

Posibles beneficios médicos de los tocotrienoles de la palma en la prevención y tratamiento del cáncer de mama

Potential Health Benefits of Palm Tocotrienols in the Prevention and Treatment of Breast Cancer

Paul W. Sylvester
Sumit Shah¹

Resumen

Tocoferoles y tocotrienoles representan los dos subgrupos en la familia de compuestos de la vitamina E, pero sólo los tocotrienoles presentan fuerte actividad anticancerosa en dosis que tienen muy poco o ningún efecto en el desarrollo o la función normales de las células. Los tocotrienoles son fuertes antioxidantes, pero la actividad antitumoral es independiente de la actividad antioxidante. No es del todo clara la razón por la que los tocotrienoles son más potentes que los tocoferoles, pero al menos eso se debe (en parte) a una mayor acumulación celular. Además, estudios realizados acerca de dosis-respuesta indican que las dosis de tocotrienoles inhibidoras del desarrollo son de 5 a 6 veces menores que sus correspondientes dosis letales, lo cual sugiere que en los efectos antiproliferantes y citotóxicos de los tocotrienoles intervienen diferentes mecanismos. Estudios recientes indican que la muerte celular programada inducida por tocotrienoles (apoptosis) se debe a la activación de proteasas cisteínicas intracelulares específicas (caspasas) asociadas con activación del receptor de muerte y la transducción de señales. Además, los inhibidores específicos de caspasa en tratamiento combinado bloquean los efectos citotóxicos de los tocotrienoles en las células epiteliales mamarias malignas. Por el contrario, la inhibición de muerte celular provocada por tocotrienol parece incluir la supresión de hormonas y de las vías de señalamiento mitógeno del factor-receptor de desarrollo. Aunque es preciso realizar estudios complementarios para esclarecer los mecanismos intracelulares que intervienen en los efectos anticancerosos de los tocotrienoles, la evidencia experimental sugiere firmemente que el suplemento dietético con tocotrienoles puede ofrecer beneficios médicos significativos, ya que disminuye en las mujeres el riesgo de cáncer de mama.

Palabras Clave

Tocotrienoles,
Cáncer de mama,
Aceite de palma,
Vitamina E.

Summary

Tocopherols and tocotrienol represent the two subgroups within the vitamin E family of compounds, but only tocotrienols display potent anticancer activity at doses that have no effect on normal cell growth or function. Tocotrienols are potent antioxidants, but antitumor activity is independent of antioxidant activity. The exact reason why tocotrienols are more potent than tocopherols is not

1 . Escuela de Farmacología, Universidad de Luisiana, Monroe, LA 71209-0470.
E-mail: sylvester@ulm.edu

Nota: Traducido por Fedepalma.

completely understood, but at least part of the reason is because of greater cellular accumulation. Furthermore, dose-response studies show that growth inhibitory doses of tocotrienols are 5-6 times lower than their corresponding lethal doses, suggesting that the antiproliferative and cytotoxic effects of tocotrienols are mediated by different mechanisms. Recent studies show that tocotrienol-induced programmed cell death (apoptosis) results from the activation of specific intracellular cysteine proteases (caspases) associated with death receptor activation and signal transduction. Furthermore, combined treatment specific caspase inhibitors block the cytotoxic effects of tocotrienols in malignant mammary epithelial cells. In contrast, tocotrienol inhibition of cell death appears to involve the suppression of hormone- and growth factor-receptor mitogenic signaling pathways. Although additional studies are required to clarify the intracellular mechanisms mediating the anticancer effects of tocotrienols, experimental evidence strongly suggests that dietary supplementation of tocotrienols may provide significant health benefits in lowering the risk of breast cancer in women.

Introducción

Vitamina E es un término genérico que representa a una familia de compuestos que se subdivide en dos subgrupos llamados tocoferoles y tocotrienoles (Packer, 1991; Elson, 1992). Los tocoferoles se encuentran por lo general en una diversidad de grasas y aceites alimenticios, mientras que los tocotrienoles son muy poco comunes y se encuentran niveles altos únicamente en unas cuantas grasas vegetales tales como el aceite de palma (Cottrell, 1991; Packer, Weber, Rimbach, 2001). Estudios realizados con anterioridad indicaron que el consumo alimenticio alto de aceite de palma, a diferencia de otras dietas altas en grasas, suprimió la tumorigénesis mamaria inducida por carcinógeno en animales experimentales (Sylvester, Russell, *et al.*, 1986; Nesaretnam *et al.*, 1992). Por el contrario, las dietas a base de aceite de palma despojado de vitamina E, no tuvieron este efecto protector (Nesaretnam *et al.*, 1992). Debido a que la fracción de vitamina E del aceite de palma, conocida también como “fracción rica en tocotrienol” del aceite de palma (TRF, por su sigla en inglés), contiene un gran número de isoformas de tocoferol y tocotrienol, no se sabía si una o todas estas isoformas podían transmitir los efectos inhibidores de las dietas a base de aceite de palma en el desarrollo y crecimiento de tumores mamarios.

El análisis realizado de la fracción de vitamina E del aceite de palma ha determinado que está compuesta por 20,2% α -tocoferol, 16,8% α -tocotrienol, 44,9% γ -tocotrienol, 14,8% γ -tocotrienol, y 3,2% de un contaminante soluble en lípido sin vitamina E (McIntyre *et al.*, 2000; McIntyre, Briski, Gapor, Sylvester, 2000). A pesar de que es posible que los niveles moderados de

α -tocoferol presentes en el aceite de palma puedan tener una función en la supresión de tumorigénesis mamaria, no hay pruebas que apoyen esta propuesta. Se encontró que el consumo de dietas altas en grasa que contengan otros aceites vegetales que tienen niveles más altos de α -tocoferol que el aceite de palma, como por ejemplo aceite de semilla de algodón, canola, cártamo y girasol estimulan el desarrollo y crecimiento en animales experimentales (Sylvester, Russell, 1986; Sylvester, 1986). Además, una gran parte de los estudios llevados a cabo para examinar la actividad anticancerosa de los tocoferoles ha producido resultados principalmente negativos (Gould *et al.*, 1991; Nesaretnam *et al.*, 1992; Zurinah *et al.*, 1991; Goh *et al.*, 1994). A pesar de que las investigaciones hechas con anterioridad han indicado que dosis farmacológicas muy altas (μ M) de α -tocoferol pueden inducir efectos antiproliferantes y citotóxicos en varios tipos de células (Schwartz, Shklar, 1992; Sigounas *et al.*, 1997), el significado fisiológico de tales hallazgos no es del todo claro.

En las comparaciones directas de los dos subgrupos de vitamina E se ha observado que los tocoferoles y tocotrienoles individuales presentan potencias diferenciales en cuanto a su actividad anticancerosa, y los tocotrienoles son mucho más potentes que los tocoferoles (McIntyre *et al.*, 2000; McIntyre, Briski, Gapor, Sylvester, 2000; Marzuki *et al.*, 1991; Sylvester *et al.*, 2001). Diversas investigaciones realizadas han indicado que la biopotencia de isoformas individuales presenta una relación constante correspondiente a δ -tocotrienol $\geq$ γ -tocotrienol $>$ α -tocotrienol $>$ δ -tocoferol $>>$ γ -y α -tocoferol. La

dosis inhibidora (IC_{50}) del crecimiento y la dosis letal (LD_{50}) de TRF y las isoformas individuales de tocoferol y tocotrienol se encuentran resumidas en la Tabla 1. Estos hallazgos son de especial interés porque se observan los efectos anticancerosos de los tocotrienoles utilizando dosis que tienen muy poco o ningún efecto en el crecimiento o viabilidad de células epiteliales mamarias normales (McIntyre *et al.*, 2000; McIntyre, Briski, Gapor, Sylvester, 2000; Sylvester *et al.*, 2001).

Efectos de varios compuestos de vitamina E en el desarrollo (IC_{50}) y viabilidad (LD_{50}) de células epiteliales mamarias normales y malignas. IC_{50} indica la dosis del tratamiento que produjo 50% de inhibición en el desarrollo, en comparación con controles realizados al cabo del 5° día del período de cultivo. LD_{50} indica la dosis del tratamiento que indujo 50% de reducción en el número viable de células en comparación con controles hechos después de una exposición de 24 horas

Tabla 1

Compuesto de vitamina E		Células epiteliales mamarias normales	Células epiteliales mamarias malignas
TRF	IC_{50}	25 μ M	6 μ M
	LD_{50}	110 μ M	38 μ M
α -tocoferol	IC_{50}	>120 μ M	>120 μ M
	LD_{50}	>250 μ M	>250 μ M
γ -tocoferol	IC_{50}	>120mM	>120mM
	LD_{50}	>250 μ M	>250 μ M
δ -tocoferol	IC_{50}	94mM	23mM
	LD_{50}	>250 μ M	125 μ M
α -tocotrienol	IC_{50}	45 μ M	5 μ M
	LD_{50}	238 μ M	23 μ M
γ -tocotrienol	IC_{50}	8 μ M	4 μ M
	LD_{50}	46 μ M	14 μ M
δ -tocotrienol	IC_{50}	7 μ M	3 μ M
	LD_{50}	36 μ M	12 μ M

La información seleccionada se obtuvo de las referencias 9 y 10.

Se desconoce la verdadera razón por la cual los tocotrienoles son agentes antitumorosos más potentes que los tocoferoles. Tocoferoles y tocotrienoles tienen la misma estructura química básica, caracterizada por una larga cadena fitil unida a la posición 1 de un anillo cromano (Figura 1). La principal diferencia existente entre estos subgrupos de vitamina E es que los tocoferoles tienen una cadena saturada, mientras que los tocotrienoles tienen una cadena fitil no

saturada (Figura 1). Cada subgrupo de vitamina E contiene varias isoformas, y las isoformas individuales de tocoferoles y tocotrienoles difieren una de otra de acuerdo al número de grupos metílicos enlazados a su anillo cromano (Figura 1). Otra característica química importante es el grupo hidroxyfenil que se encuentra en el carbono-6 del anillo cromano, que funciona como sitio mediador de la actividad antioxidante en ambos subgrupos de la vitamina E (Figura 1).

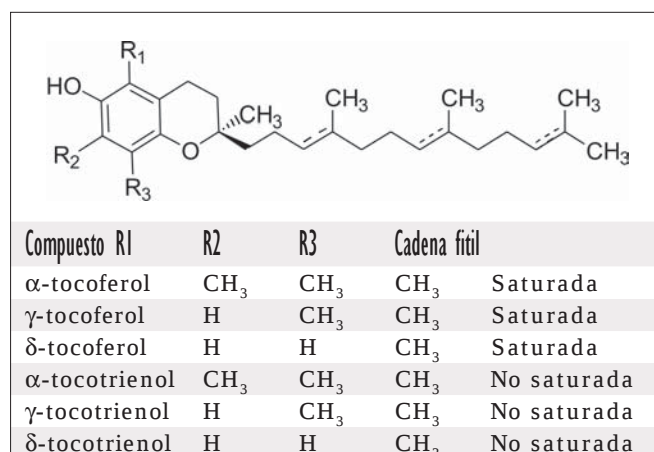


Figura 1

Estructura generalizada de compuestos de vitamina E

A pesar de que la estructura química de los tocoferoles y los tocotrienoles es muy similar, las diferencias sutiles que hay entre estos dos subgrupos de la vitamina E parecen influir en forma significativa en la especificidad del tejido objetivo, la captación celular y la biopotencia. También es cada vez más evidente que las isoformas específicas de tocoferol y tocotrienol activan diversos caminos intracelulares de señalamiento en diversos tipos de células (Sylvester *et al.*, 2001; Turley *et al.*, 1997). Estos hallazgos explican parcialmente la amplia variedad de efectos biológicos y bioquímicos provocados por estos compuestos específicos de la vitamina E. En el presente informe se revisará la comprensión actual de los mecanismos intracelulares que intervienen en los efectos anticancerosos de los tocotrienoles, y se harán intentos para aclarar los posibles beneficios de los tocotrienoles versus los tocoferoles, en la prevención y el tratamiento del cáncer de mama.

Mecanismos antiproliferativos de acción de los tocotrienoles

Potencial antioxidante

Los compuestos de vitamina E son antioxidantes importantes que regulan las reacciones peroxidantes y la producción de radicales libres en el organismo (Packer, 1991; Packer *et al.*, 1999). La producción descontrolada o excesiva de radicales libres puede llegar a causar daño celular, disfunciones o incluso, la muerte (Packer, 1991; Packer *et al.*, 1999). Debido a que los radicales libres pueden formar aducción del ADN y provocar la mutación o disfunción genética, el potencial antioxidante de los tocotrienoles puede representar un primer paso importante en la prevención de la transformación neoplásica de células epiteliales mamarias normales. Comparaciones directas entre las diversas isoformas de tocoferol y tocotrienol han revelado grandes diferencias en la actividad antioxidante.

Los estudios realizados señalan que comparado con α -tocoferol, α -tocotrienol es entre 40 y 60 veces más potente en la prevención de la peroxidación de lípidos en membranas microsómicas hepáticas de ratas y entre 6 y 7 veces mejor para la protección citocrómica P-450 (Suzuki *et al.*, 1993, Serbinova, Packer, 1994). Parece ser que son varios los factores responsables del mayor poder antioxidante que presenta el α -tocotrienol. Se observó que el α -tocotrienol tiene una mayor eficiencia de reciclamiento que tocotrienol (Suzuki *et al.*, 1993, Serbinova, Packer, 1994). Además, se comprobó que el α -tocotrienol tiene una distribución más uniforme dentro de la capa doble de la membrana microsómica, y que α -tocotrienol presenta una interacción más eficiente con los radicales libres de lípidos, en comparación con α -tocoferol (Suzuki *et al.*, 1993, Serbinova, Packer, 1994).

A pesar de que los tocotrienoles son antioxidantes más potentes que los tocoferoles, la mayoría de los efectos antitumorosos obtenidos por los tocotrienoles no depende de su actividad antioxidante (Packer, 1991; Elson, 1991; Kimmick *et al.*, 1997), sino que se debe más bien a sus efectos sobre los caminos específicos intracelulares de señalamiento que inhiben la

proliferación e inician la muerte celular programada o apoptosis en las células cancerígenas mamarias (Sylvester, Shah, 2002; Sylvester, Theriault, 2002).

Acumulación celular

Los estudios llevados a cabo han indicado que las células epiteliales mamarias malignas acumulan más fácilmente o toman preferentemente tocotrienoles en comparación con los tocoferoles (McIntyre *et al.*, 2000; McIntyre, Briski, Gapor, Sylvester, 2000). Hay indicios de que las características estructurales son la causa de un camino menos limitado de tocotrienoles a través de la membrana de las células epiteliales mamarias. De manera específica, la cadena fitil no saturada que se encuentra en los tocotrienoles, a diferencia de la cadena fitil saturada presente en los tocoferoles, resulta en una menor conformación molecular que facilita un menor paso transmembranoso restringido de tocotrienoles dentro de la célula (McIntyre *et al.*, 2000; McIntyre, Briski, Gapor, Sylvester, 2000).

Se ha señalado también que diferentes isoformas en cada subgrupo de vitamina E presentan un amplio rango de diferencias en cuanto a acumulación celular y biopotencia antitumoral (McIntyre *et al.*, 2000; McIntyre, Briski, Gapor, Sylvester, 2000). En especial, las α -isoformas de tocoferol y tocotrienol son mucho más metiladas que su contraparte γ - o δ -isoformas, y la acumulación celular y la biopotencia de α -tocoferol y α -tocotrienol eran menores que su respectivas γ - y δ -isoformas (Figura 2). Una disminución en el nivel del coeficiente de mutilación del anillo cromanol resulta en la correspondiente disminución del coeficiente de división de estos compuestos, y la acumulación celular y la biopotencia presentan una relación inversa a la lipofilicidad de tocoferol y tocotrienol (McIntyre *et al.*, 2000; McIntyre, Briski, Gapor, Sylvester, 2000). Por tanto, las células absorben menos isoformas lipofílicas o polares de tocoferoles y tocotrienoles. Esta hipótesis se apoya en los hallazgos de que α -tocoferil succinato o hemisuccinato, menos derivados lipofílicos de α -tocoferol, presentan una mayor acumulación celular y bioactividad significativamente mayor que α -tocoferol (Kline *et al.*, 2001).

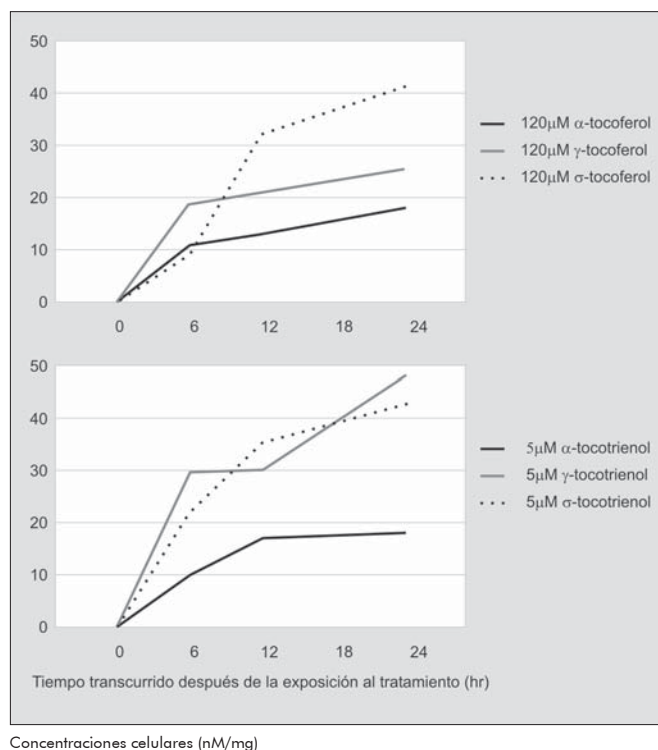


Figura 2 Acumulación celular de α -, γ - δ -tocoferol, o α -tocoferol α -, γ -, o δ -tocotrienol en células epiteliales mamarias malignas durante una exposición de 24 horas a 120 μ de tocoferol individual o 5 μ M de isoformas de tocotrienol individuales

Es muy probable que la absorción celular de tocoferoles y tocotrienoles en las células tumorales esté determinada por factores no específicos, tales como la conformación molecular y la solubilidad de lípidos, en lugar de mecanismos selectivos de absorción relacionados con proteínas transportadoras específicas. No obstante, puesto que las células epiteliales mamarias por lo general absorben tocotrienoles más que tocoferoles, mayores niveles de estos compuestos se encuentran presentes en sus sitios intracelulares de acción y por ello están capacitados para provocar una mayor respuesta biológica. Sin embargo, la creciente absorción celular no explica totalmente la mayor biopotencia que presentan los tocotrienoles versus tocoferoles. Las dosis terapéuticas que produjeron niveles intracelulares comparables de α -, γ -, o δ -tocoferol y α -, γ -, o δ -tocotrienol, no provocaron efectos antiproliferativos ni citotóxicos en células mamarias tumorosas (McIntyre *et al.*,

2000; McIntyre, Briski, Gapor, Sylvester, 2000). Estos hallazgos demuestran que una vez dentro de la célula tumoral, los tocotrienoles específicos son intrínsecamente más potentes que sus correspondientes isoformas de tocoferol, en la reducción del desarrollo y viabilidad del cáncer de mama.

Inhibición celular dependiente de tocotrienol

Se ha observado que tocoferoles y tocotrienoles modulan varios caminos intracelulares de señalamiento relacionados con la mitogénesis (McIntyre *et al.*, 2000; McIntyre, Briski, Gapor, Sylvester, 2000). Específicamente, se ha observado que el tratamiento a base de tocotrienol inhibe la mitogénesis dependiente del factor de crecimiento epidérmico (FCE) en células epiteliales mamarias no plásicas, mientras que α -tocoferol no lo hace (McIntyre *et al.*, 2000; McIntyre, Briski, Gapor, Sylvester, 2000; Sylvester *et al.*, 2001; Sylvester *et al.*, 2002). Las acciones mitógenas de FCE están intervenidas por receptores específicos hacia la membrana que tienen un dominio citoplásmico con actividad tirosina quinasa intrínseca (Ulrich *et al.*, 1990).

No obstante, la inhibición de la mitogénesis dependiente de FCE con tocotrienol no se asocia a una disminución del nivel del receptor FCE ni a la actividad tirosina quinasa (Sylvester *et al.*, 2001; Sylvester *et al.*, 2002; Ulrich *et al.*, 1990). En consecuencia, los efectos inhibidores de los tocotrienoles sobre el señalamiento de mitógeno dependiente de EGF ocurren a partir del receptor EGF.

Hay por lo menos tres caminos principales de señalamiento asociados con mitogénesis provocada por EGF en las células epiteliales mamarias: i) la cascada de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) o Ras/Raf/MEK/ERK; ii) el camino quinasa dependiente (PI3K)/PI3K 3-quinasa fosfatidilinositol (PDK)/Akt; y iii) el camino de proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA). Estudios realizados han indicado que el tratamiento a base de dosis de tocotrienoles (IC_{50}) inhibitoras de tocotrienol, disminuyó el señalamiento dependiente de mitógeno en cada uno de estos caminos (Sylvester *et al.*, 2001; Sylvester *et al.*, 2002; Sylvester, Shah, 2002; Sylvester, 2003; Ulrich *et al.*, 1990). Los posibles sitios de acción donde tocotrienoles actúan para

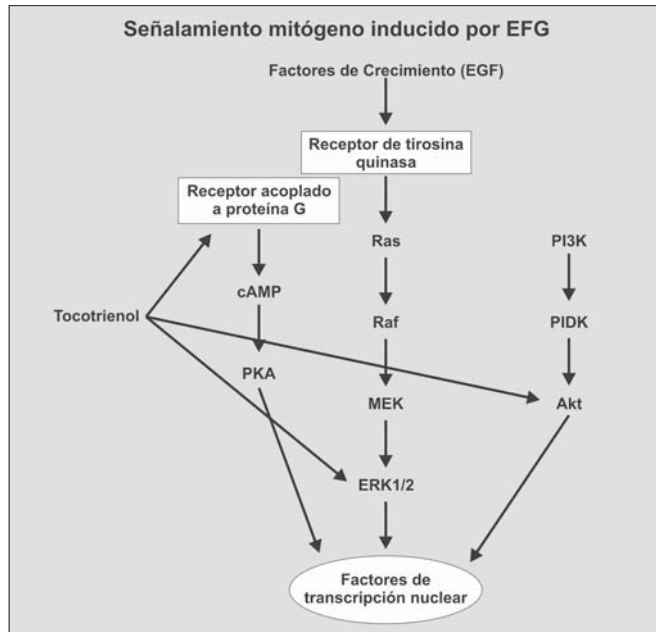


Figura 3 Sitios intracelulares de acción en que tocotrienoles parecen actuar para inhibir la transducción de señalamiento mitogénico en células mamarias cancerosas. Las pruebas experimentales sugieren que los tocotrienoles inhiben múltiples caminos mitogénicos, incluyendo el cAMP/PKA, el Ras/Raf/MEK/ERK, y el (PI3K)/PDK/Akt

inhibir tales caminos de señalamiento patógeno se ilustran en la Figura 3.

Estudios recientes han señalado que tocotrienoles inhiben el señalamiento mitogénico EGF-dependiente Ras/Raf/MEK/ERK. De acuerdo con el siguiente enlace, los receptores de tirosina-quinasa se someten a dimerización y autofosforilación en múltiples residuos de tirosina requeridos para la interacción directa entre las moléculas receptoras y efectoras relacionadas con la transducción del señalamiento intracelular. Uno de los eventos iniciales en el receptor de señalamiento mitogénico de tirosina quinasa es la activación de Ras (Denhardt, 1996; Kolch, 2000). Un Ras corriente abajo es c-Raf-1, una serina/treonina quinasa, la cual posteriormente fosforiliza y activa la cascada MAPK o el camino de quinasa MEK/ERK (Denhardt, 1996; Kolch, 2000). Los efectores corriente abajo de ERKs son factores de transcripción nuclear tales como Myc y Elk que finalmente provocan diversas respuestas biológicas, incluyendo la mitogénesis al influir

de una manera directa en la expresión del gen (Denhardt, 1996; Kolch, 2000). Se ha observado que la inhibición del desarrollo de células dependientes de mitógeno se relacionan con eventos posteriores al receptor corriente abajo que conducen a la reducción de activación de ERK1 y ERK2 (Sylvester *et al.*, 2002).

Se ha observado también que los tocotrienoles inhiben el señalamiento de mitógeno de EGF-dependiente PI3K/PDK/Akt en células epiteliales mamarias (Sylvester *et al.*, 2002). PI3Ks representa la familia de enzimas expresadas y activadas en forma ubicua por la mayoría de los receptores de la membrana celular (Jung *et al.*, 2000; Vanhaesebroeck *et al.*, 2000). La activación de PI3K da como resultado en la 3'-fosforilación de fosfoinositidas dentro de la membrana celular que enlaza y causa la translocación de Akt a la membrana celular, así como también otras proteínas efectoras actúan para transmitir señalamiento de PI3K corriente abajo (Vanhaesebroeck *et al.*, 2000). Las quinasas PI3K-dependientes (PDK1 y PDK2) son las proteínas efectoras de membrana mejor caracterizadas de PI3K, que actúan para fosforilar y activar Akt. Posteriormente, la activación de Akt lleva a la fosforilación y regulación de varios objetivos relacionados con la supervivencia de la célula (IkB, BAD, caspasa-9, factores de transcripción (tipo DAF y Forkhead) mitogénesis (mTOR), y metabolismo-glucógeno sintasa quinasa (Vanhaesebroeck *et al.*, 2000). Se ha comprobado que dosis inhibitoras de tocotrienol reducen los niveles fosforilados de Akt y la mitogénesis, mientras que el tratamiento con dosis muy altas de α -tocoferol no tuvieron efecto en las células epiteliales mamarias preneoplásicas (Sylvester *et al.*, 2002).

También se ha observado que el tratamiento con dosis de tocotrienoles inhibitoras del desarrollo atenúa el señalamiento mitogénico PKA dependiente de EGF (Sylvester *et al.*, 2002). Estudios anteriores han indicado que el receptor de EGF es un receptor acoplado a proteína G y que la activación dependiente de EGF del receptor resulta en un aumento de los niveles intracelulares de cAMP y la activación de proteína quinasa (PKA), en células epiteliales normales y neoplásicas (Bandyopadhyay *et al.*, 1995; Xing *et al.*, 1999).

Investigaciones previas han señalado que el tratamiento combinado con agentes farmacológicos que, o bien acoplan la actividad del receptor de la proteína G (toxina del cólera y la tos ferina), aumentan la actividad de adenilil ciclasa (fosfatidilcolina), o amplían los niveles intracelulares de cAMP (8-Br-cAMP), revierten completamente los efectos de tocotrienoles inhibidores del desarrollo en células epiteliales neoplásicas preneoplásicas (Sylvester *et al.*, 2002). Estos hallazgos indican que los efectos antiproliferativos de los tocotrienoles resultan, al menos parcialmente, de la inhibición de la transducción del señalamiento propiciado por la proteína G.

Muerte celular programada inducida por tocotrienoles (apoptosis)

Estudios realizados acerca de dosis-respuesta indican que las dosis de tocotrienoles inhibidoras del desarrollo (IC_{50}) son de 5 a 6 veces menores que sus correspondientes dosis letales (LD_{50}) (McIntyre *et al.*, 2000; McIntyre, Briski, Gapor, Sylvester, 2000). Estos datos sugieren de manera contundente que los efectos antiproliferativos y apoptóticos de tocotrienoles actúan a través de diferentes mecanismos. Se determinó que la muerte de células epiteliales mamarias neoplásicas inducida por tocotrienoles es el resultado del inicio de apoptosis como lo definieron los grandes aumentos de fragmentación en el ADN y tinción positiva de la prueba TUNEL, que es un marcador nuclear de apoptosis en desarrollo en una célula (McIntyre *et al.*, 2000; McIntyre, Briski, Gapor, Sylvester, 2000; Sylvester, Shah, 2002; Sylvester, 2003; Shah *et al.*, 2002).

La apoptosis es un aspecto importante del crecimiento y remodelación de las glándulas mamarias normales, así como para eliminar células neoplásicas de la mama (Kumar *et al.*, 2000). Se caracteriza por aspectos morfológicos y bioquímicos específicos, tales como condensación nuclear y citoplásmica, fragmentación del ADN, dilatación del retículo endoplásmico, alteraciones en la composición de la membrana celular, y formación de cuerpos apoptóticos encerrados por membrana (Kerr *et al.*, 1972). La iniciación de apoptosis incluye la activación de aspartilo proteasas dependientes de cisteína,

denominadas caspasas (Earnshaw *et al.*, 1999; Panka *et al.*, 2001). Las caspasas están presentes de manera esencial en células en una forma precursora inactiva que entonces debe dividirse y procesarse para su activación (Earnshaw *et al.*, 1999; Panka *et al.*, 2001). Las caspasas iniciadoras (caspasas -8, y -9) activan caspasas efectoras (caspasas -3, -6 y -7), las cuales dividen luego proteínas estructurales y reguladoras tales como el factor -45 de fragmentación de ADN (DFF45), poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), láminas, y citoqueratinas, y resultan finalmente en la destrucción organizada de la célula (Earnshaw *et al.*, 1999; Panka *et al.*, 2001).

Hay por lo menos dos mecanismos generales relacionados con la iniciación de la activación de caspasa (Figura 4). El primer mecanismo incluye la activación de caspasa receptora mediada. La activación de “receptores de muerte”, tales como Fas, el factor de necrosis tumoral (TNF, por su sigla en inglés), o receptores de ligando inductor de apoptosis relacionada con TNF (TRAIL, por sus iniciales en inglés) por sus ligandos específicos resulta en trimerización del receptor, reclutamiento de proteínas adaptadoras tales como dominio de muerte asociado a Fas (FADD, por sus iniciales en inglés), y caspasas iniciadoras (procaspasa -2 ó -8), para formar lo que se conoce como un complejo causante de muerte o DISC (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). Entonces se activa y libera la caspasa iniciadora dentro del DISC. Las caspasas iniciadoras activas, tales como caspasa -3, intervienen luego en los diversos eventos citoplásmicos y nucleares asociados con apoptosis (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). No obstante, en algunos tipos de células la activación de caspasa iniciadora puede ocurrir también en ausencia de la activación del receptor de muerte.

Estudios realizados han demostrado transducción de la fosforilación mediada por las señales de la Proteína G mediante la transmisión de señales PL3K que estimula la fosfatidilinositol3-quinasa (PI3K)/PL3K dependiente de quinasa (PDK)/Akt, señalización mitógena resultante del incremento de la expresión intracelular de la inhibición protéica de FLICE (FLIP), una proteína citoplásmica que evita la activación de procaspasa -8 (Panka *et al.*; Varadhachary *et al.*, 2001). Los tratamientos que inhiben el señalamiento

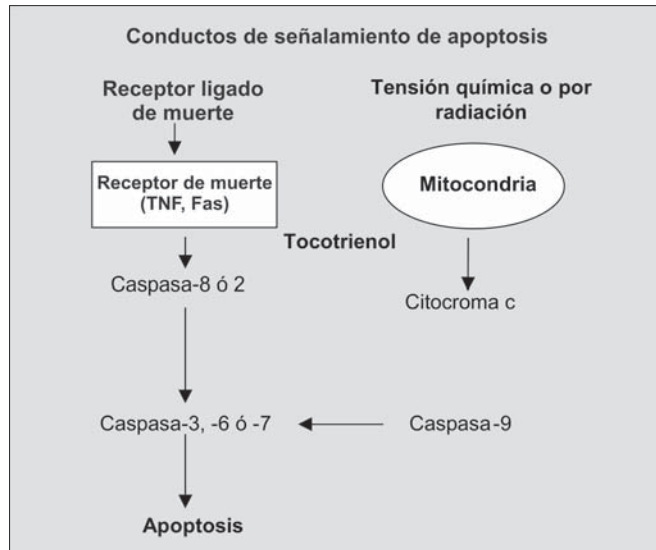


Figura 4 Sitios intracelulares de acción en que los tocotrienoles parecen actuar para inducir muerte celular o apoptosis programadas en células mamarias cancerosas. La evidencia experimental sugiere que el tratamiento con tocotrienol conduce a la activación de caspasa-8, y posteriormente caspasa-3. Estos resultados indican que la activación de caspasa inducida por tocotrienoles se produce mediante el señalamiento apoptótico del receptor de muerte. Por el contrario, el tocotrienol no induce la activación de caspasa-9, lo que sugiere que la apoptosis inducida por tocotrienoles no se produce por medio del camino de stress mitocondrial

mitógeno PI3K/PDK/Akt pueden causar una reducción en los niveles FLIP intracelulares, y aumento correspondiente en la activación de caspasa-8 y apoptosis (Panka *et al.*; Varadachary *et al.*, 2001).

En contraste, la activación de caspasa provocada por tensión puede iniciarse por medio de numerosas señales celulares que causan perturbaciones en la mitocondria, resultando en la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial y la liberación de moléculas proapoptóticas, tales como el factor inductor de apoptosis (AIF, por su sigla en inglés) y el citocroma c del espacio intermembranas entre el citoplasma (Green *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998). El citocroma c interacciona entonces con el factor 1 (Apaf-1) de activación de proteasa de apoptosis, dATP/ATP y procaspasa-9 para formar un

complejo (apoptosoma) que induce la activación de caspasa-9 iniciadora, y finalmente conduce a activación de caspasa-3 y apoptosis (Green *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998). Se requiere la liberación de citocroma c de la mitocondria para la formación de apoptosoma y está estrechamente controlada por la familia Bcl-2 de proteínas que funciona para inhibir (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 y A1) o para promover apoptosis (Bax, Bak, Bok, Bik, Hrk, Bim, Bid y Bad) por medio de la regulación de citocroma c liberación (Li *et al.*, Kirsch *et al.*, 1999). También se ha demostrado que entre la mediación del receptor y el estrés mitocondrial pueden ocurrir algunos modelos apoptóticos. La activación de caspasa-8 o caspasas efectoras corriente abajo también puede conducir directamente a la liberación de citocroma c de la mitocondria y a la activación de caspasa-9 en algunas células (Li *et al.*, Kirsch *et al.*, 1999).

Hace poco se llevaron a cabo estudios para determinar si la apoptosis inducida por los tocotrienoles se encuentra mediada por la activación de la muerte del receptor de caspasa-8 y/o si el estrés mitocondrial induce la activación de caspasa-9 en la alta malignidad en el crecimiento de las células epiteliales mamarias (Sylvester, Shah, 2002; Sylvester, Theriault, 2002; Shah *et al.*, 2003). El tratamiento con 0-50µM TRF o γ-tocotrienol causó una disminución dependiente de la dosis en la viabilidad de células epiteliales mamarias malignas (Shah *et al.*, 2003). Por el contrario, el tratamiento con dosis 10 veces más altas de α-tocoferol no tuvieron efectos en la viabilidad celular (Shah *et al.*, 2003).

Estudios adicionales revelaron que tratamientos similares con TRF o γ-tocotrienol, aumentaron la actividad intracelular y los niveles de caspasa-8 y -3 procesada, pero no los de caspasa 9 (Shah *et al.*, 2003). Además, el tratamiento con caspasa-8 o -3 específica inhibidora, pero no caspasa-9, bloqueó completamente la apoptosis provocada por tocotrienol en células mamarias tumorales (Shah *et al.*, 2003). Por el contrario, tratamientos con dosis altas de α-tocoferol no tuvieron efecto alguno en los niveles intracelulares ni en la actividad de caspasa-8, -3, o -9 (Shah *et al.*, 2003).

Estos hallazgos demuestran la función de caspasa-8 y caspasa-3, pero no de -9 en la

intervención de apoptosis inducida por tocotrienol en células epiteliales mamarias malignas, y sugieren la muerte del receptor por señal apoptótica, la cual involucra la mediación de los tocotrienoles inducidos por la actividad de caspasas. Es preciso hacer nuevos estudios adicionales para determinar los mecanismos exactos de señalamiento de receptor ligado relacionados con apoptosis provocada por tocotrienoles. Los efectos de tocotrienoles en los caminos de señalamiento apoptótico en células mamarias cancerosas se resumen en la Figura 4.

Conclusiones

El cáncer de mama es la malignidad con mayor prevalencia en las mujeres (Marshall, 1993). A pesar de que se han hecho progresos importantes en la detección y tratamiento tempranos, muchas mujeres mueren hoy en día de cáncer de mama, al igual que ocurría en los inicios del siglo pasado (Marshall, 1993). Esto se debe al hecho alarmante de que el cáncer de mama aumentó de forma constante durante los últimos cincuenta años (Marshall, 1993). Mientras se han identificado genes que predisponen a la mujer para contraer cáncer de mama, tales como BRCA1 y BRCA2, se cree que estos genes son directamente responsables únicamente en 10-15% de todos los casos de cáncer de mama, pero se desconoce la causa del 85-90% restante de cáncer de mama (Vogel *et al.*, 1993).

Por tanto, es evidente que los avances en la prevención de cáncer de mama brindarían el mayor de los beneficios en la reducción de muertes por cáncer de mama. La carcinogénesis de mama es un proceso de etapas múltiples que se inicia con una sola mutación genómica, y las mutaciones posteriores conducen a una evolución de las características fenotípicas malignas, incluyendo una mayor morfología histológica anaplásica, resistencia a terapias anticancerosas o endocrinas, y un mayor potencial invasivo y metastásico (Sylvester *et al.*, 1986; Medina, 1974; Nandi *et al.*, 1995).

La evidencia experimental sugiere que los efectos antitumorosos de tocotrienoles pueden ocurrir en más de una etapa de la carcinogénesis mamaria (Sylvester, Russell *et al.*, 1986; Sundram *et al.*, 1989; Goh *et al.*, 1994; Rogers *et al.*, 1986; Nakayama *et al.*, 1993). Además, dosis

terapéuticas de tocotrienoles que inhiben el crecimiento e inducen la muerte celular programada en células mamarias de cáncer, han probado tener muy poco o ningún efecto en el desarrollo o viabilidad de células epiteliales mamarias normales (McIntyre *et al.*, 2000; McIntyre, Briski, Gapor, Sylvester, 2000).

Es necesario realizar estudios adicionales para tener una comprensión absoluta del potencial anticancerígeno y los mecanismos de acción de los tocotrienoles en los seres humanos. En contraste con los tocoferoles, la evidencia experimental acumulada sugiere que el suplemento dietético de tocotrienoles versus tocoferoles, puede proporcionar beneficios saludables importantes para reducir en las mujeres el riesgo de cáncer de mama.

Agradecimiento

Este trabajo se llevó a cabo gracias en parte, al apoyo de la beca NIH CA86833 y a una beca de MPOB. Expreso mi muy especial gratitud al Dr. Abdul Vapor por haberme proporcionado tocotrienoles TRF y purificados para la realización de estos experimentos. 🌺

Bibliografía

- ANTONSSON, B; MARTINOU, J.D. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* 256, p.50-57.
- BANDYOPADHYAY, G.K.; IMAGAWA, W.; NANDI, S. 1995. Role of GTP-binding proteins in the poly-unsaturated fatty acid stimulated proliferation of mouse mammary epithelial cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 52, p.151-158.
- BRATTON, S.B.; MACFARLANE, M.; CAIN, K.; COHEN, G.M. 2000. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 256, p.27-33.
- CHATELAIN, E.; BOSCOBOINIK, D.; BARTOLI, G.M.; KAGAN, V.E.; GEY, F.K.; PACKER, L.; AZZI, A. 1993. Inhibition of smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity by tocoferoles and tocotrienoles. *Biochim Biophys Acta* 176, p.83-89.
- CHEN, Q.; GONG, B.; ALMASAN, A. 2002. Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 7, p.27-233.

- COTTRELL, R.C. 1991. Introduction: nutritional aspects of palm oil. *Am J Clin Nutr.* 53, p. 989S-1009S.
- DENHARDT, D.T. 1996. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho protein in the mammalian cell: the potential for multiplex signaling. *Biochem J.* 318, p. 729-747.
- DESAGHER, S.; OSEN-SAND, A.; NICHOLS, A.; ESKES, R.; MONTESSUIT, S.; LAUPER, S.; MAUNDRELL, K.; ANTONSSON, B.; MARTINOU, J.C. 1999. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol.* 144, p.891-901.
- EARNSHAW, W.C.; MARTINS, L.M.; KAUFMANN, S.H. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 68, p.383-424.
- ELSON, C.E. 1992. Tropical oils: nutritional and scientific issues. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 31, p.79-102.
- FAZZIO, A.; MARILLEY, D.; AZZI, A. 1997. The effect of alpha-tocopherol and beta-tocopherol on proliferation, protein kinase C activity and gene expression in different cell lines. *Biochem Mol Biol Int.* 41, p.93-101.
- GOH, S.H.; HEW, N.F.; NORHANOM, A.W.; YADAV, M. 1994. Inhibition of tumour promotion by various palm-oil tocotrienoles. *Int J Cancer.* 57, p.529-531.
- GOULD, M.N.; HAAG, J.D.; KENNAN, W.S.; TANNER, M.A.; ELSON, C.E. 1991. A comparison of tocoferol and tocotrienol for the chemoprevention of chemically induced rat mammary tumors. *Am J Clin Nutr.* 53, p.1068S-1070S.
- GREEN, D.R.; REED, J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281, p.1309-1312.
- GUZMAN, R.C.; OSBORN, R.C.; SWANSON, S.M.; SAKTHIVEL, R.; HWANG, S.I.; MIYAMOTO, S.; NANDI, S. 1992. Incidence of c-Ki-ras activation in N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinomas in pituitary-isografted mice. *Cancer Res.* 52, p.5732-5737.
- HAYES, K.C.; PRONCZUK, A.; LIANG, J.S. 1993. Differences in the plasma transport and tissue concentrations of tocoferoles and tocotrienoles: observations in humans and hamsters. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 202, p.353-359.
- HUTCHINSON, J.; JIN, J.; CARDIFF, R.D.; WOODGETT, J.R.; MULLER, W.J.; 2001. Activation of Akt (protein kinase B) in mammary epithelium provides a critical cell survival signal required for tumor progression. *Mol. Cell. Biol.* 21, p.2203-2212.
- IMAGAWA, W.; BANDYOPADHYAY, G.K.; GARCÍA, M.; MATSUZAWA, A.; NANDI, S. 1992. Pregnancy-dependent to ovarian-independent progression in mammary tumors delineated in primary culture: changes in signal transduction, growth factor regulation, and matrix interaction. *Cancer Res.* 52, p.6531-6538.
- JUNG, F.; HAENDELER, J.; GOEBEL, C.; ZEIHNER, A.M.; DIMMELER, S. 2000. Growth factor-induced phosphoinositide 3-OH kinase/Akt phosphorylation in smooth muscle cells: induction of cell proliferation and inhibition of cell death. *Cardiovascular Res.* 48, p.148-157.
- KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26, p.239-257.
- KIMMICK, G.G.; BELL, R.A.; BOSTICK, R.M. 1997. Vitamin E and breast cancer: a review. *Nutr. Cancer.* 27, p.109-117.
- KIRSCH, D.G.; DOSEFF, A.; CHAU, B.N.; LIM, D.S.; de SOUZA-PINTO, N.C.; HANSFORD, R.; KASTAN, M.B.; LAZEBNIK, Y.A.; HARDWICK, J.M. 1999. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J Biol Chem.* 274, p.21155-21161.
- KLINE, K.; YU, W.; SANDERS, B.G. 2001. Vitamin E: mechanisms of action as tumor cell growth inhibitors. *J Nutr.* 131, p. 161S-163S.
- KOLCH, W. 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/Mek/Erk pathway by protein interactions. *Biochem J.* 351, p.289-305.
- KUMAR, R.; VADLAMUDI, R.K.; ADAM, L. 2000. Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocr Relat Cancer.* 7, p.257-269.
- LI, H.; ZHU, H.; XU, C.J.; YUAN, J. 2000. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998 94; p.491-501.
- MARSHALL, E. 1993. Epidemiology. Search for a killer: focus shifts from fat to hormones. *Science.* 259, p.618-621.
- MARZUKI, A.F.; RAZAK, T.A.; JAARIN, K. 1991. Influence of dietary fat on plasma lipid profiles of Malaysian adolescents. *Am J Clin Nutr.* 53, p.1010S-1014S.
- MCINTYRE, B.S.; BRISKI, K.P.; TIRMENSTEIN, M.A.; FARISS, M.W.; GAPOR, A.; SYLVESTER, P.W. 2000. Antiproliferative and apoptotic effects of tocoferoles and tocotrienoles on normal mouse mammary epithelial cells. *Lipids.* 35, p.171-180.

- MCINTYRE, B.S.; BRISKI, K.P.; GAPOR, A.; SYLVESTER, P.W. 2000. Antiproliferative and apoptotic effects of tocoferoles and tocotrienoles on preneoplastic and neoplastic mouse mammary epithelial cells. *PSEBM*. 224, p.292-301.
- MEDINA, D. 1974. Mammary tumorigenesis in chemical carcinogen-treated mice. II. Dependence on hormone stimulation for tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst*. 53, p.223-226.
- NAGASAWA, H.; YANAI, R.; TANIGUCHI, H. 1976. Importance of mammary gland DNA synthesis on carcinogen-induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Res*. 36, p.2223-2226.
- NAKAYAMA, M.; JU, H.R.; SUGANO, M.; HIROSE, N.; UEKI, T.; DOI, F.; EYNARD, A.R. 1993. Effect of dietary fat and cholesterol on dimethylbenz[a]-anthracene-induced mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats. *Anticancer Res*. 13, p.691-698.
- NANDI, S.; GUZMAN, R.C.; YANG, J. 1995. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92, p. 3650-3657.
- NESARETNAM, K.; KHOR, H.T.; GANESON, J.; CHONG, Y.H.; SUNDRAM, K.; GAPOR, A. 1992. The effects of vitamin E tocotrienoles from palm oil on chemically induced mammary carcinogenesis in female rats. *Nutr. Res*. 12, p. 879-892.
- PACKERG, L. 1991. Protective role of vitamin e in biological systems. *Am J Clin Nutr*. 53, p.1050S-1055S.
- PACKER, L., WEBER S.U., RIMBACH G. 2001. Molecular aspects of α -tocotrienol antioxidant action and cell signaling. *J. Nutr*. 131, p.369S-373S.
- PACKER, L.; RIMBACH, G.; VIRGILI, F. 1999. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidinrich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic Biol Med*. 27, p.704-724.
- PANKA, D.J.; MANO, T.; SUHARA, T.; WALSH, K.; MIER, J.W. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *J Biol Chem*. 276, p.6893-6896.
- RICHARDS, J.S. 2001. New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol*. 15, p.209-218.
- ROGERS, A.E.; LEE, S.Y. 1986. Chemically-induced mammary gland tumors in rats: modulation by dietary fat. *Prog Clin Biol Res*. 222, p.255-282.
- RUSSO, I.H.; RUSSO, J. 1978. Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *J Natl Cancer Inst*. 61, p.1439-1449.
- SCHULZE-OSTHOFF, K.; FERRARI, D.; LOS, M.; WESSELBORG, S.; PETER, M.E. 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*. 254, p.439-459.
- SCHWARTZ, J.; SHKLAR, G. 1992. The selective cytotoxic effect of carotenoids and alpha-tocopherol on human cancer cell lines in vitro. *J Oral Maxillofac Surg*. 50, p.367-373, discussion p.373-364.
- SERBINOVA, E.; KAGAN, V.; HAN, D.; PACKER, L. 1991. Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radic. Biol. Med*. 10, p.263-275.
- SERBINOVA, E.A.; PACKER, L. 1994. Antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Methods Enzymol*. 234, p.354-366.
- SIGOUNAS, G.; ANAGNOSTOU, A.; STEINER M. 1997. dl-alpha-tocopherol induces apoptosis in erythroleukemia, prostate, and breast cancer cells. *Nutr. Cancer*. 28, p.30-35.
- SHAH, S.; GAPOR, A.; SYLVESTER, P.W. 2003. Role of caspase-8 activation in mediating vitamin E-induced apoptosis in murine mammary cancer cells. *Nutr. Cancer*. 45, p.236-246.
- SLEE, E.A.; ADRAIN, C.; MARTIN, S.J. 1996. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ*. 6, p.1067-1074.
- SUHARA, T.; MANO, T.; OLIVERIRA, B.E.; WALSH, K. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling cocontrols endothelial cell sensitivity to Fas-mediated apoptosis via regulation of FLICE-inhibitory protein (FLIP). *Circ Res*. 89, p.13-19.
- SUN, X.M.; MACFARLANE, M.; ZHUANG, J.; WOLF, B.B.; GREEN, D.R.; COHEN, G.M. 1999. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 274, p.5053-5060.
- SUNDRAM, K.; KHOR, H.T.; ONG, A.S.; PATHMANATHAN, R. 1989. Effect of dietary palm oils on mammary carcinogenesis in female rats induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Cancer Res*. 49, p.1447-1451.
- SUZUKI, Y.J.; TSUCHIYA, M.; WASSALL, S.R.; CHOO, Y.M.; GOVIL, G.; KAGAN, V.E.; PACKER, L. 1993. Structural and dynamic membrane properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol: implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry*. 32, p.10692-10699.
- STAUBLE, B.; BOSCOBOINIK, D.; TASINATO, A.; AZZI, A. 1994. Modulation of activator protein-1 (AP-1) transcription factor and protein kinase C by hydrogen peroxide and d-alpha-tocopherol in vascular smooth muscle cells. *Eur J Biochem*. 226, p.393-402.

- SYLVESTER, P.W.; RUSSELL, M. 1986. Ip MM, Ip C. Comparative effects of different animal and vegetable fats fed before and during carcinogen administration on mammary tumorigenesis, sexual maturation, and endocrine function in rats. *Cancer Res.* 46, p.757-762.
- SYLVESTER, P.W. 1986. Ip C, Ip MM. Effects of high dietary fat on the growth and development of ovarian-independent carcinogen-induced mammary tumors in rats. *Cancer Res.* 46, p.763-769.
- SYLVESTER, P.W.; MCINTYRE, B.S.; GAPOR, A.; BRISKI, K.P. 2001. Vitamin E inhibition of normal mammary epithelial cell growth is associated with a reduction in protein kinase C(alpha) activation. *Cell Prolif.* 34, p.347-357.
- SYLVESTER, P.W.; NACHNANI, A.; SHAH, S.; BRISKI, K.P. 2002. Role of GTP-binding proteins in reversing the antiproliferative effects of tocotrienoles in preneoplastic mammary epithelial cells. *Asia Pacific J Clin Nutr.* 11, S452-S459.
- SYLVESTER, P.W.; SHAH, S. Antioxidants in dietary oils: their potential role in breast cancer prevention. *Malaysian Journal of Nutrition* 2002 8; 1-11.
- SYLVESTER, P.W.; THERIAULT, A. 2003. Role of tocotrienoles in the prevention of cardiovascular disease and breast cancer. *Curr. Top Nutraceutical Res.* 1, p.121-136.
- SYLVESTER, P.W.; AYLSWORTH, C.F.; VAN VUGT, D.A.; MEITES, J. 1983. Effects of alterations in early hormonal environment on development and hormone dependency of carcinogen-induced mammary tumors in rats. *Cancer Res.* 43, p.5342-5346.
- SWANSON, S.M.; GUZMAN, R.C.; CHRISTOV, K.; MIYAMOTO, S.; NANDI, S. 1994. Pituitary-isografted mice are highly susceptible to MNU-induced mammary carcinogenesis irrespective of the level of alveolar differentiation. *Carcinogenesis* 15, p.1341-1346.
- SWANSON, S.M.; GUZMAN, R.C.; COLLINS, G.; TAFOYA, P.; THORDARSON, G.; TALAMANTES, F.; NANDI, S. 1995. Refractoriness to mammary carcinogenesis in the parous mouse is reversible by hormonal stimulation induced by pituitary isografts. *Cancer Lett.* 90, p.171-181.
- ULLRICH, A.; SCHLESSINGER, J. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 61, p.03-212.
- TURLEY, J.M.; RUSCETTI, F.W.; KIM, S.J.; FU, T.; GOU, F.V.; BIRCHENALL-ROBERTS, M.C. 1997. Vitamin E succinate inhibits proliferation of BT-20 human breast cancer cells: increased binding of cyclin A negatively regulates E2F transactivation activity. *Cancer Res.* 57, p.2668-2675.
- VANHAESEBROECK, B.; ALESS, D.R. 2000. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J.* 346, p.561-576.
- VARADHACHARY, A.S.; EDIDIN, M.; HANLON, A.M.; PETER, M.E.; KRAMMER, P.H.; SALGAME, P. 2001. Phosphatidylinositol 3'-kinase blocks CD95 aggregation and caspase-8 cleavage at the death-inducing signaling complex by modulating lateral diffusion of CD95. *J Immunol.* 166, p.6564-6569.
- VOGEL, V.G.; YEOMANS, A.; HIGGINBOTHAM, E. 1993. Clinical management of women at increased risk for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 28, p.195-210.
- XING, C.; IMAGAWA, W. 1999. Altered MAP kinase (ERK1,2) regulation in primary cultures of mammary tumor cells: elevated basal activity and sustained response to EGF. *Carcinogenesis.* 20, p.201-208.
- ZURINAH, W.; NGAH, W.; JARIEN, Z.; SAN, M.M.; MARZUKI, A.; TOP, G.D.; SHAMAAN, N.A.; KADIR, K.A. 1991. Effect of tocotrienoles on hepatocarcinogenesis induced by 2-acetylaminofluorene in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, p.1076S-1081S.