por los agentes promotores o quimiopreventivos. La progresión es la etapa final de la transformación neoplásica, donde se producen cambios genéticos, fenotípicos y proliferación celular. Esto implica un rápido aumento en el tamaño del tumor, donde las células pueden sufrir nuevas mutaciones con potencial invasivo y metastásico. La metástasis implica la propagación de células cancerosas desde el sitio primario a otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático (Siddiqui, Sanna, Ahmad, Sechi, & Mukhtar, 2015), (Fig III.1). Existe evidencia epidemiológica, histológica y genética que indica que el cáncer de mama surge por un proceso tumorogénico largo, que incluye múltiples etapas, comenzando con la transformación de las células normales en hiperplasia, displasia, adenoma y carcinoma in situ. El conocimiento de las interacciones moleculares que conducen al desarrollo del cáncer de mama primario, su progresión y la formación de metástasis, es el foco principal de las nuevas estrategias

dirigidas a la prevención y al tratamiento (Beckmann, Niederacher, Schnurch, Gusterson, & Bender, 1997).

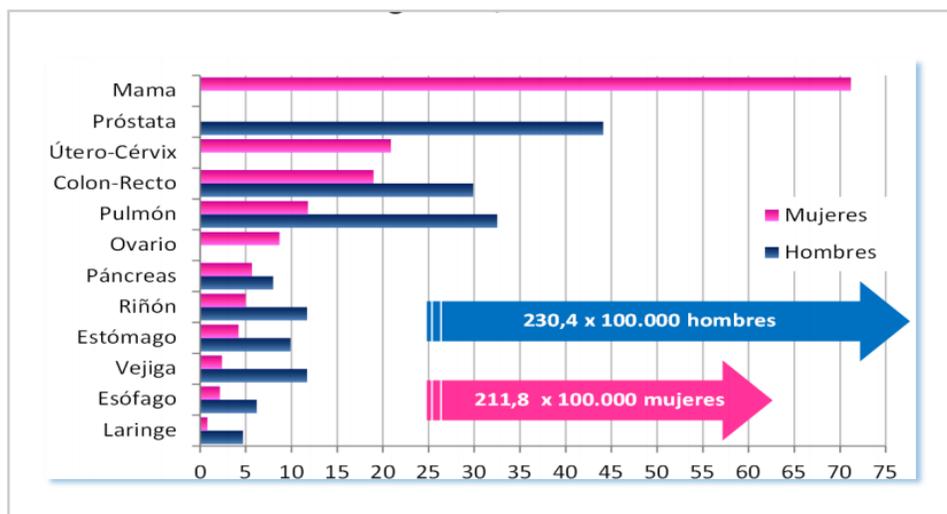


**Fig III.1. Etapas de la carcinogénesis:** iniciación, promoción, progresión y metástasis. Adaptado de Siddiqui IA et al. Ann N Y Acad Sci. 1348(1):20-31. 2015.

## Epidemiología

Argentina fue considerado un país con incidencia media-alta de cáncer según la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC) en su informe del año 2012. Se calcula una incidencia de 217 casos nuevos por año cada 100.000 habitantes en ambos sexos, basándose en datos provenientes de Registros de Cáncer de Base Poblacional del país.

Del total de las enfermedades cancerosas, el cáncer de mama recibe especial interés, ya que es la primera causa de muerte por tumores en mujeres (5600 muertes por año). Dentro de los países de América, Argentina es el segundo país con la tasa de mortalidad más alta por cáncer de mama con 71 casos por cada 100.000 mujeres. La incidencia de esta patología para los hombres representa el 1% (<http://www.prensa.mendoza.gov.ar/salud-presento-los-datos-del-periodo-2008-2012-de-cancer-y-seran-enviados-a-la-oms/>). Se estima que en la Argentina se diagnostican más de 19.000 casos nuevos de cáncer de mama por año (Fig III.2).



**Figura III.2. Estimaciones de incidencia de cáncer en varones y mujeres para las principales localizaciones topográficas.** Tasas estandarizadas por edad según población mundial por 100.000 habitantes. Argentina, 2012. Fuente: Elaborado por SIVER/INC en base a los datos de Globocan 2012. Argentina, 2016.

Con respecto a las diferentes provincias de Argentina, existe una gran diferencia en la tasa de mortalidad. Jujuy y Santiago del Estero están entre las que tienen una tasa de mortalidad más baja, mientras que San Luis y CABA son los lugares en donde se da una mayor mortalidad.

Con respecto a la provincia de Mendoza, la incidencia de cáncer de mama en mujeres representa un 47% de todas las enfermedades malignas femeninas, seguido de cáncer colon rectal (18%) y cérvix uterino (12,9%). Un total de 2.500 mujeres por año padecen cáncer de mama en Mendoza, siendo ésta la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en la provincia (<http://www.prensa.mendoza.gov.ar/salud-presento-los-datos-del-periodo-2008-2012-de-cancer-y-seran-enviados-a-la-oms/>).

### Clasificación de los tumores de mama

La mayoría de los cánceres de mama son de origen epitelial (carcinoma), pero una minoría está formada por tumores malignos del tejido conectivo (sarcomas). El carcinoma de mama surge

dentro del compartimiento epitelial del tejido mamario glandular y tiene dos fases importantes en su evolución: la fase in situ y la fase invasiva. El carcinoma in situ está confinado dentro del compartimiento epitelial y se puede curar exitosamente mediante extirpación. El carcinoma invasivo rompe la membrana basal del epitelio y se infiltra dentro del tejido conectivo de la mama. Es posible erradicar el carcinoma de su sitio primario de crecimiento, mientras que el carcinoma invasivo es más difícil de erradicar porque tiene el potencial de establecer depósitos secundarios en sitios distantes (metástasis). El tratamiento del cáncer de mama metastásico es más bien paliativo que curativo. Dentro de los tipos invasores hay una gran clasificación de los mismos, siendo los carcinomas ductales los más comunes, seguidos por los lobulillares, mucinosos, medulares, papilares y tubulares, entre otros.

El tejido glandular de la mama tiene una gran capacidad para expandir su tamaño en respuesta a estímulos fisiológicos alcanzados principalmente por el aumento del número de células epiteliales, proceso denominado hiperplasia. La hiperplasia es también un evento subyacente en numerosas lesiones, incluyendo el carcinoma in situ. Por lo tanto, es importante distinguir la hiperplasia asociada con lesiones mamarias benignas de la hiperplasia asociada con carcinoma.

Se pueden distinguir dos tipos de carcinoma in situ, el carcinoma ductal in situ (DCIS) y el carcinoma lobular in situ (LCIS). El DCIS se asocia más a menudo con carcinoma invasivo de tipo ductal mientras que el LCIS se asocia frecuentemente con carcinoma invasivo de tipo lobular, pero estas asociaciones no son exclusivas. Una diferencia molecular notable entre estas dos formas de carcinoma in situ es la ausencia de expresión de E-cadherina en LCIS, una molécula de adhesión celular cuya falta resulta en la pérdida de cohesión entre las células de carcinoma que dan lugar a la morfología característica de LCIS. El DCIS se divide en tres grados (bajo, intermedio y alto) basado en características nucleares que se utilizan para determinar el pronóstico (Fentiman & D'Arrigo, 2004).

## **Marcadores tumorales**

Se denomina marcador tumoral a todas aquellas sustancias que pueden detectarse (dependiendo del marcador) en la sangre, orina, heces, tejidos o fluidos corporales, y cuya presencia

en una concentración superior a determinado nivel puede indicar la existencia de cáncer.

Estas sustancias, principalmente de origen proteico, se utilizan para ayudar a detectar, diagnosticar y/o manejar algunos tipos de cáncer. Aunque un nivel elevado de un marcador tumoral puede sugerir la presencia de cáncer, se suelen combinar con otras pruebas para realizar el diagnóstico. Pueden medirse antes del tratamiento a fin de planificar la terapia adecuada, pero también resulta de utilidad su medición durante y al finalizar la terapia a fin de corroborar el efecto de la misma (National Cancer Institute: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet#q1>)

### **Marcadores de proliferación**

Una de las características comunes a todos los tipos de cáncer es el aumento de la proliferación celular de un tejido. Las técnicas de rutina utilizadas para medir la proliferación celular incluyen el conteo de las figuras de mitosis y la detección mediante inmunohistoquímica de las proteínas del ciclo celular, como el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y Ki67 (Elias, 1997). Los niveles de expresión de PCNA durante el ciclo celular son variables y están asociados con procesos de proliferación o transformación (Bravo, Fey, Bellatin, Larsen, & Celis, 1982; Celis, Bravo, Larsen, & Fey, 1984). La participación crucial de PCNA en la proliferación celular y su asociación estrecha con el cáncer dio lugar al uso frecuente de PCNA como un marcador diagnóstico y pronóstico del ciclo celular (Elias, 1997).

El marcador Ki67 identifica células que se encuentran en las fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M), no reconociendo células en etapa de descanso (G0). La positividad de Ki67 se correlaciona con el grado de diferenciación histológica, la invasión vascular, la posibilidad de metástasis, la recurrencia temprana y la pobre sobrevida en el cáncer de mama. Además, dentro de los marcadores proliferativos se encuentra Bcl2, una proteína que se encuentra anclada a la membrana externa mitocondrial, característica que ha sido relacionada con su propiedad anti-apoptótica.

La proteína ciclina D1 (CD1) es un miembro de la familia de las ciclinas que también interviene en la regulación del ciclo celular. Es la principal reguladora de la fase G1 (DO, 2008) y su actividad es crucial para el progreso y el paso a la fase S. Es uno de los componentes centrales de los

puntos de restricción del ciclo celular en mamíferos (Blagosklonny & Pardee, 2002).

### **Marcadores de apoptosis**

El término apoptosis hace referencia al proceso de muerte celular programada, que consiste en el fin de la vida de una célula que se encuentra predeterminado genéticamente. Se trata de un importante mecanismo de control del equilibrio entre la producción y la eliminación de las células que conforman los diferentes tejidos. La apoptosis, hace posible la destrucción de las células dañadas, evitando la aparición de enfermedades como el cáncer, consecuencia de la replicación indiscriminada de una célula dañada ([http://publicacionesmedicina.uc.cl/PatologiaGeneral/Patol\\_033.html](http://publicacionesmedicina.uc.cl/PatologiaGeneral/Patol_033.html)).

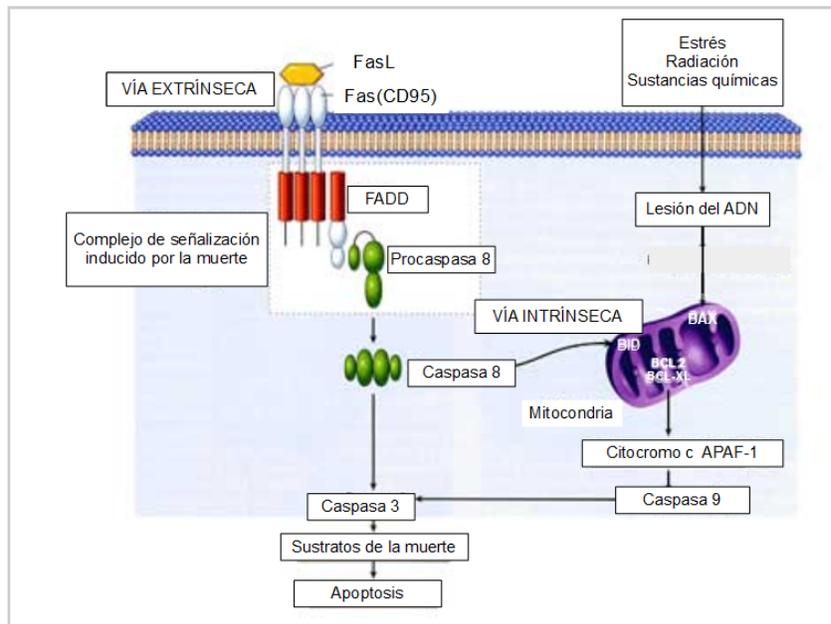
La activación funcional de las caspasas es un punto clave para que ocurra la apoptosis (Fritz, Ferrero, Philpott, & Girardin, 2006). La activación de las caspasas puede ocurrir mediante las vías intrínsecas (mediada por mitocondrias) y/o extrínsecas (mediada por receptores de la muerte). Ambas vías convergen en última instancia a una vía común final que implica la activación de caspasas que desencadena la ejecución de la apoptosis de la célula (Banerjee, Uppal, Strahan, Dabral, & Verma, 2016). Por un lado, la vía extrínseca se activa cuando los ligandos de muerte se unen con los receptores de muerte (Özören & El-Deiry, 2003), lo que da lugar a la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC), (Wong, 2011).

La formación de DISC inicia el ensamblaje y la activación de pro-caspasa-8, que promueve la apoptosis clivando otras caspasas aguas abajo (Kruidering & Evan, 2000). BID, un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2, es escindido por la caspasa-8 durante la apoptosis extrínseca (Lieven P. Billen, Kokoski, Lovell, Leber, & Andrews, 2008).

Por otro lado, la vía intrínseca se inicia como resultado de varios estímulos internos, incluyendo daño genético, estrés oxidativo e hipoxia (Wong, 2011). Estos estímulos producen el aumento de la permeabilidad mitocondrial y la liberación de moléculas pro-apoptóticas, como el citocromo-c en el citoplasma (Danial & Korsmeyer, 2004). Mientras que el grupo anti-apoptótico de las proteínas Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1) regula la apoptosis bloqueando la liberación mitocondrial del citocromo, las proteínas proapoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid,

Bik, Bim y Hrk) actúan promoviendo su liberación. El balance neto entre las proteínas pro y anti-apoptóticas realmente determina el destino de la apoptosis (Reed, 1997).

Finalmente, la liberación citoplasmática del citocromo-c conduce a la activación de la caspasa-3 a través de la formación de un complejo de apoptosoma que consiste en citocromo-c, proteína factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) y caspasa-9 (Kroemer, Galluzzi, & Brenner, 2007), (Fig III.3).



**Figura III.3. Vías extrínseca e intrínseca de señalización de la apoptosis.** La unión de Fas con su ligando inician la vía extrínseca, mientras que la activación de proteínas mitocondriales como Bax produce poros en la membrana de la mitocondria que permite la liberación del citocromo c y posterior activación de la vía intrínseca. Adaptada de [http://www10.uniovi.es/anatopatodon/modulo2/tema03\\_apoptosis/06\\_4linfocitos.htm](http://www10.uniovi.es/anatopatodon/modulo2/tema03_apoptosis/06_4linfocitos.htm).

### **Dentro de los marcadores apoptóticos analizados en esta tesis se encuentran:**

**Bid:** es un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2, que fue inicialmente descubierto por su unión a Bax (proteína pro-apoptótica) como a Bcl-2 (proteína anti-apoptótica). Durante la apoptosis, Bid puede ser escindido por caspasa-8. El clivaje de Bid genera su migración a la

mitocondria donde induce la permeabilización de la membrana mitocondrial externa que es dependiente de la proteína pro-apoptótica Bax. Por tanto, Bid actúa como un centinela en el proceso apoptótico (L P Billen, Shamas-Din, & Andrews, 2008))

**Caspasa 3:** es una proteína miembro de la familia de las caspasas, que son enzimas involucradas en el proceso de apoptosis. Las caspasas existen como proenzimas inactivas, que sufren un proceso proteolítico dando como resultado dos subunidades que al dimerizar forman la enzima activa. Al principio del proceso de apoptosis, las caspasas 8, 9 y 10 activan a la caspasa 3, que luego cliva a PARP y a otras caspasas como la 6 y 7. Esta enzima actúa tanto en la vía intrínseca como extrínseca de la apoptosis.

**Caspasa 8:** esta enzima está involucrada en la vía extrínseca de la apoptosis, la cual es mediada por la activación de receptores de membrana, como la unión de un ligando de muerte (FasL) a su receptor específico (Fas) en la superficie celular. La formación de DISC conduce a la activación de caspasas iniciadoras tales como caspasa 8, la cual una vez clivada y activada, produce la activación de la caspasa 3, efectora de la apoptosis.

**Caspasa 9:** enzima involucrada en la vía intrínseca de la apoptosis. Puede ser activada por una gran variedad de estímulos internos de la célula, que conducen a la unión del citocromo c, el cual se une y activa a Apaf-1 en el citoplasma, lo que promueve que esta última se una a ATP/dATP y forme el apoptosoma. Este último es el encargado de clivar y activar a la caspasa 9, la cual finalmente activa a la caspasa 3, efectora de la apoptosis.

**Bax:** proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia de proteínas Bcl-2, involucradas en la vía intrínseca de la apoptosis. Una vez activada, Bax oligomeriza en la membrana mitocondrial, dando como resultado la liberación de citocromo c y otras proteínas de estas organelas, que contribuyen a la activación de caspasas.

## **Modelo de cáncer de mama en animales**

El desarrollo de la glándula mamaria, así como el proceso carcinogénico son similares entre la especie humana y los roedores (Liška et al., 2016). Como se detalló en el capítulo anterior, el cáncer mamario de roedores imita a los tumores de mama humano, siendo ésta una de las principales razones para el uso de modelos de roedores en la investigación de la carcinogénesis mamaria (Martinez-Hernandez et al., 1976; Masso-Welch et al., 2000; Thayer & Foster, 2007). Los carcinomas mamaros producidos por DMBA muestran características similares al adenocarcinoma de la mama humana, tales como progresión histológica y dependencia de hormonas ováricas (Sharma et al., 2011). Uno de los sistemas más ampliamente utilizados de tumorigénesis mamaria en ratas es la inducción de tumores mamaros mediante DMBA, administrado intragástricamente a ratas Sprague-Dawley. La incidencia de tumores inducidos por DMBA alcanza el 100% cuando el carcinógeno se administra a ratas de entre 30 y 55 días (I. H. Russo & Russo, 1996).

El DMBA es un hidrocarburo aromático policíclico (HAP). Los seres humanos están expuestos a los HAP como DMBA a través del humo del tabaco y el consumo de alimentos a la parrilla. La activación de DMBA implica su epoxidación catalizada por la enzima citocromo P450 oxidasa y epóxido hidrolasa con la formación de metabolitos como los fenoles, dioles, diol epóxidos y tetroles (Safe, 2001; Shimada, 2006). Algunos de los diolepóxidos formados escapan a los mecanismos de desintoxicación, y pueden unirse a los residuos de adenina del ADN causando mutaciones en los oncogenes sensibles al crecimiento, resultando en la transformación de las células normales a un fenotipo maligno (Dipple, Pigott, Moschel, & Costantino, 1983). En adición, el metabolismo de DMBA también genera especies reactivas de oxígeno altamente tóxicas (ROS) que pueden desempeñar un papel clave en la mutagénesis y carcinogénesis mediante la inducción de daño de la membrana, oxidación de lípidos y proteínas, así como el marco de lectura y reticulaciones entre el ADN y las proteínas (Masso-Welch et al., 2000; Morrison, Burnett, Forrester, Wolf, & Craft, 1991).

## Consumo de grasas y cáncer de mama

Las grasas de la dieta son necesarias ya que aportan ácidos grasos esenciales y ayudan en la absorción de vitaminas liposolubles A, D, E y K. Sirven de sustrato para la producción de hormonas y mediadores. Especialmente en la infancia y la primera infancia las grasas son esenciales para el desarrollo neurológico y la función cerebral. La leche materna y la fórmula para lactantes suministran 40-50% de su energía en forma de grasa (Fidler, Sauerwald, Koletzko, & Demmelmair, 1998).

En la sociedad actual, existen factores que favorecen un mayor consumo de grasas y la acumulación de las mismas. Tanto en la infancia como en la vida adulta, la falta de ejercicio físico y el tiempo dedicado a actividades sedentarias, en conjunto con hábitos alimenticios inadecuados se relacionan con mala alimentación, cúmulo de grasas y obesidad (Siddarth, 2013).

La asociación entre el consumo de grasas y el desarrollo de cáncer de mama surgió por la fuerte correlación observada en estudios desde el año 1966 (Lea, 1966). La utilización de modelos animales demostró la influencia de la grasa en el desarrollo de tumores mamarios, independientemente de la ingesta total de energía (Carroll & Khor, 1975). Existen estudios en ratas y ratones que demuestran un aumento de la incidencia de la carcinogénesis mamaria ante el consumo de grasas (Freedman, Clifford, & Messina, 1990). Además, los experimentos in vitro han demostrado que la grasa de la dieta actúa como promotor de la carcinogénesis (Carroll & Khor, 1975; Weisburger, 1997). Por otra parte, los estudios realizados en humanos sobre consumo de grasa y los diferentes subtipos y el desarrollo de cáncer de mama han sido inconsistentes. Esto puede estar relacionado a la dificultad para poder diferenciar el consumo de grasas con el consumo calórico total y la obesidad; dado que la obesidad se identifica como factor de riesgo para el cáncer de mama entre las mujeres posmenopáusicas (Cummings & Bingham, 1998; Freedman et al., 2006; Thiébaud et al., 2007). Por otra parte, la reducción de la ingesta de grasas por sí sola no puede asociarse a una disminución del riesgo de cáncer de mama ya que la reducción de la ingesta de grasas es acompañada por el cambio en los componentes de la dieta, tales como las calorías totales, fibra, carbohidratos, frutas, verduras y micronutrientes (Rose, 1993).

La asociación entre los diferentes subtipos de grasa y el desarrollo de cáncer de mama es aún más compleja. A continuación se describen los diferentes tipos de grasas y sus efectos sobre la carcinogénesis mamaria:

**Grasas saturadas:** Varios estudios de casos y controles han encontrado una asociación positiva entre el consumo de grasas saturadas y el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Boyd et al., 2003; Hunter et al., 1996; Ronco, De Stefani, Mendilaharsu, & Deneo-Pellegrini, 1996; Wakai et al., 2000). Por otra parte, un meta-análisis de 11 estudios de cohortes no encontró asociación entre el consumo de grasas saturadas y el cáncer de mama (Alexander, Morimoto, Mink, & Lowe, 2010).

**Grasas monoinsaturadas (MUFA):** Tanto estudios en animales (Welsch, 1992) como en humanos (Howe et al., 1990) han reportado el rol preventivo de los ácidos grasos monoinsaturados sobre la carcinogénesis mamaria. Sin embargo, existen otros trabajos que reportan un efecto inverso (Saadatian-Elahi, Norat, Goudable, & Riboli, 2004) o que no encuentran asociación (Hunter et al., 1996; Prentice et al., 2006). La relación entre la ingesta de MUFA y el cáncer de mama podría depender de la fuente alimentaria seleccionada. Por ejemplo, el aceite de oliva es la fuente de ácido oleico en la dieta mediterránea y ha sido asociado, a una reducción de la carcinogénesis mamaria (Pelucchi, Bosetti, Negri, Lipworth, & La Vecchia, 2011; Trichopoulou et al., 1995). Por otra parte, en la dieta estadounidense, las margarinas son la fuente primaria de la forma hidrogenada de ácido oleico, que pueden aumentar el riesgo de cáncer de mama (Kohlmeier, 1997).

**Grasas poliinsaturadas:** Los estudios en animales han indicado que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) pueden tener diferentes efectos sobre el riesgo de cáncer de mama (Fay, Freedman, Clifford, & Midthune, 1997; Welsch, 1992). Se ha reportado un efecto promotor de los PUFA  $\omega 6$  (presente en los aceites de semillas) y efecto inhibitorio de los PUFA  $\omega 3$  (presentes en pescados grasos, aceite de pescados y mariscos) en la tumorigénesis mamaria (Calder, 2002; Fay et al., 1997). La relación entre el consumo de PUFA  $\omega 6$  y  $\omega 3$  podría definir el mayor o menor riesgo, dado que los ácidos grasos  $\omega 6$  compiten con los ácidos grasos  $\omega 3$  para producir eicosanoides, aumentando así el riesgo de cáncer de mama; y también, debido a que tienen muchos dobles enlaces que se oxidan fácilmente y favorecen el daño celular por los PUFA  $\omega 6$  (Wirfält et al., 2002). Los

mecanismos que se han propuesto para el efecto protector de los PUFA  $\omega 3$  incluyen la supresión de la biosíntesis de eicosanoides derivados del ácido araquidónico, alteración de metabolismo de los estrógenos, reducción de la producción de radicales libres y modificación de la sensibilidad a la insulina (Larsson, Kumlin, Ingelman-Sundberg, & Wolk, 2004).

**Grasas de origen animal:** La composición de los ácidos grasos difiere según las fuentes animales y vegetales. Los ácidos grasos monoinsaturados y las grasas saturadas son los principales contribuyentes a la grasa animal, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados, los monoinsaturados y ácidos grasos trans contribuyen principalmente a la grasa vegetal (Cho et al., 2003). Las fuentes de grasa animal incluyen carnes de rumiantes (ganado u oveja), cerdo o aves de corral, o de vida marina, huevos o productos lácteos. La grasa animal utilizada en la fabricación de alimentos incluye el sebo, la manteca de cerdo y la mantquilla (World Cancer Research Fund & American Institute for Cancer Research, 2007). El sebo es comercializado como primer jugo bovino, el cual es ampliamente utilizado en la preparación de alimentos a nivel particular e industrial. Se denomina primer jugo bovino al producto separado por fusión a una temperatura no mayor de 80° C de los tejidos y de las partes adiposas limpia e inalterada de animales bovinos ([http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO\\_VII.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_VII.pdf)).

Los hallazgos de estudios de casos y controles que evaluaron la ingesta de grasa animal y cáncer de mama han sido relativamente inconsistentes. Aunque un aumento del riesgo se han reportado en algunas investigaciones de casos y controles (Ferraroni, Decarli, Willett, & Marubini, 1991; Hermann, Linseisen, & Chang-Claude, 2002; Hirohata et al., 1985; Iscovich, Iscovich, Howe, Shiboski, & Kaldor, 1989; Richardson, Gerber, & Cenee, 1991), la mayoría de las asociaciones no han sido estadísticamente significativa y algunos estudios han observado asociaciones inversas (Ceber, Sogukpinar, Mermer, & Aydemir, 2005; Graham et al., 1982; Nancy Potischman et al., 2002).

## **CAPÍTULO IV**

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **Hipótesis**

Teniendo en cuenta que la leche materna presenta numerosos componentes bioactivos que son transmitidos al recién nacido durante una etapa fundamental del crecimiento, y, que el desarrollo de la glándula mamaria se concluye durante la vida posnatal; postulamos la siguiente hipótesis: Una adecuada lactancia materna durante la infancia previene el desarrollo de cáncer de mama en la vida adulta en forma independiente al consumo de grasa, debido a modificaciones epigenéticas de la glándula mamaria y/o modificación de factores pro, antiapoptóticos u hormonales.

#### **Objetivos**

##### **Objetivo general**

El objetivo general del presente proyecto es determinar la influencia de una lactancia materna óptima sobre el desarrollo de cáncer mamario en la vida adulta de las ratas amamantadas. Los resultados obtenidos podrían otorgarnos herramientas de utilidad para el diseño de estrategias de prevención o tratamiento novedosas.

##### **Objetivos específicos**

1. Evaluar en la progenie de ratas el efecto de una lactancia óptima sobre la incidencia y progresión de los tumores mamarios inducidos por DMBA.

2. Evaluar en crías de ratas el efecto de una dieta rica en grasas saturadas sobre la incidencia y progresión de los tumores mamarios inducidos por DMBA.
3. Analizar en las crías si una lactancia óptima influye sobre el impacto de la dieta grasa en la carcinogénesis mamaria inducida por DMBA.
4. Analizar en la progenie si el efecto de una adecuada lactancia está asociada con alteraciones de factores hormonales, y cambios en la proliferación y apoptosis en los tumores mamarios de las ratas.
5. Establecer si la lactancia óptima induce cambios morfológicos y génicos asociados a la diferenciación de la glándula mamaria.
6. Determinar si una lactancia óptima modifica la metilación de genes implicados a la diferenciación y/o carcinogénesis mamaria en ratas.

## CAPÍTULO V

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Modelos de animales en experimentación

##### 1.1. Modelo animal de lactancia diferencial con DMBA

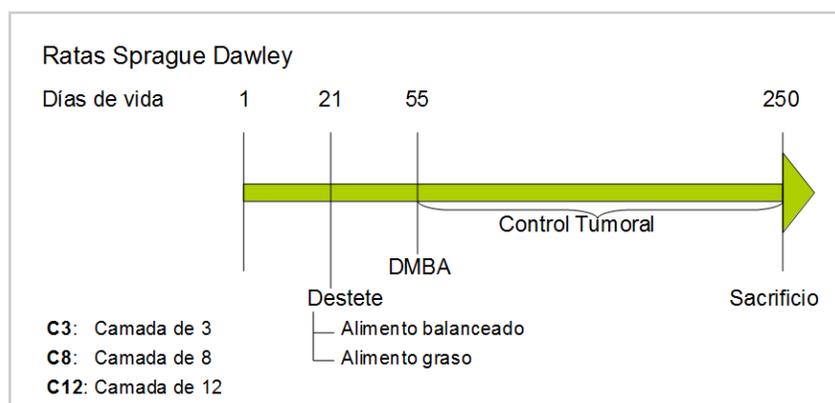
A fin de poder evaluar el desarrollo y la biología tumoral para poder llevar a cabo los objetivos 1, 2, 3 y 4 se realizó el modelo experimental que se detalla a continuación. Se utilizaron ratas Sprague Dawley hembras recién nacidas (n=79) del bioterio de IMBECU, mantenidas en ciclos de luz de catorce horas diarias y temperatura controladas (22-24°C). A las 24 h de edad, los animales se repartieron al azar en tres grupos a fin de ser sometidas a un consumo diferencial de leche materna: uno de ellos manteniendo la relación de 3 crías por madre, otro grupo formado por 8 crías por madre, y un tercer grupo con 12 crías por madre. Después del destete todas las crías de cada camada de 3 y 8 se dividieron en dos grupos, uno de los cuales fue alimentado con alimento balanceado para ratas que contiene 12,6% de grasa cada 100g de alimento (GEPESA, Córdoba, Argentina); y el otro grupo fue alimentado con alimento enriquecido en grasa (40% de grasa) para simular una dieta occidental. Este último se preparó agregando 12,1 g de grasa extraída del primer jugo bovino por cada 100g de alimento estándar. En ambos grupos se suministró agua potable *ad libitum*. A los 55 días de edad, se les administró a la totalidad de los animales el carcinógeno 7,12-Dimetilbenzantraceno (DMBA, Sigma) en una única dosis de 15 mg/rata por sonda intragástrica conectada a jeringa de 3 ml, tal como ha sido llevado a cabo en nuestro laboratorio anteriormente (Lopez-Fontana et al., 2013; López Fontana et al., 2017; Sasso et al., 2014).

Después de la administración de DMBA los animales fueron observados periódicamente hasta la aparición de tumores palpables de mama. La totalidad de los animales fueron pesados individualmente tres veces por semana para elaborar sus curvas de crecimiento. Las ratas que

desarrollaron tumores fueron sacrificadas mediante decapitación cuando los tumores alcanzaron un volumen superior a 1000 mm<sup>3</sup> y el resto fue sacrificado a los 250 días de experimento (Fig V.1).

Se contó el número de tumores por rata, se determinó el volumen tumoral, se consignaron las características de cada uno, y se procedió a recolectar muestras de sangre, tumores y tejidos circundantes. Una porción de tumor se fijó en formol al 10 % para luego ser deshidratado y montado en parafina; y otra porción se congeló en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80 °C para su posterior estudio molecular. También se extirpó la glándula mamaria contralateral al desarrollo tumoral. Se extrajo la totalidad de la grasa abdominal, la cual fue pesada y expresada como porcentaje del peso total del animal. Los animales fueron sacrificados en diestro, para ello, previo al sacrificio, se tomó una gota de lavaje vaginal con agua y se observó al microscopio óptico a un aumento de 400 x. Se clasificó el día del ciclo, según la citología predominante (MARCONDES, BIANCHI, & TANNO, 2002).

El mantenimiento y manejo de los animales se realizó de acuerdo a la guía NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (publicación NIH N8 86-23, revisado 1985 y 1991), según los requisitos del Reino Unido para la ética de la experimentación animal (ley de procedimientos científica con animales 1986). El protocolo de manejo de animales con el que se desarrolló esta tesis fue aprobado por el comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Universidad Nacional de Cuyo (CICUAL), nota número 0021084/2015.



**Fig.V.1 Modelo animal de lactancia diferencial con DMBA**

## 1.2. Modelo animal de lactancia diferencial sin DMBA

### 1.2.1. Crías

Para poder evaluar el desarrollo y la diferenciación del epitelio mamario se utilizaron glándulas mamarias de animales vírgenes que no hubieran recibido cancerígeno. De esta manera pudimos llevar a cabo los objetivos 5 y 6 de la presente tesis. Se utilizaron ratas hembras Sprague Dawley (n=60) que a las 24 h de edad se dividieron en camadas de 3, 8 y 12 crías por madre, como se describió anteriormente. Después del destete, todas las crías fueron alimentadas con el alimento balanceado habitual del bioterio y pesadas individualmente tres veces por semana para elaborar sus curvas de crecimiento. A los 20 días parte de los animales (n = 18) fueron sacrificados mediante decapitación, y se extrajo la glándula mamaria inguinal para la realización del montaje completo del órgano (técnica de Whole Mount). Los animales restantes (n = 42) fueron sacrificados a los 55 días de edad mediante decapitación, se extrajeron las dos glándulas mamarias inguinales, una para la realización del montaje completo, y de la otra se tomaron muestras para estudios genéticos y epigenéticos (Fig V.2).

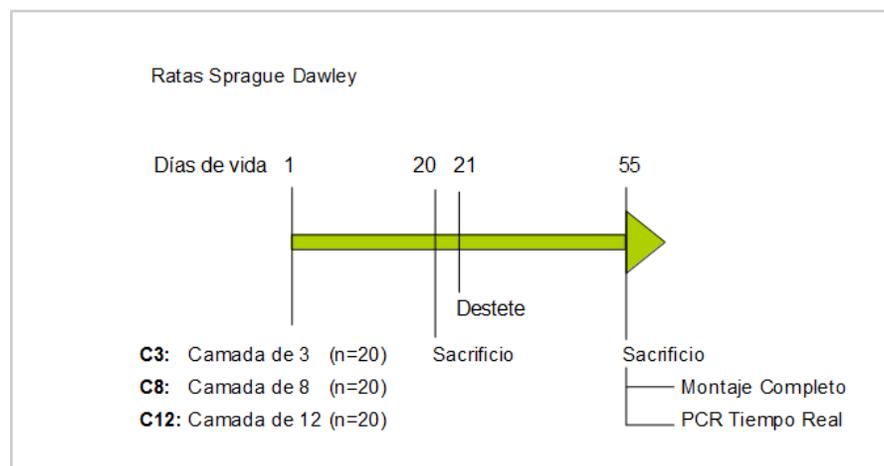


Fig V.2 Modelo animal de lactancia diferencial sin DMBA

### 1.2.2 Madres

Un tercer grupo de ratas hembras vírgenes Sprague Dawley (n=18) fue usado para estudiar el volumen de leche producido por las madres y la composición de macronutrientes de la misma, información relevante para desarrollar el objetivo específico n°1. El ciclo estrual de los animales fue determinado a partir de la semana 10 de vida analizando diariamente la citología vaginal como se explicó antes. Después de constatar dos ciclos regulares las hembras fueron colocadas en la tarde del proestro en una caja con un macho fértil para su apareo. Este se constató la mañana siguiente mediante la observación al microscopio de espermatozoides en el lavaje vaginal y se separaron todas las ratas preñadas en cajas individuales. El día posterior al parto se constituyeron tres grupos según la cantidad de crías por camada. Las madres C3 fueron aquellas que amantaron durante toda la lactancia a tres crías, las C8 amantaron a ocho crías y las C12 amamantaron a doce crías. Para ello se recolectaron todas las crías hembras y se distribuyeron al azar entre las madres de los tres grupos. Con este grupo de animales se realizaron los procedimientos de separación-succión y la extracción de leche descriptos a continuación:

- **Separación-succión**

Para estimar la producción de leche de la madre, se determinó el aumento de peso de la cría amantada. Para ello, las crías se separaron de sus madres a las 07:00 h en los días 10, 11 y 12 de lactancia, durante un período de 4 h (intervalo de separación). Antes de ser restituidas a las madres, las crías fueron pesadas individualmente. Luego se dejaron amamantar durante 60 minutos. Finalizado ese tiempo de succión, las crías se volvieron a pesar. El aumento del peso vivo de la camada durante el tiempo de lactancia sirve como una estimación de la cantidad de leche segregada durante el intervalo de secreción. Los resultados fueron expresados como el promedio de los pesos individuales de las crías. La lectura de estudios previos confirma que las crías no defecan ni orinan durante el periodo de lactancia (Morag, Popliker, & Yagil, 1975).

- **Extracción de leche**

Las crías del experimento anterior también fueron separadas de sus madres a las 07:00 h del día 14 de la lactancia. Cuatro horas más tarde, las madres fueron anestesiadas levemente con ketamina (1ml/kg) y xilacina (0,5 ml/kg) mediante inyección intraperitoneal. Luego se les administró una inyección intraperitoneal de 1 UI de oxitocina (Syntocinon 5 U.I./ml) y se extrajo la leche mediante prensado repetido y suave de los pezones (Hapon, Varas, Giménez, & Jahn, 2007). La leche eyectada fue aspirada con una micropipeta. Se obtuvieron aproximadamente 0,5 ml de leche de cada rata y se mantuvieron congeladas en microviales hasta las determinaciones de triglicéridos (Tgs), proteínas y lactosa por el método colorimétrico de punto final, en el analizador de química clínica Cobas c311 de Roche.

El contenido de glucosa de la leche estuvo por debajo de los valores detectables. El contenido de lactosa, el principal azúcar de la leche, fue determinado de manera indirecta, mediante el uso de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (SIGMA G7013), necesaria para desdoblar la lactosa en glucosa y galactosa (Amamcharla & Metzger, 2011). Para ello se utilizó una dilución de la leche 1:40 en solución fisiológica, con un volumen final de 100  $\mu$ l, a la cual se le agregó 20  $\mu$ l de la enzima  $\beta$ -galactosidasa; luego las muestras fueron incubadas durante 90 min a 37 °C. Posteriormente, se midió el contenido de glucosa y los valores fueron correlacionados al valor obtenido de la conversión de 100  $\mu$ l de lactosa (100 mg/dl) incubada con 20  $\mu$ l de la enzima  $\beta$ -galactosidasa durante 90 min a 37 °C.

## **2. Registro de peso, ingesta y apetencia**

Para poder elaborar las curvas de crecimiento, se tomaron registros de los pesos individuales de todos los animales a partir del día uno de vida. El pesaje fue realizado tres veces por semana hasta el momento del sacrificio del animal.

Con respecto a la ingesta, fue registrada y comparada entre los animales que recibieron alimento balanceado y alimento graso para poder desarrollar los objetivos específicos 2 y 3 de la

presente tesis. El alimento fue colocado, previamente pesado, en la parte superior de jaulas estándar de acero inoxidable. Después de 24 h se registró la cantidad de alimento restante, incluyendo cualquier pellet en el fondo de las jaulas. La ingesta se calculó como el peso (en gramos) de los alimentos proporcionados menos los recuperados y fue calculado por animal.

Para poder determinar si el alimento graso era apetecible para los animales, se realizó una prueba previa al inicio de los experimentos, donde por un lapso de siete días, tres cajas de ratas hembras sprague dawley (cinco animales por caja) disponían de alimento balanceado y alimento graso para poder alimentarse. Los alimentos fueron colocados, previamente pesados, de manera separada en la parte superior de las jaulas de acero inoxidable. Después de 24 h se registró la cantidad de cada uno de los alimentos restantes.

### **3. Determinación de la concentración hormonal**

Las ratas del modelo animal de lactancia diferencial con DMBA fueron sacrificadas en diestro. Se eligió esta fase del ciclo estral ya que los niveles hormonales se encuentran en concentraciones basales. Cabe destacar que las ratas del modelo animal de lactancia diferencial sin DMBA fueron sacrificadas al día 55 independientemente de la fase del ciclo estral en que estuvieran ese día. Al momento del sacrificio, se recolectó la sangre troncal, el suero se separó por centrifugación y se almacenó a -20° C hasta su uso. Se determinaron los niveles séricos de estradiol y progesterona mediante electroquimioluminiscencia en Cobas e411 de Roche.

### **4. Metodología relacionada al tumor**

#### **4.1. Medición de parámetros tumorales**

Los parámetros tumorales evaluados en la presente tesis fueron los siguientes:

- Incidencia tumoral: Calculada como el porcentaje de ratas que presentaron tumores dentro del período estudiado.
- Latencia: Considerada como el tiempo transcurrido desde la administración del DMBA hasta la aparición del primer tumor mamario palpable.
- Porcentaje de supervivencia libre de tumor: Graficado en función del día de sacrificio de los animales, cuando el tumor alcanzaba los 1000 mm<sup>3</sup>, y expresado como porcentaje de animales sobrevivientes ese día.
- Volumen tumoral (VT): Los tumores fueron medidos con calibre para determinar el diámetro mayor (DM) y menor (dm) y calcular el VT mediante la siguiente fórmula  $VT=dm^2 \times DM/2$ .
- Velocidad de crecimiento tumoral: Expresada en mm<sup>3</sup>/día y fue calculada a partir de la relación entre el VT y la diferencia en días desde la detección del tumor y el sacrificio del animal.
- Índice mitótico: Fue calculado por el conteo de figuras mitóticas presentes en diez campos en cortes de tumores teñidos con hematoxilina eosina (H&E) analizados por microscopía óptica a 400 x.
- Índice apoptótico: Calculado como la cantidad de figuras apoptóticas presentes en diez campos en cortes de tumores teñidos con hematoxilina eosina (H&E) analizados por microscopía óptica a 400 x.
- Relación mitosis apoptosis (M/A): Se calculó dividiendo el índice mitótico sobre el apoptótico de cada tumor.

#### **4.2. Análisis de la histología tumoral**

Al momento del sacrificio de las ratas se extirparon los tejidos normales y tumores de mama, los cuales fueron fijados en formol al 10% durante 24 hs, deshidratados en soluciones de etanol, aclarados con xilol e incluidos en parafina. Los cortes histológicos se realizaron con un micrótopo Carl Zeiss HYRAX M 25 Rotary 56 en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de la Universidad Nacional de Cuyo (Mendoza), en el marco de una pasantía para aprendizaje y perfeccionamiento. Se realizaron cortes de entre 3-5 μm, los cuales fueron teñidos con

H&E para su posterior observación al microscopio óptico. Se realizó un análisis histopatológico de los tumores bajo la supervisión de la Médica Patóloga Silvana Semino. Se definieron el tipo y grado tumoral, el grado de inflamación (escaso, leve, moderado y severo), fibrosis, necrosis y se determinaron los índices mitótico y apoptótico mediante el recuento en 10 campos por corte a 400x, de figuras apoptóticas y figuras mitóticas en zonas de tejido epitelial. Se tomaron imágenes de los tumores con un microscopio Nikon Eclipse E200 (Nikon Corp., Japón) equipado con una cámara digital micrometrics SE Alta Calidad (Accu-Scope, Commak, NY 11725).

### **4.3. Inmunohistoquímica**

Se cortaron secciones seriadas de 3-5  $\mu\text{m}$  y se montaron en portaobjetos recubiertos con 3-aminopropiltriétoxissilano (Sigma-Aldrich). Para desenmascarar a los antígenos, se utilizó un protocolo de recuperación de antígenos con calor (40 minutos en buffer citrato 0,01 M, pH 6), tal como ha sido llevado a cabo previamente en nuestro laboratorio (Campo Verde Arboccó et al., 2016; Lopez-Fontana et al., 2013). Luego de realizar dos lavados con agua destilada, se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena por el tratamiento con azida sódica al 0,1% por 30 minutos. Se realizó un lavado en autobuffer por 15 minutos y se bloqueó con leche descremada al 10% por 30 minutos. Luego se lavaron las secciones de tejido se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal mouse anti PCNA (M0879 Dako Cytomation, Denmark) diluido 1:700, el anticuerpo primario policlonal rabbit anti Ki67 (ab15508, Abcam, Estados Unidos de América) diluido 1:500 y el anticuerpo primario monoclonal mouse anti CD1 (ab6152, Abcam, Estados Unidos América) diluido 1:200 diluidos en buffer 0,02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,15 M NaCl, 0,04 % azida sódica y 1% BSA, pH 7,6; durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Se utilizó el sistema de detección VECTASTAIN® Elite ABC-Peroxidasa de Vector Laboratories, Inc, EE.UU en una dilución 1:400 y como sustrato de la peroxidasa ImmPACT™ DAB, Vector Laboratories, Inc, EE.UU en una dilución 1:50.

Los cortes fueron ligeramente coloreados con hematoxilina para revelar los núcleos. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Nikon Eclipse E200 (Nikon Corp., Japón) equipado con una cámara digital micrometrics SE Alta Calidad (Accu-Scope, Commak, NY 11725) bajo

aumentos 100x y 400x. El porcentaje de núcleos positivos se obtuvo basándose en un promedio de 700 células contadas por muestra, con un aumento de 400x. Se utilizó un sistema de calificación reportado previamente (Gago, Tello, Diblasi, & Ciocca, 1998). En resumen, se utilizó una puntuación de intensidad 0 = sin tinción, 1 = tinción nuclear de <10% de células tumorales, 2 = tinción entre 11 y 33% de células tumorales, 3 = tinción entre 34 y 65% de células tumorales, 4 = tinción de > 66% de las células tumorales. Estos resultados fueron obtenidos por dos observadores independientes cegados con respecto al grupo experimental, y algunas puntuaciones contradictorias se resolvieron por consenso.

#### **4.4. Aislamiento de proteínas**

Los tumores de mama extirpados al momento del sacrificio fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su utilización. Las proteínas totales se extrajeron por homogeneización de dicho tejido tumoral en 3 volúmenes de buffer de lisis (Tris 50 mM, pH 7.5, NaF 10 mM, glicerofosfato 20 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, NaCl 150 mM, y cóctel inhibidor de proteasas- P8340 from Sigma 1:100) en baño de hielo, utilizando un homogeneizador Ultraturax (Campo Verde Arboccó et al., 2016). El homogeneizado se centrifugó a 10.900 g durante 10 minutos a 4° C, se separó el sobrenadante y se congeló en varias alícuotas a -80° C hasta su uso. Las proteínas se cuantificaron utilizando el método micro BCA de Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, EE.UU. (23235, Thermo Scientific, Estados Unidos) según las instrucciones del fabricante.

#### **4.5. Electroforesis en gel y transferencia a membrana (SDS-PAGE y Western Blot)**

Las muestras proteicas se hirvieron 5 minutos en buffer de siembra. Se sembraron 50 µg de proteínas para los tumores de mama, y 3 µg del marcador de peso molecular (Blue Plus® III Protein Marker, Transgenbiotech, China). Se separaron mediante SDS-PAGE utilizando un voltaje constante de 110 V, y se electrotransfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P de Merck Millipore)

durante toda la noche a 4° C con voltaje constante de 22 V. Luego de la transferencia se bloquearon con seroalbúmina bovina (Sigma) al 0,5% por 30 minutos y se procedieron a incubar con los anticuerpos primarios que figuran en la tabla V.1 durante toda la noche a 4° C en agitador orbital. Al otro día se realizaron cinco lavados con solución salina tamponada con Tris y 0,1% de Tween 20 (TBS-T) y se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (PR), anti-ratón o anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology Inc. Estados Unidos) según correspondiera, por 1,5 h a temperatura ambiente en agitador orbital. Las membranas se lavaron y revelaron por quimioluminiscencia (Amersham ECL™, GE Healthcare, Argentina) utilizando un sistema ChemiDoc XRS+ con Image Lab Software de BIO-RAD para detectar bandas específicas que fueron cuantificadas por densitometría utilizando un paquete de procesamiento FIJI Image (Schindelin et al., 2012). Las membranas se revelaron también para β-actina (1:500; sc-47778 Santa Cruz Biotechnology Inc, Estados Unidos) como control de carga y transferencia.

**Tabla V.I Anticuerpos utilizados en Western Blot.** Se detalla la dilución utilizada, número de catálogo y fabricante.

Anticuerpo	N° de catálogo	Fabricante	Dilución
Bax	ab32503	Abcam	1:1000
Bcl-2	sc-7382	Santa Cruz	1:500
Caspasa 8 clivada	ab25901	Abcam	1:1000
BID	sc-11423	Santa Cruz	1:500
Caspasa 9 clivada	#9507	Cell Signaling	1:1000
β-actina	sc-47778	Santa Cruz	1:1000
Anti-conejo-PR	sc-2004	Santa Cruz	1:2000
Anti-ratón-PR	sc-2005	Santa Cruz	1:2000

## **5. Metodología relacionada a la glándula mamaria**

### **5.1 Extracción de ARN total, retrotranscripción y PCR en tiempo real**

El tejido mamario conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  se procesó en Ultraturrax con 1 ml de reactivo Tri (Sigma) hasta su homogeneización total. La extracción de ARN se realizó dejando reposar 10 minutos a temperatura ambiente el homogenato y agregando 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo. Luego se agitó manualmente, se dejó nuevamente 15 minutos a temperatura ambiente y se procedió a centrifugar las muestras a 10.000 g por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se trasvasó la parte superior del tubo y se agregaron 750  $\mu\text{l}$  de alcohol isopropílico. El contenido fue descartado conservando el pellet en el fondo del tubo, se agregó 1 ml de alcohol  $75^{\circ}$ , que luego también fue descartado. Se agregó 100  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril apirógena (Roux Ocefa) y se mezcló con agitador vortiginoso (Puissant & Houdebine, 1990). El ADNc se sintetizó mediante transcripción inversa de 10  $\mu\text{g}$  de RNA total a  $37^{\circ}\text{C}$  utilizando primers hexámeros aleatorios (random primers) y la retrotranscriptasa Moloney del virus de la leucemia murina (Invitrogen-Life Technologies, Buenos Aires, Argentina) en una mezcla de reacción de 20  $\mu\text{L}$ . El ARN se desnaturalizó primero a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. En presencia de 2,5  $\mu\text{g}$  de cebadores hexámeros aleatorios (Invitrogen). Para la reacción de RT posterior se añadió la siguiente mezcla: buffer RT (50 mM Tris-HCl -pH8.4-, KCl 75 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM); dNTPs 0,5 mM, DTT 5 mM, y 200 unidades de M-MLV transcriptasa inversa (Invitrogen). La reacción se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 50 minutos. A continuación, la reacción se inactivó por calentamiento a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. El ADNc se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Los primers usados para la determinación de expresión de cada gen están detallados en la tabla V.2. Las reacciones de PCR se realizaron con un termociclador en tiempo real (Corbett Research Pty Ltd Corbett Rotor Gene 6000 (Sydney, Australia) con Eva-Green (Biotium) en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ . La mezcla de reacción consistió en 2  $\mu\text{l}$  de 10xPCR Buffer, 1  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 0,4  $\mu\text{l}$  de 10 mM dNTP Mix (Invitrogen), 1  $\mu\text{l}$  de 20x Eva Green (Biotium, Inc., Fremont, EEUU), 0,25  $\mu\text{l}$  de 5 U/l de Taq ADN polimerasa (Invitrogen) 0,1  $\mu\text{l}$  de cada cebador 2,5 mM (Primers Sentido y Antisentido) y 10  $\mu\text{l}$  de reacciones de ADNc.

Las PCR diluidas se iniciaron con 5 minutos de incubación a  $95^{\circ}\text{C}$ , seguido por 40 ciclos de

95° C durante 30 segundos, 60° C durante 30 segundos y 72° C durante 30 segundos. Se utilizó análisis del pico de fusión (en inglés: melting point ) para comprobar que la amplificación originó un solo producto de amplificado específico. La cuantificación en tiempo real se monitorizó midiendo el aumento en la fluorescencia causada por la unión de colorante EvaGreen a ADN de doble hebra al final de cada ciclo de amplificación. La expresión relativa se determinó utilizando el método de cuantificación comparativa de las muestras normalizadas en relación con la expresión de un calibrador de muestra, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Pfaffl, 2001). Cada reacción de PCR incluyó un control sin ADNc y una muestra sin transcriptasa inversa. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. Las condiciones de reacción y las cantidades de ADNc añadido fueron calibradas de tal manera que la respuesta del ensayo fue lineal con respecto a la cantidad de DNAc de entrada para cada par de cebadores. Las muestras de ARN se analizaron para la contaminación de ADN mediante la realización de las diferentes reacciones de PCR sin transcripción inversa previa. Para seleccionar el gen de referencia, se estimó la estabilidad de la expresión de genes de referencia de tres candidatos,  $\beta$ -actina, GAPDH y HPRT1 utilizando el software en línea de libre acceso BestKeeper versión 1 (<http://gene-quantification.com/bestkeeper.html>). Este enfoque nos ha permitido seleccionar HPRT1 como el gen de referencia, ya que mostró el menor coeficiente de variación entre los grupos de tratamiento en comparación con  $\beta$ -actina y GAPDH. Los niveles relativos de ARNm se normalizaron al gen de referencia HPRT1. Los productos de la PCR en tiempo real se analizaron en geles de agarosa al 2% con SYBR Gold y se comprobó una banda única de aproximadamente el peso molecular esperado. Esto se correspondió con un pico único en análisis de la curva de fusión.

**Tabla V.2 Cebadores usados en PCR en tiempo real**

Gen		Secuencia	T° de annealing (°C)
Stat 6	Sense	TGGAGAGCATCTATCAGAGGGA	60
	Antisense	GTGGAACTCTTCTATAACAGCTT	
Tbx3	Sense	CGAAGTCAGGAAGGCGAATG	58
	Antisense	CCACCATCCACCGAGAATTG	
GATA-3	Sense	CCCATTACCACCTATCCGC	58
	Antisense	CCTCGACTTACATCCGAACCC	
PINC	Sense	TGGAATAACTGTGTGAAGG	58
	Antisense	CCAAAGTGAGGATAAGTAG	
PTEN	Sense	CCTTTTGAAGACCATAACCCACC	58
	Antisense	GAATTGCTGCAACATGATTGTCG	

## 5.2. Montaje completo de la glándula mamaria

El montaje completo de la glándula mamaria se realizó en el día 20 y 55 de vida, en las crías provenientes del modelo animal de lactancia diferencial sin DMBA. El objetivo fue poder contabilizar el número de TEBs y así determinar el potencial de transformación maligna de la glándula mamaria en estudio. Una vez que el animal fue eutanasiado, se sujetó con agujas desde sus patas a la superficie de una tabla, se limpió la piel con etanol y se levantó la piel abdominal con una pinza. Luego con tijera afilada se hizo una incisión de la línea media en la piel comenzando desde la vejiga hacia el cuello. Sujetamos la piel cortada con agujas a la superficie de la tabla para exponer completamente la glándula mamaria. Separamos la glándula mamaria de la piel con tijera afilada comenzando desde el área inferior hacia el extremo distal. Inmediatamente, la glándula fue

esparcida sobre un portaobjetos y se dejó reposar unos minutos a temperatura ambiente para que se pegara al vidrio. Luego, el portaobjeto se colocó en un recipiente que contiene fijador de Carnoy (75% de ácido acético glacial, 25% de etanol absoluto) bajo campana a temperatura ambiente por dos días. Posteriormente, fueron sumergidas en etanol al 70% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se enjuagó con agua destilada durante 30 minutos y se colocó en una solución colorante de Carmín Aluminio (1 g de carmín Sigma C1022 y 2,5 g de sulfato de potasio de aluminio -Sigma A7167- en 500 ml de agua destilada, se hirvió la solución por 20 minutos, se filtró y refrigeró) durante dos días, momento en el que los ganglios linfáticos se encontraron teñidos. A continuación procedimos a lavar en una serie de alcoholes de graduación creciente: 70%, 95%, 100% y, finalmente se colocó en xileno bajo campana a temperatura ambiente por dos días. Este último paso es la limpieza de la glándula mamaria que implica deslipidación de la almohadilla de grasa mamaria, y aumento de la transparencia (de Assis, Warri, Cruz, & Hilakivi-Clarke, 2010). Luego, procedimos al montaje de los vidrios con bálsamo de Canadá sintético (Biopack). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Nikon Eclipse E200 (Nikon Corp., Japón) equipado con una cámara digital micrometrics SE Alta Calidad (Accu-Scope, Commak, NY 11725) bajo aumento 100x.

### **5.3. Extracción y conversión de ADN genómico**

Las muestras de tejidos mamaros fueron resuspendidas en buffer T<sub>10</sub>E<sub>10</sub> (Tris 10 mM – EDTA 10 mM) y sometidas a una ruptura mecánica mediante el uso de homogenizador (Ultraturrax) hasta su homogeneización total. Seguidamente se centrifugaron por 15 minutos a 5.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 3 ml de una solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB; NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris 100 mM, β-mercaptoetanol 0,2%, CTAB 2%). Se agitó enérgicamente durante 10 minutos y se incubó 1 hora a 60° C hasta la disgregación completa del precipitado.

A fin de purificar el ADN se agregó 1 volumen de IAC (cloroformo : alcohol isoamílico, 24:1 v/v) saturado en H<sub>2</sub>O, tomando de la fase de inferior del preparado aproximadamente 3 ml, se invirtió el tubo suavemente por 5 minutos y se centrifugó por 5 min a máxima velocidad. En este paso obtuvimos dos fases, una orgánica (abajo) y otra acuosa (arriba) donde se encuentra el ADN.

Se recuperó el sobrenadante y se trasvasó a un tubo limpio. Por último se precipitó el ADN de la fase acuosa con 2 volúmenes de etanol 100% frío. El ADN visible fue recuperado con una punta estéril y colocado en un tubo de 1,5 ml. Se dejó secar en estufa a 37° C y se resuspendió en 200 µl de buffer T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>.

Con el programa Methyl Primer Express® Version 1.0 se detectaron las islas CpG de la región promotora de los genes Stat6 y Gata3 utilizando las secuencias de referencia: ENSRNOG00000025026 y ENSRNOG00000019336 de ENSEMBL respectivamente. Después de insertar la secuencia de ADN seleccionada en el programa, este detecta todas las islas CpG posibles y diseña cebadores específicos para para la amplificación mediante PCR específica de metilación (MSP) basados en las secuencias diana seleccionadas. Mediante el programa Promoter 2.0, se analizaron las regiones elegidas para comprobar la existencia de elementos reguladores de la transcripción y los sitios de unión. Los cebadores diseñados para la determinación de la expresión de cada gen se encuentran detallados en la tabla V.3.

Las muestras de ADN se trataron con bisulfito de sodio usando el kit EZ DNA Methylation-Gold™ KIT (Catalog N° D5005, Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.) según las indicaciones del fabricante. La conversión se realizó a partir de una cantidad de ADN total de entre 50-450 ng/µl. Para ello se cuantificó el ADN total de las muestras, en espectrofotómetro NanoDrop (LNS-101 Labocon Scientific Limited, United Kingdom). Para la MSP se utilizaron 2 µl de ADN modificado con bisulfito. La amplificación de los fragmentos se realizó mediante la enzima Go Taq ADN polimerasa (PROMEGA) siguiendo las indicaciones del fabricante. El volumen final de la reacción de PCR se ajustó con H<sub>2</sub>O estéril hasta 25 µl. Se prepararon 2 Mix de PCR, uno con los cebadores metilados y otro con los cebadores no metilados. Las condiciones de la PCR fueron: 4 minutos a 95 °C, 5 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 90 segundos a 50 °C y 60 segundos a 72 °C, seguidos de 25 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 90 segundos a 50 °C y 90 segundos a 72 °C, terminando con una extensión final a 72 °C durante 4 minutos. Tras la MSP para comprobar la correcta amplificación del ADN producto de PCR y el estado de metilación, se procedió a la carga del volumen total de PCR en un gel de poliacrilamida al 10%, con SyBR Gold a una concentración 10 pg/uL; El ADN se visualizó, y se obtuvo una imagen digital del gel empleando un sistema ChemiDoc XRS+ con Image Lab Software de BIO-RAD para detectar bandas específicas que fueron cuantificadas por densitometría utilizando un paquete de procesamiento FIJI Image (Schindelin et al., 2012).

**Tabla V.3 Cebadores usados en PCR**

Gen		Secuencia	T° de annealing (°C)
GATA-3 Metilado	Sentido	ATTTAGATACGTATTATTCCGGGTTTC	60
	Antisentido	AAACGTAATTACCTTAACCATCGAT	
GATA-3 No metilado	Sentido	TAGATATGTATTATTTGGGTTTTGG	57
	Antisentido	AACATAATTACCTTAACCATCAAT	
Stat 6 Metilado	Sentido	GTTGTCGGGTTTTTTTTTACG	58
	Antisentido	AACGATACAAAATCTATAAATCGAA	
Stat 6 No metilado	Sentido	GGGTTGTTGGGTTTTTTTTTATG	58
	Antisentido	AATCAATAACAATACAAAATCTATAAA TCA	

## 6. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism, versión 5.03 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA-USA), seleccionándose los siguientes estadísticos descriptivos: media aritmética, como medida de tendencia central y el error típico de la media, como medida de dispersión. Únicamente al comparar de los pesos corporales de los animales se utilizó la mediana del tiempo de decapitación, como medida de tendencia central.

En lo que respecta a la estadística inferencial, para comparar variables de dos categorías se utilizó la prueba T student para muestras independientes o prueba de U de Mann Whitney según los criterios de normalidad de las variables establecido con el test de normalidad de Kolmogorov-

Smirnov (Lilliefors); y para variables de más de dos categorías, se aplicó Anova de 1 vía con posterior análisis de Bonferroni para las variables paramétricas, y el test de Kruskal Wallis y Dunn's para las no paramétricas. Para establecer posibles diferencias entre las variables a lo largo del tiempo, se utilizó un test de ANOVA de 2 vías aplicándose los mismos post test mencionados anteriormente.

Con el fin de establecer posibles asociaciones entre las diferentes variables estudiadas, se utilizaron los coeficientes de correlación de Pearson y Spearman según el criterio de normalidad de las variables establecido con el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors). Además, para estudiar como varia el valor medio de las variables (dependientes) a medida que cambia la otra variable independiente, se aplicó un modelo de regresión lineal.

Finalmente, los porcentajes de incidencia se analizaron por el test de Fisher y las curvas de supervivencia se compararon según el producto límite de Kaplan-Meier. En todos los casos, se utilizó un nivel mínimo de significación de  $p \leq 0,05$ .

## **CAPÍTULO VI**

### **RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°1**

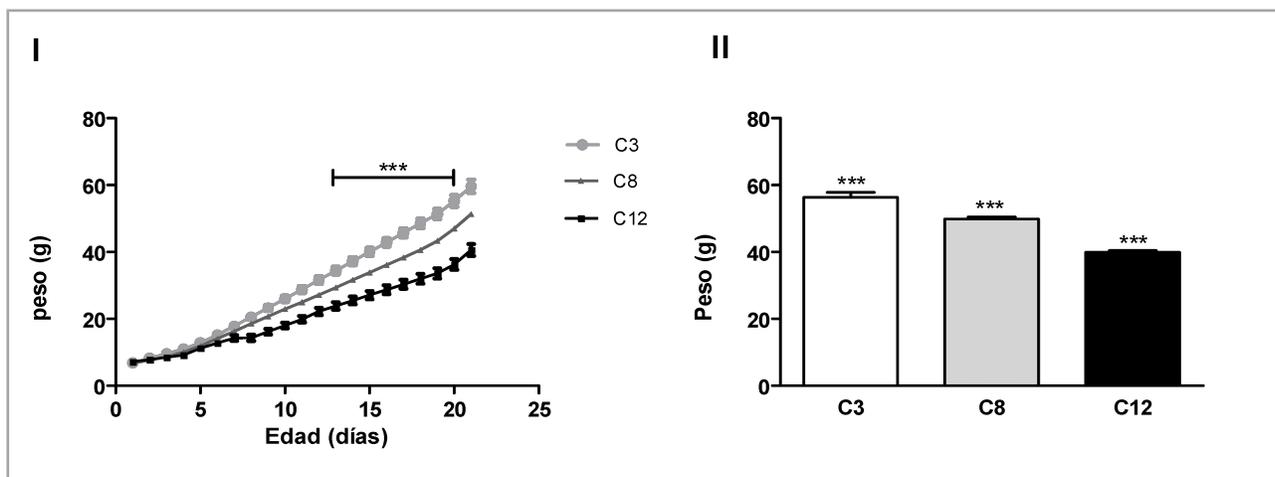
Objetivo específico N°1: Evaluar en la progenie de ratas el efecto de una apropiada lactancia sobre la incidencia y progresión de los tumores mamarios inducidos por DMBA

### **RESULTADOS**

El desarrollo del objetivo específico n° 1 implicó la puesta a punto del modelo animal de lactancia diferencial y el estudio de la carcinogénesis mamaria inducida por DMBA.

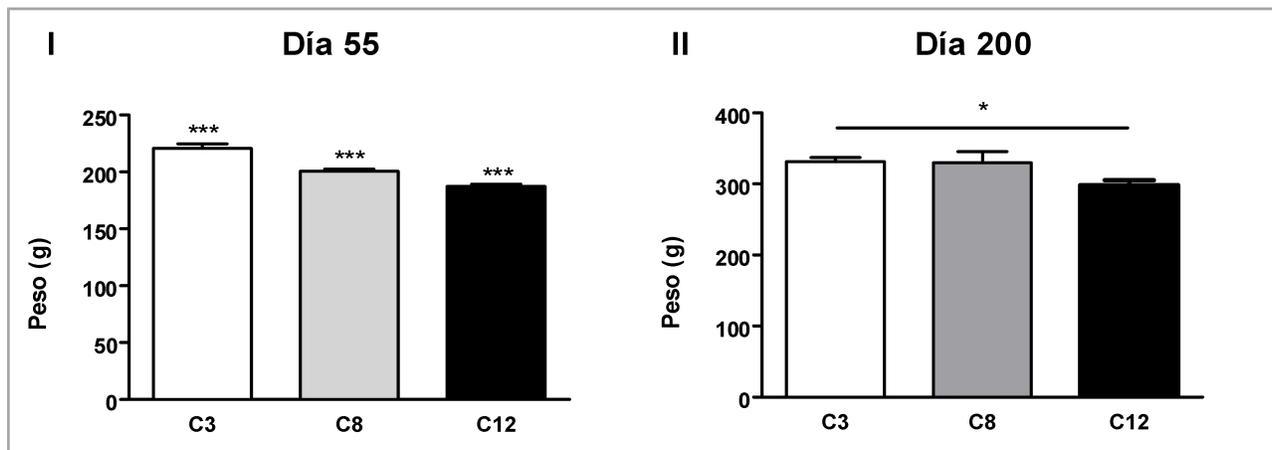
#### **Peso corporal y validación del modelo experimental**

Para poner a punto el *modelo animal de lactancia diferencial*, se utilizaron ratas hembras Sprague Dawley que a las 24 h de edad fueron separadas en camadas de 3 (C3), 8 (C8) y 12 (C12) crías por madre. De esta manera, generamos animales con un consumo de leche materna considerado óptimo en C3 y un consumo deficiente en C12. La figura VI.1.I muestra las curvas de crecimiento de los animales exhibiendo un aumento significativo en el peso ( $p < 0,001$ ) en C3 con respecto a C8 y C12 a partir del día 13 de lactancia. También observamos, desde el mismo día, un aumento de peso ( $p < 0,001$ ) en C8 en comparación con C12. Cuando las crías fueron destetadas, al día 21 de vida, la diferencia de peso fue significativa entre los tres grupos experimentales ( $p < 0,001$ , Fig VI.1.II). Claramente, esta divergencia se debió a las variaciones en el consumo de leche materna entre las camadas, corroborando nuestro modelo animal.



**Fig VI.1 Variaciones del peso corporal ante el consumo diferencial de leche hasta el final de la lactancia** (I) Las variaciones de peso entre los tres grupos se pueden observar a partir del día 13 de la vida (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). (II) Al día 21 de vida C3 presentó un peso corporal significativamente mayor con respecto a C8 y C12 (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). A su vez, C8 también tuvo un peso mayor en comparación con C12 (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 12-25 animales / grupo. Las comparaciones mostradas en I se realizaron mediante ANOVA II y prueba de Bonferroni como post hoc. Los valores mostrados en II se compararon mediante ANOVA I y prueba de Bonferroni.

La susceptibilidad de la glándula mamaria a la carcinogénesis inducida por DMBA es máxima cuando el carcinógeno se administra en la rata virgen entre los 40 y 60 días de vida, es decir poco después de la apertura vaginal y durante la madurez sexual temprana (I. H. Russo & Russo, 1996). La organogénesis activa y la alta tasa de proliferación son características de este periodo (I. H. Russo & Russo, 1996). La administración de DMBA en nuestro trabajo se realizó en el día 55 de vida del animal y la mediana de tiempo de decapitación fue a los 200 días de vida. La diferencia en el peso corporal entre las tres camadas de animales se mantuvo al día 55 de vida ( $p < 0,001$ , Fig VI.2.I), mientras que solo observamos un mayor peso en C3 con respecto a C12 al final del experimento ( $p < 0,05$ , Fig VI.2.II).

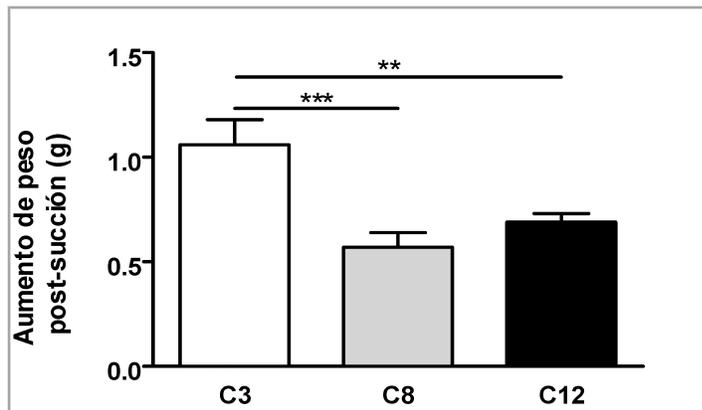


**Fig VI.2 Variaciones del peso corporal ante el consumo diferencial de leche en el día 55 y 200 de vida** (I) Las diferencias en el peso corporal observadas entre las tres camadas se mantuvieron hasta el día 55 de vida (\*\*\*)  $p < 0,001$  con respecto a los otros grupos). (II) C3 mantenía un peso mayor que C12 al día 200 de vida, considerado el tiempo de sacrificio de la mayoría de los animales (\*  $p < 0,05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 12-25 animales / grupo. Los valores mostrados en I y II se compararon mediante ANOVA I y prueba de Bonferroni como post hoc.

### Producción de leche materna

Para poder estimar la cantidad de leche producida por las madres con camadas de diferentes tamaños, se determinó el aumento de peso de las crías amantadas en un experimento de separación y succión. Las crías fueron separadas de sus madres durante un período de 4 h y, antes de ser restituidos con la madre, fueron pesadas individualmente. Luego de que amamantaran durante una hora se volvieron a pesar. La diferencia de peso obtenida entre el periodo de separación y succión fue tomada como indicador de la cantidad de leche secretada por la madre. Este procedimiento fue realizado durante los días 10, 11 y 12 de lactancia. Los experimentos de los días 10 y 11 fueron llevados a cabo para adaptar a los animales y minimizar el posible estrés debido a la separación de las crías. Los resultados que se muestran (Fig VI.3) representan los valores obtenidos el día 12. El aumento de peso de los animales fue mayor en C3 con respecto a C8 ( $p < 0,001$ ) y a C12 ( $p < 0,01$ ). Estos resultados indican una mayor producción de leche por animal en las madres que amamantan 3

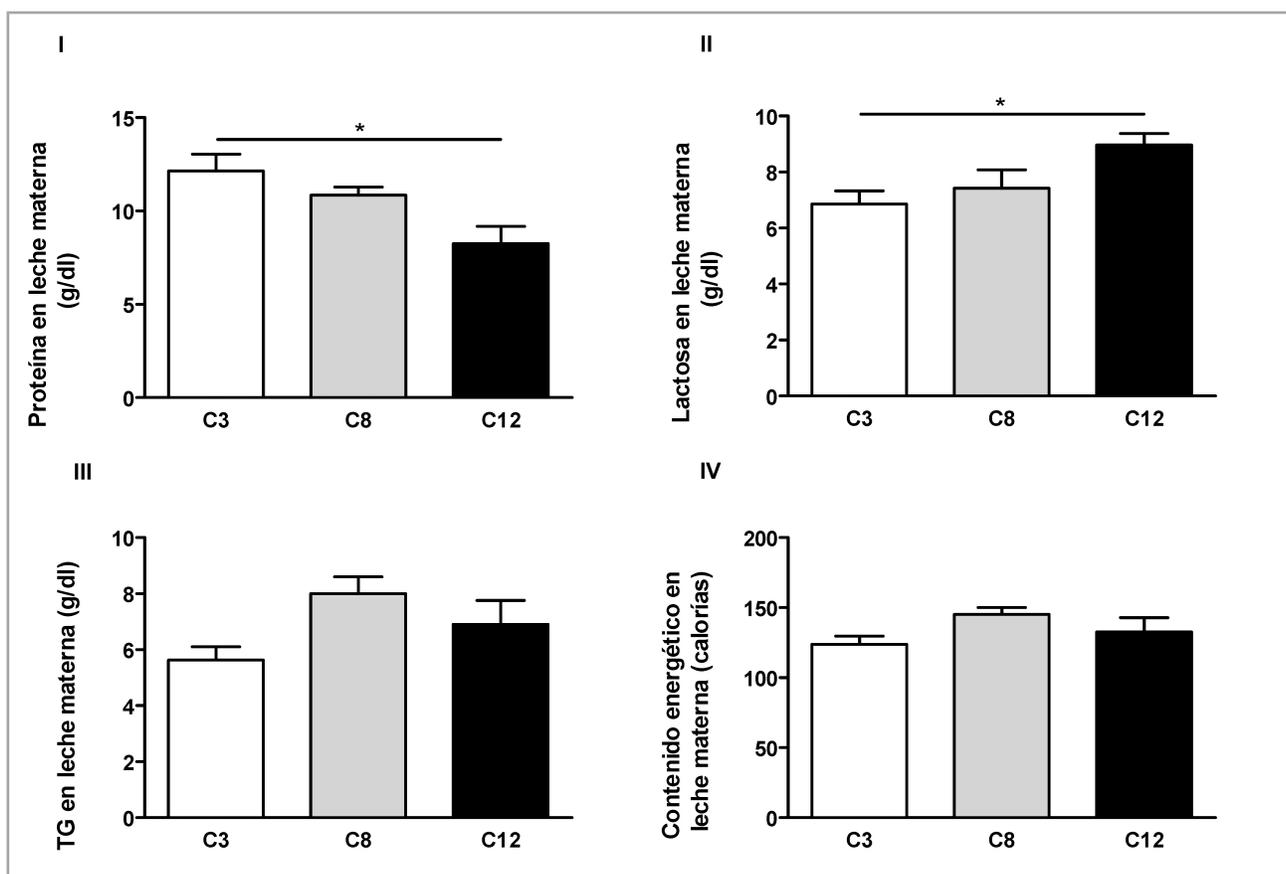
crías en comparación con las que amamantan 8 y 12 crías.



**Fig VI.3 Producción de leche materna.** Los animales alimentados en camadas de 3 crías por madre (C3) tuvieron un aumento de peso, expresado por cría, superior a los alimentados en camada de 8 (C8; \*\*\*  $p < 0,001$ ) y 12 (C12 \*\*  $p < 0,01$ ) durante el procedimiento de separación succión en el día 12 de vida. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 15-60 animales / grupo. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA I y prueba de Bonferroni como post hoc.

### Composición de macronutrientes de la leche materna

A fin de tener un conocimiento más completo sobre la composición de la leche materna en madres con camadas de diferentes tamaños (3, 8 y 12 crías por madre), extrajimos leche en el día 14 de lactancia y analizamos el contenido de macronutrientes mediante métodos colorimétricos. Se determinó el contenido de proteínas, triglicéridos y lactosa (Fig VI.4). El contenido de proteínas totales de la leche materna es mayor ( $p < 0,05$ ) en las madres con camadas reducidas (C3) con respecto a la leche producida por madres con camadas de mayor tamaño (C12). De manera inversa, el contenido de lactosa de la leche materna es mayor en madres con camadas de 12 crías ( $p < 0,05$ ) con respecto a madres con camadas de 3 crías. No se observaron diferencias en el contenido de triglicéridos y calorías totales entre la leche de las diferentes madres. Estos resultados en animales coinciden con los obtenidos en investigaciones previas en humanos (L A Nommsen, Lovelady, Heinig, Lonnerdal, & Dewey, 1991; PRENTICE, 1995). Esta variación entre los macronutrientes de la leche resulta un mecanismo de compensación para lograr mantener el contenido calórico final que se aporta a cada cría.

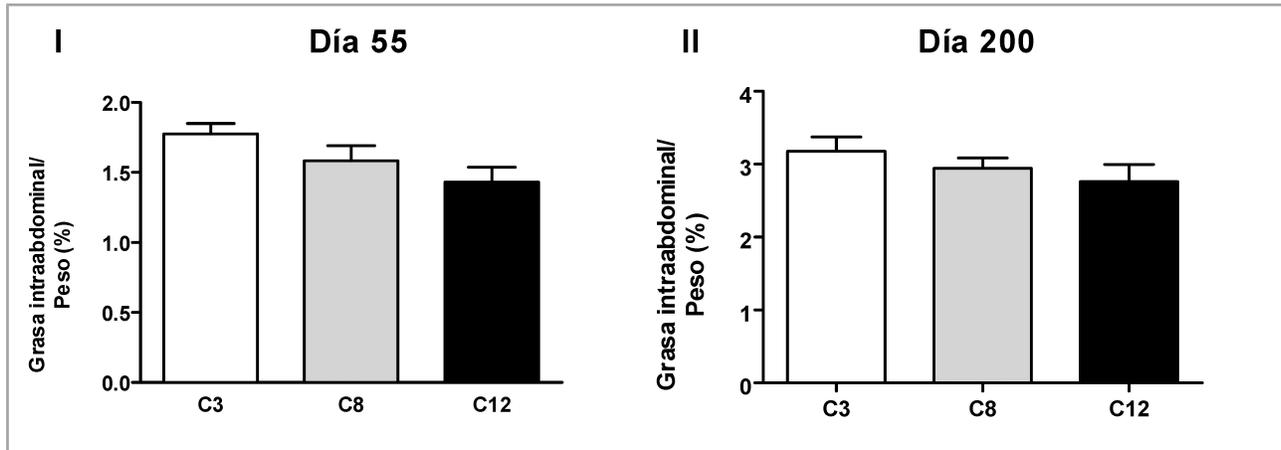


**Fig VI.4 Composición de macronutrientes de la leche materna.** I) El contenido de proteínas totales de la leche es significativamente mayor en madres C3 vs C12 (\* $p < 0,05$ ). II) La concentración de lactosa de la leche es mayor en madres C12 con respecto a C3 (\* $p < 0,05$ ). III). No se observan diferencias en el contenido de triglicéridos de la leche entre las diferentes madres. IV) El contenido de calorías totales de la leche es similar en todas las madres, independientemente el número de crías que amamanten. Los valores fueron obtenidos a partir de 5 muestras por grupo. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA I y prueba de Bonferroni como post hoc.

### Masa grasa abdominal

En el momento del sacrificio, ya sea de los animales sacrificados a los 55 días de edad sin DMBA, o de los animales sacrificados alrededor de los 200 días de edad (mediana del tiempo de decapitación) tratados con DMBA, se extrajo la totalidad de la grasa abdominal. La masa grasa

abdominal expresada como un porcentaje del peso corporal se ha utilizado previamente como una medida de la composición corporal en ratas (Vazquez-Prieto et al., 2011). El porcentaje de grasa abdominal fue similar en los tres grupos al día 55 y 200 de vida (Fig VI.5).



**Fig VI.5 Porcentaje de masa grasa intraabdominal.** No se encontraron diferencias significativas en la masa grasa abdominal entre los tres grupos en día 55 (I) y 200 (II) de vida. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 14-23 animales / grupo. Los valores mostrados en I y II se compararon mediante ANOVA I y prueba de Bonferroni como post hoc.

### La lactancia no afecta la histología tumoral

Una vez puesto a punto el modelo animal, evaluamos el efecto de una lactancia optima sobre el proceso tumorigénico de la glándula mamaria. En primer lugar, los tumores mamarios extraídos en el momento del sacrificio fueron fijados, deshidratados, aclarados e incluidos en parafina para la realización de cortes histológicos. Dichos cortes fueron teñidos con H&E y analizados en un microscopio óptico con el asesoramiento de un médico especialista en anatomía patológica. La tabla VI.1 muestra las características histopatológicas de los tumores mamarios desarrollados en los tres grupos experimentales. Los tumores fueron mayormente ductales con predominio del componente infiltrante sobre el tipo in situ. La respuesta inflamatoria y la fibrosis tumoral fueron limitadas en C3

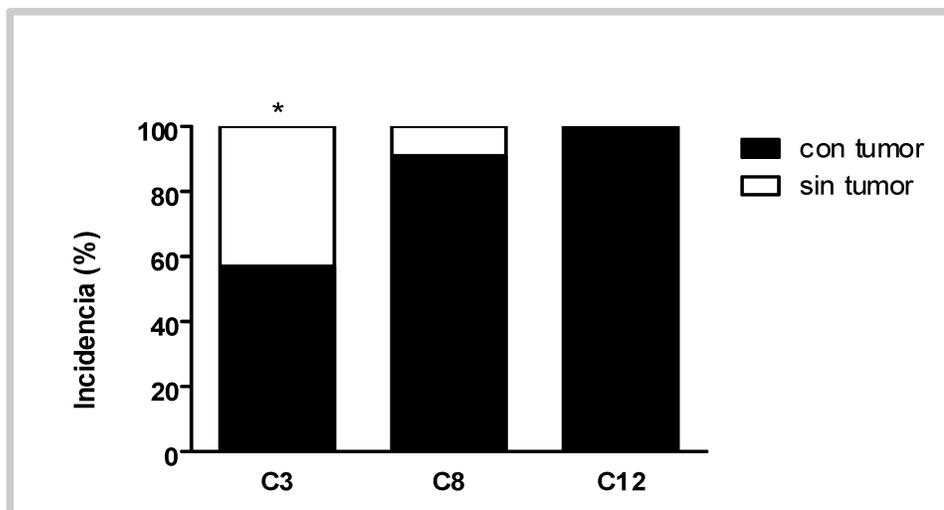
y C8, y moderadas en C12. En contraste, la necrosis fue limitada en C8 y C12, y moderada en C3.

**Tabla VI.1 Resumen de las principales características del desarrollo tumoral en ratas tratadas con DMBA**

		C3	C8	C12
<b>Animales tratados con DMBA</b>		14	23	14
<b>Ratas con tumor</b>		8	21	14
<b>Peso tumoral (g)</b>		1,63 ± 0,3	1,76 ± 0,4	1,66 ± 0,3
<b>Tipo de tumor</b>	Carcinoma ductal	6	19	10
	Carcinoma lobulillar	-	1	1
	Carcinoma papilar	1	1	3
	Carcinoma cribiforme	1	-	-
<b>Otras características</b>	Componente prevalente	infiltrante	infiltrante	infiltrante
	Respuesta inflamatoria	baja	baja	moderada
	Necrosis	moderada	moderada	moderada
	Fibrosis	baja	baja	moderada

### **La lactancia disminuye la incidencia tumoral**

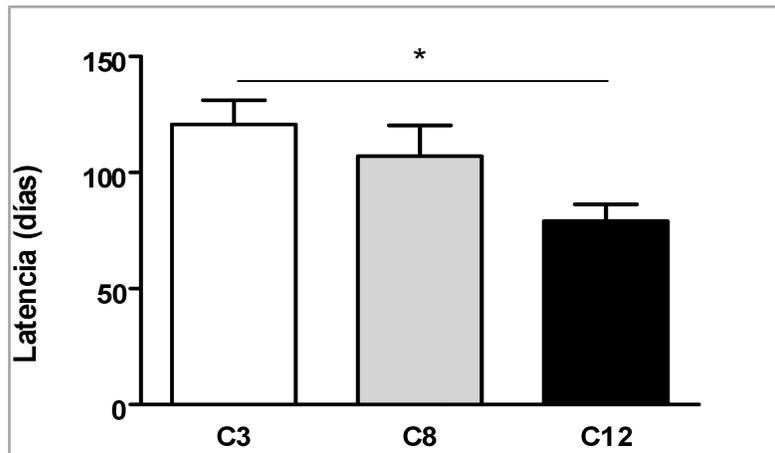
Para estudiar el efecto que produce la lactancia materna sobre el desarrollo de tumores de mama en las crías, se procedió a analizar varios aspectos, entre ellos la incidencia tumoral. La incidencia se calculó como el porcentaje de ratas que presentaron tumores dentro del período estudiado. La figura VI.6 muestra que los animales que mantuvieron una lactancia óptima (C3) tuvieron una menor incidencia de cáncer mamario respecto a los otros grupos ( $p < 0,05$ ).



**Fig VI.6 La lactancia afecta la incidencia de tumores mamarios.** C3 tuvo una incidencia tumoral menor que los otros grupos (\*  $p < 0,05$ ). La incidencia se expresó como porcentajes y se comparó mediante la prueba de Fisher.

### **La lactancia retarda el día de aparición del tumor**

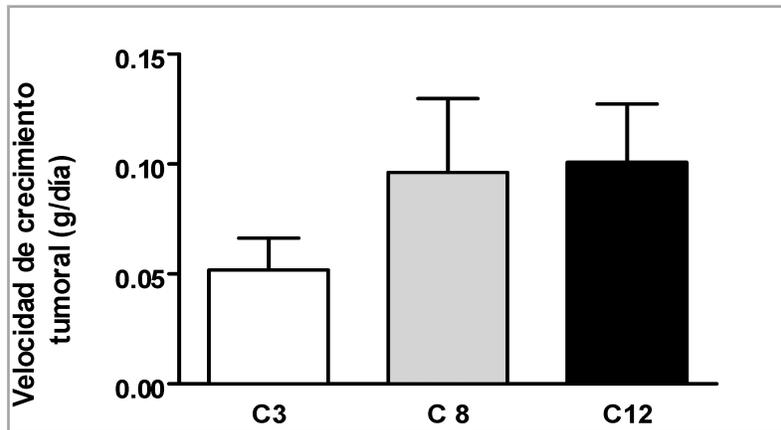
Otro de los parámetros estudiados sobre el desarrollo tumoral fue la latencia, considerada como el tiempo transcurrido desde la administración del DMBA hasta la aparición del primer tumor mamario palpable. Nuestros resultados muestran una mayor latencia en el grupo C3 comparado con C12 ( $p < 0,05$ ; Fig VI.7).



**Fig VI.7 Una lactancia óptima prolonga la latencia de tumores mamarios.** La latencia de aparición de tumores fue mayor en C3 que en C12 (\*  $p < 0,05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de cada grupo. La comparación en la latencia se realizó mediante ANOVA I y la prueba de Bonferroni como post hoc.

### **La lactancia materna no afecta significativamente el crecimiento tumoral**

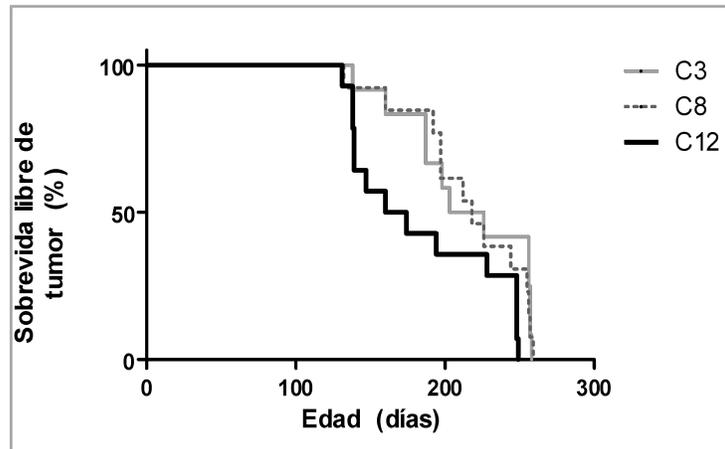
El crecimiento del tumor, expresado en gramos por día, fue similar entre los tres grupos, aunque los animales que mantuvieron una lactancia óptima (C3) muestran un crecimiento tumoral que tiende a ser menor que el de los otros grupos (Fig VI.8).



**Fig VI.8 La lactancia no afecta el crecimiento tumoral en gramos por día.** No se encontraron diferencias entre los grupos en la tasa de crecimiento tumoral. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de cada grupo. La comparación en el crecimiento tumoral se realizó mediante ANOVA I y la prueba de Bonferroni como post hoc.

### **Una lactancia óptima tiende a inducir una mayor sobrevida libre de tumor**

Los animales que mantuvieron una lactancia óptima presentaron una marcada tendencia ( $p = 0,0592$ ) a tener una supervivencia más larga libre de tumores mamarios menores de  $1.000 \text{ mm}^3$ , en comparación con aquellos que mantuvieron un bajo consumo de leche (C12, Fig VI.9). Esta tendencia alcanzó significación cuando se comparó sólo C3 con C12 ( $p < 0,05$ ) debido a la dispersión de datos en el grupo C8.



**Fig VI.9 Lactancia óptima y supervivencia libre de tumor.** Las curvas de supervivencia muestran una tendencia ( $p = 0,0592$ ) a tener una supervivencia más larga libre de tumores de menos de  $1.000 \text{ mm}^3$  en C3 que en C12. Las curvas de supervivencia se compararon según el producto límite de Kaplan-Meier.

## CAPÍTULO VII

### RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°2

Objetivo específico N°2: Evaluar en crías de ratas el efecto de una dieta rica en grasas saturadas sobre la incidencia y progresión de los tumores mamarios inducidos por DMBA

Para poder llevar a cabo este objetivo, se trabajó con ratas hembras Sprague Dawley amantadas en camadas de 8 crías por madre, que a partir del destete en el día 21, se dividieron en dos grupos. Uno de los grupos fue alimentado con alimento estándar balanceado para ratas (C8 AB; 12,6% de grasa cada 100g de alimento); y el otro grupo recibió un alimento enriquecido en grasa (C8 AG; 40% de grasa cada 100 g de alimento). El alimento con alto contenido en grasa simuló una dieta occidental, la cual se caracteriza por un elevado consumo de grasas de origen animal, fuente de grasas saturadas. Este último se preparó agregando 12,1 g de grasa extraída del primer jugo bovino por cada 100g de alimento estándar. En las tablas VII.1 se detalla la composición de macronutrientes de los alimentos administrados. En ambos grupos se suministró agua potable *ad libitum*.

Cuando los animales alcanzaron los 55 días de edad se les administró el carcinógeno mamario DMBA. El sacrificio de los animales por decapitación se realizó cuando los tumores alcanzaron un volumen superior a 1000 mm<sup>3</sup> o a los 250 días de experimento. Las dietas fueron suministradas hasta el momento del sacrificio del animal.

**Tabla VII.1 Contenido de macronutrientes por cada 100g de alimento balanceado y enriquecido en grasa.**

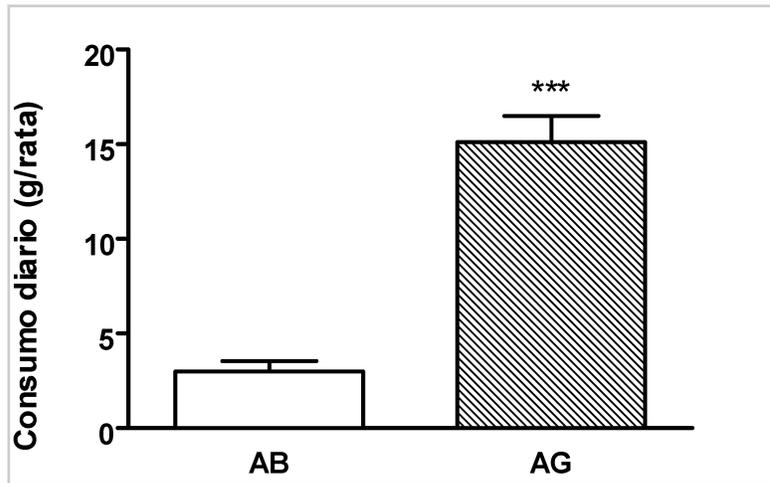
	Alimento balanceado *			Alimento enriquecido en grasa **		
	Distribución de calorías (%)	Calorías	Gramos	Distribución de calorías (%)	Calorías	Gramos
<b>Hidratos de carbono</b>	61,5	170,9	42,73	42	150,4	38
<b>Proteínas</b>	26	72	18	18	64,44	16
<b>Grasas</b>	12,6	35,1	3,9	40	143,2	16

\*Alimento ratón-rata autoclavable. Gepsa. Producto inscripto en SENASA N.º 2713/A

\*\*Alimento ratón-rata autoclavable. Gepsa. Producto inscripto en SENASA N.º 2713/A con el agregado 12,1 g de grasa extraída del primer jugo bovino por cada 100g de alimento estándar.

## **Apetencia**

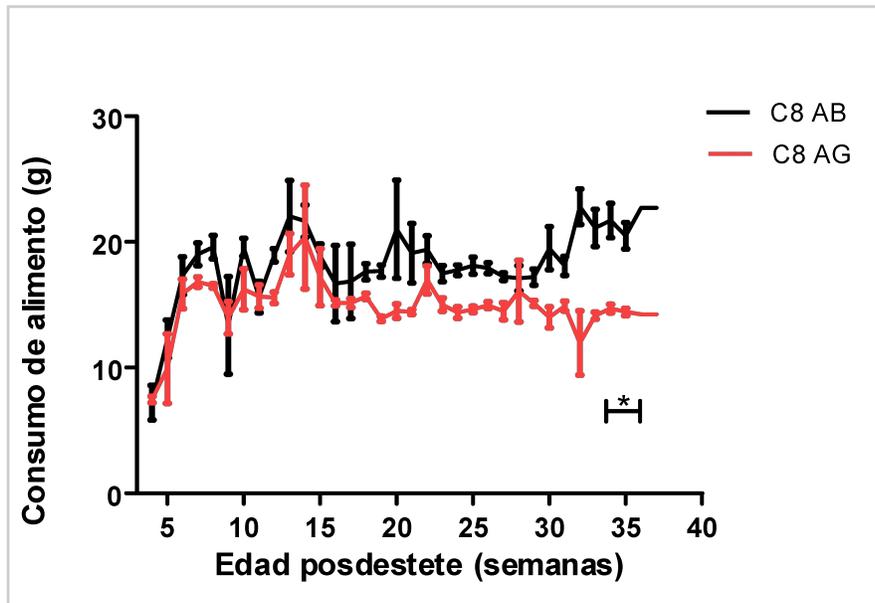
Con la finalidad de conocer si el alimento graso era apetecible para los animales, se realizó una prueba previa al inicio de los experimentos, donde por un lapso de siete días, tres cajas de ratas hembras sprague dawley (n=15) disponían de alimento balanceado y alimento graso para poder alimentarse. La ingesta de alimento graso, calculada como el peso (en gramos/rata) de los alimentos proporcionados menos los recuperados, fue mayor que la ingesta de alimento balanceado ( $p < 0,001$ ; Fig VI.1). Esto demostró que el alimento enriquecido con grasa era apetecible para los animales, lo que nos permitió proceder con nuestros experimentos.



**Fig VI.1 El alimento enriquecido en grasa es más apetecible para los animales que el alimento estándar balanceado.** Los animales realizaron un consumo significativamente mayor de alimento rico en grasa saturada que de alimento estándar balanceado (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Los valores representan el consumo en g/rata/día de 15 animales. Los datos fueron analizados por Kolmogorov-Smirnov, y posteriormente se realizó el test de Student.

### Consumo alimentario

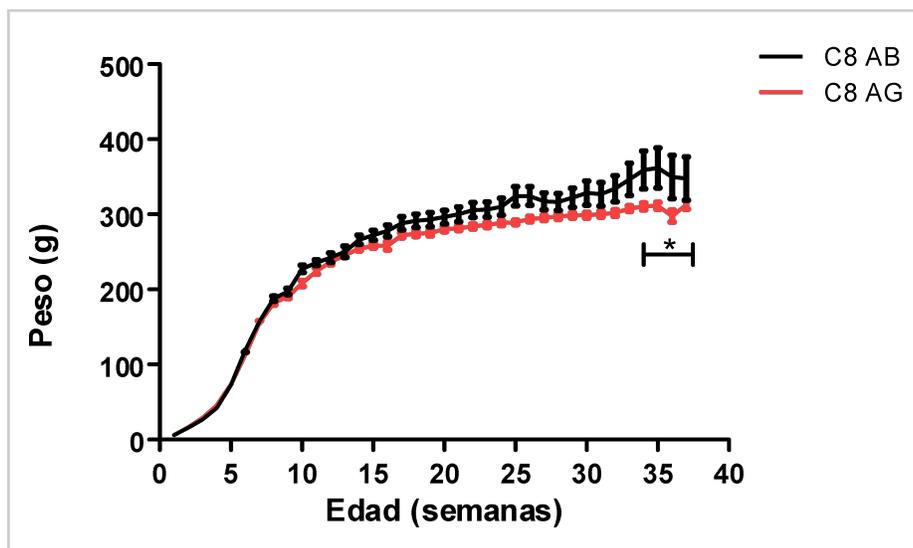
El alimento fue pesado y colocado, en la parte superior de jaulas estándar de acero inoxidable. Después de 24 h se registró la cantidad de alimento restante, incluyendo cualquier pellet en el fondo de las jaulas. La ingesta se calculó como el peso (en gramos) de los alimentos proporcionados menos los recuperados. El consumo fue menor en aquellos animales que ingirieron alimento graso con respecto a los que consumieron alimento estándar, esta diferencia se tornó significativa en las semanas 29, 30 y 31 de vida ( $p < 0,05$ ; Fig VII.2).



**Fig VII.2 Consumo de las dietas estándar y suplementadas con grasa.** El tipo de alimento administrado modificó la ingesta, generando un consumo inferior en los animales que se alimentaron con una dieta rica en grasa (C8 AG) con respecto a los que consumieron alimento balanceado (C8 AB). Esta diferencia de consumo fue significativa desde la semana 29 a la 31 (\*  $p < 0,05$ ). Los valores representan las media  $\pm$  SEM de 14-16 animales por grupo. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA II.

### Peso corporal

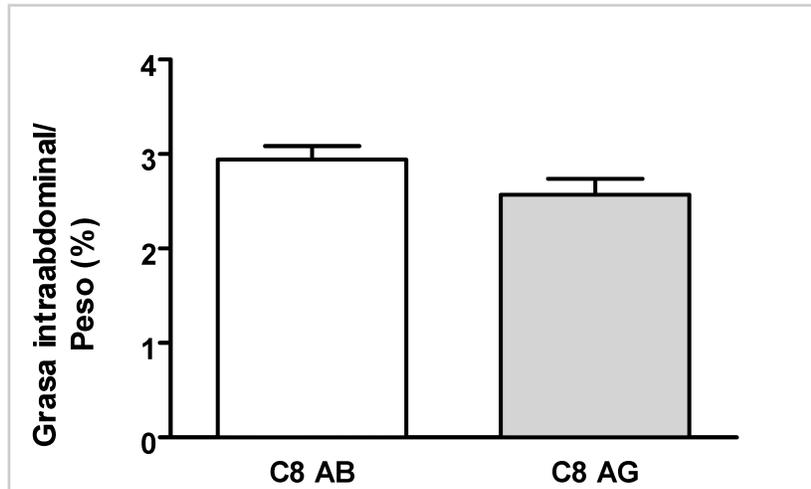
Los animales fueron pesados tres veces por semana a fin de elaborar sus curvas de crecimiento. La figura VII.3 muestra que los animales que consumieron alimento graso aumentaron menos de peso a lo largo de su crecimiento y desarrollo con respecto a los animales que ingirieron alimento estándar. Estos datos coinciden con la menor ingesta observada en dicho grupo.



**Fig VII.3** Peso corporal semanal de ratas que reciben dietas estándar y suplementadas con grasa. La dieta grasa (C8 AG) disminuyó el peso corporal medio de los animales, en comparación con la dieta estándar (C8 AB). Esta disminución del peso fue significativa a partir de la semana 34 de vida (\*  $p < 0,05$ ). Los valores representan las media  $\pm$  SEM de 14-16 animales por grupo cada grupo. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVAII.

### Masa grasa intraabdominal

La grasa intraabdominal fue extraída en el momento del sacrificio de los animales. Su peso se expresó como porcentaje del peso corporal y se utiliza para medir la composición corporal en ratas (Lopez-Fontana et al., 2013). La composición corporal es considerada bicompartimental: masa libre de grasa y masa grasa. Por lo tanto, la relación de los gramos de grasa intraabdominal y el peso total del animal permite estimar el porcentaje de masa grasa corporal. El porcentaje de grasa abdominal no mostró diferencias entre C8 AB y C8 AG (Fig VII.4).

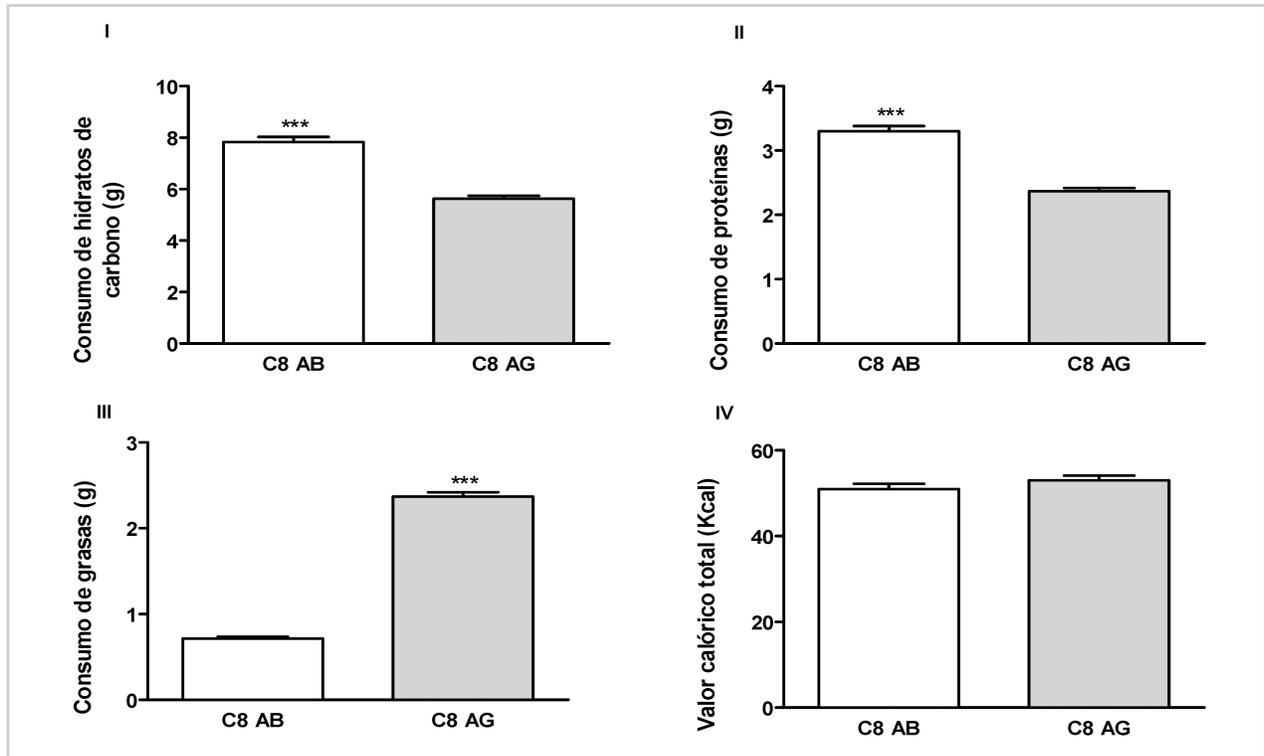


**Fig VII.4 Porcentaje de masa grasa intraabdominal.** No se encontraron diferencias significativas en la masa grasa intraabdominal entre los grupos estudiados. Los valores representan el peso del tejido graso expresado como porcentaje del peso corporal de 14-16 animales / grupo. Los datos fueron analizados por Kolmogorov-Smirnov, y posteriormente se realizó el test de Student.

### Consumo de macronutrientes y calorías totales

Debido a la disminución de la ingesta y a la menor ganancia de peso observada en los animales que mantuvieron una dieta con alto contenido en grasa, quisimos identificar el contenido final de macronutrientes y el valor calórico total consumidos diariamente por cada animal en ambos grupos. Las figuras VII.5.I y II muestran un mayor consumo de hidratos de carbono y proteínas en C8 AB con respecto a C8 AG ( $p < 0,001$ ). Además, pudimos observar una ingesta aumentada de grasas en C8 AG vs C8 AB ( $p < 0,001$ ), corroborando de esta manera nuestra dieta experimental (Fig VII.5.III). Al analizar las calorías totales consumidas por animal, observamos que se mantienen similares en ambos grupos de estudio (Fig VII.5.IV). Esto se debe a que las calorías provenientes de las grasas en el alimento enriquecido con grasa son compensadas por las calorías provenientes de los hidratos de carbono y las proteínas en el alimento balanceado.

La mayor ganancia de peso observada anteriormente en el grupo C8 AB (Fig VII.3) podría ser atribuida al mayor consumo proteico; ya que una de las principales funciones de las proteínas es favorecer el crecimiento de los tejidos corporales.

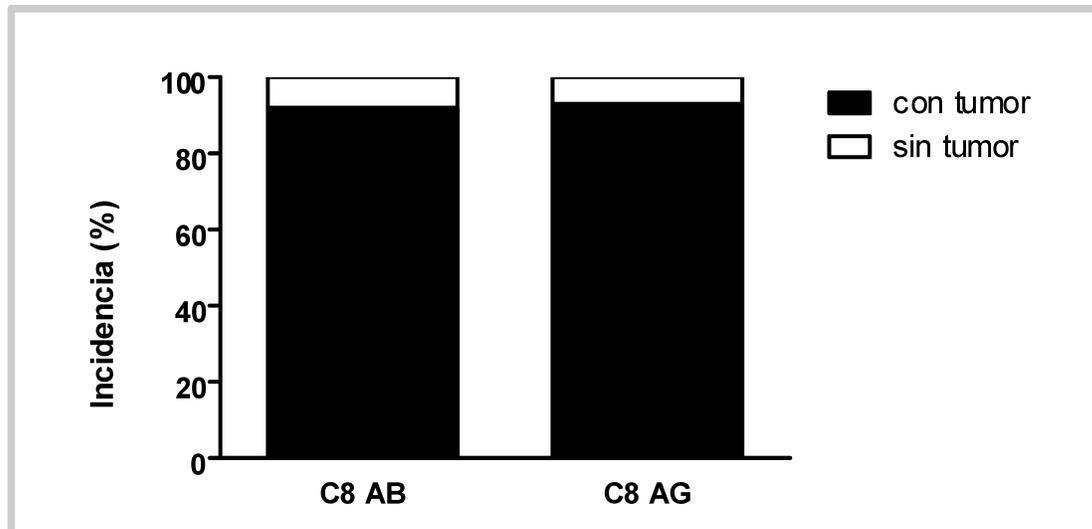


**Fig VII.5 Consumo de macronutrientes y calorías.** I) El consumo de hidratos de carbono por animal por día fue mayor en C8 AB vs C8 AG (\*\**p* < 0,001). II) Los animales C8 AB tuvieron un mayor consumo diario de proteínas por animal, con respecto a las animales C8 AG (\*\**p* < 0,001). III) El consumo diario de grasa por animal, estuvo aumentado en C8 AG en comparación con C8 AB (\*\**p* < 0,001). IV) El consumo de calorías totales por rata por día fue similar en ambos grupos experimentales. Los valores representan las media  $\pm$  SEM de cada grupo. Los valores representan los promedios de consumo de 14-16 animales por grupo. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba de T Student para muestras independientes.

### La dieta grasa no modifica la incidencia tumoral

Con el objetivo de estudiar la influencia de la dieta grasa sobre el desarrollo de tumores de mama, se procedió a analizar el porcentaje de ratas que presentaron tumores dentro del período

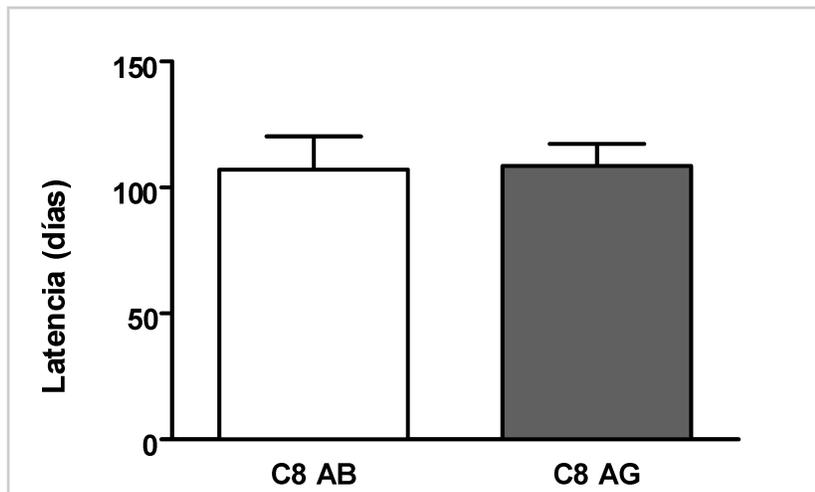
estudiado ante una dieta estándar *versus* una dieta rica en grasa. La incidencia tumoral fue del 93% en ambos grupos. Esto demuestra que no existen diferencias en la incidencia tumoral inducida por DMBA entre las diferentes camadas de animales estudiados (Fig VII.6).



**Fig VII.6 Influencia de la dieta grasa en la incidencia tumoral.** No se observaron diferencias en la incidencia de cáncer mamario entre los animales que mantuvieron una dieta rica en grasa (C8 AG) y los animales que consumieron alimento balanceado (C8 AB). La incidencia se expresó como porcentajes de ratas que desarrollaron tumor de un total de 14-16 animales por grupo. Los datos se compararon mediante la prueba de Fisher.

### **La dieta grasa no modifica la latencia tumoral**

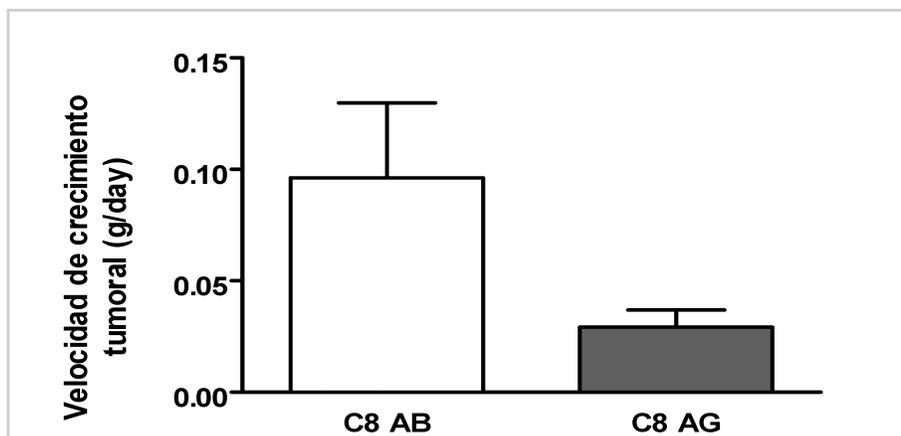
El tiempo transcurrido desde la administración del carcinógeno DMBA y la aparición del primer tumor palpable, fue similar entre los animales que consumieron alimento balanceado y aquellos que consumieron alimento graso (Fig.VII.7). El periodo de latencia para ambos grupos fue diferente para cada animal, y se observó desde el día 53 y hasta el día 165 posteriores a la administración del cancerígeno.



**Fig VII.7 Influencia de la dieta grasa en la latencia tumoral.** No se observaron diferencias en la latencia tumoral mamaria entre los animales que consumieron una dieta rica en grasas (C8 AG) y los animales que consumieron alimento balanceado (C8 AB). Los valores representan las media  $\pm$  SEM de 14-16 animales por grupo. La comparación se realizó mediante la prueba de T Student para muestras independientes.

### **Los tumores provenientes de ratas que consumen una dieta grasa no crecen más rápido**

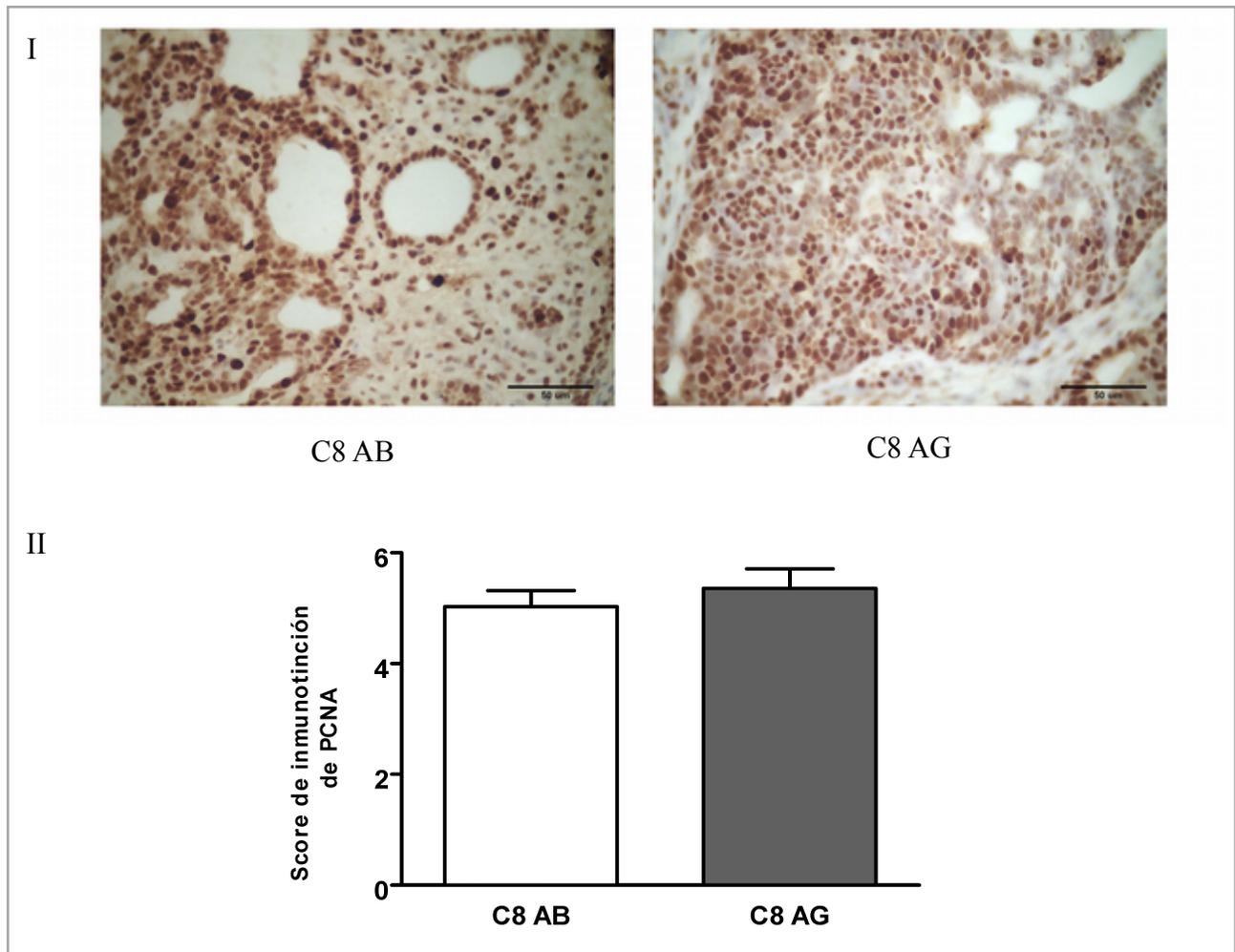
Otro de los parámetros analizados fue la velocidad de crecimiento tumoral, la cual se expresó en g/día y fue calculada a partir de la relación entre el peso tumoral final y la diferencia en días desde la detección del tumor y el sacrificio del animal. No se encontraron diferencias en la velocidad de crecimiento tumoral entre tumores de animales C8 AB y C8 AG. Los resultados se muestran en la figura VII.8.



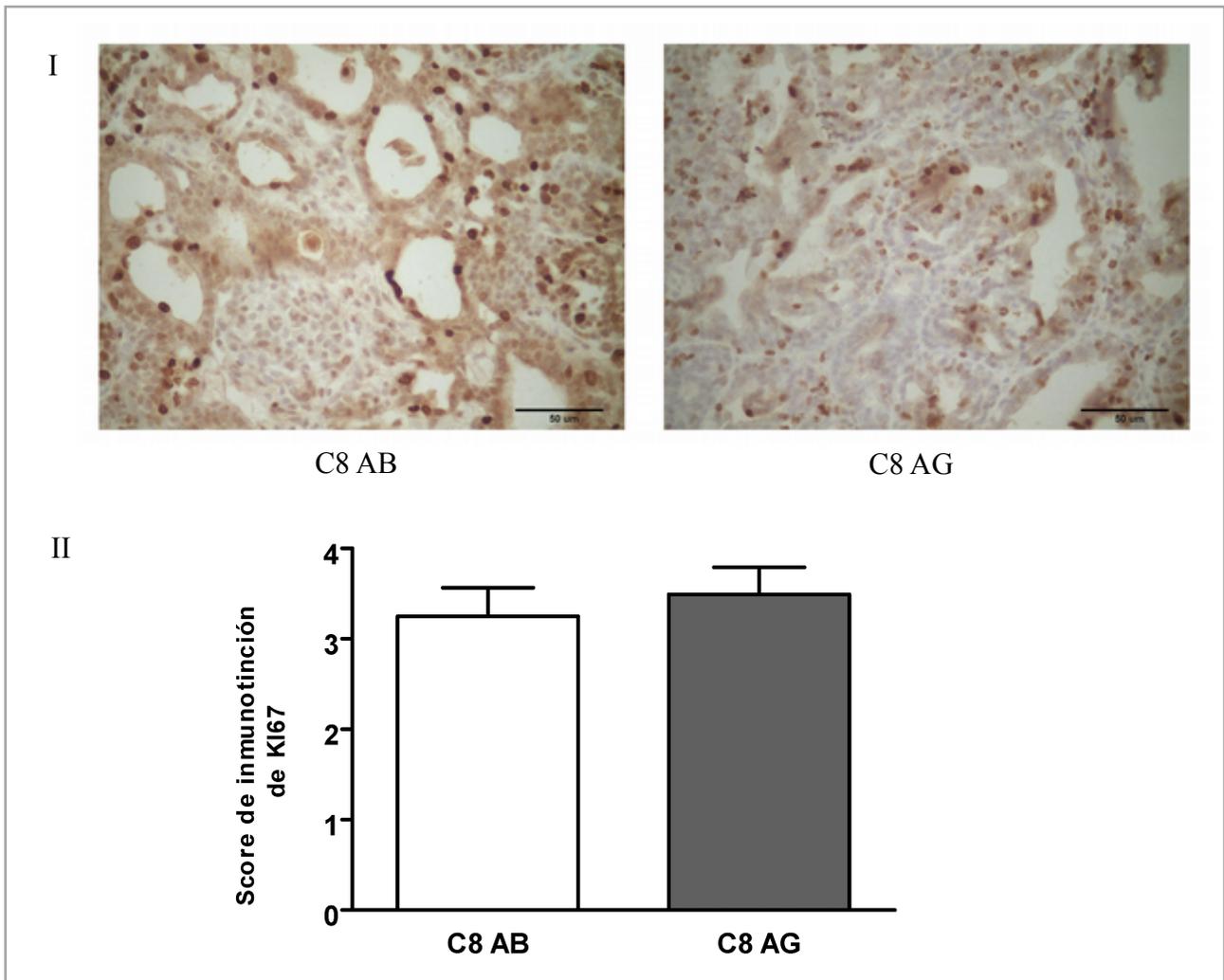
**Fig VII.8 Influencia de la dieta grasa en la velocidad de crecimiento tumoral.** No se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento tumoral entre animales alimentados con dieta balanceada y dieta grasa. Los valores representan las media  $\pm$  SEM de 14-16 animales por grupo. La comparación se realizó mediante la prueba no paramétrica U de Mann Whitney.

### **El consumo de una dieta con alto contenido en grasas no modifica la proliferación tumoral**

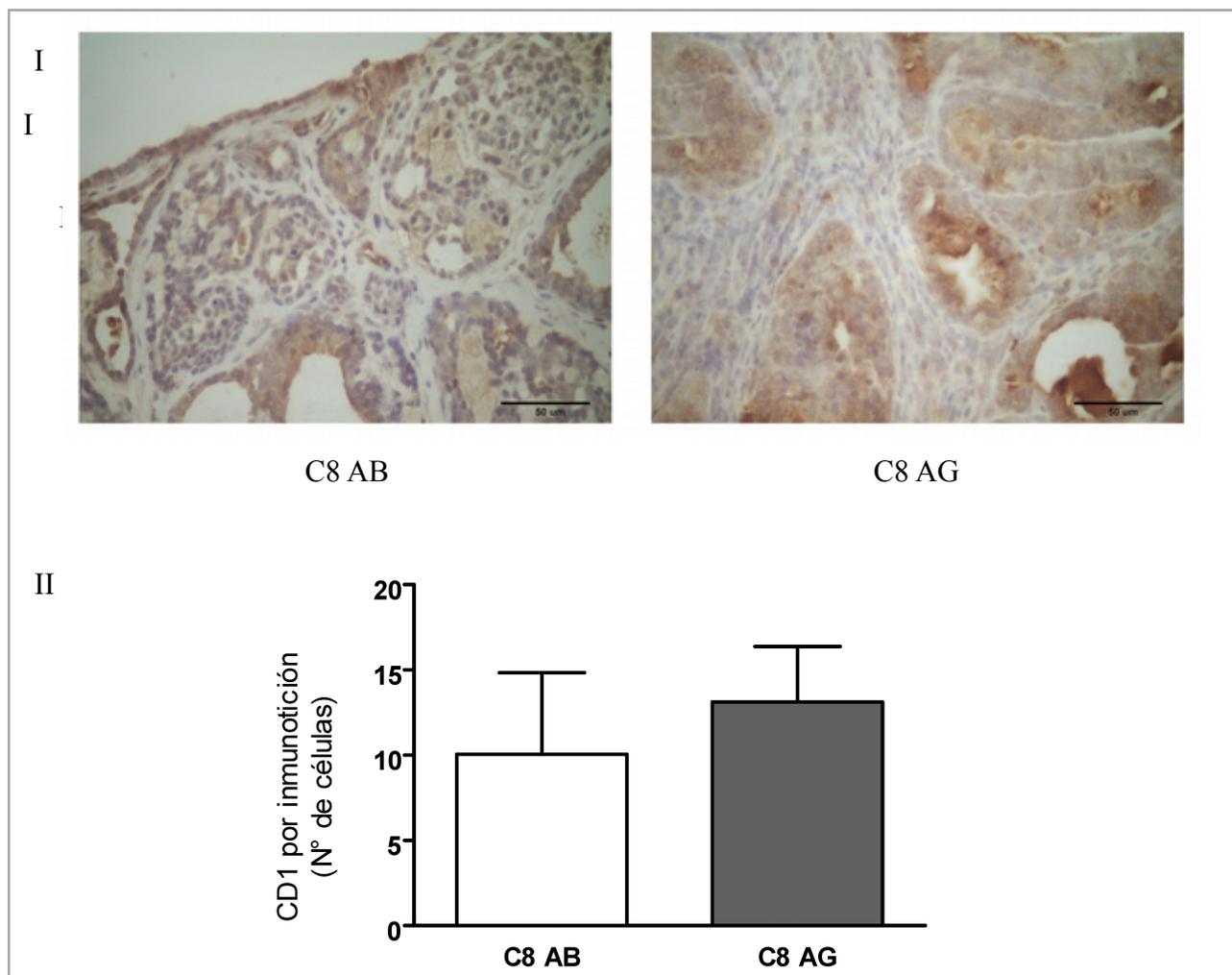
La proliferación tumoral es una variable de gran relevancia en la fase de promoción de la carcinogénesis mamaria; ya que, durante esta etapa, las células iniciadas son susceptibles a los efectos promotores de factores exógenos como la ingesta de grasas. Por ello, se estudiaron los marcadores de proliferación PCNA, Ki67 y CD1 por IHQ. No se encontraron diferencias en la expresión tumoral de PCNA, Ki67 y CD1 entre animales alimentados con dieta balanceada y dieta grasa. Los resultados se presentan en la figura VII.9, VII.10 y VII.11.



**Fig VII.9 Expresión de PCNA en los tumores de mama según las diferentes dietas.** No se observaron diferencias en la expresión tumoral de PCNA por la técnica de IHQ entre los animales alimentados con alimento balanceado (C8 AB) y alimento enriquecido en grasa (C8 GR). I) Microfotografías representativas (400 x) de IHQ de PCNA de tumores provenientes de ratas tratadas con dieta balanceada comparado con dieta grasa. II) Score de inmunotinción para PCNA considerando la suma de la proporción (<10 % de células positivas= 1, del 10 al 33 %= 2, 34-65 %= 3, >66 %= 4) y la intensidad de la tinción (baja=1, media=2 y fuerte=3). Los valores representan las media  $\pm$  SEM de cada grupo. La comparación se realizó mediante la prueba de T Student para muestras independientes.



**Fig.VII.10 Expresión de Ki67 en los tumores de mama según las diferentes dietas.** No se observaron diferencias en la expresión tumoral de Ki67 por IHQ entre los animales C8 AB y C8 AG. I) Microfotografías representativas (400 x) de inmunohistoquímica de Ki67 de tumores provenientes de C8 AB comparado C8 AG.. II) Score de inmunotinción para Ki67 considerando la suma de la proporción (<10 % de células positivas= 1, del 10 al 33 %= 2, 34-65 %= 3, >66 %= 4) y más la intensidad de la tinción (baja=1, media=2 y fuerte=3). Los valores representan las media  $\pm$  SEM de cada grupo. La comparación se realizó mediante la prueba no paramétrica de U Mann Whitney.



**Fig.VII.11 Expresión de CD1 en los tumores de mama según las diferentes dietas.** La expresión de este marcador de proliferación fue evaluada por la técnica de IHQ. No se observaron diferencias en la expresión tumoral de CD1 entre los animales alimentados con alimento balanceado (C8 AB) y alimento enriquecido en grasa (C8 AG). I) Microfotografías representativas (400 x) de inmunohistoquímica de CD1 de tumores provenientes de C8 AB comparado C8 AG. Se expresaron los resultados como porcentaje de células positivas para CD1. II) Los valores representan las media  $\pm$  SEM de cada grupo. La comparación se realizó mediante la prueba no paramétrica de U Mann Whitney.

## **CAPÍTULO VIII**

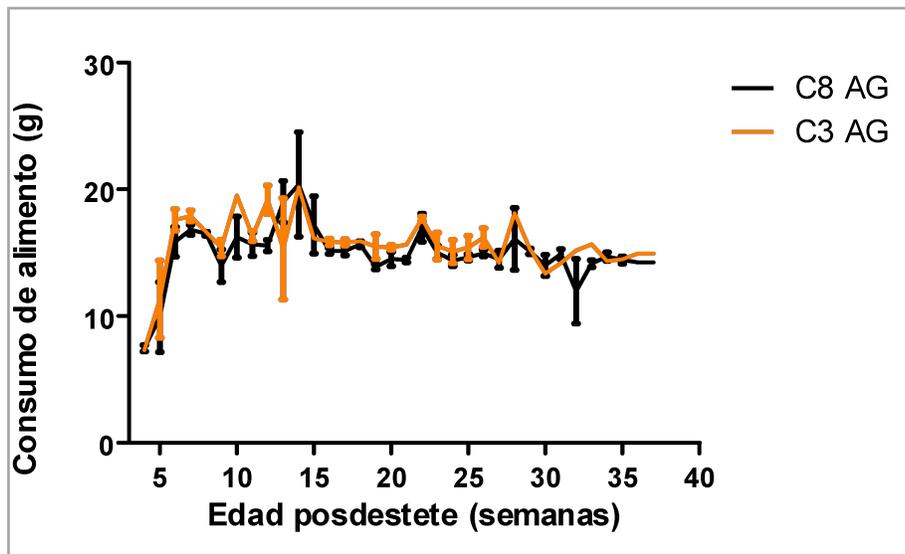
### **RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°3**

Objetivo específico N°3: Analizar en las crías si una lactancia óptima influye sobre el impacto de la dieta grasa en la carcinogénesis mamaria.

Al analizar los resultados obtenidos en los objetivos 1 y 2, pudimos observar la correlación negativa entre la lactancia materna y el desarrollo de cáncer mamario, y, demostrar que, el consumo de grasas saturadas no se correlaciona con un aumento del cáncer mamario. A partir de dicha información, quisimos analizar si la menor incidencia observada en los animales que mantuvieron una lactancia óptima podía verse influenciada por un consumo elevado de grasas saturadas. Para ello se utilizaron ratas hembras Sprague Dawley que al día uno de vida se separaron en camadas de 3 y 8 crías por madre a fin de generar un mayor y menor consumo de leche materna, respectivamente. Al día 21 de vida, todos los animales fueron destetados y alimentados con una dieta con alto contenido en grasas saturadas (40% del valor calórico total en forma de grasas). Al día 55 de vida, se administró una única dosis de DMBA y a partir de allí se realizó el seguimiento de los animales a fin de evaluar el desarrollo tumoral ante el consumo de grasas saturadas, en animales que fueron diferencialmente amantados.

#### **Consumo alimentario**

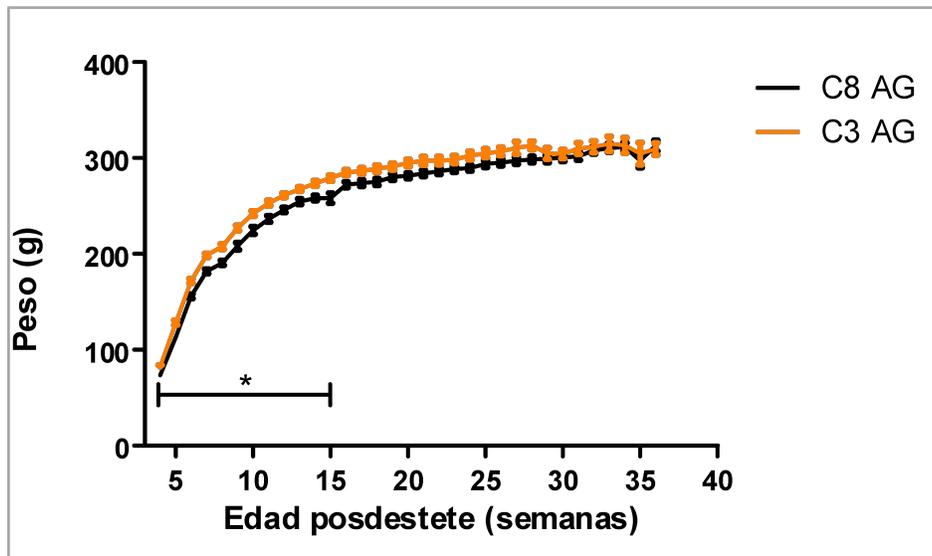
La ingesta, calculada como el peso (en gramos) de los alimentos proporcionados menos los recuperados, no mostró diferencias entre los animales criados en camada de 3 (C3 AG) y los criados en camada de 8 (C8 AG), a lo largo del tiempo (Fig VIII.1). El consumo de alimento fue evaluado tal como se describe en el capítulo anterior.



**Fig VIII.1 Consumo de alimento suplementado con grasa en animales amantados diferencialmente.** El tipo de alimento proporcionado no modificó la ingesta, entre los animales que se fueron amantados en camadas de 3 (C3 AG) y camadas de 8 (C8 AG) crías por madre. Los valores representan las media  $\pm$  SEM de 14-16 animales por grupo. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA II.

### Peso corporal

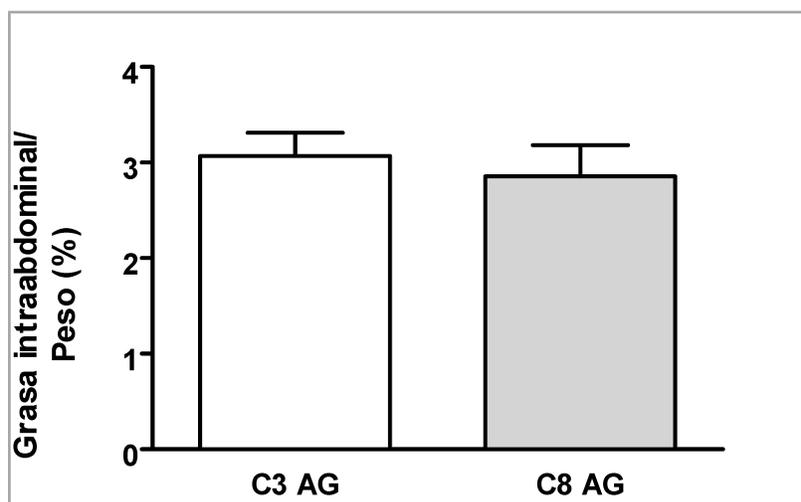
Las crías fueron pesadas tres veces por semana a fin de elaborar sus curvas de crecimiento. La figura VIII.2 muestra un mayor aumento de peso en los animales que fueron criados en camadas de 3 hasta la semana 15 de vida ( $p < 0,05$ ) con respecto a los criados en camadas de 8. Esto se debe a que durante la lactancia, los animales C3 tienen un aumento de peso mayor que los C8 (Capítulo VI, FigVI.1.I); y esta diferencia se mantiene aún durante el periodo posdestete. El consumo de una dieta rica en grasas, genera que la variación de peso observada entre ambos grupos experimentales desaparezca, igualándose los pesos, después de la semana 15 de vida y hasta la finalización del experimento.



**Fig VIII.2** Peso corporal semanal postdestete de ratas amamantadas diferencialmente, que posteriormente reciben dieta suplementada con grasa. Las crías de camada de (C3 AG) presentan un mayor peso con respecto a las crías de camada de 8 (C8 AG) durante las semanas 4 a 15 de vida (\*  $p < 0,05$ ). A partir de la semana 15 de edad no se observan diferencias en los pesos entre C3 AG y C8 AG. Los valores representan las media  $\pm$  SEM de 14-16 animales por grupo. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVAII.

### Masa grasa intraabdominal

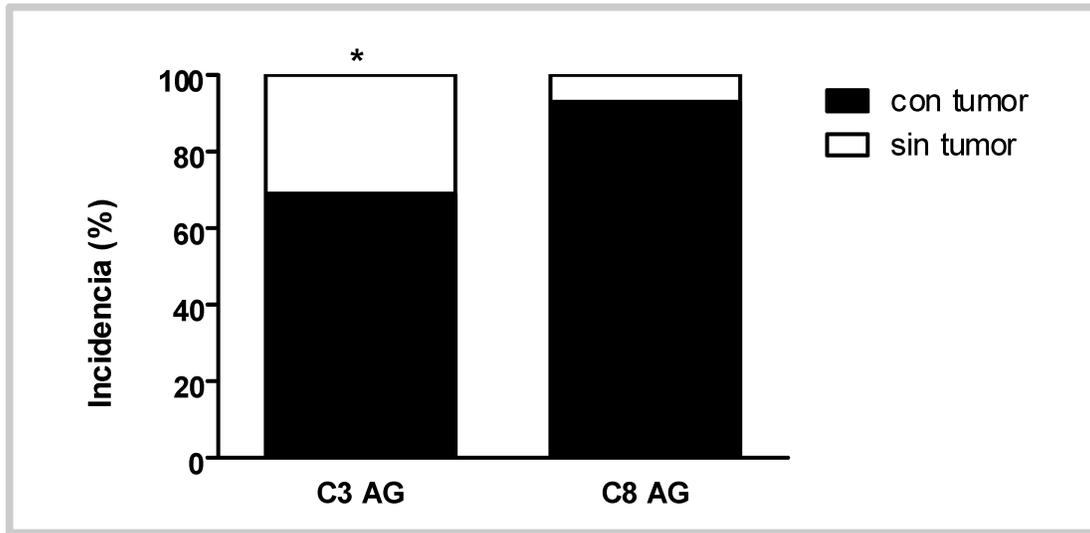
La masa grasa intraabdominal fue extraída al momento del sacrificio de los animales y fue expresada como un porcentaje del peso corporal. El porcentaje de grasa abdominal fue similar en los grupos experimentales estudiados (Fig VIII.3).



**Fig VIII.3 Porcentaje de masa grasa intraabdominal.** No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de masa grasa intraabdominal entre C3 AG y C8 AG. Los valores representan el peso del tejido graso expresado como porcentaje del peso corporal de 14-16 animales / grupo. La comparación se realizó mediante la prueba de T Student para muestras independientes.

### **La lactancia materna óptima disminuye la incidencia tumoral ante una dieta grasa**

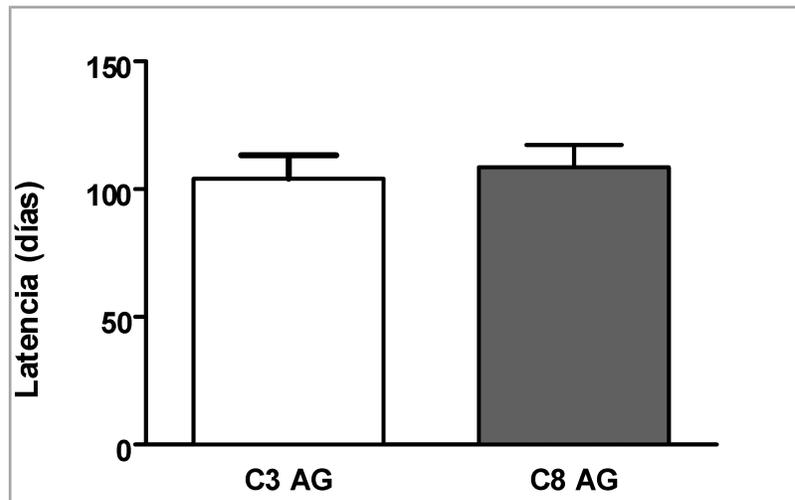
Con el objetivo de estudiar si la menor incidencia de cáncer mamario observada en animales con lactancia óptima, podía verse influenciada por el alto consumo de grasas saturadas (consideradas un promotor tumoral), se procedió a analizar el porcentaje de ratas que generaron tumores dentro del período estudiado. Los resultados obtenidos muestran que la lactancia materna apropiada protege frente al desarrollo de cáncer de mama en la vida adulta, aún cuando son expuestos a un elevado consumo de grasas saturadas. (Fig VIII.4)



**Fig VIII.4 Influencia de la lactancia materna óptima en la incidencia tumoral ante una dieta grasa.** La incidencia de cáncer mamario en animales que mantuvieron una dieta rica en grasa disminuyó en aquellos grupos que recibieron una lactancia óptima durante su vida posnatal (\*  $p < 0,05$ ). La incidencia se expresó como porcentajes de ratas que desarrollaron tumor de un total de 14-16 animales por grupo. Los datos se compararon mediante la prueba de Fisher.

### **La lactancia materna óptima no modifica la latencia tumoral ante una dieta grasa**

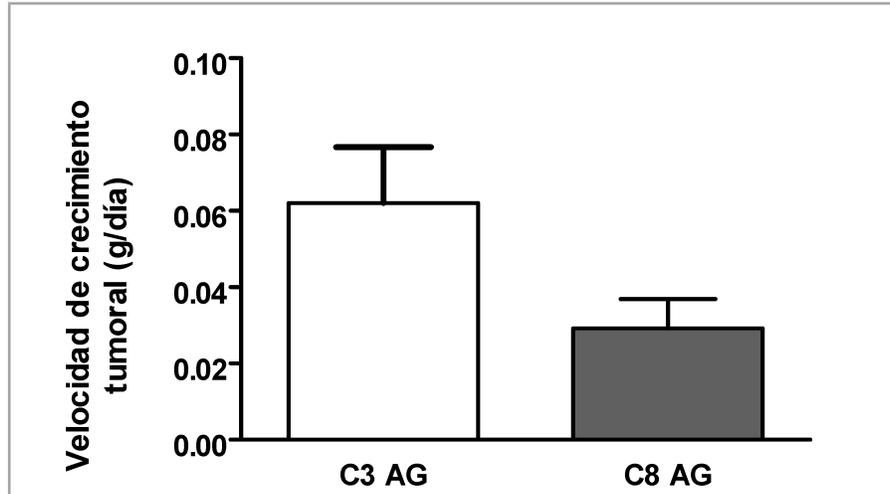
El tiempo transcurrido desde la administración del carcinógeno DMBA y la aparición del primer tumor palpable no fue modificado por una lactancia materna óptima frente a la constante influencia de una alimentación con alto contenido de grasas (Fig VIII.5).



**Fig VIII.5 Influencia de la lactancia materna óptima en la latencia tumoral ante una dieta grasa.** No se observaron diferencias en la latencia tumoral mamaria ante el consumo de una dieta con alto contenido en grasas entre animales C3 vs C8. Los valores representan las media  $\pm$  SEM de 14-16 animales por grupo. La comparación se realizó mediante la prueba de T Student para muestras independientes.

### **La lactancia materna óptima no modifica el crecimiento tumoral ante una dieta grasa**

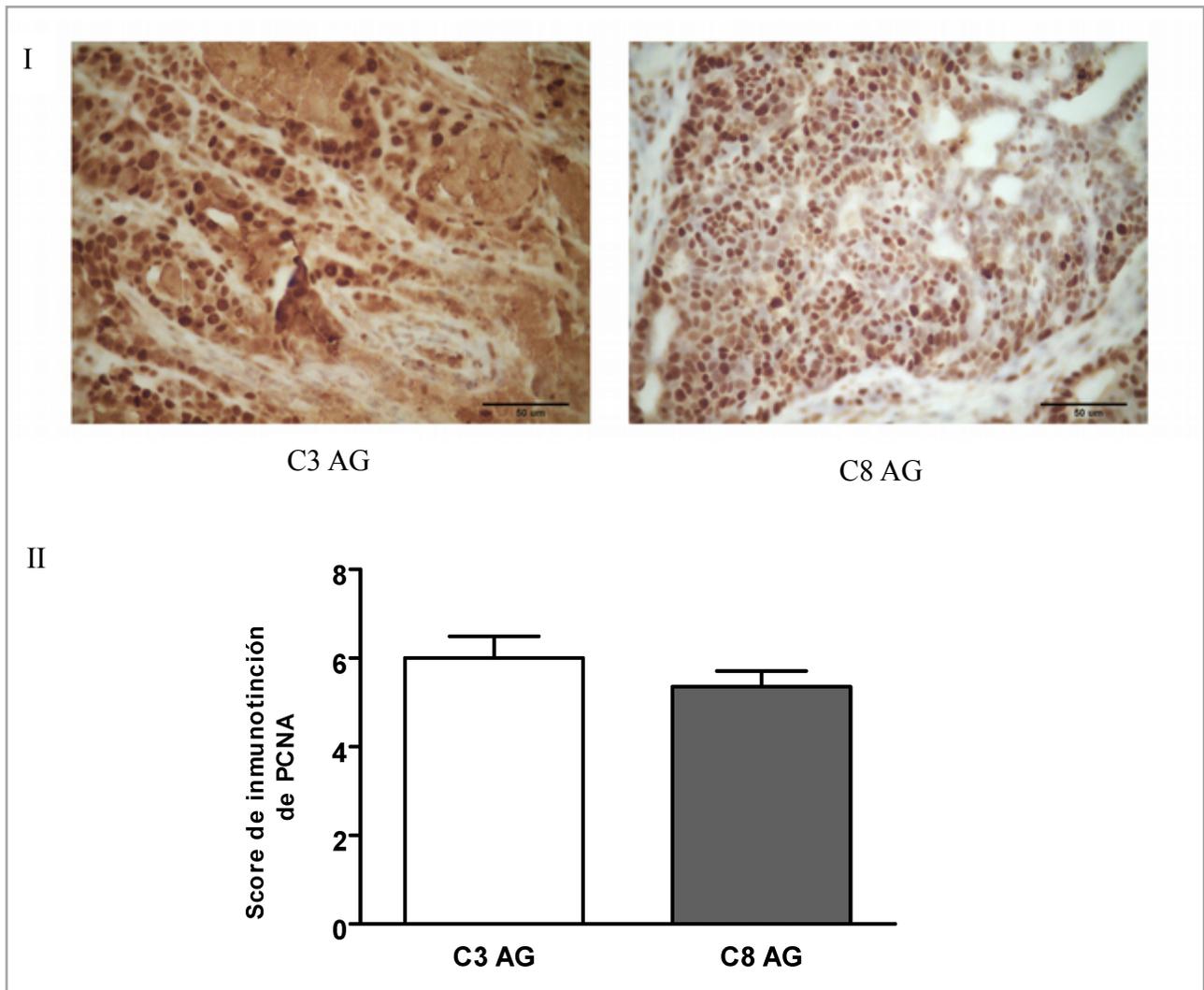
La velocidad de crecimiento tumoral fue estudiada y expresada en g/día. La lactancia materna diferencial no modificó significativamente la velocidad de crecimiento de los tumores en presencia de un estímulo promotor como la dieta rica en grasas (Figura VIII.6). Sin embargo el grupo C3 AG muestra una tendencia a tener mayor velocidad de crecimiento con respecto al grupo C8 AG.



**Fig VIII.6 Influencia de la lactancia materna óptima en el crecimiento tumoral ante una dieta grasa.** La velocidad de crecimiento tumoral fue similar en animales alimentados con una dieta grasa criados en camada de 3 *versus* los criados en camadas de 8 crías por madre. Los valores representan las media  $\pm$  SEM de 14-16 animales por grupo. La comparación se realizó mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney.

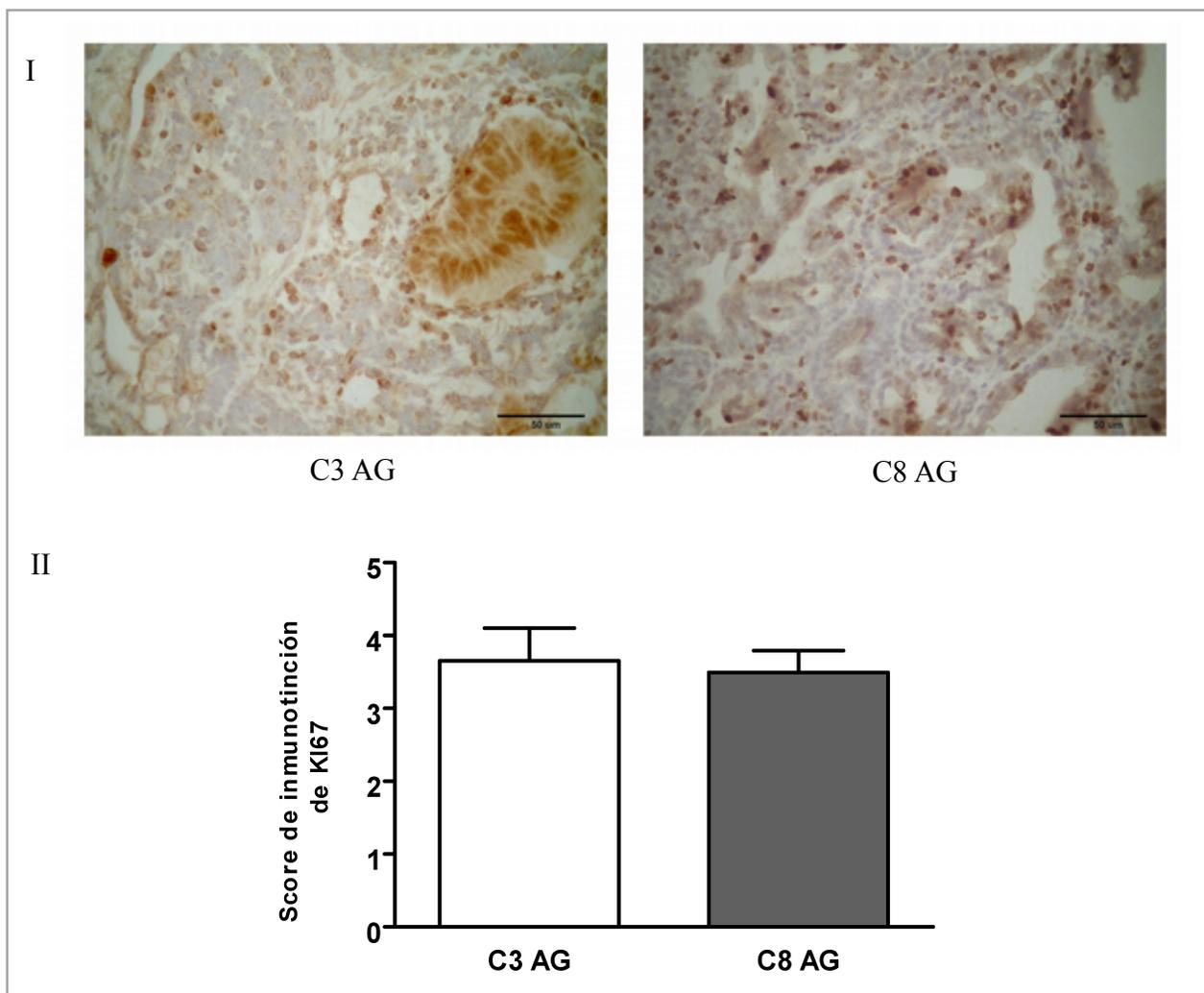
### **La lactancia materna óptima no modifica la proliferación tumoral ante una dieta grasa**

La tendencia observada en la velocidad de crecimiento tumoral, nos llevó a profundizar el efecto del consumo de grasas sobre la proliferación tumoral, en animales con lactancia diferencial. Para ello se analizaron los marcadores PCNA, Ki67 y CD1 por IHQ. No se observaron cambios en la expresión de PCNA (Figura VIII.7), Ki67 (Figura VIII.8) y CD1 (Figura VIII.9) entre ambos grupos de estudio.



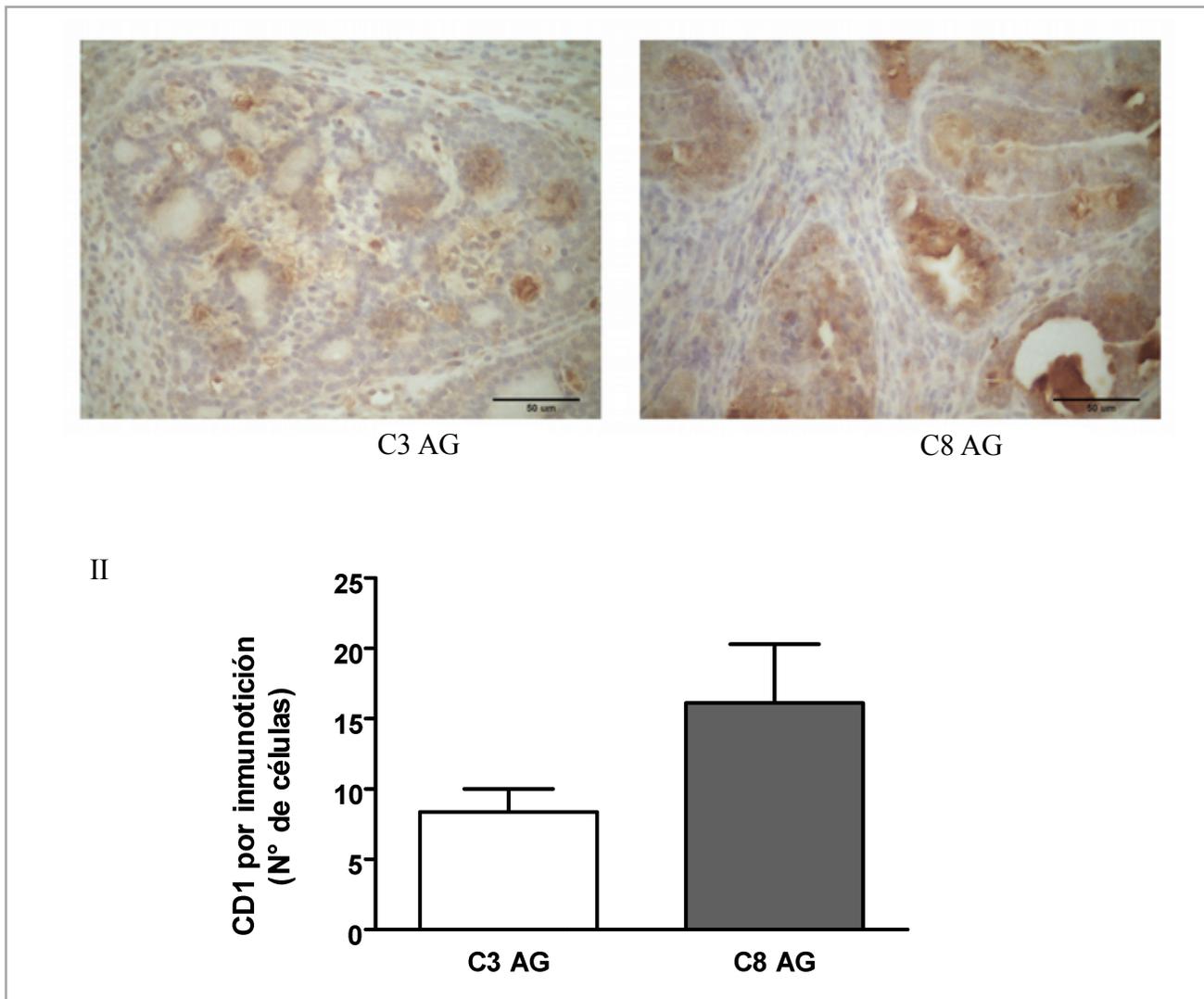
**Fig VIII.7 Expresión de PCNA en tumores de mama ante una dieta grasa y consumo diferencial de leche materna.**

La expresión de este marcador de proliferación no mostró diferencias significativas entre las camadas al ser evaluada por la técnica de IHQ. I) Microfotografías representativas (400 x) de inmunohistoquímica de PCNA de tumores provenientes de camadas de 3 (C3 AG) comparado con los de camada de 8 (C8 AG). II) Score de inmunotinción para PCNA considerando la suma de la proporción (<10 % de células positivas= 1, del 10 al 33 %= 2, 34-65 %= 3, >66 %= 4) y la intensidad de la tinción (baja=1, media=2 y fuerte=3). Los valores representan las media  $\pm$  SEM de cada grupo. La comparación se realizó mediante la prueba no paramétrica de U Mann Whitney.



**Fig VIII.8. Expresión de Ki67 en tumores de mama ante una dieta grasa y diferentes consumos de leche materna.**

La expresión de este marcador de proliferación fue evaluada por la técnica de IHQ. I) Microfotografías representativas (400 x) de inmunohistoquímica de Ki67 de tumores provenientes de la camada de 3 (C3 AG) comparado con los de 8 (C8 AG). II) Score de inmunotinción para Ki67 considerando la suma de la proporción (<10 % de células positivas= 1, del 10 al 33 %= 2, 34-65 %= 3, >66 %= 4) y la intensidad de la tinción (baja=1, media=2 y fuerte=3). Los valores representan las media ± SEM de cada grupo. La comparación se realizó mediante la prueba no paramétrica de U Mann Whitney.



**Fig VIII.9 Expresión de CD1 en tumores de mama ante una dieta grasa y diferentes consumos de leche materna.** La expresión de este marcador de CD1 fue evaluada por la técnica de IHQ. I) Microfotografías representativas (400 x) de inmunohistoquímica de CD1 de tumores provenientes de camadas de 3 (C3 AG) comparado con los de camada de 8 (C8 AG). II) Se expresaron los resultados como porcentaje de células positivas para CD1. Los valores representan las media  $\pm$  SEM de cada grupo. La comparación se realizó mediante la prueba de T Student para muestras independientes.

## **CAPÍTULO IX**

### **RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°4**

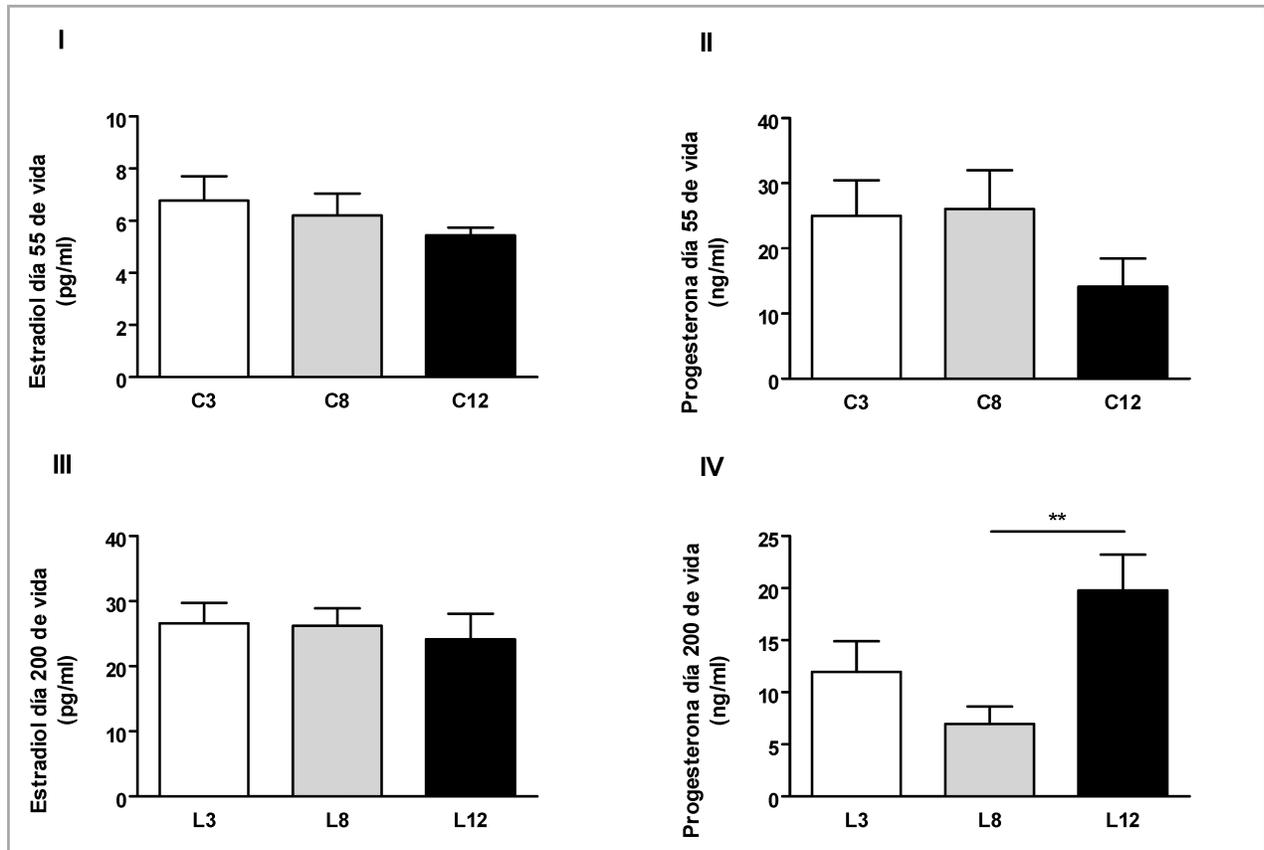
Objetivo específico N°4: Analizar en la progenie si el efecto de una adecuada lactancia está asociada con alteraciones de factores endógenos, y cambios en la proliferación y apoptosis en los tumores mamarios de las ratas.

Del análisis de los resultados obtenidos en el objetivo 1, 2 y 3, surge la conclusión de que la lactancia materna provoca una disminución de la incidencia de cáncer de mama, aún cuando son expuestos crónicamente a una dieta alta en grasas saturadas. Con el fin de dilucidar los mecanismos implicados en la menor carcinogénesis mamaria provocada por la lactancia, procedimos a estudiar la concentración hormonal y la biología tumoral. Dicho estudio se llevó a cabo en ratas criadas en camadas de 3, 8 y 12 crías por madre, a fin de tener diferentes niveles de lactancia materna y a las que se les administró el cancerígeno mamario DMBA en el día 55 de vida. Estos animales recibieron una dieta balanceada a partir de su destete.

#### **Concentración Hormonal**

Está ampliamente demostrado que una exposición aumentada a estradiol durante la vida de la mujer aumenta su riesgo de padecer cáncer de mama. Sin embargo, el rol de la progesterona en la tumorigénesis inducida por carcinógenos no se ha estudiado tan extensamente como el rol del estradiol. La importancia de la progesterona en el desarrollo tumoral mamario utilizando roedores ovariectomizados no está claro)(Stires, Saboya, Globerman, & Cohick, 2016). Para poder evaluar la influencia hormonal en el desarrollo canceroso, en nuestro modelo animal, se determinaron los niveles séricos de estradiol y progesterona mediante electroquimioluminiscencia de los animales a los 55 y 200 días (Fig IX.1). No se encontraron diferencias en la concentración de estradiol y

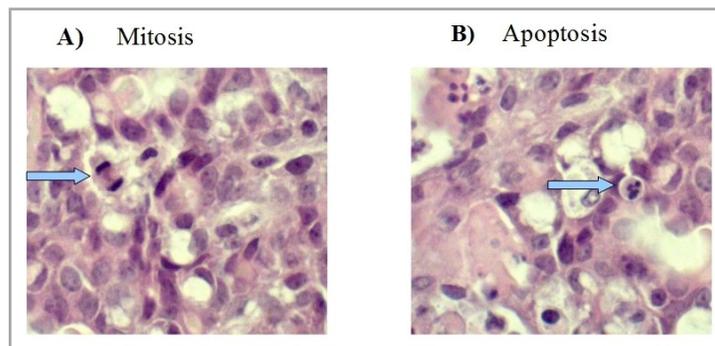
progesterona en el día 55 de vida, momento en el cual se les administra el DMBA. Los animales de 200 días de vida no mostraron diferencias en la concentración de estradiol; aunque la concentración de progesterona se vio aumentada en C12 vs C8 ( $p < 0,01$ ).



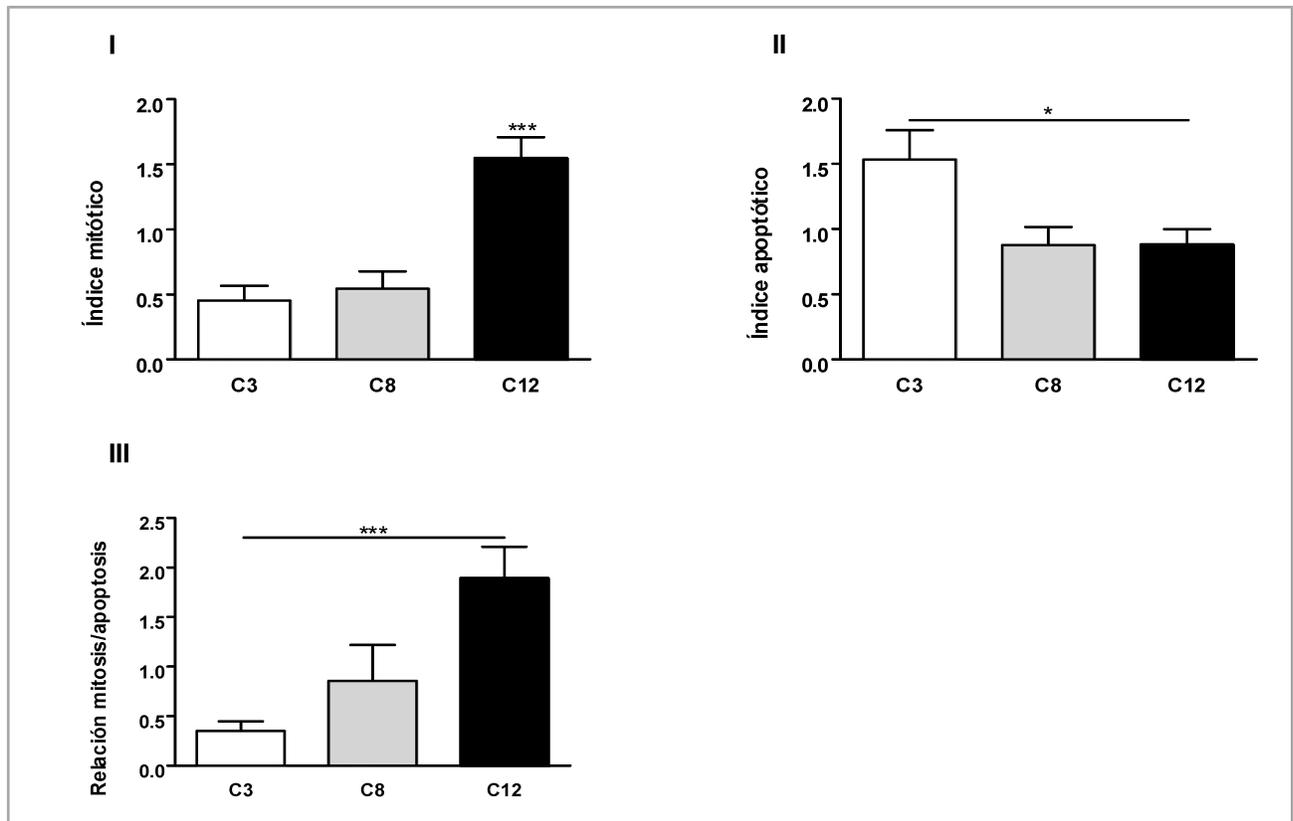
**Fig IX.1 Concentración de estradiol y progesterona.** I) No se encontraron diferencias en la concentración de estradiol en el día 55 de vida entre los diferentes grupos. II) No se encontraron diferencias entre C3, C8 y C12 en la concentración de progesterona en el día 55 de vida. III) Los animales de 200 días de vida no mostraron diferencias en la concentración de estradiol. IV) La concentración de progesterona se vio aumentada en C12 vs C8 a los 200 días de vida (\*\* $p < 0,01$ ). Los valores fueron obtenidos a partir de 10-15 muestras por grupo. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA I y prueba de Bonferroni como post hoc.

## Los tumores de animales que recibieron una lactancia óptima presentaron mayor apoptosis y menor mitosis

Para continuar el análisis de la influencia de la lactancia materna sobre la biología tumoral, se determinaron los índices mitótico y apoptótico en los tumores por microscopía óptica con un aumento de 400 x (Fig IX.3). Se observaron diez campos de cortes histológicos de cada tumor (6-19 tumores / grupo) teñidos con H&E. El recuento de las figuras mitóticas y cuerpos apoptóticos fue realizado en doble ciego por dos observadores independientes, evitando campos con necrosis, inflamación o pliegues tisulares; y permitió calcular los índices mitótico y apoptótico, respectivamente. Se estimó la relación mitosis / apoptosis ( $M / A$ ) dividiendo el índice mitótico por el índice apoptótico de cada tumor. Los tumores provenientes de animales criados en camada de 12 (C12) presentaron mayor número de figuras mitóticas ( $p < 0,001$ ) con respecto a los otros grupos. Por su parte, los tumores de camadas de 3 crías (C3), es decir que recibieron una lactancia óptima, mostraron un mayor índice apoptótico comparado con aquellos con lactancia deficiente (C12;  $p < 0,05$ ). Finalmente, la relación  $M/A$  fue significativamente superior en el grupo C12 sugiriendo una mayor proliferación tumoral en dicha camada ( $p < 0,001$ ).



**Fig.IX.2 Microfotografías representativas (600 x) de A) Figura mitótica y B) Cuerpos apoptóticos en cortes histológicos de tumores ductales mamarios teñidos con H&E.**

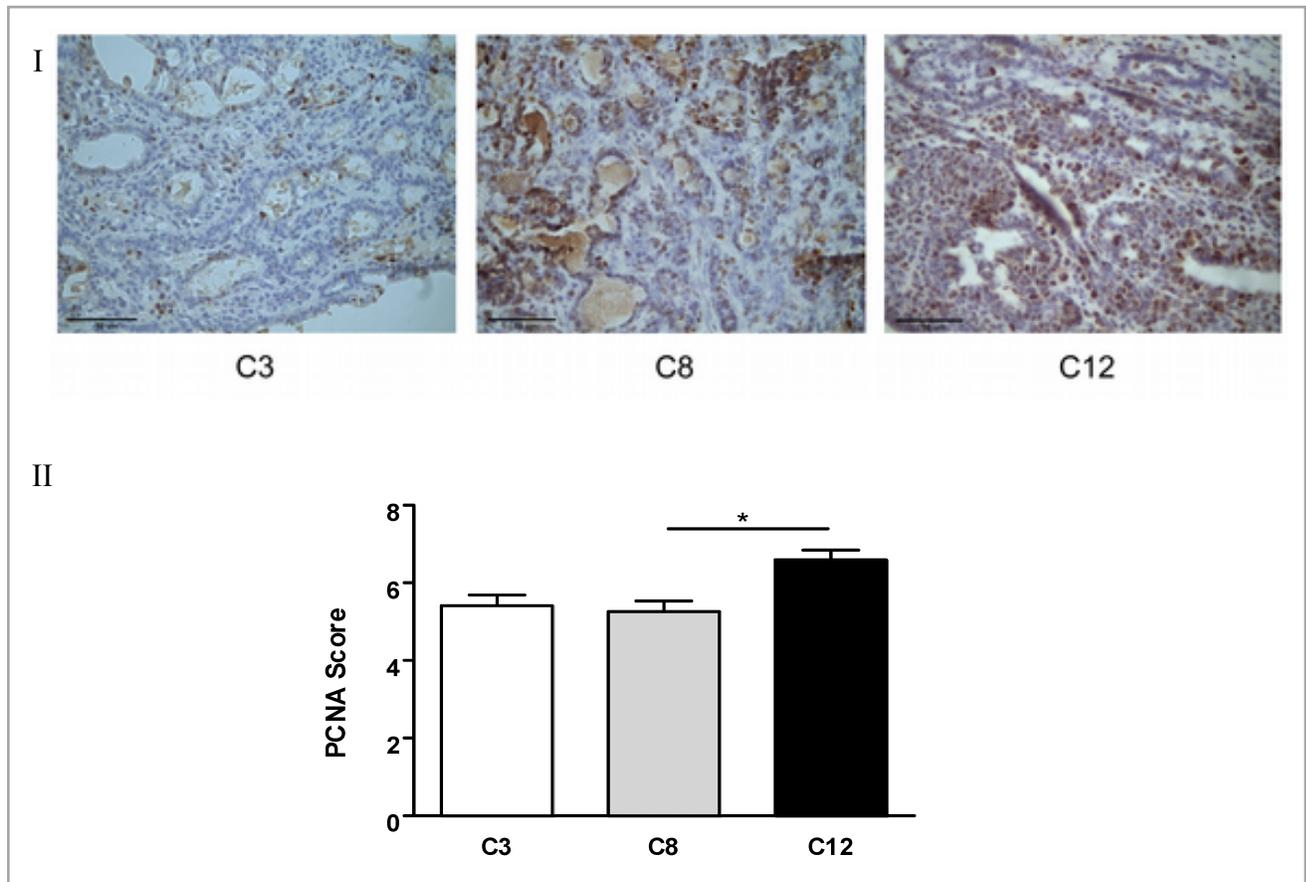


**Fig IX.3 La lactancia óptima modifica la apoptosis y mitosis tumoral.** I) El índice mitótico fue mayor en los tumores de ratas C12 en comparación con los otros grupos (\*\*\*)  $p < 0,001$ . II) El índice apoptótico se incrementó en tumores de C3 en comparación a C12 (\*  $p < 0,05$ ). III) La relación mitosis / apoptosis (M/A) fue significativamente mayor en C12 cuando se comparó con C3 (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 8-10 campos de cada preparación de 6-19 animales / grupo. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA I y prueba de Bonferroni como post hoc.

### Los tumores de animales que recibieron lactancia deficiente presentan mayor expresión de PCNA

Además, con el fin de validar los resultados obtenidos mediante el recuento de las figuras mitóticas, se evaluó la proliferación tumoral mediante la determinación de PCNA por IHQ en los cortes de tumores. Coincidentemente, se observó una mayor expresión de PCNA en los tumores de

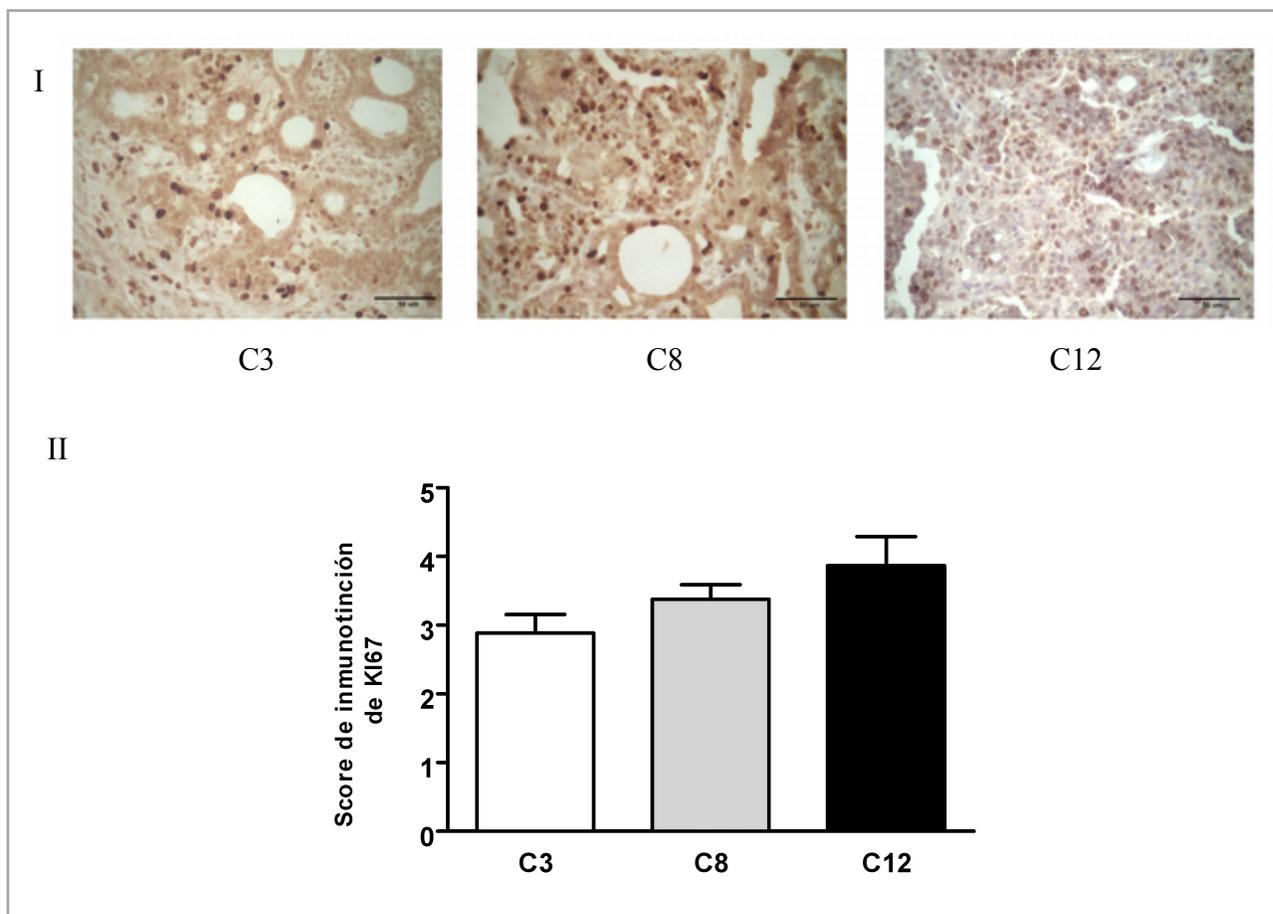
C12 en comparación con los de C8 ( $p < 0,05$ ; Fig IX.4). Esta diferencia no alcanza a ser estadísticamente significativa con respecto al grupo C3.



**Fig IX.4 La lactancia deficiente induce la expresión de PCNA.** I) Microfotografías representativas (400 x) de la expresión de PCNA determinada por IHQ en cortes de tumores provenientes de los grupos C3, C8 y C12. II) La expresión de PCNA determinada por IHC fue mayor en C12 comparada con C8 (\*  $p < 0,05$ ). Score de inmunotinción para PCNA considerando la suma de la proporción (<10 % de células positivas= 1, del 10 al 33 %= 2, 34-65 %= 3, >66 %= 4) y más la intensidad de la tinción (baja=1, media=2 y fuerte=3). Los valores representan media  $\pm$  SEM de 8-10 campos de cada preparación de 6-19 animales / grupo. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn como post hoc.

**Los tumores de animales que recibieron lactancia deficiente presentan una tendencia a tener mayor expresión de Ki67**

Evaluamos también la mitosis por IHQ de Ki67 a fin de corroborar las variaciones de proliferación observadas en el tejido tumoral. Si bien no encontramos diferencias significativas, pudimos observar una marcada tendencia a aumentar la expresión de Ki67 en la camada de 12 con respecto a los otros grupos (Fig IX.5).

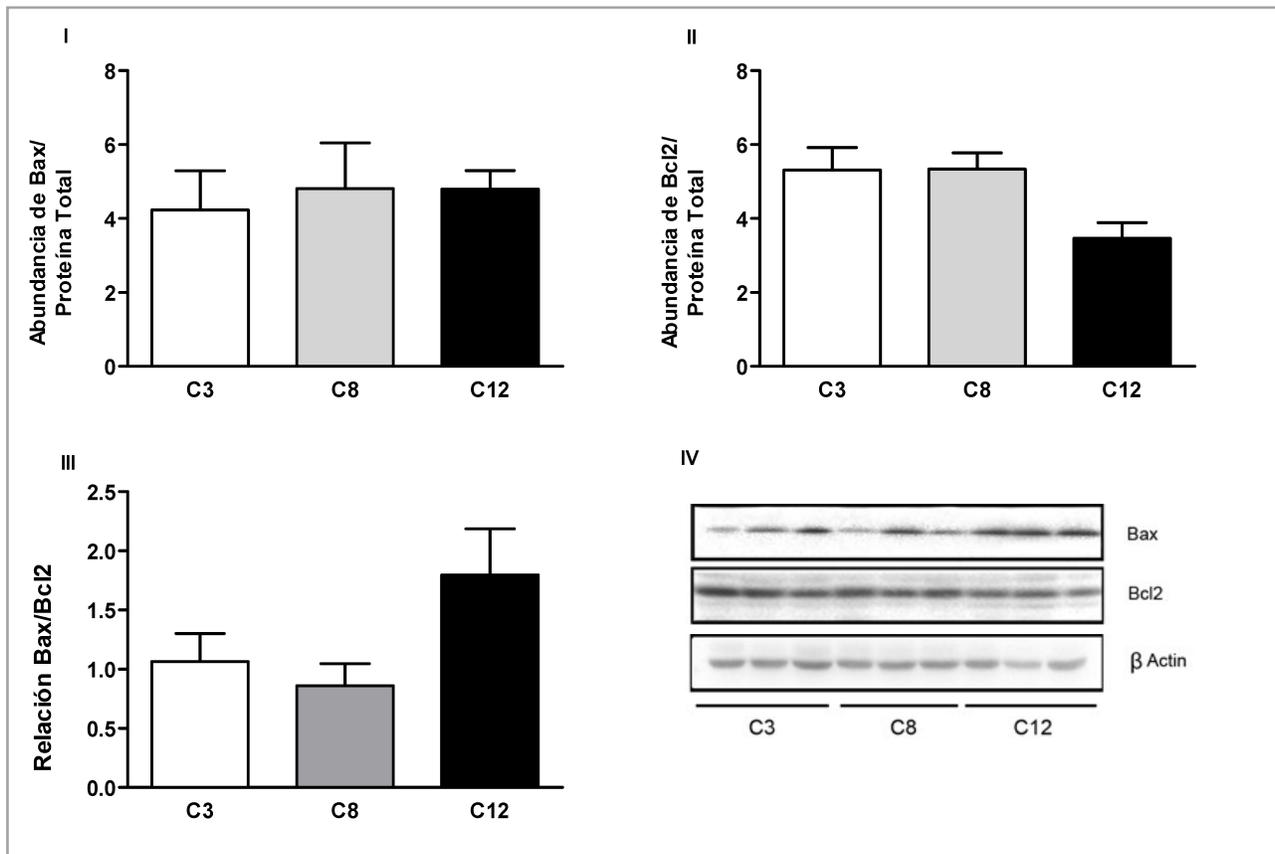


**Fig IX.5 La lactancia deficiente tiende a aumentar la expresión de Ki67.** Existe una tendencia a aumentar la expresión de Ki67 evaluada por IHQ en la camada de 12 (C12) aunque estadísticamente no significativa ( $p = 0,88$ ). I) Microfotografías representativas (400 x) de la expresión de Ki67 determinada por IHQ en cortes de tumores provenientes de los grupos C3, C8 y C12. II) Score de inmunotinción para Ki67 considerando la suma de la proporción (<10 % de células positivas= 1, del 10 al 33 %= 2, 34-65 %= 3, >66 %= 4) y la intensidad de la tinción (baja=1, media=2 y fuerte=3). Los valores representan media  $\pm$  SEM de 8-10 campos de cada preparación de 6-19 animales / grupo. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn como post hoc.

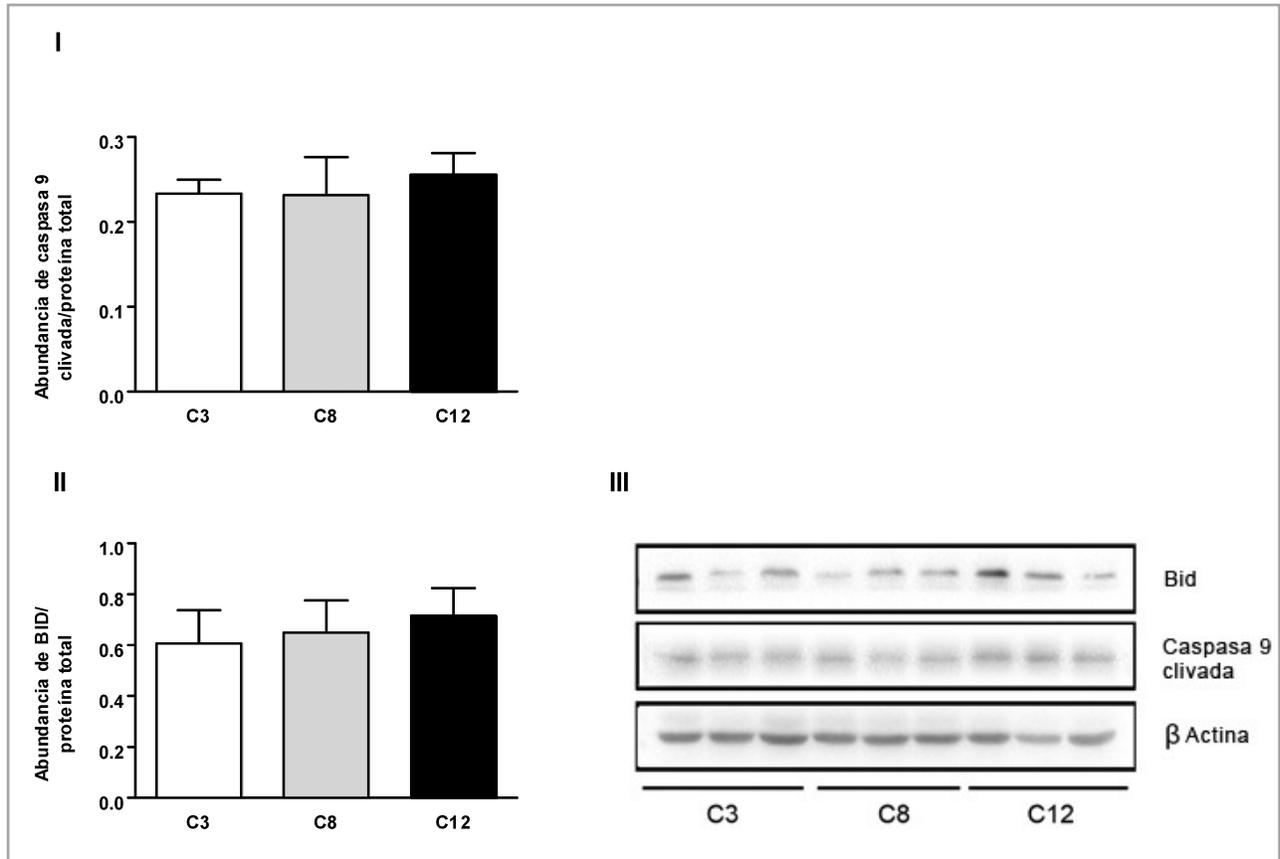
### La lactancia óptima activa la vía apoptótica extrínseca

Ya que los cambios observados en los marcadores de proliferación tumoral no alcanzan por sí solos a explicar las diferencias en el índice M/A, nos propusimos indagar más detalladamente los

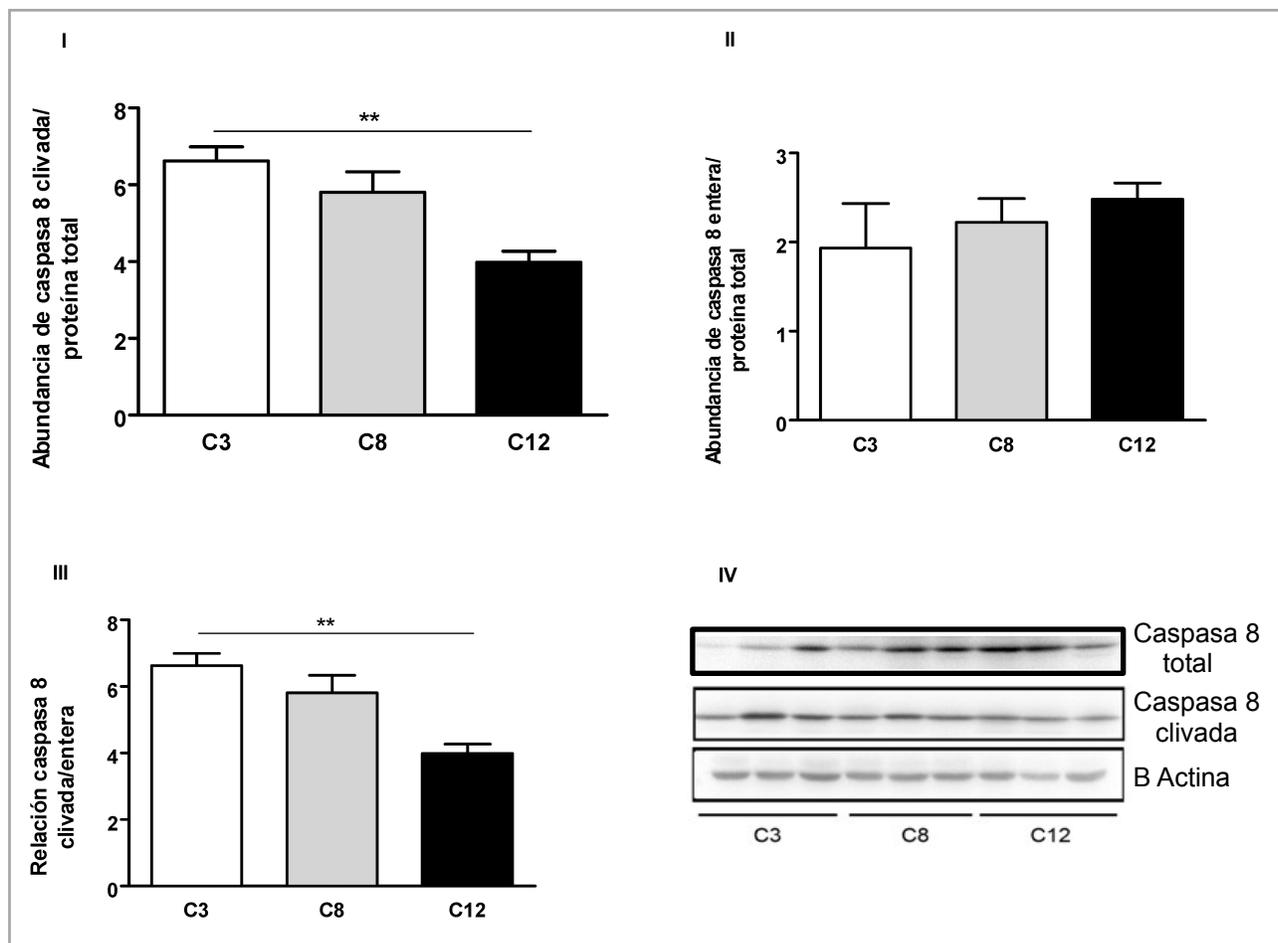
mecanismos apoptóticos subyacentes. Para ello, se determinó la expresión de Bax, Bcl2, Bid, caspasa 9 y caspasa 8 por western blot en tumores de los grupos C3, C8 y C12. La expresión de proteínas que median la apoptosis mitocondrial como Bax, Bcl2, Bid y caspasa 9 fueron similares en los tumores de los tres grupos (Fig IX.6 y 7). Sin embargo, la expresión de caspasa 8 clivada, una proteína de apoptosis mediada por receptores de muerte, fue mayor en tumores C3 que en tumores C12 ( $p < 0,01$ ; Fig IX.8). Todos estos resultados indican que la lactancia óptima en la vida temprana se asocia con la activación de la vía apoptótica extrínseca en tumores mamarios.



**Fig IX.6 Una lactancia óptima no modifica la expresión de Bax y Bcl2.** No se observaron diferencias significativas en la expresión de I) Bax, II) Bcl2, III) ni en la relación de ambas proteínas. IV) Western blots representativos para cada proteína estudiada. Los resultados mostrados surgen del análisis de 6 tumores por grupo experimental. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA I y prueba de Bonferroni como post hoc.



**Fig IX.7 Una lactancia óptima no modifica la expresión de Bid y Caspasa 9 clivada.** No se encontraron diferencias significativas en la expresión de I) caspasa 9 clivada, II) ni Bid entre los tres grupos. III) Western blots representativos para cada proteína estudiada. Los valores surgen del análisis de 6 tumores por grupo. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA I y prueba de Bonferroni como post hoc.



**Fig IX.8 La lactancia óptima activa la vía apoptótica extrínseca.** I) La expresión de caspasa 8 clivada fue mayor en los tumores C3 que en los C12 (\*\*  $p < 0,01$ ). II) La expresión de caspasa 8 entera no presentó modificaciones entre los grupos, aunque puede observarse una tendencia a estar aumentada en C12 con respecto a los otros grupos. III) La relación caspasa 8 clivada/entera fue mayor (\*\*  $p < 0,01$ ) en C3 con respecto a C12. IV) Western blots representativos para cada proteína estudiada. Los valores mostrados surgen del estudio de 6 tumores por grupo. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA I y prueba de Bonferroni como post hoc.

## **CAPÍTULO X**

### **RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°5**

Objetivo específico N°5: Establecer si la lactancia óptima induce cambios en la diferenciación de la glándula mamaria.

#### **La lactancia materna óptima disminuye el número y tamaño de TEBs**

Estudiamos la morfología de la glándula mamaria de las crías a fin de investigar si la exposición a diferentes niveles de lactancia materna en la primera infancia, modifica el desarrollo mamario dando cuenta de la diferencia en la susceptibilidad a la carcinogénesis, observada en los capítulos anteriores. Dado que el cáncer de mama en los seres humanos se inicia en las estructuras mamarias TDLUs, similares a TEBs en ratas, la técnica de montaje completo de la glándula mamaria fue utilizada para determinar el potencial de transformación maligna que presentaba cada grupo de animales. Para ello, la glándula mamaria fue extraída, estirada completamente sobre un portaobjetos de vidrio y sumergida en xilol para lograr su deslipidación. La tinción posterior con rojo carmín permitió que todos sus componentes fueran visualizados por microscopía, permitiendo evaluar los niveles mamarios de desarrollo y diferenciación.

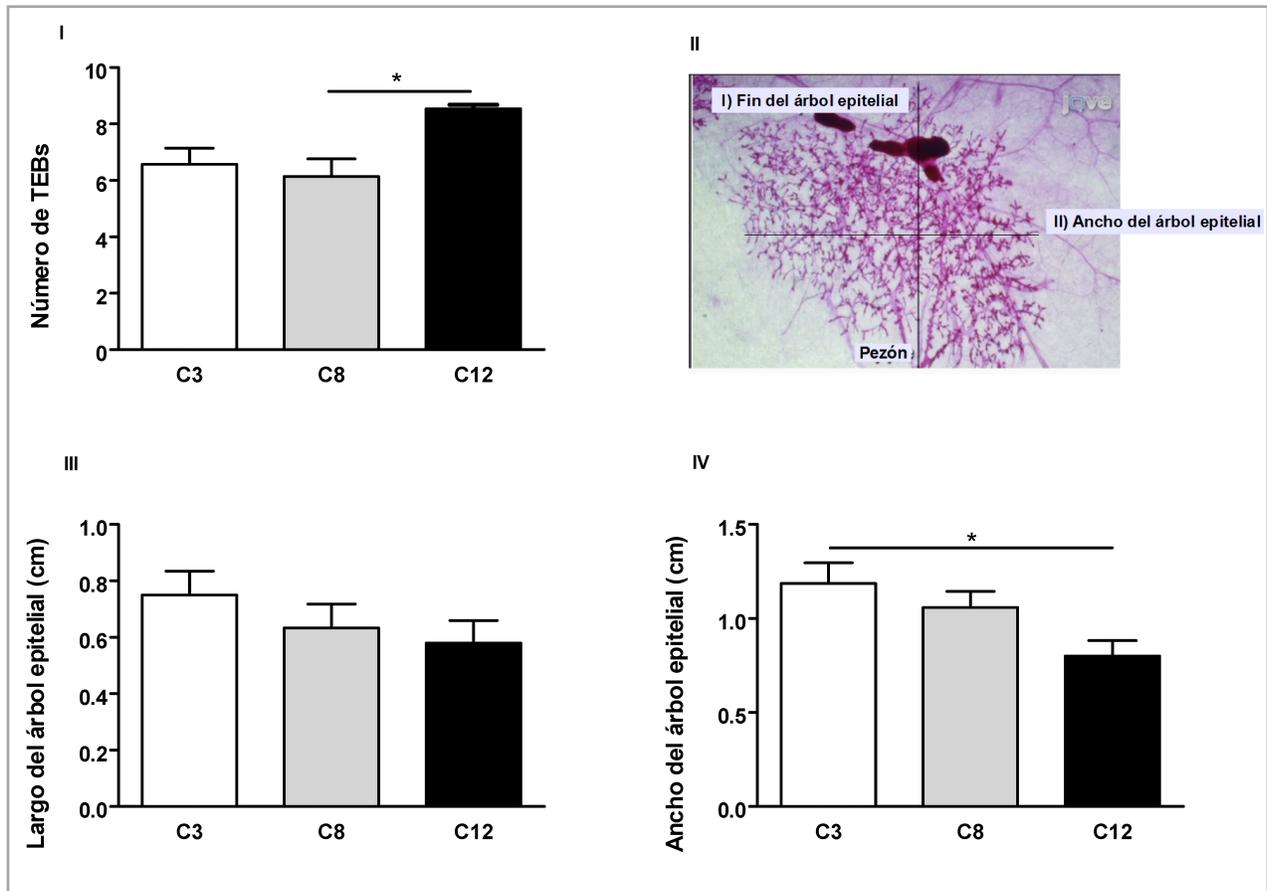
#### **Desarrollo de la glándula mamaria en el día 20 de vida (etapa prepuberal)**

Con el fin de evaluar si la lactancia materna genera cambios inmediatos en el tejido epitelial mamario, realizamos el montaje completo de glándulas mamarias procedentes de animales criados en camadas de 3, 8 y 12 crías por madre. Estos animales lactaron diferencialmente hasta el fin de la lactancia en el día 20, momento en el que fueron sacrificados. A partir del análisis del montaje

completo de la glándula mamaria, observamos que el número de los TEBs es mayor en aquellos animales que fueron criados en camada de 12 (C12) con respecto a los criados en camada de 8 (C8;  $p < 0,05$ ; Fig X.1.1). También pudimos ver una tendencia en aumento en C12 *versus* C3.

Con respecto al desarrollo epitelial, tomamos con regla la medida desde el pezón hasta el final del árbol epitelial considerado como el largo del árbol epitelial, y la medida del ancho del árbol epitelial. Observamos que C3 presenta un árbol epitelial más ancho (\*  $p < 0,05$ ) y tiende a presentar un árbol epitelial más largo (Fig X.1.III y IV).

A partir de estos resultados podemos concluir que la glándula mamaria de los animales que mantuvieron una lactancia óptima (C3) es menos vulnerable a la transformación carcinogénica y se encuentra más desarrollada al día 20 de vida con respecto a los animales que mantuvieron una lactancia deficiente (C12).

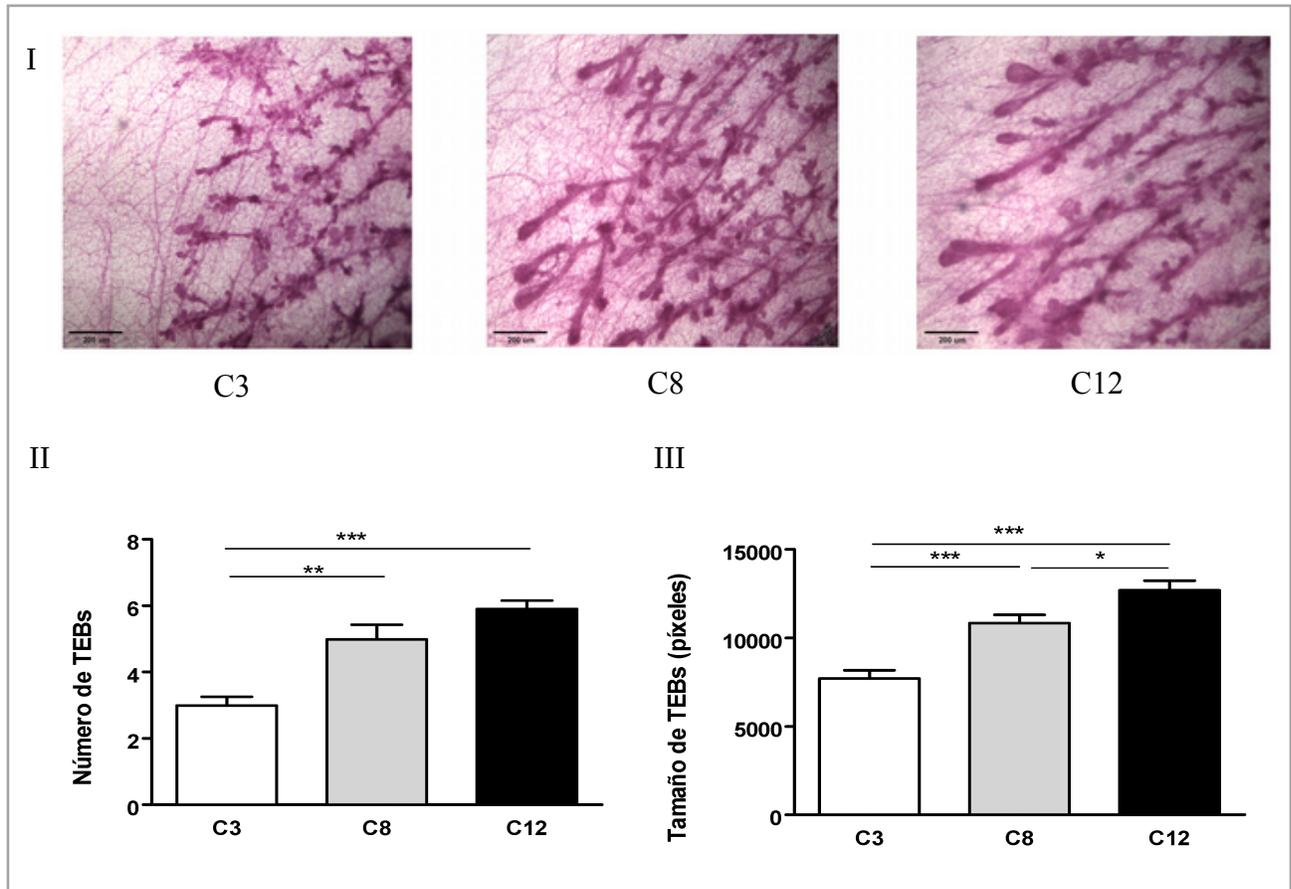


**Fig X.1** Análisis de los montajes completos de las glándulas mamarias de ratas sacrificadas a los 20 días de edad, amamantadas en camadas de 3, 8 y 12 crías por madre. I) El número de TEBS en el día 20 de vida es mayor en C12 con respecto a C8 (\*  $p < 0,05$ ). II) Imagen representativa de las mediciones realizadas para estudiar el crecimiento epitelial de la glándula mamaria a los 20 días de vida (Adaptado de Assis et al, *J Vis Exp.*, 44, 2010). III) La distancia tomada desde el pezón hasta el fin del árbol epitelial, fue considerada como el largo de árbol epitelial, y tiende a ser mayor en C3 con respecto a C8 y C12. IV) El ancho del árbol epitelial fue mayor en C3 con respecto a C12 (\*  $p < 0,05$ ). Los datos mostrados en I representan un promedio de 10-18 campos por glándula mamaria de 6 animales por grupo. Los datos mostrados en III y IV representan las mediciones de 6 glándulas mamarias por grupo. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante ANOVA I y el test de Bonferroni como post test.

## **Desarrollo de la glándula mamaria en el día 55 de vida (etapa pospuberal)**

A partir de los cambios observados en el desarrollo de la glándula mamaria en la etapa prepuberal, quisimos determinar si estos cambios se mantienen en el tiempo o inclusive si se hacen más significativos a expensas de los ciclos ovulatorios de la etapa pospuberal. Para ello utilizamos glándulas mamarias procedentes de animales criados en camadas de 3, 8 y 12 crías por madre y, que a partir de su destete, recibieron alimento balanceado hasta el momento del sacrificio en el día 55 de vida.

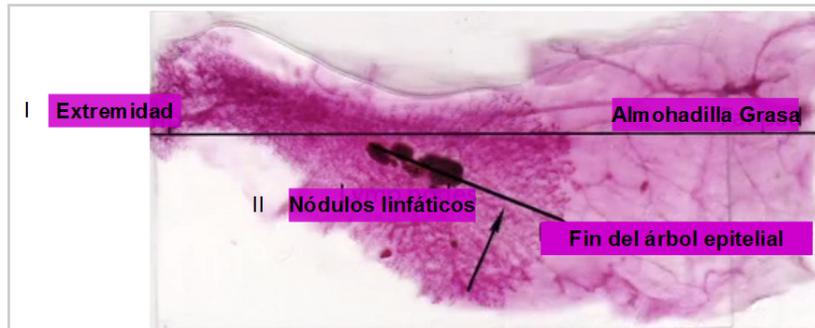
Los resultados a partir del análisis del montaje completo de la glándula mamaria muestran que el número y tamaño de los TEBs es menor en aquellos animales que mantuvieron una lactancia óptima (C3) con respecto a los otros grupos (C8 y C12; Fig X.2).



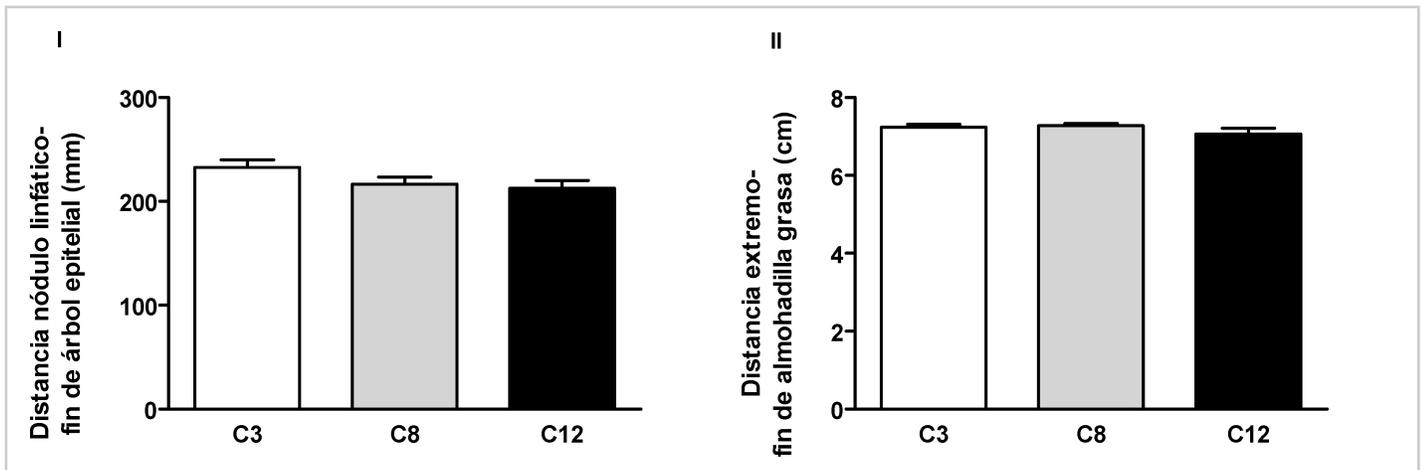
**Fig X.2 Análisis de los montajes completos de las glándulas mamarias de ratas sacrificadas a los 55 días de edad amamantadas en camadas de 3, 8 y 12 crías por madre.** I) Microfotografías representativas (100x) de los montajes completos de glándula mamaria de animales criados en camadas de 3, 8 y 12 crías por madre. II) El número de TEBs fue menor en C3 con respecto a C8 (\*\*  $p < 0,01$ ) y C12 (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). III) El tamaño de TEBs fue menor en C3 (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) *versus* C8 y C12. A su vez, el tamaño de los TEBs fue más pequeño en C8 (\*  $p < 0,05$ ) con respecto a C12. Los valores correspondientes al número y el tamaño de los TEBs representan un promedio de 10-18 campos por glándula mamaria de 10-14 animales por grupo. Los valores fueron comparados mediante ANOVA I y el test de Bonferroni como post test.

También estudiamos el desarrollo epitelial de las glándulas mamarias a los 55 días de vida. Para ello, tal como se puede observar en la figura X.3, medimos con una regla la distancia desde el ganglio linfático hasta el extremo del árbol epitelial (en milímetros) y la distancia desde el extremo

del árbol epitelial hasta el final de la almohadilla grasa (en centímetros). No se observaron diferencias en ambas mediciones entre los grupos (Fig X.4).



**Fig X.3** Imagen representativa de las mediciones realizadas para estudiar el crecimiento epitelial de la glándula mamaria a los 55 días de vida. I) Distancia desde el extremo del árbol epitelial hasta el final de la almohadilla grasa. II) Distancia desde el ganglio linfático hasta el extremo del árbol epitelial. Adaptado de Assis et al, J Vis Exp. (44), 2010.



**Fig X.4** La lactancia materna no modifica el desarrollo epitelial mamario a los 55 días de edad. I) No se observaron cambios en la distancia desde el nódulo linfático hasta el fin del árbol epitelial en los diferentes grupos. II) La distancia desde el extremo del árbol epitelial hasta el fin de la almohadilla grasa es similar en todos los grupos de animales. Los valores representan las mediciones de 10 - 14 glándulas mamarias por grupo. Las comparaciones fueron realizadas mediante ANOVA I y el test de Bonferroni como post test.

A partir de estos resultados, observamos que la glándula mamaria de los animales de 55 días que recibieron una lactancia óptima presenta menor número y tamaño de TEBs, volviéndose menos vulnerable a la transformación cancerosa. Sin embargo, el crecimiento del árbol epitelial de este grupo de animales es similar al de los grupos que recibieron una lactancia deficiente. Ello podría sugerir que la diferente susceptibilidad al carcinógeno descrita en los capítulos precedentes no está en relación con el desarrollo epitelial, sino más bien con el grado de diferenciación alcanzado por la glándula mamaria.

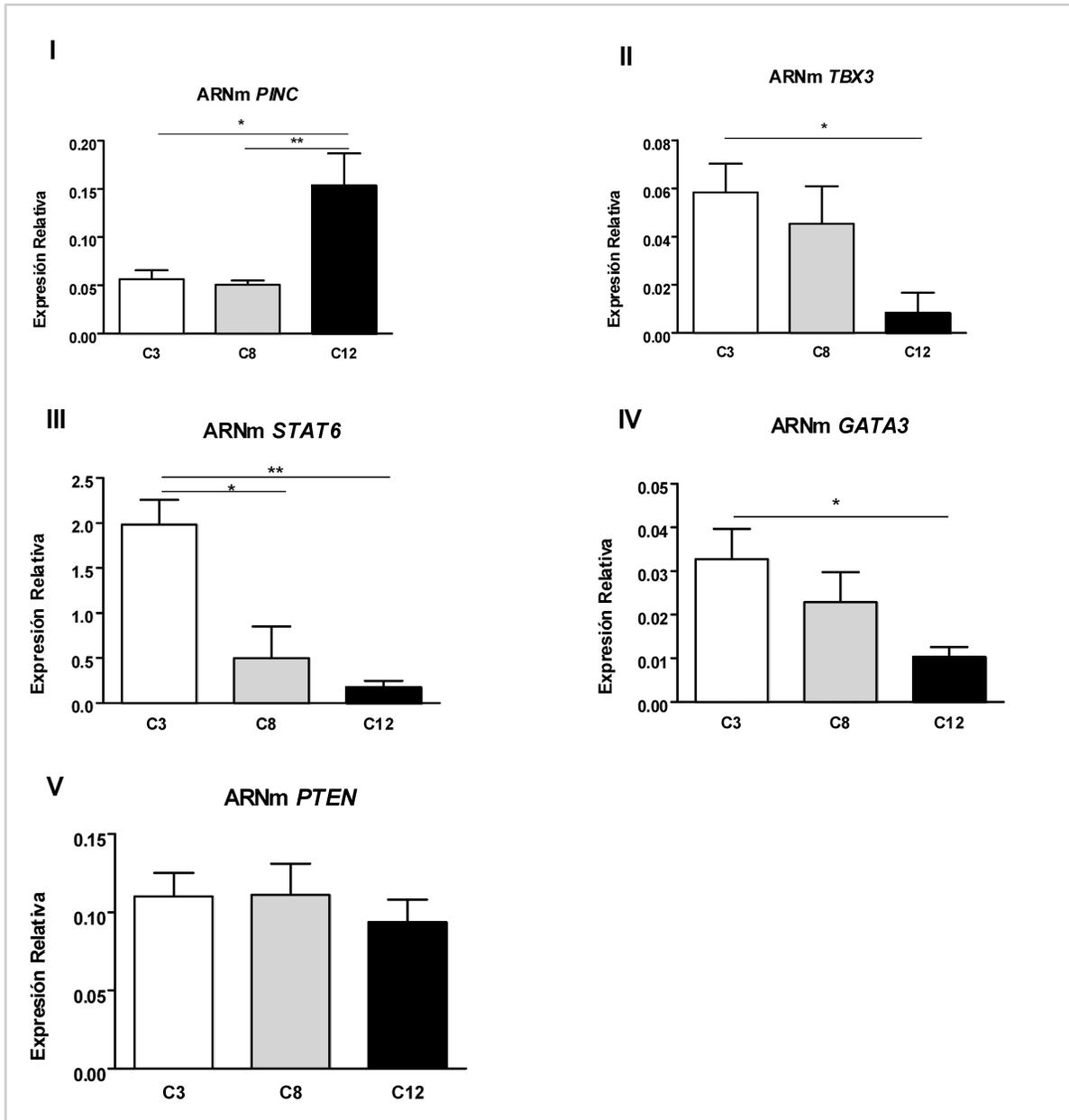
Al comparar los resultados obtenidos en el día de vida 20 y 55, vemos que el mayor desarrollo epitelial observado en C3 al día 20, se iguala con el de C8 y C12 al día 55. Este cambio, podría estar influenciado por el ambiente hormonal propio del desarrollo puberal. Por otra parte, la diferencia en el número de TEBs presente en el día 20 se hace más notable al día 55 de vida. Esto se debe a la progresiva diferenciación de los TEBs, que es acentuada por cada ciclo estral. Si observamos el número de TEBs por campo, podemos ver que se reducen del día 20 al día 55 en todos los grupos, sugiriendo una transformación de los mismos en ABs. Esta reducción en el número de TEBs es más notable en las crías C3, sugiriendo nuevamente, que la diferenciación es mayor en este grupo.

### **Una lactancia óptima modifica la expresión mamaria de genes implicados en el proceso de diferenciación**

Luego de los cambios observados en la morfología de la glándula mamaria ante el consumo diferencial de leche materna, nos propusimos investigar el nivel de expresión de genes implicados en el proceso de desarrollo y diferenciación del epitelio mamario. La leche materna contiene numerosos componentes que actúan sobre elementos de respuesta de genes asociados a la diferenciación y carcinogénesis celular. STAT6, es una proteína implicada en la regulación de la diferenciación de células mamarias alveolares potenciada mediante la inducción transcripcional de GATA3. En ausencia de STAT6 se produce un retraso en el desarrollo glandular mamario. Coincidentemente GATA3 es un factor involucrado en el mantenimiento de la diferenciación mamaria. Por otra parte, la expresión de PINC, ha sido asociada a la inhibición de la diferenciación

terminal de células alveolares mamarias. TBX3 y PTEN son proteínas necesarias para controlar el normal desarrollo del epitelio mamario.

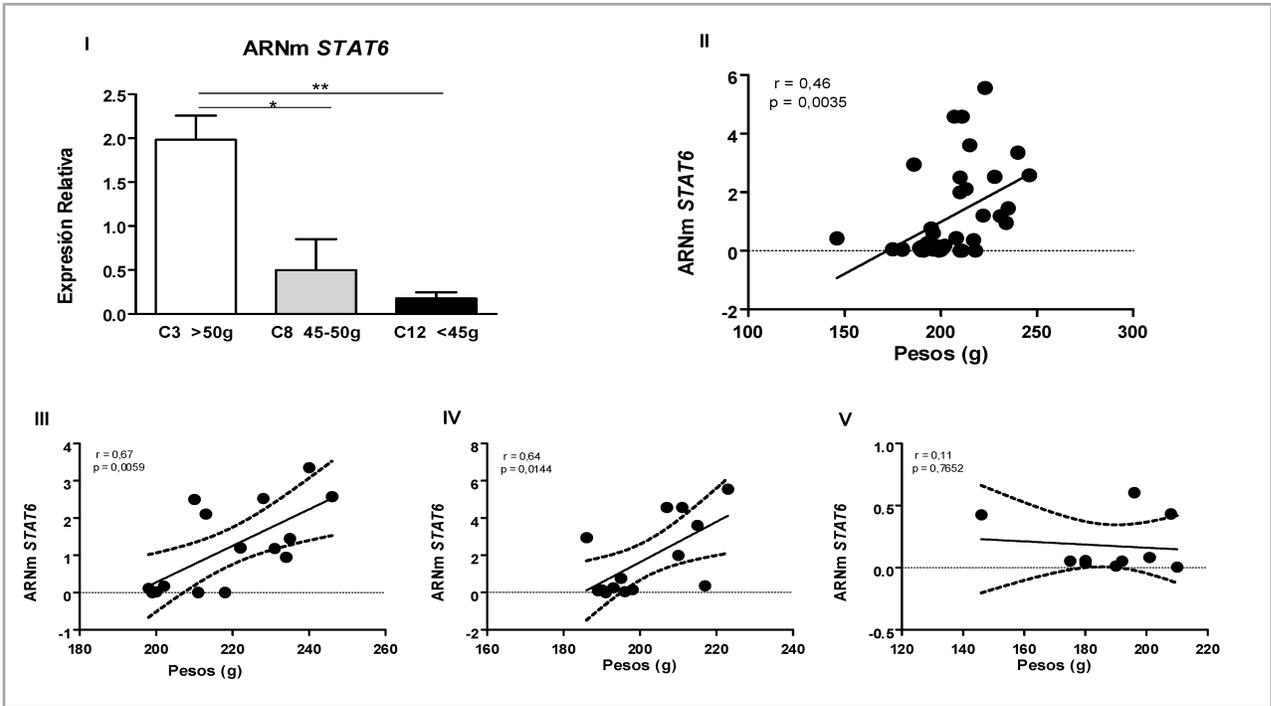
Por lo tanto, en este objetivo evaluamos mediante qPCR el nivel de expresión de TBX3, PINC, STAT6, GATA3 Y PTEN (Fig X.5). Los resultados obtenidos muestran una menor expresión del ARNm de PINC ( $p < 0,05$ ), y expresión aumentada de STAT6 ( $p < 0,01$ ), GATA3 ( $p < 0,05$ ) y TBX3 ( $p < 0,05$ ) en C3 con respecto a C12. El ARNm de PTEN, no mostró diferencias en su expresión entre los diferentes grupos estudiados. Estos resultados demuestran una relación directa entre el consumo de leche materna y la capacidad de la glándula mamaria de activar programas génicos asociados a la diferenciación celular, que podrían disminuir la carcinogénesis mamaria.



**Fig X.5 Análisis de la expresión mamaria de genes relacionados al estado de diferenciación, mediante PCR en tiempo real.** I) El contenido de ARNm de *P1NC* estuvo aumentado en C12 con respecto a C3 (\*  $p < 0.05$ ) y C8 (\*\*  $p < 0.01$ ). II) La expresión de *TBX3* se encuentra disminuida en C12 en comparación con C3 (\*  $p < 0.05$ ). III) El ARNm de *STAT6* se encontró elevado en C3 con respecto a C8 (\*  $p < 0.05$ ) y C12 (\*\*  $p < 0.01$ ). IV) La expresión de *GATA3* fue mayor en C3 *versus* C12 (\*  $p < 0.05$ ). IV) El ARNm de *PTEN* no mostró diferencias en su expresión entre los diferentes grupos estudiados. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 10-14 animales / grupo. Los valores mostrados se compararon mediante ANOVA I y el test de Bonferroni como post test.

## **La expresión relativa del ARNm de *STAT6* se ve modificada por el peso corporal**

De la observación de los datos de PCR en tiempo real, pudimos ver que la expresión de ARNm de *STAT6* se correlaciona con los pesos de los animales en el día 55 de vida (Fig X.6 I y II). Por lo tanto, analizamos estadísticamente la correlación existente entre la expresión de ARNm de *STAT6* y el peso individual de las crías al día 55 en diferentes camadas de animales por separado. Observamos que la expresión del ARNm de *STAT6* se correlaciona con los pesos de los animales criados en camadas de 3 y 8, y no se correlaciona con los pesos de animales criados en camada de 12 (Fig X.6 III, IV y V). En las gráficas se consignan los respectivos coeficientes de correlación ( $r$ ) y la probabilidad de que las variables correlacionen ( $p$ ), calculados por el test de correlación.



**Fig X.6 La expresión relativa del ARNm de STAT6 se correlaciona con el peso corporal.** I) El ARNm de *STAT6* se encontró elevado en camadas que mantenían un peso promedio superior a los 50 gramos, con respecto a camadas que presentaban un peso variable entre 45 y 50 gramos ( $p < 0,05$ ), y camadas con un peso inferior a 45 gramos (\*\*  $p < 0,01$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 10-14 animales / grupo. Los valores mostrados se compararon mediante ANOVA I y el test de Bonferroni como post test. II) La expresión de ARNm de *STAT6* se correlacionó con los pesos de los animales en el día 55 de vida. III) Los pesos de los animales criados en camadas de 3 (C3) presentaron una correlación positiva con la expresión del ARNm de *STAT6*. IV) Los pesos de los animales criados en camadas de 8 (C8) mostraron una correlación positiva con la expresión del ARNm de *STAT6*. V) Los pesos de los animales criados en camadas de 12 (C12) se correlacionaron negativamente con la expresión del ARNm de *STAT6*. En las gráficas se consignan los respectivos coeficientes de correlación ( $r$ ) y la probabilidad de que las variables correlacionen ( $p$ ) calculados por el test de regresión lineal.

## **CAPÍTULO XI**

### **RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N° 6**

Objetivo específico N°6: Determinar si una adecuada lactancia induce cambios en la metilación de genes asociados a la diferenciación y/o carcinogénesis mamaria en ratas.

Existe evidencia de que los factores ambientales y, en particular, los factores dietéticos, en edades claves del desarrollo pueden inducir cambios en el epigenoma. Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que los animales que recibieron una lactancia óptima presentan mayor desarrollo epitelial mamario, menor potencial para la transformación maligna, y mayor expresión del ARNm de genes implicados en el proceso de diferenciación epitelial. A partir de estos hallazgos quisimos investigar si dichos cambios podían deberse a diferencias en el grado de metilación de los principales genes que regulan la diferenciación del epitelio mamario (STAT6 y GATA3). Para ello obtuvimos el ADN genómico de las glándulas mamarias de animales de 55 días de vida criados en camadas de 3, 8 y 12 crías por madre que, a partir de su destete recibieron alimento balanceado hasta el momento del sacrificio.

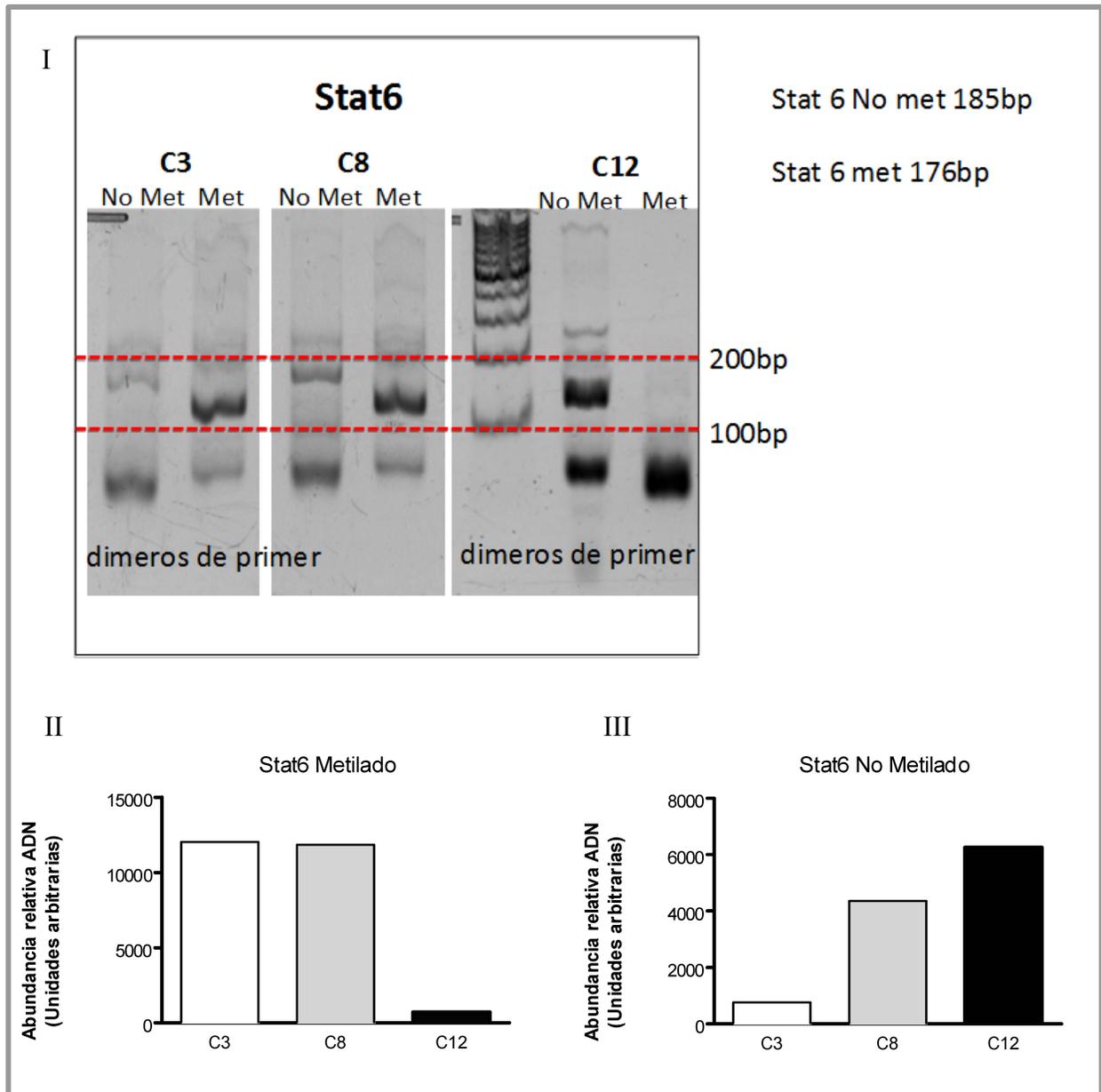
#### **Cuantificación del ADN genómico**

El ADN obtenido fue cuantificado en un espectrofotómetro NanoDrop (Labocon, LNS-101) y posteriormente, convertido con el kit de metilación EZ DNA Methylation-Gold™. Este Kit utiliza la técnica de conversión del ADN por bisulfito, donde las citocinas no metiladas son convertidas en uracilo. Los primers utilizados para la determinación de expresión de cada gen se encuentran detallados en el capítulo V. Una vez convertido, el ADN fue nuevamente cuantificado.

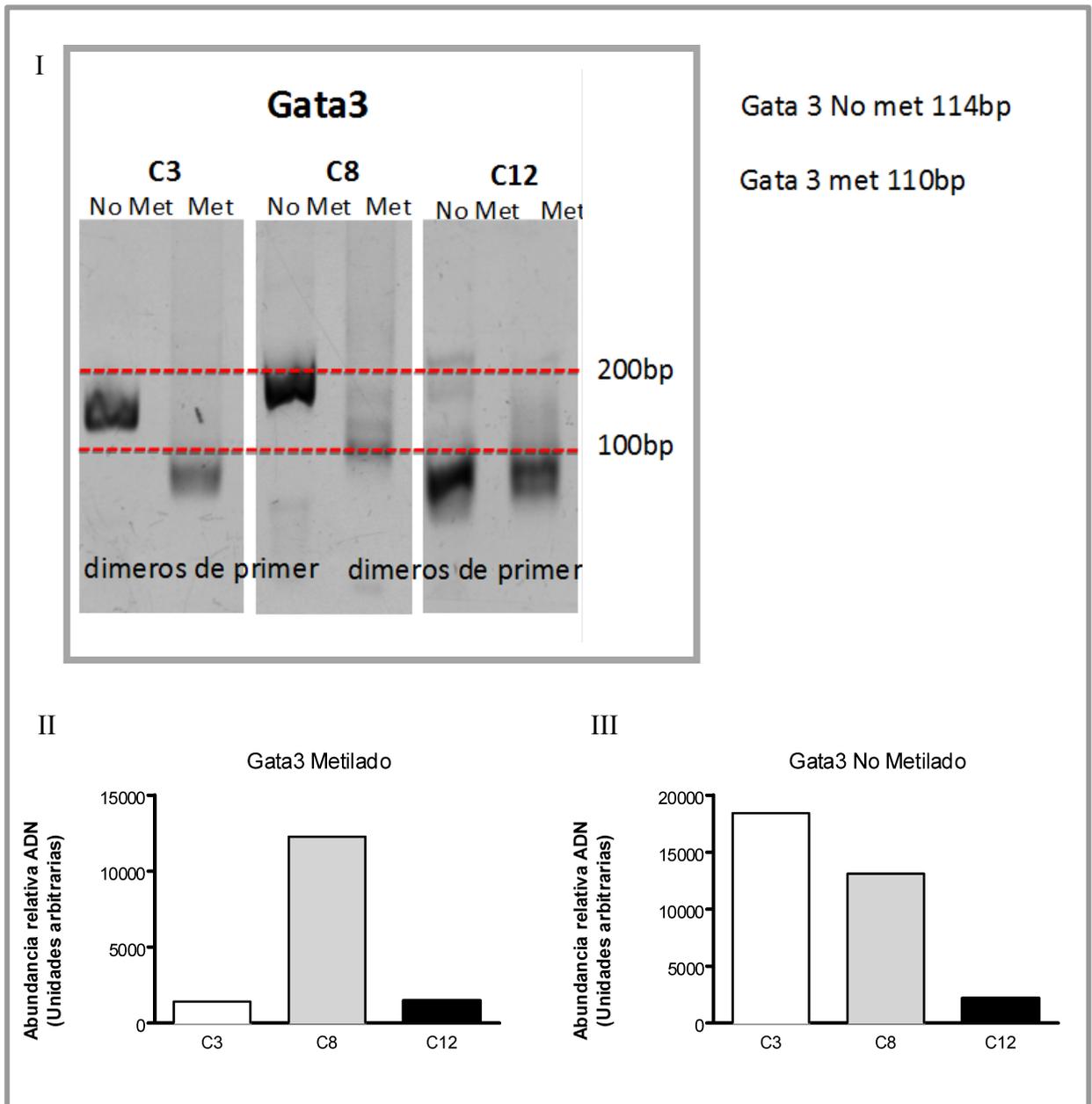
## **PCR específica de metilación**

El análisis del perfil de metilación por MSP-PCR convencional, mostró que Stat6 se encuentra principalmente no metilado en las islas CpG del promotor analizadas en C12. Mientras que en C3 se observó lo opuesto dado que, Stat 6 se encontró principalmente metilado. En C8 se observó un estado intermedio de metilación y no metilación de Stat 6 siendo más abundante el producto de MSP-PCR para la forma metilada (Fig XI.1).

Los resultados del análisis del perfil de metilación de Gata3 (Fig XI.2), mostraron que en C3 este gen se encuentra principalmente no metilado en las islas CpG de la región promotora analizada. Mientras que, en C8 y C12 se observó una disminución de la no metilación.



**Fig XI.1. Análisis del perfil de metilación por MSP-PCR convencional para Stat6.** I) Gel de acrilamida representativo de cada gen estudiado. Los valores representan la cuantificación de las bandas por densitometría, expuestas en gel de acrilamida. Cada banda representa una muestra mixta, formada por la unión de 5 muestras de ADN convertido. II) Stat6 se encuentra principalmente metilado en las islas CpG del promotor analizadas en C8. III) Stat6 se encuentra principalmente no metilado en C3, y moderadamente en C8.



**Fig XI.2. Análisis del perfil de metilación por MSP-PCR convencional para Gata3.** I) Gel de acrilamida representativo de cada gen estudiado. Los valores representan la cuantificación de las bandas por densitometría, expuestas en gel de acrilamida. Cada banda representa una muestra mixta, formada por la unión de 5 muestras de ADN convertido. II) Gata3 se encuentra metilado en las islas CpG del promotor analizadas en C3 y C8. III) Gata3 se encuentra principalmente no metilado en las islas CpG del promotor analizadas en C3 y parcialmente no metilado en C8.

## **CAPÍTULO XII**

### **DISCUSIÓN**

En este trabajo de tesis, hemos demostrado el papel protector de la lactancia en la carcinogénesis mamaria, que se relaciona con las variaciones en la proliferación, la apoptosis tumoral y los procesos de diferenciación de la glándula mamaria.

Las diferencias en el peso corporal observadas entre los tres grupos de animales fueron causadas exclusivamente por las variaciones en la ingesta de leche por parte de las crías. Esto nos permitió generar un modelo animal con consumo diferencial de leche. Existe evidencia de que la disminución de la ingesta de energía reduce la carcinogénesis mamaria en ratas (Rogers, 1997). Sin embargo, a pesar de que nuestras camadas de doce crías por madre presentaron una reducción en la ingesta calórica, evidenciada por el menor peso corporal, tenían una mayor incidencia de tumores. Estos resultados sugieren que la reducción del consumo de leche materna durante la vida postnatal priva al animal de compuestos hormonales, nutricionales y / o inmunes que participan en la prevención del desarrollo tumorigénico, favoreciendo así la aparición de la enfermedad en la vida adulta.

Durante la puesta a punto del modelo animal, observamos que el volumen de leche succionado por cría y la composición de la misma fueron diferentes entre las madres que amamantaban tres, ocho o doce crías. El volumen de leche succionado por cría en C3, fue más abundante y con mayor contenido proteico. Contrariamente, las crías C12 succionaron un volumen menor de leche por animal y éste presentaba menor contenido de proteínas totales y mayor contenido de lactosa. Si bien el volumen de leche succionado por cría es menor en C12, el número de crías a amantar fue mayor, lo que resume una mayor producción de leche de baja calidad nutricional, pero que logra igualar el valor calórico de la leche de madres que sólo amamantan a tres crías. Estas variaciones observadas en la composición de la leche, sugieren un mecanismo de compensación en C12 para alcanzar un valor calórico adecuado, compatible con la vida de la cría, a expensas del aumento del contenido de lactosa. Estos resultados en animales coinciden con los

obtenidos en investigaciones previas en humanos, que demuestran que la concentración de proteína de la leche disminuye (B. Melnik & Schmitz, 2017) y de lactosa aumenta (Laurie A. Nommsen et al., 1991) en las madres que producen mayores cantidades de leche.

En nuestro modelo animal, el consumo de leche materna no produce un aumento significativo de la grasa intraabdominal, aunque se puede observar una tendencia creciente en aquellos animales que presentan mayor peso. En un estudio reciente que relaciona los depósitos de grasa corporal con el riesgo de desarrollar cáncer, no hubo asociación entre mayores depósitos de tejido adiposo visceral y un aumento en el desarrollo del cáncer de mama (Gupta et al., 2017). De acuerdo con estos resultados, Rosner et al. afirmaron que la adiposidad en la vida temprana está inversamente asociada con la incidencia de cáncer de mama (Rosner et al., 2017). En concordancia, la tendencia creciente observada en el presente trabajo, en el acúmulo de grasa abdominal en animales que mantuvieron un mayor consumo de leche materna (C3) no promovería la carcinogénesis mamaria.

La asociación de diferentes factores presentes desde los primeros años de vida y el desarrollo de enfermedades en la vida adulta ha recibido un creciente interés. Se ha observado que los factores perinatales están involucrados en el desarrollo de cáncer de mama en la descendencia (Ekbom, Hsieh, Lipworth, Adami, & Trichopoulos, 1997; Ekbom, Trichopoulos, Adami, Hsieh, & Lan, 1992; Sanderson et al., 1998). Existe una tendencia a disminuir el riesgo de cáncer de mama en mujeres que fueron amamantadas (Weiss et al., 1997a). En concomitancia, un estudio de casos y controles mostró una asociación significativa entre haber sido amamantado y un menor riesgo de desarrollar cáncer de mama en la vida adulta (Freudenheim et al., 1994). Además, Titus-Ernstoff et al. informaron que la incidencia de cáncer de mama no aumentó en las mujeres que fueron amamantadas aun cuando sus madres desarrollaron carcinoma de mama (Titus-Ernstoff et al., 1998). Un metaanálisis reciente sobre lactancia materna y cáncer de mama reveló un menor riesgo de cáncer de mama en mujeres premenopáusicas que habían sido amamantadas (Martin, Middleton, et al., 2005). Nuestros resultados actuales muestran una menor incidencia y mayor latencia tumoral en los animales que mantuvieron una lactancia óptima, respaldando la idea que el consumo adecuado de leche materna protege contra la carcinogénesis mamaria. Además, se observó una tendencia notable a una mayor supervivencia en aquellos animales con una lactancia óptima. Curiosamente, también se observó que a medida que el consumo de leche materna disminuyó, la tasa de

crecimiento tumoral en la edad adulta tendió a aumentar.

Nuestros resultados son consistentes con muchos, pero no todos, los estudios publicados sobre el tema. El prospectivo Nurses' Health Study no encontró asociación entre haber sido amamantado y el desarrollo cáncer de mama en la edad adulta, entre mujeres premenopáusicas o postmenopáusicas (Michels et al., 2001). Sin embargo, se mostró una tendencia a disminuir el riesgo relativo en las mujeres premenopáusicas que han sido amamantadas. Aunque este estudio comprende un enorme número de casos, posee la limitación del escaso conocimiento autorreferencial de las pacientes sobre su propio amamantamiento cuando fueron lactantes. En otro estudio de casos y controles, Wise et al. no encontraron ninguna asociación (Wise et al., 2009). Hasta el momento, no se han utilizado modelos experimentales de animales para estudiar la influencia de la lactancia, lo que ocurre en etapas temprana de la vida, sobre la carcinogénesis mamaria en la edad adulta. La mayoría de los experimentos en roedores se han realizado para explorar los efectos de varios componentes nutricionales, en su mayoría proteínas y grasas, desde el destete hasta la vida adulta (Rogers, 1997). Además, los efectos de la composición de la leche sobre la carcinogénesis en la vida adulta en modelos animales, han sido evaluados modificando la nutrición de las madres y en búsqueda de carcinogénesis en las hijas (Fernandez-Twinn & Ozanne, 2010; L Hilakivi-Clarke et al., 1997; L Hilakivi-Clarke, Clarke, & Lippman, 1999; Lo, Hsieh, Chen, & Su, 2009; Su, Hsieh, & Chen, 2010).

Otro de los factores nutricionales estudiados en esta tesis fue el elevado consumo de grasas saturadas desde la infancia hasta la vida adulta y su implicancia en el desarrollo de cáncer de mama. Nuestros resultados muestran que no hay correlación entre el mayor consumo de grasa de origen animal y la carcinogénesis mamaria. Estos hallazgos son coincidentes con investigaciones realizadas en humanos (Fletcher et al., 2017; Mueller & Fusenig, 2004; I. H. Russo & Russo, 1996).

A fin de poder corroborar si la disminución de la incidencia de cáncer de mama provocada por la lactancia, se veía afectada por el consumo sostenido de grasas saturadas, combinamos los modelos experimentales anteriormente estudiados. Obtuvimos animales que presentaban una lactancia óptima, pero que a partir de su destete fueron alimentados con una dieta rica en grasa saturadas. No encontramos cambios en la incidencia tumoral de los animales adecuadamente amamantados, aunque hubiesen recibido una dieta alta en grasas. Esto demuestra que la lactancia materna genera modificaciones durante el proceso de remodelación y desarrollo glandular que la

vuelvan más resistente a la acción del cancerígeno y de un promotor como es el consumo de grasas saturadas.

Los mecanismos por los cuales la lactancia materna podría modificar el desarrollo de la carcinogénesis en la vida adulta son aún desconocidos. Este trabajo de tesis fue realizado en animales para generar un ambiente controlado, evitando la intrusión de factores alimentarios, hormonales, situaciones de estrés y actividad física que podrían intervenir en el desarrollo tumoral. Dentro de los posibles mecanismos involucrados en la menor incidencia observada dentro del grupo de animales que recibió una lactancia óptima, evaluamos por un lado la biología tumoral y por otro el desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria.

La carcinogénesis está directamente relacionada con el desequilibrio entre la proliferación y la apoptosis. Por un lado, una proliferación anormal de células dañadas en su ADN puede inducir la progresión del cáncer. En este trabajo, la medición de los niveles de proliferación fue realizado mediante las técnicas de rutina más utilizadas, que incluyen conteo de mitosis e IHQ de PCNA y Ki-67 (Elias, 1997). Se observó una mayor proliferación celular de tumores en ratas con una lactación deficiente (C12) evaluada por inmunotinción de PCNA y conteo de figuras mitóticas en secciones histológicas. Coincidentemente, la expresión de Ki67 evaluada por inmunotinción tendió a aumentar en C12 con respecto a los otros grupos de animales. Estos resultados están de acuerdo con el aumento en la incidencia de tumores en este grupo de animales. Además, podría dar cuenta del discreto aumento en la velocidad de crecimiento de dichos tumores.

Por su parte, la inactivación de la muerte celular programada, o apoptosis, es crucial para el desarrollo del cáncer (Budihardjo, Oliver, Lutter, Luo, & Wang, 1999). El equilibrio neto entre las proteínas pro- y anti-apoptóticas determina el destino de la apoptosis (Desagher et al., 1999; Reed, 1997). Nuestros resultados muestran un aumento en la expresión de la caspasa 8 clivada en los tumores de animales que recibieron un mayor consumo de leche (C3); demostrando la activación de la vía apoptótica extrínseca. Esta activación coincide con el mayor número de cuerpos apoptóticos encontrados en las secciones tumorales en dicho grupo experimental. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de Bax, Bcl-2, Bid y caspasa 9 clivada, indicando que la vía intrínseca no estaría directamente afectada. Del mismo modo, Puertollano et al. también observaron una activación de la vía extrínseca de apoptosis en tumores mamarios inducidos químicamente en ratas, sin diferencias en la actividad de caspasa 9 (Puertollano et al., 2008). Estos hallazgos sugieren que

existen factores extrínsecos asociados a la lactancia en la edad temprana que limitarían el desarrollo del tumor en la edad adulta.

La progresión del tumor también depende del diálogo entre las células epiteliales tumorales y las células del estroma circundante (Mueller & Fusenig, 2004). Entre los diferentes tipos de células que rodean al tumor, las más abundantes son las que conforman el tejido adiposo mamario (Fletcher et al., 2017). Por otra parte, las variaciones en la diferenciación de la glándula mamaria podrían explicar una susceptibilidad modificada al desarrollo del cáncer (I. H. Russo & Russo, 1996).

Otro de los mecanismos que evaluamos fue el desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria, ya que los cambios en la morfología de la misma pueden predecir el riesgo de cáncer mamario en ratas. Nuestros hallazgos muestran que los animales que mantuvieron una lactancia óptima presentan menor número de TEBs en el día cincuenta y cinco de vida y una tendencia a tener menor número de TEBs en el día veinte de vida con respecto a los otros grupos. Además en el día veinte de vida, los animales criados en camadas de tres, presentaron una glándula mamaria más desarrollada, evidenciada por el mayor ancho del árbol epitelial. Esto demuestra que la glándula mamaria de los animales con lactancia óptima es morfológicamente diferente a la de los grupos de animales sometidos a una lactancia deficiente, ya que se encuentra más desarrollada y es menos vulnerable a la transformación maligna durante la etapa pre- y pospuberal (Leena Hilakivi-Clarke, 2007; Leena Hilakivi-Clarke & de Assis, 2006; I. H. Russo & Russo, 1996).

A fin de dilucidar el origen de los cambios anteriormente observados, evaluamos la expresión de genes involucrados en los procesos de diferenciación del epitelio mamario. Pudimos observar que el grupo de animales que tuvo una lactancia óptima presentó una expresión aumentada de genes que favorecen el desarrollo (TBX3) y la diferenciación de la célula epitelial mamaria (GATA3 y STAT6), y una expresión disminuida de genes que inhiben los procesos de diferenciación (PINC). Por otra parte, los animales que tienen una lactancia deficiente (C12) tuvieron menor expresión del ARNm de PINC y mayor expresión de TBX3, GATA3 y STAT6, lo que coincide con el menor grado de desarrollo mamario observado en éste grupo. Los animales criados en camada de ocho, establecido como grupo control, tienen un comportamiento intermedio entre los grupos de animales C3 y C12, tanto en la expresión de los genes estudiados como en otros parámetros analizados a lo largo de este trabajo. Esto podría deberse a la presencia, dentro de la misma camada de ocho, de algunas crías que logran un mayor consumo de leche materna, pareciéndose a los

animales criados en camadas de tres; que coexisten con otras crías con un consumo insuficiente de leche materna, más parecidas a los animales criados en camadas de doce. Ello podría explicar la mayor variabilidad que se observó en el grupo C8 en casi todos los parámetros medidos en esta tesis.

Para poder evaluar si los cambios observados en la expresión de los genes vinculados al proceso de diferenciación en la vida adulta resultan de modificaciones epigenéticas, que podrían producirse como consecuencia de la exposición a distintos niveles de lactancia durante la etapa posnatal, estudiamos el grado de metilación de las regiones promotoras de dichos genes. La metilación de un dinucleótido CpG en el ADN, es una modificación común en los genomas de mamíferos y constituye una marca epigenética estable que se transmite a través de la replicación y división celular del ADN (A. Bird, 2002). La metilación se establece ampliamente durante la embriogénesis o en la vida postnatal temprana, edades claves del desarrollo que pueden verse fuertemente influenciadas por los factores nutricionales.

Nuestros resultados mostraron que existen diferencias en el perfil de metilación de STA6 y GATA3 en las glándulas mamarias de las crías, ante diferentes consumos de leche materna. Estas diferencias entre los grupos experimentales se mantuvieron aún ante el desarrollo de la pubertad. En los animales que consumieron una lactancia óptima, STAT6 se encontró metilado, mientras que, en los animales que mantuvieron una lactancia deficiente se encontró principalmente no metilado. Dado que la hipermetilación de las islas CpG se asocia con la represión transcripcional, mientras que la hipometilación de las islas CpG se asocia generalmente con la activación transcripcional (a P. Bird, 1986; Reik & Dean, 2001); nuestros resultados sugieren que el alto nivel de consumo de leche materna en C3 estaría promoviendo la represión transcripcional de STAT6. Esto puede deberse a que la glándula mamaria de animales que recibieron una lactancia óptima (C3) ya alcanzó el grado de desarrollo y diferenciación deseado; lo que se condice con los cambios morfológicos observados en este grupo de animales.

Por otra parte, los resultados del análisis del perfil de metilación de GATA3, mostraron que en C3 este gen se encuentra principalmente no metilado, sugiriendo la activación transcripcional del mismo. Se ha demostrado que GATA3 interviene activamente en el mantenimiento de la diferenciación epitelial luminal en la glándula mamaria (Kouros-Mehr et al., 2006), lo que podría sugerirnos que los animales con una lactancia óptima promueven la transcripción de GATA3 a fin de

mantener la diferenciación del epitelio mamario alcanzada.

Un posible mecanismo, por el cual la leche materna puede comportarse como un regulador epigenético, es a través de la transferencia de miRNA (B. Melnik & Schmitz, 2017). Los miRNA son secretados principalmente por la célula epitelial de la glándula mamaria de la madre y son transferidos desde la leche hacia la circulación sistémica de la cría. Este mecanismo, se ve facilitado por la alta permeabilidad intestinal propia del periodo posnatal y, además, por la alta estabilidad a las adversidades del tracto digestivo que presentan los exosomas encargados de transportarlos. Una vez que alcanzaron la circulación sistémica, los miRNA exosomales pueden regular la metilación del ADN de la célula epitelial mamaria (B. Melnik & Schmitz, 2017). Otra posibilidad, no excluyente, sería que pasen a las crías componentes inmunitarios como IL4, IL5 e IL13 que puedan contribuir al proceso de diferenciación de la glándula mamaria (Khaled et al., 2007).

Un estudio más completo sobre el perfil de metilación de los genes estudiados es necesario para poder fortalecer los resultados anteriormente descritos. La puesta a punto de la técnica MSP en nuestro laboratorio, resultó una laboriosa tarea, pero contribuyó de manera significativa al entendimiento de los cambios observados entre los diferentes grupos de animales estudiados. Profundizar en el estudio de los cambios epigenéticos anteriormente descritos, es una perspectiva futura de este trabajo de investigación. En la actualidad, en nuestro laboratorio estamos trabajando en la puesta a punto de MSP-PCR con primers dirigidos a islas CpG de otras regiones del promotor de los genes estudiados, con el fin de pequisar los sitios susceptibles a modificaciones epigenéticas de estos genes, frente a una lactancia óptima en la vida adulta de las crías.

En resumen, se estableció un modelo in vivo de consumo diferencial de leche para estudiar el papel específico de la lactancia en el riesgo de desarrollar carcinoma mamario. Hemos demostrado que la lactancia óptima durante la vida postnatal genera una menor incidencia y mayor latencia de cáncer de mama en la edad adulta, independientemente del consumo de grasa saturada de origen animal. También, observamos una reducción en la proliferación y un aumento de la apoptosis en los tumores de los animales que mantuvieron un consumo adecuado de leche durante el periodo posnatal. Por otra parte, pudimos demostrar una relación directa entre el consumo de leche materna y la presencia de modificaciones epigenéticas, que regulan capacidad de la glándula mamaria de activar programas génicos asociados a la diferenciación celular. En conjunto, nuestra investigación subraya la importancia de la lactancia en la etiología y progresión del cáncer de mama y establece

las bases para explorar el papel específico de la leche materna en futuros estudios. Por lo tanto, la lactancia en la vida postnatal contribuye a un doble beneficio, no sólo para la prevención del cáncer sino también otros tipos de patologías como la obesidad, la diabetes y la enfermedad coronaria; resultado de un gran interés en la salud pública. De esta manera, podríamos evitar un mayor número de enfermedades no transmisibles.

## CONCLUSIONES GENERALES

Dado que

- Una lactancia óptima disminuye la incidencia y aumenta la latencia de tumores mamarios.
- La lactancia materna apropiada protege contra el desarrollo de cáncer de mama aún cuando se mantiene un elevado consumo de grasa saturada.
- Los animales con lactancia óptima presentan tumores menos proliferativos y con un proceso apoptótico más marcado que aquellos animales con una lactancia deficiente.
- El número y tamaño de TEBs es menor en animales que recibieron una lactancia óptima.
- Una óptima lactancia materna provoca en la glándula mamaria la activación de programas génicos asociados a la diferenciación celular y carcinogénesis.
- El consumo diferencial de leche materna provoca cambios en la metilación de genes involucrados en el proceso de diferenciación de la glándula mamaria.

*Se concluye que* la lactancia materna apropiada protege contra el desarrollo de cáncer de mama de las crías, produciendo cambios epigenéticos de genes que inducen y mantienen el estado de diferenciación mamario en la vida adulta.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

A partir de los resultados y discusiones presentados en esta Tesis Doctoral, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en dos direcciones.

En un primer plano estarían las tareas destinadas a completar los aspectos epigenéticos mostrados, ya que solamente se han contemplado cambios en la metilación del ADN. Se conoce que la modificación de las histonas y los miRNA, pueden funcionar conjuntamente con cambios en la metilación para regular la expresión génica. En concreto, se podría evaluar el efecto de la lactancia materna óptima sobre la expresión en la glándula mamaria de miRNA e histonas relacionados con la diferenciación y el CaM en ratas, a fin de obtener un panorama más completo.

Además, sería de gran relevancia analizar con mayor profundidad los cambios observados en la metilación del ADN. Para ello se deberían analizar nuevas islas CpG presentes en el promotor de los genes estudiados; como así también extender los estudios a otros genes vinculados con la diferenciación y el cáncer.

En un segundo plano, se encontrarían los estudios destinados a evaluar si el contenido de miRNA en la leche de rata y humana se modifican ante los distintos grados de lactancia materna. Para ello sería necesario obtener leche de ratas que estén amamantando camadas de 3, 8 ó 12 crías por madre. Por otra parte se seleccionarían muestras de madres con bebés de entre 15 y 60 días de vida a fin de conformar dos cohortes, una con madres que alimentan exclusivamente sus bebés con leche materna (equivalente a la lactancia óptima de nuestro modelo animal) y otra con madres que complementan la alimentación de sus bebés con leche de fórmula (equivalente a nuestro modelo de lactancia deficiente). Tanto las leches provenientes de animales como de humanos serán investigadas para evaluar el contenido de miRNA específicos.

Por otra parte, entre las perspectivas futuras se pretende publicar los resultados obtenidos, parte de los cuales se encuentran actualmente en proceso de revisión.

## REFERENCIAS

- Admyre, C., Johansson, S. M., Qazi, K. R., Filen, J.-J., Lahesmaa, R., Norman, M., ... Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *179*(3), 1969–1978.
- Akobeng, a K., Ramanan, a V, Buchan, I., & Heller, R. F. (2006). Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Archives Of Disease In Childhood*, *91*(1), 39–43. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1136/adc.2005.082016>
- Alexander, D. D., Morimoto, L. M., Mink, P. J., & Lowe, K. A. (2010). Summary and meta-analysis of prospective studies of animal fat intake and breast cancer. *Nutrition Research Reviews*, *23*(1), 169–79. <https://doi.org/10.1017/S095442241000003X>
- Amamcharla, J. K., & Metzger, L. E. (2011). Development of a rapid method for the measurement of lactose in milk using a blood glucose biosensor. *Journal of Dairy Science*, *94*(10), 4800–4809. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4416>
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, *431*(7006), 350–355. <https://doi.org/10.1038/nature02871>
- Anderson, E., & Clarke, R. B. (2004). Steroid receptors and cell cycle in normal mammary epithelium. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, *9*(1), 3–13. <https://doi.org/10.1023/B:JOMG.0000023584.01750.16r483560> [pii]
- Anderson, J. W., Johnstone, B. M., & Remley, D. T. (1999). Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *70*(4), 525–535.
- Anderson, S. M., Rudolph, M. C., McManaman, J. L., & Neville, M. C. (2007). Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! *Breast Cancer Research : BCR*, *9*(1), 204. <https://doi.org/10.1186/bcr1653>
- Ansel, K. M., Djuretic, I., Tanasa, B., & Rao, A. (2006). Regulation of Th2 differentiation and IL4

locus accessibility. *Annual Review of Immunology*, 24, 607–656.

<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115821>

Arifeen, S., Black, R. E., Antelman, G., Baqui, A., Caulfield, L., & Becker, S. (2001). Exclusive Breastfeeding Reduces Acute Respiratory Infection and Diarrhea Deaths Among Infants in Dhaka Slums. *PEDIATRICS*, 108(4), e67–e67. <https://doi.org/10.1542/peds.108.4.e67>

Bachrach, V. R. G., Schwarz, E., & Bachrach, L. R. (2003). Breastfeeding and the Risk of Hospitalization for Respiratory Disease in Infancy. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 157(3), 237. <https://doi.org/10.1001/archpedi.157.3.237>

Baddela, V. S., Nayan, V., Rani, P., Onteru, S. K., & Singh, D. (2016). Physicochemical Biomolecular Insights into Buffalo Milk-Derived Nanovesicles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(3), 544–557. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1893-7>

Bahl, R., Frost, C., Kirkwood, B. R., Edmond, K., Martines, J., Bhandari, N., & Arthur, P. (2005). Infant feeding patterns and risks of death and hospitalization in the first half of infancy: Multicentre cohort study. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(6), 418–426. <https://doi.org/S0042-96862005000600009>

Bakhshandeh, B., Kamaledin, M. A., & Aalishah, K. (2017). A Comprehensive Review on Exosomes and Microvesicles as Epigenetic Factors. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 31–36.

Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60(1), 49–74. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>

Banerjee, S., Uppal, T., Strahan, R., Dabral, P., & Verma, S. C. (2016). The modulation of apoptotic pathways by gammaherpesviruses. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00585>

BARKER, D. J. P. (1998). In utero programming of chronic disease. *Clinical Science*, 95(2), 115–128. <https://doi.org/10.1042/cs0950115>

Beckmann, M. W., Niederacher, D., Schnurch, H. G., Gusterson, B. A., & Bender, H. G. (1997).

- Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 75(6), 429–439.
- Billen, L. P., Kokoski, C. L., Lovell, J. F., Leber, B., & Andrews, D. W. (2008). Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biology*, 6(6), 1268–1280. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060147>
- Billen, L. P., Shamas-Din, A., & Andrews, D. W. (2008). Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene*, 27, S93–S104. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.47>
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 16(1), 6–21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>
- Bird, a P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321(6067), 209–213. <https://doi.org/10.1038/321209a0>
- Black, R. E., Victora, C. G., Walker, S. P., Bhutta, Z. A., Christian, P., de Onis, M., ... Uauy, R. (2013). Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet (London, England)*, 382(9890), 427–451. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60937-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60937-X)
- Blagosklonny, M. V., & Pardee, A. B. (2002). The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*. <https://doi.org/10.4161/cc.1.2.108>
- Boon, R. A., & Vickers, K. C. (2013). Intercellular transport of microRNAs. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(2), 186–192. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300139>
- Boyd, N. F., Stone, J., Vogt, K. N., Connelly, B. S., Martin, L. J., & Minkin, S. (2003). Dietary fat and breast cancer risk revisited: a meta-analysis of the published literature. *British Journal of Cancer*, 89(9), 1672–1685. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601314>
- Bravi, F., Wiens, F., Decarli, A., Dal Pont, A., Agostoni, C., & Ferraroni, M. (2016). Impact of maternal nutrition on breast-milk composition: A systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition*. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.120881>

- Bravo, R., Fey, S. J., Bellatin, J., Larsen, P. M., & Celis, J. E. (1982). Identification of a nuclear polypeptide (“cyclin”) whose relative proportion is sensitive to changes in the rate of cell proliferation and to transformation. *Progress in Clinical and Biological Research*, 85 Pt A, 235–248.
- Brown, K. H., Black, R. E., Lopez de Romaña, G., & Creed de Kanashiro, H. (1989). Infant-feeding practices and their relationship with diarrheal and other diseases in Huascar (Lima), Peru. *Pediatrics*, 83(1), 31–40.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., & Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15, 269–90. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.269>
- Burke, V., Beilin, L. J., Simmer, K., Oddy, W. H., Blake, K. V., Doherty, D., ... Stanley, F. J. (2005). Breastfeeding and overweight: Longitudinal analysis in an Australian birth cohort. *Journal of Pediatrics*, 147(1), 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.03.038>
- Butte, N., Lopez-Alaracon, M., & Garza, C. (2002). Nutrient adequacy of exclusive breastfeeding for the term infant during the first six months of life. *World Health Organization*, 47. <https://doi.org/ISBN 92 4 156211 0>
- Calder, P. C. (2002). Dietary modification of inflammation with lipids. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61(3), 345–358. <https://doi.org/10.1079/PNS2002166>
- Campo Verde Arboccó, F., Sasso, C. V., Actis, E. A., Carón, R. W., Hapon, M. B., & Jahn, G. A. (2016). Hypothyroidism advances mammary involution in lactating rats through inhibition of PRL signaling and induction of LIF/STAT3 mRNAs. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 419, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.09.023>
- Carroll, K. K., & Khor, H. T. (1975). Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Progress in Biochemical Pharmacology*, 10, 308–353.
- Ceber, E., Sogukpinar, N., Mermer, G., & Aydemir, G. (2005). Nutrition, Lifestyle, and Breast Cancer Risk Among Turkish Women. *Nutrition and Cancer*, 53(2), 152–159. [https://doi.org/10.1207/s15327914nc5302\\_4](https://doi.org/10.1207/s15327914nc5302_4)
- Celis, J. E., Bravo, R., Larsen, P. M., & Fey, S. J. (1984). Cyclin: A nuclear protein whose level

correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cells. *Leukemia*

*Research*. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(84\)90135-8](https://doi.org/10.1016/0145-2126(84)90135-8)

Chantry, C. J., Howard, C. R., & Auinger, P. (2006). Full breastfeeding duration and associated decrease in respiratory tract infection in US children. *Pediatrics*, *117*(2), 425–32. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-2283>

Chen, T., Xi, Q.-Y., Ye, R.-S., Cheng, X., Qi, Q.-E., Wang, S.-B., ... Zhang, Y.-L. (2014). Exploration of microRNAs in porcine milk exosomes. *BMC Genomics*, *15*, 100. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-100>

Chen, X., Gao, C., Li, H., Huang, L., Sun, Q., Dong, Y., ... Zhang, C.-Y. (2010). Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Research*, *20*(10), 1128–1137. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.80>

Cho, E., Spiegelman, D., Hunter, D. J., Chen, W. Y., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., & Willett, W. C. (2003). Premenopausal Fat Intake and Risk of Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *95*(14), 1079–1085. <https://doi.org/10.1093/jnci/95.14.1079>

Chua, S., Arulkumaran, S., Lim, I., Selamat, N., & Ratnam, S. S. (1994). Influence of breastfeeding and nipple stimulation on postpartum uterine activity. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, *101*(9), 804–805. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1994.tb11950.x>

Clarkson, R. W. E., Wayland, M. T., Lee, J., Freeman, T., & Watson, C. J. (2004). Gene expression profiling of mammary gland development reveals putative roles for death receptors and immune mediators in post-lactational regression. *Breast Cancer Research : BCR*, *6*(2), R92-109. <https://doi.org/10.1186/bcr754>

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, C. G. on H. F. in B., Vessey, M., Baron, J., ... WHO. (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and

- 96973 women without the disease. *Lancet (London, England)*, 360(9328), 187–95.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09454-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09454-0)
- Collaborative Study Team, W. (2000). Effect of breastfeeding on infant and child mortality due to infectious diseases in less developed countries: a pooled analysis. *The Lancet*, 355(9202), 451–455. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)82011-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)82011-5)
- Conneely, O. M., & Lydon, J. P. (2000). Progesterone receptors in reproduction: Functional impact of the A and B isoforms. In *Steroids* (Vol. 65, pp. 571–577). [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(00\)00115-X](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(00)00115-X)
- Cummings, J. H., & Bingham, S. a. (1998). Diet and the prevention of cancer. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 317(7173), 1636–1640. <https://doi.org/10.1136/bmj.319.7203.186a>
- Cutfield, W. S., Hofman, P. L., Mitchell, M., & Morison, I. M. (2007). Could epigenetics play a role in the developmental origins of health and disease? *Pediatric Research*, 61(5 Pt 2), 68R–75R. <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e318045764c>
- Czank, C., Henderson, J., Kent, J. C. ., Lai, C. T., & Hartmann, P. (2007). No Title Hormonal Control of the Lactation Cycle. *Textbook of Human Lactation*, 89–111.
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205–219.
- Daniels, M. C., & Adair, L. S. (2005). Breast-feeding influences cognitive development in Filipino children. *The Journal of Nutrition*, 135(11), 2589–2595. <https://doi.org/10.1093/ajph/95/11/2589> [pii]
- Davenport, T. G. (2003). Mammary gland, limb and yolk sac defects in mice lacking Tbx3, the gene mutated in human ulnar mammary syndrome. *Development*, 130(10), 2263–2273. <https://doi.org/10.1242/dev.00431>
- Dawodu, A., Zalla, L., Woo, J. G., Herbers, P. M., Davidson, B. S., Heubi, J. E., & Morrow, A. L. (2014). Heightened attention to supplementation is needed to improve the vitamin D status of breastfeeding mothers and infants when sunshine exposure is restricted. *Maternal & Child Nutrition*, 10(3), 383–397. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8709.2012.00422.x>
- De, Z. I., Rea, M., & Martines, J. (1991). Why promote breastfeeding in diarrhoeal disease control programmes? *Health Policy and Planning*, 4,371-374,379.

- de Assis, S., Warri, A., Cruz, M. I., & Hilakivi-Clarke, L. (2010). Changes in Mammary Gland Morphology and Breast Cancer Risk in Rats. *Journal of Visualized Experiments*, (44).  
<https://doi.org/10.3791/2260>
- Dennis, C.-L., & McQueen, K. (2009). The relationship between infant-feeding outcomes and postpartum depression: a qualitative systematic review. *Pediatrics*, *123*(4), e736-51.  
<https://doi.org/10.1542/peds.2008-1629>
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., ... Martinou, J. C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, *144*(5), 891–901.
- Dewey, K. G., & Adu-Afarwuah, S. (2008). Systematic review of the efficacy and effectiveness of complementary feeding interventions in developing countries. *Maternal and Child Nutrition*.  
<https://doi.org/10.1111/j.1740-8709.2007.00124.x>
- Dewey, K. G., & Brown, K. H. (2003). Update on technical issues concerning complementary feeding of young children in developing countries and implications for intervention programs. *Food and Nutrition Bulletin*, *24*(1), 5–28. <https://doi.org/10.1177/156482650302400102>
- Dewey, K. G., Cohen, R. J., Brown, K. H., & Rivera, L. L. (2001). Effects of Exclusive Breastfeeding for Four versus Six Months on Maternal Nutritional Status and Infant Motor Development: Results of Two Randomized Trials in Honduras. *The Journal of Nutrition*, *131*(2), 262–267.
- Dipple, A., Pigott, M., Moschel, R. C., & Costantino, N. (1983). Evidence That Binding of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene to DNA in Mouse Embryo Cell Cultures Results in Extensive Substitution of both Adenine and Guanine Residues. *Cancer Research*, *43*(9), 4132–4135.
- DO, M. (2008). SnapShot: cell-cycle regulators I. *Cell*, *135*(4), 764–764.e1.
- Do Nascimento, M., Moura Reis, M., Franco, S., Issler, H., Ferraro, A., & Grisi, S. (2010). Exclusive Breastfeeding in Southern Brazil: Prevalence and Associated Factors. *Breastfeeding Medicine*, *5*(2), 79–85.
- Douglas, N. C., & Papaioannou, V. E. (2013). The T-box transcription factors TBX2 and TBX3 in

- mammary gland development and breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. <https://doi.org/10.1007/s10911-013-9282-8>
- Ekblom, A., Hsieh, C. C., Lipworth, L., Adami, H. Q., & Trichopoulos, D. (1997). Intrauterine environment and breast cancer risk in women: a population-based study. *Journal of the National Cancer Institute*, *89*(1), 71–76.
- Ekblom, A., Trichopoulos, D., Adami, H. O., Hsieh, C. C., & Lan, S. J. (1992). Evidence of prenatal influences on breast cancer risk. *Lancet (London, England)*, *340*(8826), 1015–1018.
- Elias, J. M. (1997). Cell proliferation indexes: a biomarker in solid tumors. *Biotechnic & Histochemistry : Official Publication of the Biological Stain Commission*, *72*(2), 78–85.
- Fay, M. P., Freedman, L. S., Clifford, C. K., & Midthune, D. N. (1997). Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Research*, *57*(18), 3979–3988.
- Feachem, R. G. (1984). Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: Promotion of personal and domestic hygiene. *Bulletin of the World Health Organization*, *62*(3), 467–476. <https://doi.org/10.1097/00006454-198411000-00036>
- Fentiman, I. S., & D'Arrigo, C. (2004). Pathogenesis of breast carcinoma. *International Journal of Clinical Practice*, *58*(1), 35–40. <https://doi.org/10.1111/j.1368-5031.2003.0091.x>
- Fernandez-Twinn, D. S., & Ozanne, S. E. (2010). Early life nutrition and metabolic programming. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1212*, 78–96. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05798.x>
- Ferraroni, M., Decarli, a, Willett, W. C., & Marubini, E. (1991). Alcohol and breast cancer risk: a case-control study from northern Italy. *International Journal of Epidemiology*, *20*(4), 859–864.
- Fidler, N., Sauerwald, T. U., Koletzko, B., & Demmelmair, H. (1998). Effects of human milk pasteurization and sterilization on available fat content and fatty acid composition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. <https://doi.org/10.1097/00005176-199809000-00009>
- Figueroa, J. D., Pfeiffer, R. M., Patel, D. A., Linville, L., Brinton, L. A., Gierach, G. L., ... Sherman, M. E. (2014). Terminal duct lobular unit involution of the normal breast: Implications for breast

- cancer etiology. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(10).  
<https://doi.org/10.1093/jnci/dju286>
- Fletcher, S. J., Sacca, P. A., Pistone-Creydt, M., Coló, F. A., Serra, M. F., Santino, F. E., ... Pistone-Creydt, V. (2017). Human breast adipose tissue: characterization of factors that change during tumor progression in human breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 36(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0494-4>
- Forsyth, I. A. (1991). The mammary gland. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 5(4), 809–832.
- Foster, W. G., Younglai, E. V., Boutross-Tadross, O., Hughes, C. L., & Wade, M. G. (2004). Mammary gland morphology in Sprague-Dawley rats following treatment with an organochlorine mixture in utero and neonatal genistein. *Toxicological Sciences*.  
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg247>
- Freedman, L. S., Clifford, C., & Messina, M. (1990). Analysis of Dietary Fat, Calories, Body Weight, and the Development of Mammary Tumors in Rats and Mice: A Review. *Cancer Research*, 50(18), 5710–5719.
- Freedman, L. S., Potischman, N., Kipnis, V., Midthune, D., Schatzkin, A., Thompson, F. E., ... Subar, A. F. (2006). A comparison of two dietary instruments for evaluating the fat-breast cancer relationship. *International Journal of Epidemiology*, 35(4), 1011–1021.  
<https://doi.org/10.1093/ije/dyl085>
- Freudenheim, J. L., Marshall, J. R., Graham, S., Laughlin, R., Vena, J. E., Bandera, E., ... Nemoto, T. (1994). Exposure to breastmilk in infancy and the risk of breast cancer. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 5(3), 324–331.
- Fritz, J. H., Ferrero, R. L., Philpott, D. J., & Girardin, S. E. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nature Immunology*, 7(12), 1250–1257.  
<https://doi.org/10.1038/ni1412>
- Gago, F. E., Tello, O. M., Diblasi, a M., & Ciocca, D. R. (1998). Integration of estrogen and progesterone receptors with pathological and molecular prognostic factors in breast cancer patients. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 67(5–6), 431–437.

- Gao, X., McMahon, R. J., Woo, J. G., Davidson, B. S., Morrow, A. L., & Zhang, Q. (2012). Temporal changes in milk proteomes reveal developing milk functions. *Journal of Proteome Research*, 11(7), 3897–3907. <https://doi.org/10.1021/pr3004002>
- Gdalevich, M., Mimouni, D., & Mimouni, M. (2001). Breast-feeding and the risk of bronchial asthma in childhood: a systematic review with meta-analysis of prospective studies. *The Journal of Pediatrics*, 139(2), 261–6. <https://doi.org/10.1067/mpd.2001.117006>
- Geddes, D. T. (2007). Inside the Lactating Breast: The Latest Anatomy Research. *Journal of Midwifery and Women's Health*, 52(6), 556–563. <https://doi.org/10.1016/j.jmwh.2007.05.004>
- Ginger, M. R., Shore, A. N., Contreras, A., Rijnkels, M., Miller, J., Gonzalez-Rimbau, M. F., & Rosen, J. M. (2006). A noncoding RNA is a potential marker of cell fate during mammary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(15), 5781–5786. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600745103>
- Gluckman, P. D., & Hanson, M. A. (2004). Maternal constraint of fetal growth and its consequences. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2004.03.001>
- Goldman, A. S. (2007). The Immune System in Human Milk and the Developing Infant. *Breastfeeding Medicine*, 2(4), 195–204. <https://doi.org/10.1089/bfm.2007.0024>
- Graham, S., Marshall, J., Mettlin, C., Rzepka, T., Nemoto, T., & Byers, T. (1982). Diet in the epidemiology of breast cancer. *American Journal of Epidemiology*, 116(1), 68–75.
- Greer, F. R. (2001). Do breastfed infants need supplemental vitamins? *Pediatric Clinics of North America*, 48(2), 415–423.
- Gu, Y., Li, M., Wang, T., Liang, Y., Zhong, Z., Wang, X., ... Lv, X. (2012). Lactation-Related MicroRNA Expression Profiles of Porcine Breast Milk Exosomes. *PLoS ONE*, 7(8), e43691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043691>
- Gupta, A., Pandey, A., Ayers, C., Beg, M. S., Lakoski, S. G., Vega, G. L., ... Neeland, I. J. (2017). An Analysis of Individual Body Fat Depots and Risk of Developing Cancer: Insights From the Dallas Heart Study. *Mayo Clinic Proceedings*, 92(4), 536–543. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.12.023>

- Gutierrez-Castrellon, P., Mora-Magana, I., Diaz-Garcia, L., Jimenez-Gutierrez, C., Ramirez-Mayans, J., & Solomon-Santibanez, G. A. (2007). Immune response to nucleotide-supplemented infant formulae: systematic review and meta-analysis. *The British Journal of Nutrition*, *98 Suppl 1*, S64-7. <https://doi.org/10.1017/S000711450783296X>
- Ha, D., Yang, N., & Nadithe, V. (2016). Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, *6*(4), 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001>
- Hapon, M. B., Varas, S. M., Giménez, M. S., & Jahn, G. A. (2007). Reduction of mammary and liver lipogenesis and alteration of milk composition during lactation in rats by hypothyroidism. *Thyroid : Official Journal of the American Thyroid Association*, *17*(1), 11–8. <https://doi.org/10.1089/thy.2005.0267>
- Harder, T., Bergmann, R., Kallischnigg, G., & Plagemann, A. (2005). Duration of breastfeeding and risk of overweight: A meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, *162*(5), 397–403. <https://doi.org/10.1093/aje/kwi222>
- Haricharan, S., & Li, Y. (2014). STAT signaling in mammary gland differentiation, cell survival and tumorigenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *382*(1), 560–569. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.03.014>
- Hartmann, P. E. (2007). The Lactating Breast: An Overview from Down Under. *Breastfeeding Medicine*, *2*(1), 3–9. <https://doi.org/10.1089/bfm.2006.0034>
- Hassiotou, F., & Geddes, D. (2013). Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical Anatomy*. <https://doi.org/10.1002/ca.22165>
- Hata, T., Murakami, K., Nakatani, H., Yamamoto, Y., Matsuda, T., & Aoki, N. (2010). Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *396*(2), 528–533. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.135>
- He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews. Genetics*, *5*(7), 522–531. <https://doi.org/10.1038/nrg1379>

- Hennighausen, L., & Robinson, G. W. (2005). Information networks in the mammary gland. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(9), 715–725. <https://doi.org/10.1038/nrm1714>
- Hermann, S., Linseisen, J., & Chang-Claude, J. (2002). Nutrition and breast cancer risk by age 50: a population-based case-control study in Germany. *Nutrition and Cancer*, 44(1), 23–34. [https://doi.org/10.1207/S15327914NC441\\_4](https://doi.org/10.1207/S15327914NC441_4)
- Hilakivi-Clarke, L. (2007). Nutritional Modulation of Terminal End Buds: Its Relevance to Breast Cancer Prevention. *Current Cancer Drug Targets*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/156800907781386641>
- Hilakivi-Clarke, L., Clarke, R., & Lippman, M. (1999). The influence of maternal diet on breast cancer risk among female offspring. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 15(5), 392–401. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10355854>
- Hilakivi-Clarke, L., Clarke, R., Onojafe, I., Raygada, M., Cho, E., & Lippman, M. (1997). A maternal diet high in n - 6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(17), 9372–9377.
- Hilakivi-Clarke, L., & de Assis, S. (2006). Fetal origins of breast cancer. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 17(9), 340–348. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2006.09.002>
- Hirohata, T., Shigematsu, T., Nomura, A. M., Nomura, Y., Horie, A., & Hirohata, I. (1985). Occurrence of breast cancer in relation to diet and reproductive history: a case-control study in Fukuoka, Japan. *National Cancer Institute Monograph*, 69, 187–190. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3834330>
- Hock, A., Miyake, H., Li, B., Lee, C., Ermini, L., Koike, Y., ... Pierro, A. (2017). Breast milk-derived exosomes promote intestinal epithelial cell growth. *Journal of Pediatric Surgery*, 52(5), 755–759. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2017.01.032>
- Hovey, R. C., McFadden, T. B., & Akers, R. M. (1999). Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 4(1), 53–68. <https://doi.org/10.1023/A:1018704603426>
- Howard, B. A., & Gusterson, B. A. (2000). Human breast development. *Journal of Mammary Gland*

*Biology and Neoplasia*, 5(2), 119–137.

- Howard, K. M., Jati Kusuma, R., Baier, S. R., Friemel, T., Markham, L., Vanamala, J., & Zempleni, J. (2015). Loss of miRNAs during processing and storage of cow's (*Bos taurus*) milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 588–592. <https://doi.org/10.1021/jf505526w>
- Howe, G. R., Hirohata, T., Hislop, T. G., Iscovich, J. M., Yuan, J. M., Katsouyanni, K., ... Rohan, T. (1990). Dietary factors and risk of breast cancer: combined analysis of 12 case-control studies. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(7), 561–569. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2156081>
- Howie, P. W., Forsyth, J. S., Ogston, S. A., Clark, A., & Florey, C. D. (1990). Protective effect of breast feeding against infection. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 300(6716), 11–16.
- Hunter, D. J., Spiegelman, D., Adami, H. O., Beeson, L., Van Den Brandt, P. a, Folsom, a R., ... Howe, G. R. (1996). Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer--a pooled analysis. *The New England Journal of Medicine*, 334(6), 356–361. <https://doi.org/10.1056/NEJM199602083340603>
- Hurley, W. L. (1989). Mammary gland function during involution. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1637–1646. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79276-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79276-6)
- Inoue, M., Binns, C. W., Otsuka, K., Jimba, M., & Matsubara, M. (2012). Infant feeding practices and breastfeeding duration in Japan: A review. *International Breastfeeding Journal*, 7, 15. <https://doi.org/10.1186/1746-4358-7-15>
- Iscovich, J. M., Iscovich, R. B., Howe, G., Shiboski, S., & Kaldor, J. M. (1989). A case-control study of diet and breast cancer in Argentina. *International Journal of Cancer*, 44(5), 770–776.
- Izumi, H., Kosaka, N., Shimizu, T., Sekine, K., Ochiya, T., & Takase, M. (2012). Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 4831–4841. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5489>
- Izumi, H., Kosaka, N., Shimizu, T., Sekine, K., Ochiya, T., & Takase, M. (2014). Time-dependent expression profiles of microRNAs and mRNAs in rat milk whey. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088843>
- Javed, A., & Lteif, A. (2013). Development of the Human Breast. *Seminars in Plastic Surgery*,

27(1), 5–12. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1343989>

- Jensen, R. G. (1996). Handbook of Milk Composition, edited by Robert G. Jensen. Academic Press, San Diego, 1995, 919 pp., 89.95. *Journal of Food Composition and Analysis*, 9(3), 284. <https://doi.org/10.1006/jfca.1996.0035>
- Jerome-Majewska, L. A., Jenkins, G. P., Ernstoff, E., Zindy, F., Sherr, C. J., & Papaioannou, V. E. (2005). Tbx3, the ulnar-mammary syndrome gene, and Tbx2 interact in mammary gland development through a p19Arf/p53-independent pathway. *Developmental Dynamics*, 234(4), 922–933. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20575>
- Khaled, W. T., Read, E. K. C., Nicholson, S. E., Baxter, F. O., Brennan, A. J., Came, P. J., ... Watson, C. J. (2007). The IL-4/IL-13/Stat6 signalling pathway promotes luminal mammary epithelial cell development. *Development (Cambridge, England)*, 134(15), 2739–2750. <https://doi.org/10.1242/dev.003194>
- Kikkawa, Y., Seki, Y., Okumura, K., Ohshiba, Y., Miyasaka, Y., Suzuki, S., ... Yonekawa, H. (2012). Advantages of a mouse model for human hearing impairment. *Experimental Animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 61(2), 85–98. <https://doi.org/10.1538/expanim.61.85>
- King Wiliam. (1910). *The orders of mammals. Bulletin of the AMNH* (Vol. 27).
- Klement, E., Cohen, R. V, Boxman, J., Joseph, A., & Reif, S. (2004). Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am J Clin Nutr*, 80(5), 1342–1352. Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/content/80/5/1342.long>
- Kohlmeier, L. (1997). Biomarkers of fatty acid exposure and breast cancer risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66(6 Suppl), 1548S–1556S.
- Koletzko, B., Rodriguez-Palmero, M., Demmelmair, H., Fidler, N., Jensen, R., & Sauerwald, T. (2001). Physiological aspects of human milk lipids. *Early Human Development*, 65 Suppl, S3–S18.
- Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K., & Ochiya, T. (2010). microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 1(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1758-907X-1-7>

- Kouros-Mehr, H., Slorach, E. M., Sternlicht, M. D., & Werb, Z. (2006). GATA-3 Maintains the Differentiation of the Luminal Cell Fate in the Mammary Gland. *Cell*, *127*(5), 1041–1055. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.048>
- Kramer, M. S. (2001). Promotion of Breastfeeding Intervention Trial (PROBIT): A Randomized Trial in the Republic of Belarus. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, *285*(4), 413–420. <https://doi.org/10.1001/jama.285.4.413>
- Kramer, M. S., Guo, T., Platt, R. W., Sevkovskaya, Z., Dzikovich, I., Collet, J. P., ... Bogdanovich, N. (2003). Infant growth and health outcomes associated with 3 compared with 6 mo of exclusive breastfeeding. *American Journal of Clinical Nutrition*, *78*(2), 291–295.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, *87*(1), 99–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
- Kruidering, M., & Evan, G. (2000). Caspase-8 in Apoptosis: The Beginning of “The End”? *IUBMB Life*, *50*(2), 85–90. <https://doi.org/10.1080/713803693>
- Kwan, M. L., Buffler, P. A., Abrams, B., & Kiley, V. A. (2004). Breastfeeding and the risk of childhood leukemia: A meta-analysis. *Public Health Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.phr.2004.09.002>
- Landecker, H. (2011). Food as exposure: Nutritional epigenetics and the new metabolism. *BioSocieties*, *6*(2), 167–194. <https://doi.org/10.1057/biosoc.2011.1>
- Larsson, S. C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., & Wolk, A. (2004). Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *79*(6), 935–945.
- Lea, A. J. (1966). Dietary factors associated with death-rates from certain neoplasms in man. *Lancet (London, England)*, *2*(7458), 332–333.
- León-Cava, N., Lutter, C., Ross, J., & Martin, L. (2002). Cuantificación de los Beneficios de la Lactancia Materna: Reseña de la Evidencia. *Us1.1*, 1–186.
- Liao, Y., Alvarado, R., Phinney, B., & Lonnerdal, B. (2011). Proteomic characterization of human milk whey proteins during a twelve-month lactation period. *Journal of Proteome Research*,

10(4), 1746–1754. <https://doi.org/10.1021/pr101028k>

Liotto, N., Miozzo, M., Gianni, M. L., Taroni, F., Morlacchi, L., Piemontese, P., ... Mosca, F. (2009). [Early nutrition: the role of genetics and epigenetics]. *La Pediatria medica e chirurgica : Medical and surgical pediatrics*, 31(2), 65–71.

Líška, J., Brtko, J., Dubovický, M., Macejová, D., Kissová, V., Polák, Š., & Ujházy, E. (2016). Relationship between histology, development and tumorigenesis of mammary gland in female rat. *Experimental Animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 65(1), 1–9. <https://doi.org/10.1538/expanim.15-0055>

Liu, J., Esmailpour, T., Shang, X., Gulsen, G., Liu, A., & Huang, T. (2011). TBX3 over-expression causes mammary gland hyperplasia and increases mammary stem-like cells in an inducible transgenic mouse model. *BMC Developmental Biology*, 11(1), 65. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-11-65>

Lo, C.-Y., Hsieh, P.-H., Chen, H.-F., & Su, H.-M. (2009). A maternal high-fat diet during pregnancy in rats results in a greater risk of carcinogen-induced mammary tumors in the female offspring than exposure to a high-fat diet in postnatal life. *International Journal of Cancer*, 125(4), 767–773. <https://doi.org/10.1002/ijc.24464>

Lönnerdal, B. (2004). Human Milk Proteins BT - Protecting Infants through Human Milk: Advancing the Scientific Evidence. In L. K. Pickering, A. L. Morrow, G. M. Ruiz-Palacios, & R. J. Schanler (Eds.) (pp. 11–25). Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4242-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4242-8_4)

Lopez-Fontana, C. M., Sasso, C. V., Maselli, M. E., Santiano, F. E., Semino, S. N., Cuello Carrion, F. D., ... Caron, R. W. (2013). Experimental hypothyroidism increases apoptosis in dimethylbenzanthracene-induced mammary tumors. *Oncology Reports*, 30(4), 1651–1660. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2648>

López Fontana, C. M., Zyla, L. E., Santiano, F. E., Sasso, C. V., Cuello-Carrión, F. D., Pistone Creydt, V., ... Carón, R. W. (2017). Hypothyroidism reduces mammary tumor progression via B-catenin-activated intrinsic apoptotic pathway in rats. *Histochemistry and Cell Biology*, 147(6), 759–769. <https://doi.org/10.1007/s00418-017-1544-x>

- Macias, H., & Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1002/wdev.35>
- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., & Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, *62*(4a), 609–614. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400008>
- Mårild, S., Hansson, S., Jodal, U., Odén, a, & Svedberg, K. (2004). Protective effect of breastfeeding against urinary tract infection. *Acta Paediatrica*, *93*(2), 164–168. <https://doi.org/10.1080/08035250310007402>
- Martin, R. M., Ebrahim, S., Griffin, M., Smith, G. D., Nicolaides, A. N., Georgiou, N., ... Gunnell, D. (2005). Breastfeeding and atherosclerosis: Intima-media thickness and plaques at 65-year follow-up of the Boyd Orr cohort. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *25*(7), 1482–1488. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000170129.20609.49>
- Martin, R. M., Gunnell, D., & Smith, G. D. (2005). Breastfeeding in infancy and blood pressure in later life: Systematic review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*. <https://doi.org/10.1093/aje/kwh338>
- Martin, R. M., Middleton, N., Gunnell, D., Owen, C. G., & Smith, G. D. (2005). Breast-feeding and cancer: the Boyd Orr cohort and a systematic review with meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, *97*(19), 1446–1457. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji291>
- Martinez-Hernandez, A., Fink, L. M., & Pierce, G. B. (1976). Removal of basement membrane in the involuting breast. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *34*(5), 455–462. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5627>
- Masso-Welch, P. A., Darcy, K. M., Stangle-Castor, N. C., & Ip, M. M. (2000). A developmental atlas of rat mammary gland histology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *5*(2), 165–185. <https://doi.org/10.1023/A:1026491221687>
- Medina, D. (1996). The mammary gland: A unique organ for the study of development and tumorigenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *1*(1), 5–19. <https://doi.org/10.1007/BF02096299>

- Melnik, B. C., John, S. M., & Schmitz, G. (2013). Milk is not just food but most likely a genetic transfection system activating mTORC1 signaling for postnatal growth. *Nutrition Journal*, *12*(1), 103. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-12-103>
- Melnik, B. C., Kakulas, F., Geddes, D. T., Hartmann, P. E., John, S. M., Carrera-Bastos, P., ... Schmitz, G. (2016). Milk miRNAs: simple nutrients or systemic functional regulators? *Nutrition & Metabolism*, *13*, 42. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0101-2>
- Melnik, B., & Schmitz, G. (2017). Milk's Role as an Epigenetic Regulator in Health and Disease. *Diseases*, *5*(1), 12. <https://doi.org/10.3390/diseases5010012>
- Michels, K. B., Trichopoulos, D., Rosner, B. A., Hunter, D. J., Colditz, G. A., Hankinson, S. E., ... Willett, W. C. (2001). Being breastfed in infancy and breast cancer incidence in adult life: results from the two nurses' health studies. *American Journal of Epidemiology*, *153*(3), 275–283.
- Modepalli, V., Kumar, A., Hinds, L. A., Sharp, J. A., Nicholas, K. R., & Lefevre, C. (2014). Differential temporal expression of milk miRNA during the lactation cycle of the marsupial tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *BMC Genomics*, *15*, 1012. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1012>
- Morag, M., Popliker, F., & Yagil, R. (1975). Effect of litter size on milk yield in the rat. *Laboratory Animals*, *9*(1), 43–47. <https://doi.org/10.1258/002367775780994844>
- Morrison, V. M., Burnett, A. K., Forrester, L. M., Wolf, C. R., & Craft, J. A. (1991). The contribution of specific cytochromes P-450 in the metabolism of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in rat and human liver microsomal membranes. *Chemico-Biological Interactions*, *79*(2), 179–196. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(91\)90081-H](https://doi.org/10.1016/0009-2797(91)90081-H)
- Mortensen, E. L. (2002). The Association Between Duration of Breastfeeding and Adult Intelligence. *JAMA*, *287*(18), 2365. <https://doi.org/10.1001/jama.287.18.2365>
- Mueller, M. M., & Fusenig, N. E. (2004). Friends or foes — bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *4*(11), 839–849. <https://doi.org/10.1038/nrc1477>
- Na, R. S., E, G. X., Sun, W., Sun, X. W., Qiu, X. Y., Chen, L. P., & Huang, Y. F. (2015).

- Expressional analysis of immune-related miRNAs in breast milk. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 14(3), 11371–11376. <https://doi.org/10.4238/2015.September.25.4>
- Naccarato, A. G., Viacava, P., Vignati, S., Fanelli, G., Bonadio, A. G., Montruccoli, G., & Bevilacqua, G. (2000). Bio-morphological events in the development of the human female mammary gland from fetal age to puberty. *Virchows Archiv*, 436(5), 431–438. <https://doi.org/10.1007/s004280050470>
- Neville, M. C., McFadden, T. B., & Forsyth, I. (2002). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. <https://doi.org/10.1023/A:1015770423167>
- Newburg, D. S., & Walker, W. A. (2007). Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatric Research*. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000250274.68571.18>
- Nishioka, E., Haruna, M., Ota, E., Matsuzaki, M., Murayama, R., Yoshimura, K., & Murashima, S. (2011). A prospective study of the relationship between breastfeeding and postpartum depressive symptoms appearing at 1-5 months after delivery. *Journal of Affective Disorders*, 133(3), 553–559. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.04.027>
- Nommsen, L. A., Lovelady, C. A., Heinig, M. J., Lonnerdal, B., & Dewey, K. G. (1991). Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(2), 457–465.
- Nommsen, L. A., Lovelady, C. A., Heinig, M. J., Lönnerdal, B., & Dewey, K. G. (1991). Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: The DARLING Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53(2), 457–465.
- Oddy, W. H., Sherriff, J. L., De Klerk, N. H., Kendall, G. E., Sly, P. D., Beilin, L. J., ... Stanley, F. J. (2004). The relation of breastfeeding and body mass index to asthma and atopy in children: A prospective cohort study to age 6 years. *American Journal of Public Health*, 94(9), 1531–1537. <https://doi.org/10.2105/AJPH.94.9.1531>

- Oftedal, O. T. (2012). The evolution of milk secretion and its ancient origins. *Animal : An International Journal of Animal Bioscience*, 6(3), 355–368.  
<https://doi.org/10.1017/S1751731111001935>
- Oliver, C. H., Khaled, W. T., Friend, H., Nichols, J., & Watson, C. J. (2012). The Stat6-regulated KRAB domain zinc finger protein Zfp157 regulates the balance of lineages in mammary glands and compensates for loss of Gata-3. *Genes and Development*, 26(10), 1086–1097.  
<https://doi.org/10.1101/gad.184051.111>
- OMS, UNICEF, AED, U. (2008). Indicadores para evaluar las prácticas de alimentación del lactante y del niño pequeño. *Conclusiones de La Reunión de Consenso Llevada a Cabo Del 6 Al 8 de Noviembre de 2007 En Washington, DC, EE.UU.*, 27. Retrieved from  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44156/1/9789243596662\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44156/1/9789243596662_spa.pdf)
- OMS (2010). Alimentación del Lactante y del Niño pequeño. *Número 342*. Retrieved from  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs342/es/index.html>
- OPS/OMS. (2003). *Principios de orientación para la alimentación complementaria del niño amamantado*.
- Owen, C. G., Whincup, P. H., Odoki, K., Gilg, J. A., & Cook, D. G. (2002). Infant feeding and blood cholesterol: a study in adolescents and a systematic review. *Pediatrics*, 110(3), 597–608.  
<https://doi.org/10.1542/peds.110.3.597>
- Özören, N., & El-Deiry, W. S. (2003). Cell surface death receptor signaling in normal and cancer cells. *Seminars in Cancer Biology*. [https://doi.org/10.1016/S1044-579X\(02\)00131-1](https://doi.org/10.1016/S1044-579X(02)00131-1)
- Pelucchi, C., Bosetti, C., Negri, E., Lipworth, L., & La Vecchia, C. (2011). Olive Oil and Cancer Risk: an Update of Epidemiological Findings through 2010. *Current Pharmaceutical Design*, 17(8), 805–812. <https://doi.org/10.2174/138161211795428920>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e–45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pieters, B. C. H., Arntz, O. J., Bennink, M. B., Broeren, M. G. A., van Caam, A. P. M., Koenders, M. I., ... van de Loo, F. A. J. (2015). Commercial cow milk contains physically stable extracellular vesicles expressing immunoregulatory TGF-beta. *PloS One*, 10(3), e0121123.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121123>

Plessis, A. du. (2009). Neurology of the Newborn Infant. *Clinics in Perinatology*, 36–4(1), 11–13.

Potischman, N., Coates, R. J., Swanson, C. A., Carroll, R. J., Daling, J. R., Brogan, D. R., ...

Brinton, L. A. (2002). Increased risk of early-stage breast cancer related to consumption of sweet foods among women less than age 45 in the United States. *Cancer Causes and Control*, 13(10), 937–946. <https://doi.org/10.1023/A:1021919416101>

Potischman, N., & Troisi, R. (1999). In-utero and early life exposures in relation to risk of breast cancer. *Cancer Causes & Control: CCC*, 10(6), 561–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10616825>

Power, M. L., & Schulkin, J. (2013). Maternal regulation of offspring development in mammals is an ancient adaptation tied to lactation. *Applied and Translational Genomics*, 2(1), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.atg.2013.06.001>

PRENTICE, A. N. N. (1995). D - Regional Variations in the Composition of Human Milk A2 - Jensen, Robert G. BT - Handbook of Milk Composition. In *Food Science and Technology* (pp. 115–221). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012384430-9/50012-3>

Prentice, R. L., Caan, B., Chlebowski, R. T., Patterson, R., Kuller, L. H., Ockene, J. K., ...

Henderson, M. M. (2006). Low-fat dietary pattern and risk of invasive breast cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA*, 295(6), 629–642. <https://doi.org/10.1001/jama.295.6.629>

Puertollano, M. A., Carrera, M. P., Puertollano, E., Alvarez de Cienfuegos, G., Ramirez-Exposito, M. J., De Pablo, M. A., & Martinez-Martos, J. M. (2008). Analysis of caspase activities in rat mammary tumours induced by N-methyl-nitrosourea. *Oncology Reports*, 20(3), 657–662.

Puissant, C., & Houdebine, L. M. (1990). An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *BioTechniques*, 8(2), 148–149.

Reed, J. C. (1997). Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in

- hematologic malignancies. *Seminars in Hematology*, 34(4 Suppl 5), 9–19.
- Reik, W., & Dean, W. (2001). DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis*, 22(14), 2838–2843. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200108\)22:14<2838::AID-ELPS2838>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200108)22:14<2838::AID-ELPS2838>3.0.CO;2-M)
- Reinhardt, T. A., Lippolis, J. D., Nonnecke, B. J., & Sacco, R. E. (2012). Bovine milk exosome proteome. *Journal of Proteomics*, 75(5), 1486–1492. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.017>
- Richardson, S., Gerber, M., & Cenee, S. (1991). The role of fat, animal protein and some vitamin consumption in breast cancer: A case control study in southern France. *International Journal of Cancer*, 48(1), 1–9. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0025857341&partnerID=40&md5=3d859a17a227ce07da87a509f56e9419>
- Rogers, A. E. (1997). Diet and breast cancer: studies in laboratory animals. *The Journal of Nutrition*, 127(5 Suppl), 933S–935S.
- Ronco, A., De Stefani, E., Mendilaharsu, M., & Deneo-Pellegrini, H. (1996). Meat, fat and risk of breast cancer: a case-control study from Uruguay. *International Journal of Cancer*, 65(3), 328–31. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19960126\)65:3<328::AID-IJC9>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19960126)65:3<328::AID-IJC9>3.0.CO;2-1)
- Rose, D. P. (1993). Diet, hormones and cancer. *Annual Review of Public Health*, 14, 1–17. <https://doi.org/10.1146/annurev.pu.14.050193.000245>
- Rosenblatt, K. A., & Thomas, D. B. (1993). Lactation and the risk of epithelial ovarian cancer. *International Journal of Epidemiology*, 22(2), 192–197. <https://doi.org/10.1093/ije/22.2.192>
- Rosner, B., Eliassen, A. H., Toriola, A. T., Chen, W. Y., Hankinson, S. E., Willett, W. C., ... Colditz, G. A. (2017). Weight and weight changes in early adulthood and later breast cancer risk. *International Journal of Cancer*, 140(9), 2003–2014. <https://doi.org/10.1002/ijc.30627>
- Rowley, M., Grothey, E., & Couch, F. J. (2004). The role of Tbx2 and Tbx3 in mammary development and tumorigenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. <https://doi.org/10.1023/B:JOMG.0000037156.64331.3f>
- Rudel, R. A., Fenton, S. E., Ackerman, J. M., Euling, S. Y., & Makris, S. L. (2011). Environmental exposures and mammary gland development: State of the science, public health implications,

- and research recommendations. *Environmental Health Perspectives*.  
<https://doi.org/10.1289/ehp.1002864>
- Russo, I. H., & Russo, J. (1996). Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environmental Health Perspectives*. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104938>
- Russo, J. (2015). Significance of Rat Mammary Tumors for Human Risk Assessment. *Toxicologic Pathology*, 43(2), 145–170. <https://doi.org/10.1177/0192623314532036>
- Russo, J., Calaf, G., Roi, L., & Russo, I. H. (1987). Influence of Age and Gland Topography on Cell Kinetics of Normal Human Breast Tissue. *J Natl Cancer Inst*, 78(3), 413–418.  
<https://doi.org/10.1093/jnci/78.3.413>
- Russo, J., Gusterson, B. A., Rogers, A. E., Russo, I. H., Wellings, S. R., & van Zwieten, M. J. (1990). Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 62(3), 244–278.
- Russo, J., & Russo, I. H. (1978). DNA Labeling Index and Structure of the Rat Mammary Gland as Determinants of Its Susceptibility to Carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 61(6), 1451–1459. <https://doi.org/10.1093/jnci/61.6.1451>
- Russo, J., & Russo, I. H. (1980). Influence of differentiation and cell kinetics on the susceptibility of the rat mammary gland to carcinogenesis. *Cancer Research*, 40(8).
- Russo, J., & Russo, I. H. (1987). Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 57(2), 112–137.
- Russo, J., & Russo, I. H. (1992). The pathology of breast cancer: staging and prognostic indicators. *Journal of the American Medical Women's Association (1972)*, 47(5), 181–187.
- Russo, J., & Russo, I. H. (2004). Development of the human breast. In *Maturitas* (Vol. 49, pp. 2–15). <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2004.04.011>
- Russo, J., Tait, L., & Russo, I. H. (1983). Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. III. The cell of origin of rat mammary carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 113(1), 50–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1916301/>
- Saadatian-Elahi, M., Norat, T., Goudable, J., & Riboli, E. (2004). Biomarkers of dietary fatty acid

- intake and the risk of breast cancer: a meta-analysis. *International Journal of Cancer: Journal International Du Cancer*, *111*(4), 584–91. <https://doi.org/10.1002/ijc.20284>
- Sachdev, H. P. S., Krishna, J., Puri, R. K., Satyanarayana, L., & Kumar, S. (1991). Water supplementation in exclusively breastfed infants during summer in the tropics. *The Lancet*, *337*(8747), 929–933. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91568-F](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91568-F)
- Sadauskaite-Kuehne, V., Ludvigsson, J., Padaiga, Z., Jasinskiene, E., & Samuelsson, U. (2004). Longer breastfeeding is an independent protective factor against development of type 1 diabetes mellitus in childhood. *Diabetes/metabolism Research and Reviews*, *20*(2), 150–7. <https://doi.org/10.1002/dmrr.425>
- Safe, S. (2001). Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. In *Toxicology Letters* (Vol. 120, pp. 1–7). [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00301-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00301-0)
- Sanderson, M., Williams, M. a, Daling, J. R., Holt, V. L., Malone, K. E., Self, S. G., & Moore, D. E. (1998). Maternal factors and breast cancer risk among young women. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, *12*(4), 397–407. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3016.1998.00133.x>
- Sasso, C. V, Santiano, F. E., Lopez-Fontana, C. M., Pistone-Creydt, V., Ezquer, M. E., Hapon, M. B., ... Caron, R. W. (2014). Effects of parity and serum prolactin levels on the incidence and regression of DMBA-induced tumors in OFA hr/hr rats. *BioMed Research International*, *2014*, 210424. <https://doi.org/10.1155/2014/210424>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Sharma, D., Smits, B. M. G., Eichelberg, M. R., Meilahn, A. L., Muelbl, M. J., Haag, J. D., & Gould, M. N. (2011). Quantification of epithelial cell differentiation in mammary glands and carcinomas from DMBA- and MNU-exposed rats. *PLoS ONE*, *6*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026145>
- Shimada, T. (2006). Xenobiotic-Metabolizing Enzymes Involved in Activation and Detoxification of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, *21*(4), 257–276. <https://doi.org/10.2133/dmpk.21.257>

- Shimoda, K., van Deursent, J., Sangster, M. Y., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Tripp, R. A., ... Ihle, J. N. (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted State6 gene. *Nature*, *380*(6575), 630–633. <https://doi.org/10.1038/380630a0>
- Shore, A. N., Kabotyanski, E. B., Roarty, K., Smith, M. A., Zhang, Y., Creighton, C. J., ... Rosen, J. M. (2012). Pregnancy-induced noncoding RNA (PINC) associates with polycomb repressive complex 2 and regulates mammary epithelial differentiation. *PLoS Genetics*, *8*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002840>
- Siddarth, D. (2013). Risk factors for obesity in children and adults. *Journal of Investigative Medicine : The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, *61*(6), 1039–42. <https://doi.org/10.231/JIM.0b013e31829c39d0>
- Siddiqui, I. A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., & Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1348*(1), 20–31. <https://doi.org/10.1111/nyas.12811>
- Silfverdal, S. A., Bodin, L., & Olcén, P. (1999). Protective effect of breastfeeding: An ecologic study of Haemophilus influenzae meningitis and breastfeeding in a Swedish population. *International Journal of Epidemiology*, *28*(1), 152–156. <https://doi.org/10.1093/ije/28.1.152>
- Singhal, A., Macfarlane, G., Macfarlane, S., Lanigan, J., Kennedy, K., Elias-Jones, A., ... Lucas, A. (2008). Dietary nucleotides and fecal microbiota in formula-fed infants: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *87*(6), 1785–1792.
- Skafida, V. (2012). Juggling work and motherhood: The impact of employment and maternity leave on breastfeeding duration: A survival analysis on growing up in Scotland data. *Maternal and Child Health Journal*. <https://doi.org/10.1007/s10995-011-0743-7>
- Sternlicht, M. D., Dunning, A. M., Moore, D. H., Pharoah, P. D. P., Ginzinger, D. G., Chin, K., ... Werb, Z. (2006). Prognostic value of PAI1 in invasive breast cancer: Evidence that tumor-specific factors are more important than genetic variation in regulating PAI1 expression. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *15*(11), 2107–2114. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0351>
- Stires, H., Saboya, M., Globerman, S. P., & Cohick, W. S. (2016). Peroral estradiol is sufficient to

- induce carcinogen-induced mammary tumorigenesis in ovariectomized rats without progesterone. *PLoS ONE*, *11*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162662>
- Su, H. M., Hsieh, P. H., & Chen, H. F. (2010). A maternal high n-6 fat diet with fish oil supplementation during pregnancy and lactation in rats decreases breast cancer risk in the female offspring. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *21*(11), 1033–1037. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.08.007>
- Sun, Q., Chen, X., Yu, J., Zen, K., Zhang, C.-Y., & Li, L. (2013). Immune modulatory function of abundant immune-related microRNAs in microvesicles from bovine colostrum. *Protein & Cell*, *4*(3), 197–210. <https://doi.org/10.1007/s13238-013-2119-9>
- Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., ... Akira, S. (1996). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*, *380*(6575), 627–630. <https://doi.org/10.1038/380627a0>
- Tammen, S. A., Friso, S., & Choi, S.-W. (2013). Epigenetics: the link between nature and nurture. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*(4), 753–764. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.018>
- Tay, L. K., & Russo, J. (1981). 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced dna binding and repair synthesis in susceptible and nonsusceptible mammary epithelial cells in culture. *Journal of the National Cancer Institute*, *67*(1), 155–161. <https://doi.org/10.1093/jnci/67.1.155>
- Tay, L. K., & Russo, J. (1981). Formation and removal of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene - nucleic acid adducts in rat mammary epithelial cells with different susceptibility to carcinogenesis. *Carcinogenesis*, *2*(12), 1327–1333. <https://doi.org/10.1093/carcin/2.12.1327>
- Thayer, K. A., & Foster, P. M. (2007). Workgroup report: National toxicology program workshop on hormonally induced reproductive tumors - Relevance of Rodent bioassays. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 115, pp. 1351–1356). <https://doi.org/10.1289/ehp.10135>
- The World Bank. (2006). *Repositioning Nutrition as to Development: A Strategy for Large-Scale Action*. *The World Bank Publication* (Vol. 13). <https://doi.org/10.1596-978-0-8213-6399-7>
- Thiébaud, A. C. M., Kipnis, V., Chang, S.-C., Subar, A. F., Thompson, F. E., Rosenberg, P. S., ... Schatzkin, A. (2007). Dietary fat and postmenopausal invasive breast cancer in the National

- Institutes of Health-AARP Diet and Health Study cohort. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(6), 451–62. <https://doi.org/10.1093/jnci/djk094>
- Tian, T., Wang, Y., Wang, H., Zhu, Z., & Xiao, Z. (2010). Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(2), 488–496. <https://doi.org/10.1002/jcb.22733>
- Tian, T., Zhu, Y.-L., Hu, F.-H., Wang, Y.-Y., Huang, N.-P., & Xiao, Z.-D. (2013). Dynamics of exosome internalization and trafficking. *Journal of Cellular Physiology*, 228(7), 1487–1495. <https://doi.org/10.1002/jcp.24304>
- Tian, T., Zhu, Y.-L., Zhou, Y.-Y., Liang, G.-F., Wang, Y.-Y., Hu, F.-H., & Xiao, Z.-D. (2014). Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(32), 22258–22267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.588046>
- Titus-Ernstoff, L., Egan, K. M., Newcomb, P. A., Baron, J. A., Stampfer, M., Greenberg, E. R., ... Trichopoulos, D. (1998). Exposure to breast milk in infancy and adult breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(12), 921–924.
- Trichopoulou, A., Katsouyanni, K., Stuver, S., Tzala, L., Gnardellis, C., Rimm, E., & Trichopoulos, D. (1995). Consumption of olive oil and specific food groups in relation to breast cancer risk in Greece. *Journal of the National Cancer Institute*, 87(2), 110–116. <https://doi.org/10.1093/jnci/87.2.110>
- Uauy, R., Quan, R., & Gil, A. (1994). Role of nucleotides in intestinal development and repair: implications for infant nutrition. *The Journal of Nutrition*, 124(8 Suppl), 1436S–1441S.
- Valdes, V., Pugin, E., Schooley, J., Catalan, S., & Aravena, R. (2000). Clinical support can make the difference in exclusive breastfeeding success among working women. *Journal of Tropical Pediatrics*, 46(3), 149–154.
- Valentine, C. J., Morrow, G., Fernandez, S., Gulati, P., Bartholomew, D., Long, D., ... Rogers, L. K. (2010). Docosahexaenoic Acid and Amino Acid Contents in Pasteurized Donor Milk are Low for Preterm Infants. *The Journal of Pediatrics*, 157(6), 906–910. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.06.017>

- Vazquez-Prieto, M. A., Renna, N. F., Diez, E. R., Cacciamani, V., Lembo, C., & Miatello, R. M. (2011). Effect of red wine on adipocytokine expression and vascular alterations in fructose-fed rats. *American Journal of Hypertension*, 24(2), 234–240. <https://doi.org/10.1038/ajh.2010.214>
- Vickers, K. C., & Remaley, A. T. (2012). Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. *Current Opinion in Lipidology*, 23(2), 91–97. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328350a425>
- Vickers, M. H. (2014). Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrients*, 6(6), 2165–2178. <https://doi.org/10.3390/nu6062165>
- Victora, C. G., Vaughan, J. P., Lombardi, C., Fuchs, S. M. C., Gigante, L. P., Smith, P. G., ... Barros, F. C. (1987). EVIDENCE FOR PROTECTION BY BREAST-FEEDING AGAINST INFANT DEATHS FROM INFECTIOUS DISEASES IN BRAZIL. *The Lancet*, 330(8554), 319–322. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(87\)90902-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)90902-0)
- Visvader, J. E. (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1849509>
- Visvader, J. E., & Stingl, J. (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes & Development*, 28(11), 1143–1158. <https://doi.org/10.1101/gad.242511.114>
- Volpe, J. J. (1981). Neurology of the newborn. *Major Problems in Clinical Pediatrics*, 22, 1–648.
- Von Hertzen, H. (1999). The World Health Organization multinational study of breast-feeding and lactational amenorrhea. III. Pregnancy during breast-feeding. *Fertility and Sterility*, 72(3), 431–440. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00274-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00274-5)
- Wakai, K., Dillon, D. S., Ohno, Y., Prihartono, J., Budiningsih, S., Ramli, M., ... Cornain, S. (2000). Fat intake and breast cancer risk in an area where fat intake is low: a case-control study in Indonesia. *International Journal of Epidemiology*, 29, 20–28. <https://doi.org/10.1093/ije/29.1.20>
- Waterland, R. A., & Michels, K. B. (2007). Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annual Review of Nutrition*, 27, 363–388.

<https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093705>

Watson, C. J., Oliver, C. H., & Khaled, W. T. (2011). Cytokine signalling in mammary gland development. *Journal of Reproductive Immunology*, 88(2), 124–129.

<https://doi.org/10.1016/j.jri.2010.11.006>

Weisburger, J. H. (1997). Dietary fat and risk of chronic disease: mechanistic insights from experimental studies. *Journal of the American Dietetic Association*, 97(7 Suppl), S16-23.

[https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(97\)00725-6](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(97)00725-6)

Weiss, H. A., Potischman, N. A., Brinton, L. A., Brogan, D., Coates, R. J., Gammon, M. D., ... Schoenberg, J. B. (1997a). Prenatal and perinatal risk factors for breast cancer in young women. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 8(2), 181–187. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9229211>

Weiss, H. A., Potischman, N. A., Brinton, L. A., Brogan, D., Coates, R. J., Gammon, M. D., ... Schoenberg, J. B. (1997b). Prenatal and perinatal risk factors for breast cancer in young women. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 8(2), 181–187.

Welsch, C. W. (1992). Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: A review and critique. In *Cancer Research* (Vol. 52).

WHO, U. (2003). OMS | Estrategia mundial para la alimentación del lactante y del niño pequeño.

*WHO*. Retrieved from <http://www.who.int/nutrition/publications/infantfeeding/9241562218/es/>

Wirfält, E., Mattisson, I., Gullberg, B., Johansson, U., Olsson, H., & Berglund, G. (2002).

Postmenopausal breast cancer is associated with high intakes of omega6 fatty acids (Sweden).

*Cancer Causes & Control: CCC*, 13(10), 883–893. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12588084>

Wise, L. A., Titus-Ernstoff, L., Newcomb, P. A., Trentham-Dietz, A., Trichopoulos, D., Hampton, J. M., & Egan, K. M. (2009). Exposure to breast milk in infancy and risk of breast cancer. *Cancer Causes & Control : CCC*, 20(7), 1083–1090. <https://doi.org/10.1007/s10552-009-9332-0>

Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 30(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966->

World Cancer Research Fund, & American Institute for Cancer Research. (2007). *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Cancer Research*.  
<https://doi.org/978-0-9722522-2-5>

Zauderer Cheryl. (2011). Postpartum Depression and Breastfeeding: What Should a New Mother Do? *Journal of Obstetric Gynecologic and Neonatal Nursing*, 40(1), S131.

Zhou, Q., Li, M., Wang, X., Li, Q., Wang, T., Zhu, Q., ... Li, X. (2012). Immune-related MicroRNAs are Abundant in Breast Milk Exosomes. *International Journal of Biological Sciences*, 8(1), 118–123. Retrieved from  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3248653/>