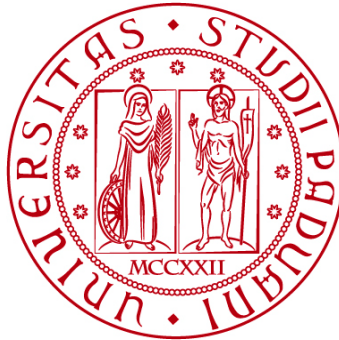


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia Molecolare**



**ELABORATO DI LAUREA**

Analisi trascrittomica degli effetti della restrizione calorica intermittente e cronica nel tessuto adiposo mammario di un modello murino di carcinoma mammario

**Tutor:** Prof.ssa Sofia Pavanello

Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità Pubblica

**Laureanda:** Chiara Celere

**ANNO ACCADEMICO 2025/2026**



## INDICE

|                                                                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Abstract.....</b>                                                                                              | <b>1</b>  |
| <b>1. Stato dell'arte.....</b>                                                                                    | <b>2</b>  |
| <b>2. Approccio sperimentale.....</b>                                                                             | <b>7</b>  |
| <b>2.1. Modello murino MMTV-TGF<math>\alpha</math>.....</b>                                                       | <b>7</b>  |
| <b>2.2. Disegno sperimentale.....</b>                                                                             | <b>8</b>  |
| <b>2.3. Analisi trascrittomica.....</b>                                                                           | <b>9</b>  |
| 2.3.1 Estrazione e purificazione dell'RNA .....                                                                   | 9         |
| 2.3.2 Quantificazione e valutazione della purezza e dell'integrità dell'RNA.....                                  | 10        |
| 2.3.3 Preparazione delle librerie di sequenziamento .....                                                         | 10        |
| <b>2.4. Analisi bioinformatica e statistica .....</b>                                                             | <b>11</b> |
| 2.4.1 Analisi bioinformatica .....                                                                                | 11        |
| 2.4.2 Analisi statistica .....                                                                                    | 12        |
| <b>3. Risultati.....</b>                                                                                          | <b>13</b> |
| <b>3.1. Alterazioni trascrittomiche associate all'invecchiamento.....</b>                                         | <b>13</b> |
| 3.1.1 Geni sovraregolati nei topi adulti.....                                                                     | 13        |
| 3.1.2 Geni sottoregolati nei topi adulti.....                                                                     | 14        |
| 3.1.3 Geni sovraregolati nei topi anziani.....                                                                    | 14        |
| 3.1.4 Geni sottoregolati nei topi anziani.....                                                                    | 15        |
| <b>3.2. Effetti a medio termine della restrizione calorica cronica e<br/>intermittente nei topi adulti.....</b>   | <b>15</b> |
| 3.2.1 Geni differenzialmente espressi nel gruppo CCR .....                                                        | 15        |
| 3.2.2 Geni differenzialmente espressi nel gruppo ICR-R.....                                                       | 16        |
| 3.2.3 Geni differenzialmente espressi nel gruppo ICR-RF .....                                                     | 17        |
| <b>3.3. Effetti a lungo termine della restrizione calorica cronica e<br/>intermittente nei topi anziani .....</b> | <b>17</b> |
| 3.3.1 Panoramica nel gruppo CCR.....                                                                              | 17        |
| 3.3.2 Geni differenzialmente espressi nel gruppo ICR-R.....                                                       | 18        |
| 3.3.3 Panoramica nel gruppo ICR-RF .....                                                                          | 18        |
| <b>4. Discussione.....</b>                                                                                        | <b>19</b> |
| <b>5. Conclusione .....</b>                                                                                       | <b>25</b> |
| <b>Bibliografia.....</b>                                                                                          | <b>26</b> |
| <b>Appendice.....</b>                                                                                             | <b>28</b> |

## **Abstract**

Tra i numerosi cambiamenti nei processi biologici provocati dall'invecchiamento, spiccano alterazioni trascrittomiche associate a diverse patologie, tra cui il carcinoma mammario. In questo contesto, la restrizione calorica costituisce un promettente intervento dietetico non farmacologico, in grado di influire positivamente sulla salute metabolica e sul rischio di carcinoma mammario, soprattutto negli individui geneticamente predisposti.

Il presente elaborato valuta l'effetto della restrizione calorica cronica (CCR) e della restrizione calorica intermittente (ICR) sul trascrittoma del tessuto adiposo mammario (MFP) in un modello murino di carcinoma mammario.

A tale scopo, topi femmina transgenici sono stati randomizzati nei gruppi ad libitum (AL), CCR e ICR e analizzati mediante RNA-seq a diverse età. L'analisi dell'espressione genica differenziale ha identificato significative variazioni trascrittomiche associate all'invecchiamento, caratterizzate dalla sottoregolazione dei pathway coinvolti nella segnalazione neuroendocrina. L'ICR ha attenuato tali alterazioni, sovraregolando i geni coinvolti nel supporto ai neurotrasmettitori e sottoregolando i processi di organizzazione della matrice extracellulare e di regolazione positiva dell'angiogenesi.

Al contrario, la CCR non ha mostrato la stessa efficacia nel modulare il trascrittoma del MFP, soprattutto nel lungo termine.

Alla luce dei risultati ottenuti, l'ICR non solo rappresenta una promettente strategia dietetica per il mantenimento della funzionalità del tessuto adiposo mammario durante l'invecchiamento, ma possiede anche potenziali implicazioni nella prevenzione del carcinoma mammario.

## 1. Stato dell'arte

L'invecchiamento è in grado di provocare cambiamenti inevitabili nei processi biologici, tra cui significative modifiche trascrittomiche a livello molecolare.

La restrizione calorica, definita come una condizione di "sottonutrizione senza malnutrizione", è in grado di indurre un effetto protettivo contro le patologie e le malattie associate all'invecchiamento. Tra i principali benefici emergono la prevenzione dell'obesità, del diabete, delle malattie cardiovascolari e renali, nonché la riduzione del rischio di sviluppare diverse forme di cancro.

Questi contribuiscono a migliorare la qualità della vita e a prolungare la longevità, in quanto la riduzione del rischio di patologie correlate all'età si traduce in un periodo più esteso di salute e benessere.

La restrizione calorica previene inoltre la comparsa del carcinoma mammario, sia spontaneo che indotto da agenti cancerogeni.

Nei modelli sperimentali, come i roditori, si osserva una diminuzione dell'incidenza tumorale fino al 95%, quando l'apporto calorico è limitato al 60-80% del loro consumo *ad libitum* (AL) [1, 2].

La restrizione calorica induce risposte metaboliche differenti nelle cellule normali rispetto a quelle tumorali, poiché interrompe la disponibilità della fonte energetica necessaria alla crescita e alla proliferazione del tumore.

Le cellule tumorali utilizzano prevalentemente la glicolisi aerobica per soddisfare il loro fabbisogno energetico, mentre le cellule sane si affidano principalmente alla fosforilazione ossidativa mitocondriale. Durante un regime di restrizione calorica, l'organismo utilizza i grassi come fonte di energia. La loro degradazione porta alla formazione di corpi chetonici (acetoacetato e  $\beta$ -idrossibutirrato), che vengono successivamente convertiti in acetil-CoA.

L'acetil-CoA entra nei mitocondri e viene utilizzato per la produzione di ATP tramite fosforilazione ossidativa.

Questo processo comporta un rallentamento della glicolisi, dal momento che la degradazione del glucosio non è necessaria per la produzione primaria di energia.

In questo modo, le cellule mantengono una produzione energetica stabile anche in carenza di glucosio.

Le cellule tumorali, invece, dipendono direttamente dalla glicolisi per la produzione di energia, anche in presenza di ossigeno (condizione in cui le cellule normali preferirebbero la fosforilazione ossidativa nei mitocondri). Questo fenomeno è noto come "effetto Warburg". Grandi quantità di glucosio vengono consumate e convertite in lattato.

Inoltre, numerose cellule tumorali non sono in grado di utilizzare i corpi chetonici a causa dell'assenza o dei bassi livelli di enzimi mitocondriali necessari per il loro metabolismo. Questa condizione provoca una carenza di ATP, che rallenta la proliferazione delle cellule tumorali e può indurre la morte cellulare.

Parallelamente, l'esaurimento della glicolisi priva le cellule tumorali delle molecole necessarie per la loro rapida crescita, come ribonucleotidi, aminoacidi, NADPH, eliminando così i vantaggi conferiti dall'effetto Warburg [3].

Sono state sviluppate diverse strategie per attuare la CR, tra cui la restrizione calorica intermittente (ICR) e la restrizione calorica cronica (CCR).

L'ICR consiste in cicli alternati di restrizione calorica e rialimentazione, promuovendo la flessibilità metabolica e migliorando l'adattamento allo stato di stress.

La CCR, al contrario, prevede un deficit calorico continuo e moderato, mantenuto nel tempo.

Attualmente, gli effetti della CCR sulla prevenzione del cancro risultano ampiamente studiati, mentre le ricerche sull'ICR risultano più limitate.

L'adozione di protocolli di restrizione calorica, sia intermittente (ICR) sia cronica (CCR), comporta un significativo miglioramento del profilo metabolico e infiammatorio.

Entrambe le strategie determinano una riduzione significativa dei livelli sierici delle citochine pro-infiammatorie IL-6 e TNF- $\alpha$ , sia a breve sia a lungo termine. Tale riduzione appare più pronunciata con l'adozione dell'ICR rispetto alla CCR.

Analogamente, la restrizione calorica modula la secrezione di numerosi fattori endocrini coinvolti nell'omeostasi energetica e nella carcinogenesi.

Rispetto ai soggetti alimentati *ad libitum* (AL), entrambe le strategie di restrizione calorica determinano una diminuzione dei livelli sierici di IGF-I e di leptina, mentre i livelli di adiponectina e di insulina negli adipociti risultano incrementati.

Questo effetto risulta particolarmente evidente nei protocolli che prevedono l'applicazione dell'ICR con fase di rialimentazione (ICR-RF).

Inoltre, il peso corporeo mostra una correlazione positiva con i livelli di IL-6, TNF- $\alpha$ , insulina e leptina, mentre emerge una correlazione negativa con il rapporto adiponectina/leptina.

La correlazione positiva osservata tra IL-6 e TNF- $\alpha$  suggerisce che gli effetti benefici della restrizione calorica, in particolare dell'ICR, siano mediati, almeno in parte, dalla modulazione delle vie di segnalazione delle citochine pro-infiammatorie [4].

L'adiponectina, un'adipochina con proprietà antinfiammatorie, esercita i propri effetti tramite l'inibizione di TNF- $\alpha$  e la produzione di molecole di adesione monocitaria. Contribuisce alla regolazione del metabolismo glucidico e lipidico, dell'insulina e della funzione del tessuto adiposo.

I livelli di adiponectina aumentano in risposta alla restrizione calorica, mentre l'adiposità e la concentrazione di adiponectina sono influenzate dall'invecchiamento.

La leptina, anch'essa secreta dal tessuto adiposo, regola l'appetito e il bilancio energetico. Questa, al contrario, è coinvolta nella proliferazione cellulare e nella progressione tumorale. La modulazione della secrezione di queste due adipochine costituisce uno dei principali meccanismi attraverso cui la restrizione calorica può influenzare il rischio di carcinoma mammario.

Il rapporto adiponectina/leptina è considerato un indicatore dell'equilibrio tra i segnali anti- e pro-proliferativi derivanti dal tessuto adiposo. Un rapporto anomalo tra adiponectina e leptina è direttamente associato a diverse patologie, tra cui l'obesità. Questo rapporto diminuisce significativamente con l'invecchiamento, ma tale riduzione può essere attenuata dalla restrizione calorica, in particolare con il protocollo ICR. Di conseguenza, un rapporto adiponectina/leptina più elevato è associato ad uno stato di salute metabolica migliore e a un rischio ridotto di sviluppare patologie, incluso il carcinoma mammario [5].

Anche il profilo trascrittomico risulta profondamente influenzato dalla restrizione calorica, con una regolazione differenziale dell'espressione genica in numerosi processi biologici.

È stata osservata una down-regolazione di diverse vie di segnalazione coinvolte nella proliferazione e nella crescita cellulare, tra cui l'insulina-fattore di crescita insulino simile (IGF-I), il fattore di crescita epidermico (EGF), il fattore di crescita trasformante beta (TGF- $\beta$ ).

Numerosi geni associati a proprietà strutturali, come la matrice extracellulare, l'adesione cellulare e il citoscheletro, risultano anch'essi down-regolati in proporzione al livello di CR.

Analogamente, risultano down-regolati anche i geni correlati al ciclo cellulare e all'adipogenesi.

Al contrario, è stata osservata una up-regolazione dei geni coinvolti nei processi metabolici, in particolare quelli coinvolti nel ciclo dell'acido tricarbossilico (ciclo di Krebs) e nella catena di trasporto degli elettroni [6].

L'invecchiamento e la restrizione calorica influenzano la composizione dei lipidi circolanti. È stato riscontrato che la composizione degli acidi grassi all'interno delle classi lipidiche differisce rispetto ai soggetti alimentati *ad libitum*.

Inoltre, le varie classi di lipidi presentano traiettorie di cambiamento differenti durante l'invecchiamento [7].

Il cuscinetto adiposo mammario (MFP) rappresenta il sito principale per l'analisi dell'impatto trascrittomico dell'invecchiamento e della restrizione calorica.

Il tessuto adiposo costituisce uno dei principali componenti della mammella e svolge un ruolo fondamentale nella comunicazione tra gli elementi del microambiente mammario.

La sua funzione principale consiste nell'immagazzinare l'energia in eccesso e rilasciarla quando necessario per l'organismo. Inoltre, secerne diversi fattori di crescita utilizzati dalle cellule tumorali per la loro sopravvivenza.

Si tratta di un complesso tissutale dinamico e di un organo endocrino, è costituito da adipociti e da una frazione stromale-vascolare che include linfociti, macrofagi, cellule endoteliali, fibroblasti, periciti, matrice extracellulare e cellule precursori. È sensibile ai segnali di eccesso di energia e di fame e comunica attivamente con la maggior parte degli organi in tutto il corpo mediante la secrezione di fattori di rilascio. Il tessuto adiposo comprende 3 tipologie distinte: tessuto adiposo bianco, bruno e beige [8].

La quantità di tessuto adiposo presente nella mammella aumenta proporzionalmente alla massa corporea e al volume mammario. Con l'avanzare dell'età, i lipidi tendono ad accumularsi a livello sistemico, determinando l'espansione del cuscinetto adiposo mammario. L'incremento dell'adiposità è associato a disfunzioni metaboliche e all'insulino-resistenza, oltre ad aumentare i livelli sistemici di insulina e glucosio, condizioni che favoriscono la crescita tumorale.

Il tessuto adiposo risponde anche ai fattori derivati dal tumore, attraverso alterazioni delle adipochine, degli ormoni, del metabolismo cellulare, della deposizione della matrice extracellulare e della vasodilatazione, contribuendo alla progressione tumorale [9].

La restrizione calorica può ridurre l'adiposità, prolungare la longevità e ritardare l'insorgenza di patologie correlate all'età.

Il tessuto adiposo sottocutaneo contiene nervi mielinizzati e non mielinizzati, oltre a cellule di Schwann, associate ai terminali nervosi che contengono vescicole sinaptiche.

L'asse ipotalamo-tessuto adiposo svolge un ruolo centrale nella regolazione dell'omeostasi metabolica, dell'invecchiamento e della longevità.

Il declino della segnalazione neuroendocrina associato all'età è in grado di alterare, non solo il tessuto nervoso, ma anche il microambiente del tessuto adiposo mammario, contribuendo alle modificazioni trascrittomiche osservate durante l'invecchiamento.

La restrizione calorica rappresenta quindi una strategia promettente per prevenire i cambiamenti legati all'età nel tessuto adiposo, in particolare negli individui con predisposizione genetica al carcinoma mammario.

Il presente studio mira a comprendere come differenti protocolli di restrizione calorica, ovvero CCR e ICR, modulino il trascrittoma del tessuto adiposo mammario, confrontando i profili di espressione ottenuti con quelli di topi alimentati *ad libitum* (AL) durante l'invecchiamento.

Numerosi studi hanno già evidenziato gli effetti benefici della restrizione calorica sul metabolismo e sulla prevenzione tumorale.

Tuttavia, le conoscenze sugli effetti comparativi tra restrizione calorica cronica e intermittente sul trascrittoma del tessuto adiposo mammario durante l'invecchiamento rimangono limitate.

Si ipotizza che la restrizione calorica cronica e quella intermittente modulino in modo differenziato il panorama trascrittomico del tessuto MFP, con l'ICR potenzialmente in grado di esercitare effetti più pronunciati, a causa dei cambiamenti metabolici.

Inoltre, è stato valutato se il periodo di alimentazione successivo alla restrizione calorica intermittente possa o meno influenzare il panorama trascrizionale del tessuto MFP.

È stato osservato un declino legato all'età nella segnalazione neuroendocrina nel tessuto MFP; tuttavia, tali alterazioni sono state invertite mediante l'applicazione dell'ICR.

L'ICR mostra un effetto più pronunciato sul trascrittoma del tessuto MFP a lungo termine, rispetto alla CCR.

Per lo studio è stato utilizzato il modello murino MMTV-TGF- $\alpha$  di carcinoma mammario, che sovraesprime il TGF- $\alpha$  umano. Questo è un fattore di crescita che attiva la via di segnalazione del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR)/Erb, fondamentale nello sviluppo dei tumori mammari. I topi MMTV-TGF- $\alpha$  sviluppano spontaneamente tumori mammari nella seconda metà della loro vita.

## 2. Approccio sperimentale

### 2.1. Modello murino MMTV-TGF $\alpha$

Nello studio sono stati utilizzati topi femmina MMTV-TGF- $\alpha$  C57BL/6 che, al momento dell'analisi, non presentavano tumori mammari (MT).

Ciò ha consentito di valutare gli effetti della restrizione calorica sulle modificazioni trascrittomiche e metaboliche che precedono l'insorgenza del carcinoma.

È stato realizzato un transgene contenente il cDNA umano di TGF- $\alpha$  e l'enhancer/promotore del virus del tumore mammario murino, indicato con la sigla MMTV.

Il promotore MMTV risulta essere molto attivo nella ghiandola mammaria, per questo motivo viene molto spesso impiegato nei modelli murini destinati allo studio del tumore mammario.

Il costrutto di DNA è stato iniettato in embrioni murini allo stadio di cellula.

La sovraespressione del Transforming Growth Factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) nei topi transgenici MMTV-TGF- $\alpha$  induce lo sviluppo di tumori mammari, dimostrando come questo fattore di crescita possieda una potenziale attività oncogenica in vivo.

TGF- $\alpha$  è un fattore di crescita che si lega al recettore del fattore di crescita epidermico EGFR. In questo modo stimola la proliferazione continua delle cellule epiteliali e favorisce la migrazione cellulare e l'angiogenesi, andando a creare un ambiente favorevole alla progressione neoplastica.

La stimolazione proliferativa continua aumenta il numero di divisioni cellulari e, di conseguenza, la probabilità di accumulo di alterazioni genetiche che possono favorire la trasformazione tumorale.

La sovraespressione di TGF- $\alpha$  non determina anomalie durante lo sviluppo embrionale; le modificazioni iniziano a manifestarsi nell'animale adulto. Questi dati suggeriscono che TGF- $\alpha$  sia principalmente coinvolto nella proliferazione e nell'omeostasi dei tessuti epiteliali maturi.

Lo sviluppo del carcinoma mammario è correlato allo stato fisiologico della ghiandola mammaria: le femmine vergini, pur esprimendo il transgene, non sviluppano tumori mammari, mentre gli adenocarcinomi compaiono nelle femmine che hanno affrontato almeno una gravidanza seguita da lattazione. Durante la gravidanza, la ghiandola mammaria subisce una crescita fisiologica intensiva, mentre dopo lo svezzamento va incontro ad un processo di involuzione, durante il quale molte cellule vengono eliminate tramite apoptosi.

In presenza di elevati livelli di TGF- $\alpha$ , l'equilibrio risulta alterato: la stimolazione proliferativa continua impedisce il completo ritorno allo stato basale e favorisce la sopravvivenza e l'espansione di cellule che possono accumulare ulteriori alterazioni genetiche nel tempo [10].

Attraverso un'analisi istologica si è potuto evidenziare come la sovraespressione di TGF- $\alpha$  provochi differenti gradi di anomalia nel tessuto della ghiandola mammaria. Inizialmente può formarsi un'iperplasia (un eccesso di proliferazione cellulare), o una displasia (un'alterazione della forma e delle dimensioni cellulari con perdita dell'architettura tissutale), per giungere infine alla formazione di adenocarcinomi (tumori maligni dell'epitelio ghiandolare) [11].

## 2.2. Disegno sperimentale

È stata costruita una colonia di 46 topi femmina MMTV-TGF- $\alpha$ , geneticamente predisposti allo sviluppo di tumori mammari, ma sani e privi di tumori al momento dell'inizio dello studio.

Gli animali sono stati alimentati *ad libitum* fino a 10 settimane d'età e successivamente assegnati casualmente a tre diversi gruppi dietetici: *ad libitum* (AL), restrizione calorica cronica (CCR) o restrizione calorica intermittente (ICR).

I topi del gruppo AL hanno avuto libero accesso al cibo per tutta la durata dello studio. Gli animali del gruppo CCR sono stati alimentati quotidianamente con una quantità di cibo pari all'85% dell'assunzione media del gruppo AL della stessa età, con una riduzione calorica del 15% rispetto al gruppo AL.

Ai topi assegnati al gruppo ICR è stato fornito il 40% del consumo giornaliero di cibo (60% CR) del gruppo AL di pari età per una settimana, seguito da tre settimane di alimentazione con dieta AL, in modo ciclico.

Anche questa procedura ha comportato una riduzione calorica complessiva del 15% in quattro settimane rispetto ai topi AL di pari età.

I topi appartenenti al gruppo ICR sono stati ulteriormente suddivisi in due gruppi, in base al loro momento di sacrificio. Quelli sacrificati al termine delle tre settimane di rialimentazione AL (settimane 49 e 81) sono stati indicati come ICR-refed (ICR-RF), mentre quelli che sono stati sacrificati alla fine della settimana del periodo CR (settimane 50 e 82) sono stati indicati come ICR-restricted (ICR-R).

Tutti i topi sono stati sottoposti a digiuno durante la notte precedente il sacrificio e soppressi in momenti temporali prestabiliti: settimane 10 (baseline), settimane 49/50 (adulti) e 81/82 (anziani). (Fig.1A)

Gli animali sono stati anestetizzati con isoflurano e successivamente soppressi con un sovradosaggio dello stesso anestetico, nel rispetto delle procedure volte a minimizzare la sofferenza animale.

Al momento del sacrificio, sono stati prelevati campioni di tessuto adiposo mammario (MFP). Un frammento di ciascun campione è stato fissato in formalina tamponata neutra al 10% per l'analisi istopatologica, al fine di determinare la presenza di malignità e lo stato della malattia.

Il tessuto rimanente è stato conservato in congelatore a -80°C fino al momento del successivo utilizzo.



Prima dell'estrazione, i campioni di tessuto sono stati omogeneizzati utilizzando un omogeneizzatore meccanico mediante Direct-zol (Zymo Research, Irvine, CA, USA).

Direct-zol è un reagente contenente agenti denaturanti che lisano le cellule, inattivano le RNasi e preservano l'integrità dell'RNA durante le successive fasi di estrazione.

Al termine di questo processo si ottiene una sospensione omogenea contenente RNA, DNA, proteine e altri componenti cellulari.

Dopo l'omogeneizzazione, il residuo di tessuto non completamente disgregato viene rimosso dalla sospensione e si procede con l'isolamento dell'RNA.

L'RNA totale è stato purificato utilizzando il kit Direct-zol RNA MiniPrep secondo le istruzioni del produttore (Zymo Research, Irvine, CA, USA, Cat No: R2052). Il principio del kit si basa sull'utilizzo di una colonna di silice, a cui l'RNA si lega attraverso legami di forte intensità. Una serie di lavaggi successivi consente di eliminare i componenti legati in modo aspecifico alla colonna. L'RNA totale estratto comprende mRNA, rRNA e tRNA.

### 2.3.2 Quantificazione e valutazione della purezza e dell'integrità dell'RNA

La quantificazione dell'RNA è stata effettuata mediante lo spettrofotometro NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Questo strumento determina la concentrazione dell'RNA estratto tramite spettroscopia UV, misurando l'assorbanza a 260 nm, lunghezza d'onda alla quale gli acidi nucleici assorbono la luce. È possibile inoltre valutare la purezza dei campioni, calcolando i rapporti tra le assorbanze specifiche di proteine e carboidrati.

La contaminazione proteica viene valutata tramite il rapporto  $A_{260}/A_{280}$ , valori prossimi a 2,0 indicano RNA puro.

La contaminazione da carboidrati viene valutata tramite il rapporto  $A_{260}/A_{230}$ , valori prossimi a 2,2 indicano RNA puro.

Oltre alla qualità, l'integrità dell'RNA totale viene verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1%. Le molecole migrano nel gel sotto l'azione di un campo elettrico. Se l'RNA è integro, si osservano bande ben definite e corrispondenti ai principali RNA ribosomiali (28S e 18S negli eucarioti); in caso di RNA degradato si rilevano bande poco definite e la presenza di uno "smear".

### 2.3.3 Preparazione delle librerie di sequenziamento

I campioni di RNA di qualità adeguata sono stati sequenziati utilizzando il sequenziatore Illumina Novaseq (Illumina, San Diego, CA, USA) presso il Murdoch University Genomics Centre, Perth, WA, Australia.

L'RNA è stato retrotrascritto in cDNA a doppia elica e utilizzato per la preparazione di librerie di sequenziamento, mediante l'aggiunta di adattatori e l'amplificazione dei frammenti.

#### 2.3.4 Sequenziamento mediante Illumina NovaSeq

La piattaforma Illumina NovaSeq esegue il sequenziamento per sintesi (SBS, Sequencing by Synthesis) utilizzando nucleotidi fluorescenti a terminazione reversibile. Durante la sintesi del nuovo filamento viene incorporato un nucleotide alla volta e uno scanner rileva il segnale fluorescente emesso da ciascun nucleotide. In questo modo è possibile ricostruire la sequenza dei frammenti. La tecnica permette l'analisi simultanea di milioni di frammenti in parallelo.

### 2.4. Analisi bioinformatica e statistica

#### 2.4.1 Analisi bioinformatica

Dopo il sequenziamento, l'analisi bioinformatica genera inizialmente un file FastQ, che raccoglie tutte le reads. Ogni file FastQ contiene, per ciascuna read, due informazioni fondamentali: la sequenza nucleotidica e il punteggio di qualità assegnato a ciascuna base.

I file FastQ sono stati analizzati mediante Salmon, che esegue il quasi-mapping utilizzando come input un indice del trascrittoma e un set di sequenze di lettura grezze (sequenze di lettura non allineate in formato FASTA/Q). Salmon esegue la quantificazione direttamente, senza generare file di allineamento intermedi. Questo approccio consente un notevole risparmio di tempo, poiché il quasi-mapping è molto più rapido dell'allineamento tradizionale, e riduce significativamente l'utilizzo di memoria e spazio su disco rigido, evitando la scrittura e la lettura di file di allineamento di grandi dimensioni.

Prima dell'analisi delle reads, Salmon richiede un indice, ovvero una banca dati contenente tutte le sequenze di riferimento note del topo. In questo studio sono stati utilizzati il genoma murino GRCm39 e l'annotazione Gencode M29, che include la posizione di tutti i geni, esoni e trascritti conosciuti. L'aggiunta di un decoy, costituito da sequenze genomiche aggiuntive, consente a Salmon di individuare la corrispondenza ottimale, distinguendo le reads provenienti da trascritti realmente espressi, da quelle che derivano da altre regioni genomiche o da contaminazioni.

Al termine dell'analisi, Salmon produce un file quant per ogni campione. Questi contengono la quantificazione dell'espressione dei trascritti e indicano il livello di espressione di ciascun trascritto nel campione analizzato.

I file quant sono stati importati in R utilizzando la funzione tximport, che riunisce i dati relativi ai diversi trascritti e li aggrega a livello dei geni. Si viene a costruire una matrice di conteggio utilizzata per le analisi successive.

La matrice presenta una riga per ogni gene e una colonna per ogni campione; gli elementi della matrice rappresentano il numero di letture di sequenziamento mappate in modo univoco a ciascun gene nel campione [12].

Diventa quindi possibile confrontare i livelli di espressione di ciascun gene tra i diversi campioni e i gruppi sperimentali.

#### 2.4.2 Analisi statistica

L'analisi dell'espressione differenziale è stata eseguita utilizzando il pacchetto DESeq2, al fine di identificare i geni che modificano significativamente la propria espressione tra le condizioni sperimentali.

Sono stati eseguiti due tipi di confronto: in primo luogo, è stato analizzato l'effetto dell'invecchiamento per ciascun gruppo dietetico; in secondo luogo, le diverse diete sono state confrontate tra loro in ciascun punto temporale (alle settimane 49/50 e 81/82). La linea di base per l'analisi era rappresentata dalla settimana 10, quando tutti gli animali hanno terminato l'alimentazione AL e iniziato i regimi alimentari specifici assegnati sperimentalmente.

L'analisi delle componenti principali (PCA) è stata eseguita utilizzando il pacchetto PCAtools, riducendo migliaia di geni a poche componenti principali.

La separazione osservata nella PCA è stata verificata statisticamente utilizzando PERMANOVA, che consente di analizzare simultaneamente migliaia di variabili e di valutare se dieta ed età producono differenze significative nell'intero genoma.

Per l'analisi e la visualizzazione dei percorsi arricchiti sono stati utilizzati i pacchetti clusterProfiler e enrichplot. Questi strumenti verificano se i geni differenzialmente espressi appartengono più frequentemente del previsto a determinate categorie biologiche.

L'identificazione dei geni differenzialmente espressi è stata effettuata applicando contemporaneamente tre criteri specifici.

Il primo criterio riguarda la significatività statistica, in particolare è stata fissata una soglia di significatività pari a  $p < 0,05$ .

Il secondo criterio riguarda la correzione per i confronti multipli, in quanto nell'analisi dell'espressione genica vengono eseguiti numerosi test statistici simultaneamente. È stata applicata la correzione del False Discovery Rate (FDR), mediante il metodo di Benjamini-Hochberg ed è stata adottata una soglia di significatività per il p-value corretto per FDR pari a 0,1.

Il terzo e ultimo criterio riguarda l'entità della variazione dell'espressione genica. Sono stati considerati solo i geni con un valore di  $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ . Tale soglia corrisponde a una variazione dell'espressione superiore di due volte, sia in aumento che in diminuzione, rispetto alla condizione di riferimento.

### 3. Risultati

#### 3.1. Alterazioni trascrittomiche associate all'invecchiamento

Il sequenziamento dell'RNA dei campioni di tessuto MFP dei topi ha generato una media di 2.222.240 letture grezze per ciascun campione. Dopo il controllo e il filtraggio di qualità, sono state mantenute mediamente 2.217.814 letture di alta qualità per campione.

Complessivamente, sono stati rilevati in media 11.579 geni per campione, con un intervallo di geni espressi compreso tra 315 e 16.378 in tutti i campioni.

Per valutare i cambiamenti legati all'età nel trascrittoma del MFP del gruppo AL, sono stati confrontati i risultati del sequenziamento dell'RNA di topi adulti (49/50 settimane) e anziani (81/82 settimane) con il basale (10 settimane).

L'analisi delle componenti principali (PCA) non ha rilevato differenze statisticamente significative nel profilo trascrittomico globale associate all'invecchiamento ( $p > 0,05$ ). (Fig. 1B)

Tuttavia, l'analisi dell'espressione differenziale ha messo in evidenza alterazioni specifiche a livello genico correlate all'età.

La mappa di calore (heatmap), ottenuta mediante clustering gerarchico non supervisionato, evidenzia i pattern di espressione dei trenta geni più variabili tra i diversi punti temporali nel gruppo AL. Ciò consente una visualizzazione immediata dei geni che aumentano o diminuiscono con l'invecchiamento. Ogni riga corrisponde a un gene, mentre ciascuna colonna ad un campione e la scala cromatica indica i differenti livelli di espressione. (Fig. 1C)

Nei topi adulti sono stati identificati 668 geni espressi in modo differenziale (DEG) rispetto al gruppo basale, di cui 77 appaiono up-regolati e 591 down-regolati.

Nei topi anziani sono stati rilevati 466 DEG rispetto ai livelli basali, con 44 up-regolati e 422 down-regolati. L'effetto principale dell'invecchiamento consiste in una riduzione dell'espressione genica.

Attraverso specifici grafici a vulcano è possibile rappresentare quali geni risultano, rispettivamente, sovraregolati o sottoregolati rispetto ai livelli basali in età adulta e anziana.

##### 3.1.1 Geni sovraregolati nei topi adulti

I geni che appaiono sovraregolati nei topi adulti sono: *Asph*, coinvolto nell'omeostasi del calcio e fondamentale per numerosi processi cellulari; *Hnrpna3* e *Pcbp2*, entrambi implicati nel metabolismo dell'RNA, in particolare nel legame all'RNA e nella regolazione della trascrizione e dello splicing.

Rispetto al gruppo basale, nei topi adulti si osserva un aumento dell'espressione di *Malat1*. Questo gene non codifica una proteina, ma produce un lncRNA che agisce come regolatore dell'espressione genica.

L'aumento dell'espressione, direttamente correlato all'età, suggerisce una maggiore predisposizione del tessuto adiposo mammario all'attivazione di vie molecolari associate alla tumorigenesi.

*Malat1* regola numerose cascate di segnalazione, sia direttamente che indirettamente, e tramite queste esercita la sua attività tumorigenica. In particolare, la cascata PI3K rappresenta una via fondamentale coinvolta nella divisione e nella sopravvivenza cellulare e svolge un ruolo rilevante nella progressione del cancro al seno.

*Malat1* partecipa anche alla regolazione dello splicing alternativo delle molecole di pre-mRNA, interagendo con fattori di splicing ricchi in serina e arginina.

Studi sperimentali hanno dimostrato che il silenziamento di *Malat1* riduce in modo significativo la proliferazione, la migrazione e l'invasione delle cellule del carcinoma mammario, accompagnata da una minore espressione di geni appartenenti alla via PI3K [13].

I geni *Csn1s1* e *Csn2* risultano anch'essi sovraregolati con l'età rispetto ai livelli basali.

*Csn1s1* codifica la  $\alpha_{s1}$ -caseina e *Csn2* codifica la  $\beta$ -caseina, entrambi appartengono al cluster genico delle caseine, normalmente molto espresso nella ghiandola mammaria.

Le caseine, oltre ad essere essenziali per il nutrimento della prole, aiutano a mantenere la polarità e la differenziazione delle cellule epiteliali mammarie (MEC).

Con l'avanzare dell'età, l'espressione persistente di *Csn1s1* e *Csn2* suggerisce un possibile contributo al mantenimento delle funzioni fisiologiche della ghiandola mammaria, anche al di fuori del periodo di lattazione.

### 3.1.2 Geni sottoregolati nei topi adulti

Nei topi adulti, la maggior parte dei geni sottoregolati, come *Septin3*, *Cacna2d3* e *Fbxo41*, è coinvolta nella comunicazione neuronale e nell'organizzazione presinaptica. Questi geni risultano prevalentemente arricchiti nella risposta cellulare alle vie della dopamina, delle catecolamine e delle monoamine, indicando potenziali alterazioni nella regolazione neuroendocrina, che potrebbero riflettere una disfunzione legata all'età. (Fig. 1D)

### 3.1.3 Geni sovraregolati nei topi anziani

Nei topi anziani, oltre alla famiglia di geni della  $\beta$ -caseina, risultano sovraregolati rispetto al livello basale anche *Dnajc7*, *Egfl7*, *Pcbp2* e *Pdia6*. *Dnajc7* è coinvolto nell'attività di legame delle proteine da shock termico. *Egfl7* interviene nella regolazione negativa della migrazione delle cellule muscolari lisce.

*Pcbp2* partecipa alla regolazione positiva della trascrizione mediata dalla RNA polimerasi II.

Infine, *Pdia6* codifica la proteina disolfuro reduttasi, coinvolta nella formazione e nel riarrangiamento dei ponti disolfuro e nella risposta all'accumulo di proteine mal ripiegate.

### 3.1.4 Geni sottoregolati nei topi anziani

Tra i geni sottoregolati, figura *Camk2b*, coinvolto nell'organizzazione del citoscheletro di actina e in grado di codificare una subunità della proteina chinasi II dipendente dal calcio e dalla calmodulina. (Fig. 1E)

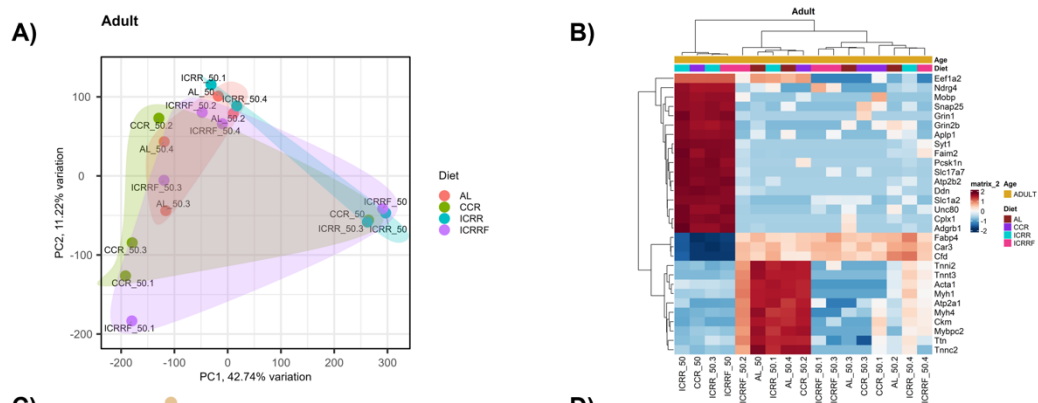
## 3.2. Effetti a medio termine della restrizione calorica cronica e intermittente nei topi adulti

Per valutare gli effetti a medio termine dei diversi interventi dietetici sul trascrittoma MFP, i risultati del sequenziamento dell'RNA dei gruppi CCR, ICR-R e ICR-RF sono stati confrontati con quelli del gruppo AL.

L'analisi delle componenti principali (PCA) non ha evidenziato differenze significative nei profili trascrittomici globali del tessuto MFP tra i gruppi di topi adulti ( $p > 0,05$ ).

Al contrario, l'analisi dell'espressione differenziale ha identificato cambiamenti specifici a livello genico associati alla dieta, indicando spostamenti trascrittomici localizzati. (Fig. 2A)

La mappa di calore derivante dal clustering gerarchico non supervisionato illustra i modelli di espressione dei 30 geni più variabili tra i diversi gruppi dietetici nei topi adulti. (Fig. 2B)



### 3.2.1 Geni differenzialmente espressi nel gruppo CCR

Nel gruppo CCR, sono stati identificati 10 geni differenzialmente espressi (DEG) rispetto al gruppo *ad libitum*, di cui 5 up-regolati e 5 down-regolati.

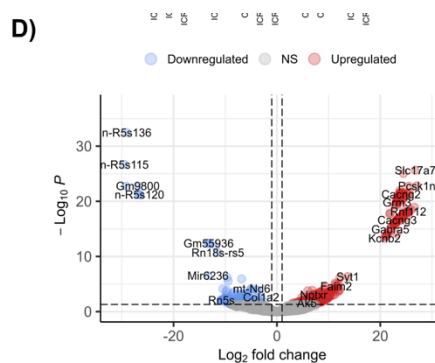
Tra i geni sovraregolati figurano *Stxbp1* e *Snph*, entrambi coinvolti nella regolazione di processi intracellulari legati al traffico di vescicole e organelli nel tessuto mammario.

*Stxbp1* è una proteina del complesso SNARE, responsabile della regolazione della fusione vescicolare con la membrana plasmatica e dei processi di esocitosi.

*Snph* codifica una proteina coinvolta nell'ancoraggio dei mitocondri e nella regolazione del loro traffico intracellulare.

### 3.2.2 Geni differenzialmente espressi nel gruppo ICR-R

Il gruppo ICR-R, a differenza del gruppo CCR, ha mostrato un effetto più marcato sul profilo trascrittomico del tessuto MFP, identificando 637 geni differenzialmente espressi rispetto al gruppo AL: 455 geni up-regolati e 182 down-regolati. (Fig. 2D)



Nel gruppo ICR-R, tra i geni sovraregolati figurano *Pcsk1n* e *Slc17a7*.

*Pcsk1n* codifica una proteina importante per la regolazione dell'attività delle proteine proprotein peptidasi e per l'elaborazione dei neuropeptidi implicati nell'omeostasi energetica e nel controllo dell'appetito.

*Slc17a7* codifica il trasportatore VGLUT1, specifico per il trasporto vescicolare del glutammato all'interno delle vescicole sinaptiche.

L'analisi di arricchimento funzionale ha evidenziato che i geni sovraregolati nel gruppo ICR-R sono principalmente associati ai processi biologici di trasporto vescicolare a livello delle sinapsi, al trasporto dei neurotrasmettitori e alle funzioni neuronali.

Tra i geni sottoregolati figurano *Col1a1* e *Col1a2*, coinvolti nella produzione del collagene e espressi nei tessuti connettivi, e il gene *Tert*, che codifica l'enzima telomerasi, la cui attività è associata all'angiogenesi.

I geni sottoregolati nel gruppo ICR-R, rispetto al gruppo AL, risultano arricchiti nei processi di organizzazione della matrice extracellulare e nella regolazione positiva dell'angiogenesi. Tale down-regolazione potrebbe quindi riflettere una ridotta capacità di rimodellamento tissutale e un'attenuazione dei pathway pro-angiogenici, entrambi implicati nella progressione e nello sviluppo tumorale.

### 3.2.3 Geni differenzialmente espressi nel gruppo ICR-RF

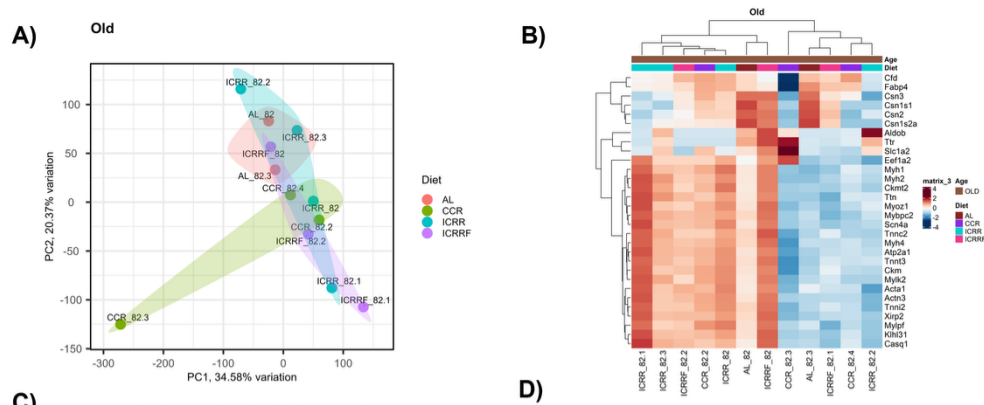
Nel gruppo ICR-RF, sono stati identificati 73 geni differenzialmente espressi (DEG) rispetto al gruppo *ad libitum* nei topi adulti, di cui 3 risultano up-regolati e 70 down-regolati. Il periodo di rialimentazione di tre settimane ha portato all'annullamento delle differenze significative di un ampio numero di geni.

### 3.3. Effetti a lungo termine della restrizione calorica cronica e intermittente nei topi anziani

Per valutare gli effetti a lungo termine della restrizione calorica sul trascrittoma del tessuto MFP, sono stati confrontati i profili trascrittomici dei gruppi CCR, ICR-R e ICR-RF con quello del gruppo AL di topi anziani. L'analisi delle componenti principali (PCA) non ha evidenziato distinzioni trascrittomiche globali significative tra i gruppi dietetici nei topi anziani ( $p > 0,05$ ). Tuttavia, la variabilità individuale suggerisce alterazioni trascrizionali localizzate. (Fig. 3A)

Al contrario, l'analisi dell'espressione differenziale ha rilevato alterazioni specifiche a livello genico associate alla dieta.

La mappa di calore del clustering gerarchico non supervisionato mostra i 30 geni con la maggiore variabilità tra i gruppi dietetici nei topi anziani. (Fig. 3B)



### 3.3.1 Panoramica nel gruppo CCR

In particolare, non sono stati identificati geni differenzialmente espressi (DEG) nel gruppo CCR rispetto ai topi anziani alimentati *ad libitum* (AL). Questa osservazione suggerisce che l'applicazione continua di CR, se mantenuta a lungo termine, non sia sufficiente a contrastare efficacemente i cambiamenti legati all'età nel trascrittoma del tessuto MFP.

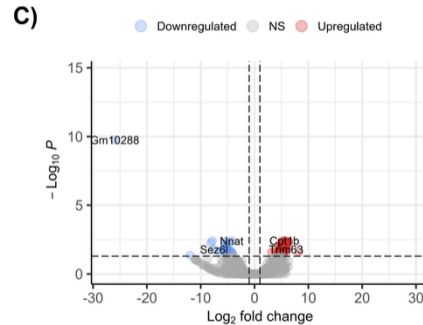
### 3.3.2 Geni differenzialmente espressi nel gruppo ICR-R

L'applicazione a lungo termine di ICR-R ha determinato l'espressione differenziale di 90 geni: 57 up-regolati e 33 down-regolati, rispetto all'alimentazione *ad libitum*.

Tra i geni sovraregolati figura *Cpt1b*, appartenente alla famiglia della carnitina/colina acetiltransferasi, in grado di controllare la velocità della via di  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi a catena lunga nei mitocondri muscolari.

*Trim63* identifica una proteina che si trova principalmente nei muscoli striati e appartiene alla famiglia RING con dita di zinco.

(Fig. 3C)



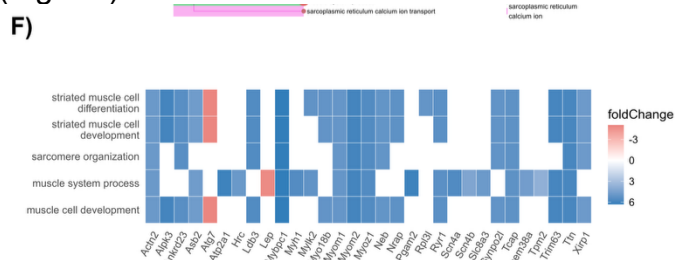
L'analisi di arricchimento funzionale ha evidenziato che i geni che appaiono sovraregolati sono associati a processi di sviluppo e differenziamento muscolare.

La restrizione calorica intermittente promuove il mantenimento della funzionalità muscolare e può contrastare il declino associato all'invecchiamento.

Tra i geni sottoregolati figurano, ad esempio, *Lep*, che codifica la leptina e agisce come regolatore dell'appetito e segnalatore delle citochine nel metabolismo, e *Atg7*, gene essenziale per il processo di autofagia e per la modulazione della via di segnalazione del ciclo cellulare dipendente da p53. Anche *Nnat*, coinvolto nella regolazione positiva della secrezione di insulina e nella risposta al glucosio, risulta sottoregolato.

Infine, anche *Sez6l*, coinvolto nella segnalazione della proteina chinasi-C e nella maturazione delle sinapsi, risulta sottoregolato.

(Fig. 3F)



### 3.3.3 Panoramica nel gruppo ICR-RF

Non sono stati rilevati geni differenzialmente espressi (DEG) nel gruppo ICR-RF rispetto al gruppo AL nei topi anziani. Questo risultato suggerisce che la rialimentazione abbia invertito le modifiche trascrittomiche indotte dalla restrizione, determinando la perdita degli effetti benefici della restrizione calorica.

#### 4. Discussione

Nel presente studio, è stato eseguito il sequenziamento dell'RNA sul tessuto adiposo mammario (MFP) del modello murino transgenico di carcinoma mammario, sottoposto a tre differenti regimi dietetici (AL, CCR o ICR) dalla settimana 10 fino alla settimana 82 di vita. L'obiettivo era di delineare le alterazioni trascrittomiche del microambiente mammario nel corso del tempo.

L'analisi dell'espressione genica differenziale ha rilevato cambiamenti significativi associati all'invecchiamento, tra cui una diffusa down-regolazione delle vie di comunicazione neuronale, dell'organizzazione presinaptica e della risposta cellulare alla dopamina, alle monoamine e alle catecolamine. Questi risultati indicano una progressiva disfunzione neuroendocrina locale correlata all'invecchiamento. Il tessuto adiposo mammario svolge non solo una funzione di riserva energetica, ma rappresenta anche un organo endocrino e metabolico densamente innervato. È caratterizzato da una rete complessa di fibre nervose mielinizzate e non mielinizzate, ricche di cellule di Schwann e terminali sinaptici. Questa interconnessione risulta fondamentale per la regolazione dell'omeostasi sistemica e dei processi di invecchiamento nei topi.

L'innervazione dei tumori deriva principalmente dal sistema nervoso autonomo e sensitivo, inclusi i nervi simpatici, parasimpatici e sensoriali. Questi sistemi coordinano risposte metaboliche opposte. L'innervazione simpatica favorisce la progressione tumorale. La stimolazione adrenergica, intensificata in condizioni di stress cronico, attiva i recettori  $\beta$ -adrenergici, promuovendo l'angiogenesi e la resistenza alla chemioterapia.

Al contrario, l'innervazione parasimpatica e quella vagale esercitano un effetto soppressivo sulla crescita tumorale. Una bassa densità di nervi parasimpatici è correlata a una minore sopravvivenza dei pazienti e a un rischio aumentato di progressione tumorale.

La repressione della trascrizione dei geni associati alla funzione sinaptica e alla risposta catecolaminergica, osservata nel MFP invecchiato, potrebbe risultare direttamente correlata alla compromissione età-dipendente dei processi di ripristino e di rimodernamento neuro-stromale. La perdita di questo equilibrio neuroendocrino nel microambiente mammario anziano compromette l'omeostasi metabolica e la sorveglianza immunitaria locale, creando un microambiente stabile e permissivo che favorisce l'insorgenza e la progressione del carcinoma mammario [14].

Si è registrato un incremento progressivo e costante nell'espressione dei geni *Csn1s1* e *Csn2*, associato all'invecchiamento nei topi alimentati *ad libitum*. Questi geni risultano normalmente altamente espressi nel tessuto mammario e sono considerati essenziali per il nutrimento della prole durante la lattazione.

Tuttavia, evidenze sperimentali preliminari suggeriscono un coinvolgimento di queste molecole anche nei processi di progressione del carcinoma mammario.

Il confronto del profilo trascrizionale tra tessuto tumorale e tessuto normale mostra una diffusa *down-regolazione* di *Csn1s1* nella maggior parte delle neoplasie, particolarmente marcata nel carcinoma mammario. Tale repressione trascrizionale risulta direttamente correlata all'ipermetilazione del DNA nelle regioni promotrici del gene [15].

Quindi, se il mantenimento o l'up-regolazione di *Csn1s1* favorisce la conservazione dello stato differenziato dell'epitelio mammario, la sua perdita dovuta all'ipermetilazione potrebbe rappresentare un evento chiave nelle fasi iniziali della trasformazione neoplastica. Le evidenze molecolari sui meccanismi con cui *Csn1s1* e *Csn2* contribuiscono all'iniziazione e alla progressione tumorale rimangono tuttavia ancora limitate, evidenziando la necessità di ulteriori studi funzionali.

Rispetto al gruppo basale, nei topi adulti si osserva un aumento dell'espressione di *Malat1*, mentre nei topi anziani non si è rilevato alcun cambiamento significativo.

Questi risultati indicano che l'alterazione dell'espressione di *Malat1* si verifica in una fase specifica dell'invecchiamento del tessuto mammario, anziché aumentare progressivamente con l'età.

*Malat1* promuove la proliferazione e l'invasività tumorale, anche attraverso la via PI3K e lo splicing alternativo. L'aumento dell'espressione negli individui adulti potrebbe riflettere l'attivazione di meccanismi associati alla tumorigenesi.

Tuttavia, l'assenza di variazioni negli animali anziani suggerisce che l'espressione di *Malat1* sia regolata anche da fattori non correlati all'età.

Non si sono osservati cambiamenti nell'espressione del gene in seguito all'adozione di un regime di restrizione calorica. Pertanto, le vie molecolari ad esso associate risultano meno sensibili alle modifiche metaboliche indotte dalla dieta o da regimi alimentari protettivi.

Dopo l'analisi delle alterazioni trascrittomiche legate all'età nel MFP, è stato valutato in che modo gli interventi dietetici possano contrastare tali cambiamenti.

La restrizione calorica cronica (CCR), ampiamente studiata per i suoi effetti benefici sulla salute metabolica, ha dimostrato un'influenza limitata sull'espressione genica a medio termine e non ha determinato alterazioni significative nell'intero trascrittoma quando applicata a lungo termine.

In seguito a CCR, i geni *Stxbp1* e *Snph* risultano sovraregolati. Entrambi sono coinvolti in vie di segnalazione fondamentali per il rilascio di neurotrasmettitori, l'ancoraggio di vescicole sinaptiche e il traffico mitocondriale.

Negli esseri umani, *Snph* codifica una proteina di ancoraggio mitocondriale che regola negativamente il traffico dei mitocondri nei neuroni.

Quando espressa nei tumori, questa inibisce la velocità e la distanza percorsa dai singoli mitocondri, sopprime la dinamica degli organelli e blocca la chemiotassi e le metastasi. Al contrario, la progressione tumorale

è associata alla down-regolazione o alla perdita di questo gene, correlata a una ridotta sopravvivenza dei pazienti.

La sovraregolazione di *Snph* indotta da CCR potrebbe essere associata a un possibile effetto protettivo contro l'insorgenza e la metastasi del cancro al seno, mediato da un traffico mitocondriale alterato nel MFP.

*Stxbp1* è identificato come un regolatore della morte cellulare dipendente dal lisosoma. I suoi effetti nelle neoplasie sono stati raramente esplorati in precedenza, e anche le sue specifiche funzioni nel carcinoma mammario richiedono ulteriori approfondimenti.

Ad oggi, *Stxbp1* risulta down-regolato nel carcinoma mammario HR + /HER-rispetto ai tessuti adiacenti.

Mentre, il suo silenziamento favorisce la sopravvivenza delle cellule tumorali e conferisce loro una maggiore resistenza alle terapie.

L'aumento di *Stxbp1* in seguito alla CCR potrebbe quindi favorire i meccanismi di morte cellulare e ridurre la sopravvivenza delle cellule neoplastiche.

Nel complesso, il numero limitato di geni a espressione differenziale (DEG) osservati con CCR a medio termine suggerisce un impatto marginale sul trascrittoma MFP, insufficiente a contrastare le alterazioni trascrittomiche legate all'età.

Anche nei topi sottoposti a restrizione calorica cronica a lungo termine non sono state osservate alterazioni significative dell'intero trascrittoma rispetto ai topi alimentati *ad libitum*.

La restrizione calorica intermittente (ICR) appare, invece, responsabile della regolazione dell'espressione genica, del miglioramento dell'infiammazione associata al tessuto adiposo e dell'aumento del dispendio energetico. Nel presente studio, l'ICR a lungo termine ha modificato in modo significativo il trascrittoma del tessuto adiposo mammario rispetto all'alimentazione *ad libitum* (AL), risultando più efficace rispetto al protocollo di restrizione calorica prolungata (CCR).

L'ICR-restricted (ICR-R) mostra una sovraregolazione dei geni *Pcsk1n* e *Slc17a7*, coinvolti nel trasporto transmembranale, nel potenziale di membrana, nella plasticità sinaptica e nel supporto dei neurotrasmettitori, con possibili effetti neuroprotettivi e metabolici.

La variazione dell'espressione di questi due geni riflette una risposta adattativa alle modificazioni metaboliche indotte dalla restrizione calorica.

*Pcsk1n* regola l'elaborazione dei neuropeptidi essenziali per l'omeostasi energetica e il controllo dell'appetito.

Le mutazioni di *Pcsk1n* che determinano una perdita parziale o totale della funzione possono provocare diversi disturbi endocrini e metabolici, inclusa l'obesità associata a iperfagia.

La sua sovraregolazione potrebbe risultare direttamente correlata alla modulazione dei meccanismi neuroendocrini coinvolti nell'adattamento ad una ridotta disponibilità energetica.

Il gene *Slc17a7* codifica per VGLUT1, una proteina che modula la comunicazione neuronale e la plasticità sinaptica.

La sua espressione nell'ipotalamo murino varia in funzione del regime alimentare che si adotta: appare aumentata con una dieta ricca di grassi, mentre diminuisce con una dieta chetogenica.

Questo dato supporta l'ipotesi che i circuiti glutamatergici rispondano alle modificazioni dello stato nutrizionale.

Le vie di segnalazione coinvolte nel potenziale di membrana e nella comunicazione sinaptica risultano ridotte con l'invecchiamento.

L'ICR contrasta tali alterazioni legate all'età, esercitando un effetto sull'attenuazione della disfunzione neuroendocrina. I geni che appaiono down-regolati nel gruppo ICR rispetto ai controlli alimentati AL sono principalmente coinvolti nell'organizzazione della matrice extracellulare e nella regolazione positiva dell'angiogenesi.

La restrizione calorica intermittente appare in grado di limitare il rimodellamento tissutale e di inibire i processi che favoriscono lo sviluppo neoplastico nel microambiente del MFP.

In particolare, nei topi anziani sottoposti a restrizione calorica intermittente (ICR) si osserva una diminuzione dell'espressione di *Lep*, che codifica la leptina.

La leptina esercita le sue funzioni biologiche attraverso il legame selettivo con il proprio recettore (LEPR), espresso in numerosi tessuti, incluse le ghiandole mammarie.

Studi precedenti hanno dimostrato che la leptina favorisce la crescita delle cellule tumorali mammarie umane *in vitro* attraverso due principali meccanismi: stimolando direttamente la proliferazione delle cellule tumorali e promuovendo l'angiogenesi. Nello specifico, la leptina aumenta la produzione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e l'espressione del suo recettore, VEGFR-2, nelle cellule tumorali. Questa interazione favorisce la formazione di nuovi vasi sanguigni, che forniscono al tumore l'ossigeno e i nutrienti necessari alla crescita.

L'inibizione del segnale della leptina determina una riduzione dei livelli di VEGF e VEGFR-2, rallentando così la progressione del tumore mammario [16].

Sulla base di queste evidenze, la riduzione dei livelli di *Lep* osservata nei topi anziani sottoposti a ICR può rappresentare un meccanismo attraverso cui la restrizione calorica ostacola lo sviluppo del tumore mammario.

Nel presente studio è stato osservato che, dopo la fase di restrizione calorica intermittente, tre settimane di rialimentazione hanno attenuato quasi totalmente le differenze trascrittomiche ottenute, rispetto al gruppo alimentato *ad libitum*. Nei topi adulti, infatti, dopo la rialimentazione sono rimasti 73 geni differenzialmente espressi (DEG) rispetto al gruppo AL, mentre nei topi anziani non è stato identificato alcun DEG. Questi risultati suggeriscono che la rialimentazione consente di ripristinare, almeno parzialmente, il profilo trascrizionale precedente alla restrizione.

Risultati coerenti con quelli ottenuti sono stati osservati in uno studio precedente condotto su modelli murini Wistar. È stato dimostrato che un regime prolungato di restrizione alimentare determina una down-regolazione dell'espressione del gene della leptina sia nell'ipotalamo, sia nel tessuto adiposo bianco (WAT). Tale effetto è associato a una diminuzione della concentrazione sierica dell'ormone.

Tuttavia, dopo soli due giorni di rialimentazione è stato osservato un significativo incremento dell'espressione genica della leptina nel tessuto adiposo bianco e della sua concentrazione sierica. Al contrario, la rialimentazione non ha modificato significativamente l'espressione ipotalamica della leptina, indicando una risposta differente nei due tessuti [17].

Una risposta altrettanto rapida alle variazioni dell'apporto energetico è stata riscontrata anche per l'adiponectina. Uno studio condotto su donne con obesità grave ne ha analizzato l'espressione dell'mRNA nel tessuto adiposo sottocutaneo. Le partecipanti hanno seguito una dieta a bassissimo contenuto calorico per due giorni, seguiti da due giorni di rialimentazione.

In condizioni basali, i livelli di mRNA dell'adiponectina risultavano inferiori rispetto a quelli rilevati nelle donne normopeso.

La dieta ipocalorica ha aumentato mediamente del 33% l'espressione dell'adiponectina, mentre dopo la successiva rialimentazione si è registrata una riduzione del 32,8%. L'espressione della leptina, invece, non ha registrato cambiamenti rilevanti [18].

Questi dati potrebbero rappresentare una risposta adattativa alle variazioni a breve termine dell'assunzione calorica.

Ad oggi, i meccanismi molecolari responsabili degli effetti protettivi di ICR non sono ancora completamente chiariti, sebbene diversi percorsi molecolari siano stati associati a questo fenomeno.

I risultati di questo studio suggeriscono che la restrizione calorica intermittente può esercitare un ruolo protettivo, modulando globalmente il profilo di espressione genica del tessuto adiposo mammario contro le alterazioni legate all'età.

Nonostante il valore dei risultati ottenuti, è necessario considerare alcune limitazioni dello studio.

Le implicazioni funzionali delle alterazioni trascrittomiche identificate tramite RNA-sequencing richiedono una conferma sperimentale, ad esempio mediante qPCR, Western Blot o analisi immunoistochimiche. Inoltre, i risultati dovrebbero essere integrati in un contesto multi-omico per approfondire la risposta molecolare del MFP ai diversi regimi di restrizione calorica (CR).

L'analisi delle componenti principali (PCA) mostra una separazione limitata dei campioni. Questo potrebbe essere attribuibile al numero ridotto di animali analizzati, così come a una marcata variabilità individuale all'interno dello stesso gruppo.

La PCA rileva esclusivamente le variazioni complessive dell'intero dataset. Pertanto, i cambiamenti limitati a pochi geni specifici, o a singole vie

biologiche, potrebbero non essere sufficientemente ampi da modificare il profilo globale e generare gruppi distinti nell'analisi.

Per evidenziare i cambiamenti relativi a specifici geni, è necessario ricorrere all'analisi dell'espressione differenziale. La restrizione calorica sembra influenzare selettivamente determinati meccanismi molecolari, senza modificare il trascrittoma globale.

Un'ulteriore limitazione riguarda il modello animale adottato: sono stati utilizzati esclusivamente topi con background genetico MMTV-TGF- $\alpha$ , escludendo i topi wild-type. Questa scelta limita la possibilità di rappresentare l'eterogeneità fenotipica e molecolare dei diversi sottotipi clinici di carcinoma mammario umano.

A tal proposito, è stato condotto uno studio in cui il medesimo protocollo di restrizione calorica intermittente (ICR) è stato applicato al modello murino MMTV-Neu. Le femmine MMTV-Neu tendevano a sviluppare MT in età significativamente più giovane rispetto ai topi TGF- $\alpha$ .

La restrizione calorica intermittente ha determinato una riduzione dell'incidenza tumorale dal 37%, riscontrata nel gruppo alimentato ad libitum (AL), al 22% per i topi sottoposti a restrizione calorica intermittente, e al 33% per i topi sottoposti a restrizione cronica (differenza considerata non significativa).

Questi risultati indicano che l'ICR, seguita da rialimentazione, può fornire un effetto protettivo, mentre la CCR non offre una protezione significativa contro lo sviluppo di MT nei topi transgenici Neu.

L'ICR potrebbe quindi rappresentare una strategia efficace per ridurre l'incidenza di MT, indipendentemente dal modello animale utilizzato [19].

Tuttavia, è importante considerare che le neoplasie guidate dall'oncogene MMTV-Neu presentano un fenotipo aggressivo ed estrogeno-indipendente, a differenza del modello MMTV-TGF- $\alpha$ .

Di conseguenza, i regimi di restrizione calorica potrebbero esercitare un impatto molecolare distinto nei vari modelli.

In conclusione, sebbene gli effetti protettivi della CR, in particolare dell'ICR, appaiano promettenti, sono necessari ulteriori studi comparativi che includano modelli transgenici multipli di cancro al seno. L'obiettivo è chiarire in dettaglio come l'ICR rimodelli il microambiente e il trascrittoma tissutale in diversi background genetici.

## **5. Conclusione**

Il presente studio, condotto utilizzando un modello murino, ha dimostrato che l'applicazione della restrizione calorica intermittente (ICR), in particolare nel lungo termine, modula specifici profili di espressione genica nel MFP e attenua alcune alterazioni trascrittomiche associate all'invecchiamento, mostrando effetti più pronunciati rispetto alla restrizione calorica cronica (CCR).

Tuttavia, sono necessarie ulteriori ricerche per chiarire i meccanismi molecolari responsabili di tali modificazioni.

In prospettiva, l'identificazione di profili molecolari specifici associati all'espressione genica mediata da ICR potrà aiutare lo sviluppo di interventi dietetici personalizzati per contrastare in modo mirato la disregolazione metabolica e trascrizionale legata all'invecchiamento.

## Bibliografia

1. Tran Q. et al., Revisiting the Warburg Effect: Diet-Based Strategies for Cancer Prevention. *BioMed Research International*. 2020; 2020(1).
2. Pallavi R. et al., Insights into the beneficial effect of caloric/ dietary restriction for a healthy and prolonged life. *Frontiers in Physiology*. 2012; 3:318.
3. Green C.L. et al., Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2022; 23:56-73.
4. Dogan S. et al., The influence of different calorie restriction protocols on serum pro-inflammatory cytokines, adipokines and IGF-I levels in female C57BL6 mice: Short term and long term diet effects. *Meta Gene*. 2017; 12:22-32.
5. Dogan S. et al., Effects of chronic vs. intermittent calorie restriction on mammary tumor incidence and serum adiponectin and leptin levels in MMTV-TGF- $\alpha$  mice at different ages. *Oncology Letters*. 2010; 1(1):167-176.
6. Kim S.S. et al., Whole-transcriptome analysis of mouse adipose tissue in response to short-term caloric restriction. *Molecular Genetics and Genomics*. 2016; 291:831-847.
7. Miller K.N. et al., Aging and caloric restriction impact adipose tissue, adiponectin, and circulating lipids. *Aging Cell*. 2017; 16(3):497-507.
8. Kothari C. et al., The importance of breast adipose tissue in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(16):5760.
9. Brown K.A. et al., Update on adipose tissue and cancer. *Endocrine Reviews*. 2023; 44(6):961-974.
10. Matsui Y. et al., Development of mammary hyperplasia and neoplasia in MMTV-TGF $\alpha$  transgenic mice. *Cell*. 1990; 61(6):1147-1155.
11. Choi Y.J. et al., Casein gene expression in bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*. 1988; 71(11):2898-2903.
12. Love M. et al., Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*. 2014; 15:550.
13. Naveed M. et al., LncRNA MALAT1 expression regulates breast cancer progression via PI3K/AKT/mTOR pathway modulation. *Biochemical Genetics*. 2024; 62:3421-3438.
14. Cui Q. et al., The tumor-nerve circuit in breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2023; 42:543–574.
15. Mou M.A. et al., Validation of CSN1S1 transcriptional expression, promoter methylation, and prognostic power in breast cancer using

- independent datasets. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2020; 24: 100867.
16. Gonzalez R.R. et al., Leptin signaling promotes the growth of mammary tumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R2). *The Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281(36): 26320-26328.
  17. Sucajtyś-Szulc E. et al., Refeeding after prolonged food restriction differentially affects hypothalamic and adipose tissue leptin gene expression. *Neuropeptides*. 2009; 43(4): 321-325.
  18. Liu Y.M. et al., Adiponectin gene expression in subcutaneous adipose tissue of obese women in response to short-term very low calorie diet and refeeding. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003; 88(12): 5881-5886.
  19. Pape-Ansorge K.A. et al., Effect of moderate caloric restriction and/or weight cycling on mammary tumor incidence and latency in MMTV-Neu female mice. *Nutrition and Cancer*. 2002; 44(2): 162-168.

## **Appendice**

Tuna BG, Keles NA, Cicekdal MB, Dogan S, Koks S. Distinct transcriptomic effects of intermittent and chronic caloric restriction in mammary fat pad of a breast cancer mouse model. PLOS ONE. 2025; 20(9):e0331898. DOI: 10.1371/journal.pone.0331898.

RESEARCH ARTICLE

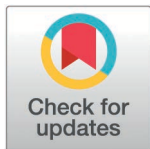
# Distinct transcriptomic effects of intermittent and chronic caloric restriction in mammary fat pad of a breast cancer mouse model

Bilge Guvenc Tuna<sup>1</sup>✉, Nazim Arda Keles<sup>2,3</sup>✉, Munevver Burcu Cicekdal<sup>4,5</sup>, Soner Dogan<sup>2</sup>, Sulev Koks<sup>6,7\*</sup>

**1** Department of Biophysics, School of Medicine, Yeditepe University, Istanbul, Türkiye, **2** Department of Medical Biology, School of Medicine, Yeditepe University, Istanbul, Türkiye, **3** Graduate School of Natural and Applied Sciences, Yeditepe University, Istanbul, Türkiye, **4** Department of Biomedical Molecular Biology, Ghent University, Ghent, Belgium, **5** Department of Biomolecular Medicine, Ghent University and Center for Medical Genetics, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium, **6** Perron Institute for Neurological and Translational Science, Nedlands, Washington, Australia, **7** Personalized Medicine Centre, Murdoch University, Perth, Washington, Australia

✉ These authors contributed equally to this work.

\* [sulev.koks@murdoch.edu.au](mailto:sulev.koks@murdoch.edu.au)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Tuna BG, Keles NA, Cicekdal MB, Dogan S, Koks S (2025) Distinct transcriptomic effects of intermittent and chronic caloric restriction in mammary fat pad of a breast cancer mouse model. PLoS One 20(9): e0331898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0331898>

**Editor:** Osman El-Maarri, University of Bonn, Institute of Experimental Hematology and Transfusion Medicine, GERMANY

**Received:** April 9, 2025

**Accepted:** August 22, 2025

**Published:** September 23, 2025

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0331898>

**Copyright:** © 2025 Tuna et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/),

## Abstract

Age-related dysfunction in neuroendocrine signaling, which influences adipose tissue homeostasis, has been implicated in numerous diseases, including breast cancer. Caloric restriction has been shown to improve metabolic health and prolong lifespan, yet the molecular mechanisms underlying its long-term effects are not fully understood. In this study, we investigated the impact of long-term chronic (CCR) and intermittent caloric restriction (ICR) on the whole transcriptome of mammary fat pad tissue (MFP) in a breast cancer mouse model. Transgenic female Mouse Mammary Tumor Virus-Transforming Growth Factor-Alpha (MMTV-TGF- $\alpha$ ) C57BL/6 mice were randomized into *ad libitum* (AL), CCR, and ICR groups. Total RNA was isolated from the samples collected at weeks 10 (baseline), 49/50 (adult), and 81/82 (old), were then subjected to RNA sequencing. Differential gene expression analysis identified significant age-related transcriptomic shifts. Specifically, *Malat1* expression levels, a long non-coding RNA associated with cancer progression, were elevated with aging, suggesting increased tumorigenic susceptibility in this model. Pathways linked to neuroendocrine signaling were downregulated with age, reflecting a potential decline in neuro-adipose cross-talk. Remarkably, ICR appeared to mitigate this age-related decline in neuroendocrine signaling by upregulating genes involved in neurotransmitter support and downregulating extracellular matrix organization and positive regulation of angiogenesis. In contrast, CCR did not effectively alter the whole transcriptome profile, particularly in long-term. Our findings reveal that ICR mitigates age-related transcriptional shifts in MFP tissue, providing a novel insight into dietary strategies for maintaining adipose tissue function with potential implications for cancer susceptibility.

which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data availability statement:** All data underlying the findings of this study have been made fully available. The raw sequencing reads have been deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under BioProject ID PRJNA1279411.

**Funding:** This work was supported by Perron Institute for Neurological and Translational Science, Nedlands, WA, Australia. This work was partly supported by The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TUBITAK). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## 1. Introduction

Aging leads to inevitable changes in biological processes, including significant transcriptomic modifications at the molecular level [1,2]. These age-related molecular alterations are associated with numerous diseases, including breast cancer [3–5]. Caloric restriction (CR), one of the proposed preventive strategies against mammary tumor (MT) development, is shown to lower breast cancer risk, especially in genetically predisposed individuals [6,7]. CR is defined as reducing caloric intake without causing malnutrition [8] and emerged as a non-pharmaceutical intervention that improves metabolic health by modulating inflammation, oxidative stress, and cellular aging [9–11]. Alternative strategies, such as intermittent CR (ICR) have been implemented by fasting or limiting energy intake during certain periods and could improve metabolic flexibility and cellular stress responses [12,13]. While the effects of chronic CR (CCR) have been extensively studied, the long-term molecular impacts of ICR remain relatively elusive. Therefore, investigating tissue-specific transcriptomic modifications of cancer predisposition models under different CR protocols during aging holds great potential for developing preventive approaches against age-related metabolic diseases and cancer.

Mammary fat pad (MFP), a heterogenous tissue central to metabolic homeostasis, is a key site for investigating the transcriptomic impacts of aging and CR due to its role in both metabolism and cancer, including breast cancer [14,15]. Previous studies reported age-related increase in serum pro-inflammatory cytokines [16], and elevated levels of inflammation in adipose tissue [17]. Although the exact molecular mechanisms remain to be elucidated, previous work showed CR alters the transcriptomic profile and the age-related molecular changes in adipose tissue function [18–20]. Therefore, CR offers a promising strategy to prevent age-related changes in adipose tissue, particularly in individuals with genetic predisposition to breast cancer. Our previous work demonstrated that ICR had protective effects against mammary tumor (MT) development and reduced the tumor incidence rate in the breast cancer mouse model to 11.5%, while CCR and AL group showing 20% and 45.5% incidence rates, respectively. [21]. In contrast, a recent study revealed that a different protocol of ICR was less effective in reducing mammary tumor incidence (20.5%) compared to AL-fed mice (21.1%), while CCR still showed a substantial reduction to 8.8% [22]. These contradictory results highlight the need to investigate the molecular background of different CR strategies, particularly in long term.

In the current study, we hypothesized the long-term CCR and ICR would differentially modulate the transcriptomic landscape of MFP tissue, with ICR potentially exerting more pronounced effects due to the metabolic shifts. Using the MMTV-TGF- $\alpha$  C57BL/6 female mouse model, we aimed to evaluate transcriptomic alterations induced by aging and different CR strategies. The mouse models are foremost for studying long-term dietary interventions and aging since it is challenging for human subjects, with different physiological conditions to comply with the experimental protocols [23]. Thus, we used MMTV-TGF- $\alpha$  breast cancer mouse model which over-express human TGF- $\alpha$ , a part of the epidermal growth factor receptor (EGFR)/Erb cascade that play a key role in MT development. These mice usually develops MTs in the second half of their lives [24].

Here, the effects of CCR and ICR on the MFP tissue transcriptome and its biological relevance were investigated by analyzing and comparing the gene expression profiles with the AL-fed control mice. Furthermore, we aimed to explore whether the re-feeding period of ICR influences the transcriptional landscape of MFP tissue, following the restriction period. We reported an age-related decline in neuroendocrine signaling in MFP tissue. However, these alterations were reverted with the ICR application. In addition, ICR has a more pronounced effect on MFP tissue transcriptome in the long-term, compared to CCR. Overall, our study provides novel insights into the molecular mechanisms underlying the distinct effects of CCR and ICR on MFP tissue biology and its relationship with aging processes, with potential implications for breast cancer susceptibility.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and experimental design

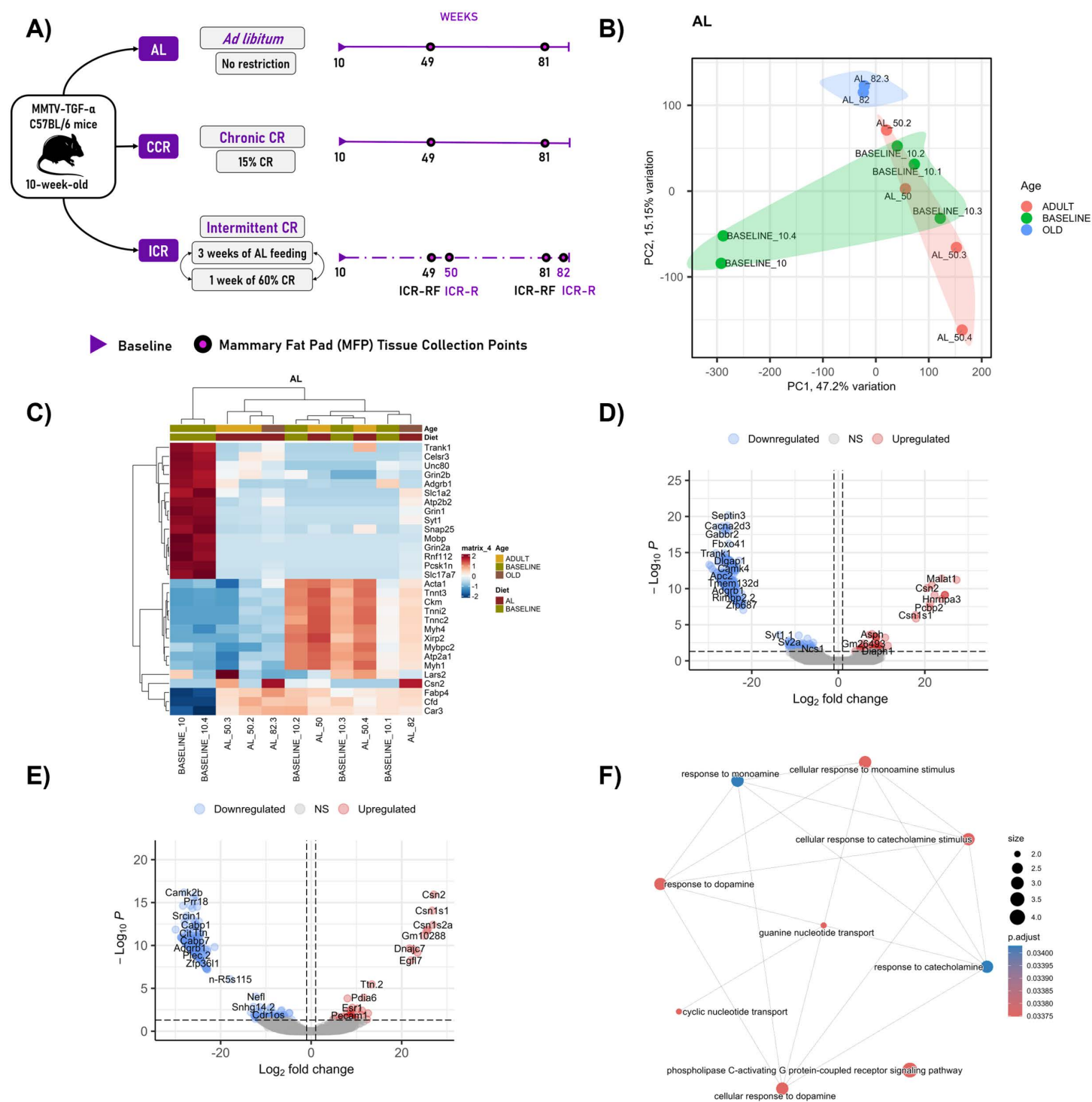
MMTV-TGF- $\alpha$  C57BL/6 female mice that did not develop any mammary tumors (MTs) were used in the current study. Originally, MMTV-TGF- $\alpha$  gene-positive [24] female mice were provided by Dr. Margot Cleary, Hormel Institute, University of Minnesota to establish a breeding colony at Yeditepe University, Istanbul. A total of 46 mice were enrolled in the study ( $n=4-5$ ) (S1 Table). All mice were fed AL until 10 weeks of age and then randomly assigned to three different dietary groups, as explained in detail in our previous studies [13,22]: *Ad libitum* (AL), chronic CR (CCR), or ICR (Fig 1A). All the animals were fed with standard chow (Altromin TPF1414) diet purchased from Kobay AS (Ankara, Türkiye). Dietary composition is given as supplementary data (S1 File). Mice in the AL group had free access to food throughout the study. Mice assigned to the CCR group were provided 85% of the daily food consumption (15% CR) of the age-matched AL group, resulting in a 15% caloric reduction compared to the AL group. Mice assigned to the ICR group were provided 40% of the daily food consumption (60% CR) of the age-matched AL group for one week, then were fed AL for the following three weeks, cyclically. This also resulted in an overall caloric reduction of 15% in four weeks compared to age-matched AL mice. Mice in the ICR group were later divided into two groups, according to their sacrifice points. The ones that were sacrificed at the end of three weeks of AL feeding (weeks 49 and 81) were referred to as ICR-refed (ICR-RF), while the ones that were sacrificed at the end of the one-week of the CR period (weeks 50 and 82) were referred to as ICR-restricted (ICR-R) (Fig 1A). Body weights and food consumption were measured weekly and reported in our previous publications [13,22]. All mice were fasted overnight and sacrificed the next day at designated time points: weeks 10 (baseline), 49/50 (adult), and 81/82 (old). Animals were anesthetized using isoflurane and humanely euthanized by isoflurane overdose under observation to eliminate unexpected suffering, and MFP tissue samples were collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  freezer until further use. All efforts were made to minimize suffering, including regular monitoring of health status and the use of humane endpoints when necessary. The health status of the animals was checked weekly by a veterinarian. Mice were allowed free access to tap water and were housed under standard conditions in a room at a temperature of  $21-24^{\circ}\text{C}$  12h light/dark cycle. All procedures involving animals were in compliance with the European Community Council Directive of 24 November 1986, and ethical approval was granted by the Yeditepe University Ethics Committee (file no. 11 03 2019, Istanbul, Türkiye).

### 2.2. Tissue collection and histopathological analysis

At sacrifice, MFP tissue samples were removed and checked to assess whether there were any macroscopic pathological changes. A piece of each tissue sample was placed in 10% neutral buffered formalin to be sent to the pathologist for histopathologic analyses to determine malignancy and disease status in a blind fashion by the pathologist. The remaining tissues were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. The animals included in the current study were tumor-free and healthy animals.

### 2.3. Total RNA isolation and whole transcriptome sequencing

Total RNA was isolated from the frozen MFP tissues stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Tissue samples were homogenized in Direct-zol (Zymo Research, Irvine, CA, USA) with a tissue homogenizer. After homogenization, the remaining tissue



**Fig 1. Age-related modifications in the whole transcriptome and biological pathways of the MFP tissue of the breast cancer mouse model.**  
**A)** Experimental design of the dietary groups. AL group followed an *ad libitum* diet (no restriction) throughout the study. CCR group was applied to 15% caloric restriction throughout the study. ICR group was applied to 3 weeks of *ad libitum* feeding followed by 1 week of 60% caloric restriction, cyclically. Samples were collected at weeks 10 (baseline), 49 or 50 (adult), and 81 or 82 (old). AL: *ad libitum*, CCR: chronic caloric restriction, ICR: intermittent caloric restriction, ICR-R: intermittent caloric restriction-restricted, ICR-RF: intermittent caloric restriction-refed. **B)** PCA analysis of the samples belong to AL group at different time points. **C)** Heatmap displays the unsupervised hierarchical clustering of the expression patterns of the top 30 most variable

genes in the AL group at different time points. **D-E**) Volcano graphs display the differentially expressed genes (DEGs) compared to the baseline levels at adult and old age, respectively. **F**) Network plot displays the relationship between the enriched pathways of downregulated genes with adult AL compared to the baseline, with adjusted p-values. PC: Principal component. For volcano graphs, absolute log<sub>2</sub> fold-change value of > 1 and adjusted p value of 0.1 were considered statistically significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0331898.g001>

residual was removed from suspension and RNA isolation was performed with a Direct-zol RNA MiniPrep Kit according to the manufacturer's instructions (Zymo Research, Irvine, CA, USA, Cat No: R2052). RNA concentrations were determined with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and total RNA integrity was checked by 1% agarose gel electrophoresis. RNA samples were sequenced using the Illumina Novaseq (Illumina, San Diego, CA, USA) sequencer at the Murdoch University Genomics Centre, Perth, WA, Australia.

## 2.4. Bioinformatic and statistical analyses

The resulting *fastq* files were used for whole transcriptome analysis using Salmon workflow as described in detail previously [25]. In brief, the index and decoy were based on mouse genome assembly version GRCm39, Gencode release M29. Salmon performs quasi-mapping and provides highly accurate expression measures as *quant* files. The *quant* files were imported to R using the *tximport* function with gene-level summarisation for further analyses. Differential expression analysis was done in different stages. First, the effect of aging for each dietary group was analyzed, and then the different diets at each time point were compared to each other (at weeks 49/50 and 81/82). The baseline for analysis was at week 10 when all the animals finished AL feeding and switched to the specific experimentally allocated feeding schemes. R programming language (version 4.3.3) was used for all the bioinformatic and statistical analyses and visualizations [26]. *DESeq2* package with standard workflow was used for differential expression analysis [27]. Statistical significance testing is done with *vegan* package using the PERMANOVA test. *PCAtools* package was used to visualize principal component analysis (PCA) results. For the enriched pathway analysis and visualizations, *clusterProfiler* and *enrichplot* packages were used. For the reference pathway annotations, *org.Mm.e.g.,db* package was used. FDR correction was applied for the multiple testing of whole transcriptome data using the Benjamini-Hochberg method [28]. The significance threshold was set at a p-value of < 0.05, FDR-adjusted p-value of 0.1, and absolute log<sub>2</sub> fold-change (log<sub>2</sub>FC) of > 1.

## 3. Results

### 3.1. Age-related alterations in the whole transcriptome profile of mammary fat pad tissue

All the tissue samples used in the current study were collected from healthy mice that did not develop any MTs. RNA-sequencing of MFP tissue samples from mice generated an average of 2,222,240 raw reads per sample. After quality filtering, an average of 2,217,814 high-quality reads per sample remained. On average, 11,579 genes were detected per sample, with the number of expressed genes ranging from 315 to 16,378 across all samples. RNA-sequencing results of adult (49/50-week-old) and old (81/82-week-old) mice in the AL group were compared with the baseline (10-week-old) to investigate the age-related changes in the MFP transcriptome. PCA revealed that aging did not significantly distinguish the global transcriptome profile ( $p > 0.05$ ) (Fig 1B). A few individual samples had unique transcriptome profiles, which might indicate inter-individual variability or localized transcriptional alterations. Although PCA showed no significant global distinction in whole transcriptome profiles, differential expression analysis highlighted specific gene-level alterations with age. The heatmap of unsupervised hierarchical clustering displays the expression patterns of the top 30 most variable genes between the different time points in the AL group (Fig 1C).

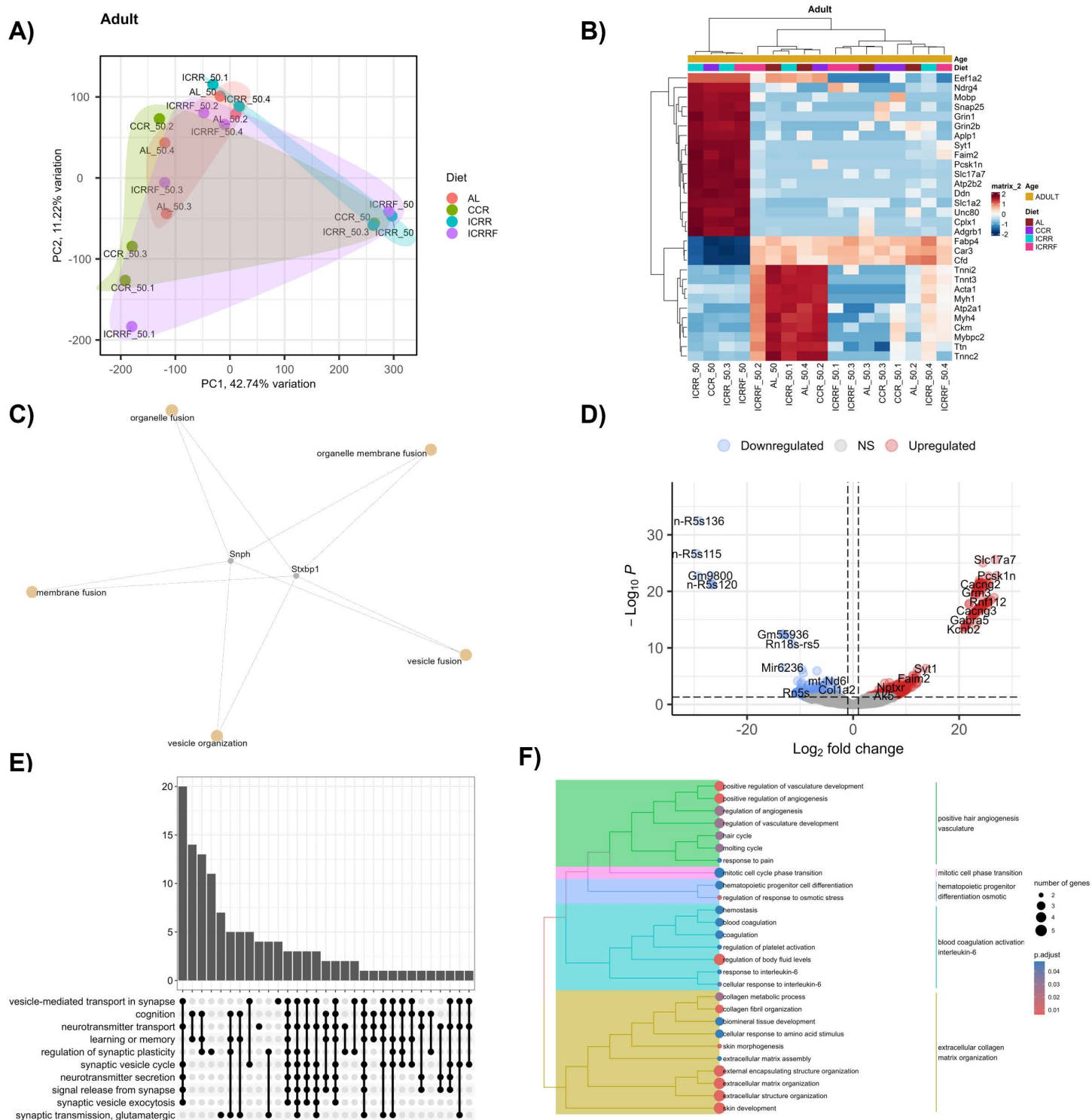
Differential gene expression analyses revealed age-related alterations in the AL-fed mice (Fig 1D,E). In adult mice, the number of differentially expressed genes (DEGs) compared to the baseline was 668 (77↑, 591↓), while in old mice, there were 466 DEGs compared to the baseline levels (44↑, 422↓). Among the upregulated genes in adult mice, the *Asph* gene is thought to play an important role in calcium homeostasis. Additionally, *Hnrpna3* and *Pcbp2* are predicted to be involved in RNA binding, transcription, and splicing activity. Interestingly, *Malat1* is also upregulated in adult mice compared to baseline. *Malat1* gene product is a long non-coding RNA that functions as a gene expression regulator and is linked to various types of cancer. Upregulation of *Malat1* might suggest age-related susceptibility to increase in oncogenic pathways in MFP. *Csn1s1* and *Csn2* was consistently upregulated with age compared to the baseline levels. Not surprisingly, *Csn* beta-casein gene family is highly expressed in the mammary gland. This suggests its sustained involvement in mammary gland biology, potentially beyond its lactation-related roles. Most downregulated genes such as *Septin3*, *Cacna2d3*, and *Fbxo41* in adult mice are known to be involved in neuronal communication and presynapse organization. These genes were mostly enriched in cellular response to dopamine, catecholamine, and monoamine pathways, which points to potential alterations in neuroendocrine regulation, possibly reflecting age-related dysfunction (Fig 1D). In old mice, in addition to the beta-casein gene family, *Dnajc7*, *Egfl7*, *Pcbp2*, and *Pdia6* were among the upregulated genes compared to the baseline. *Pdia6* enables protein-disulfide reductase activity and is involved in unfolded protein response. *Pcbp2* is involved in the positive regulation of transcription by RNA polymerase II. On the other hand, *Egfl7* is involved in the negative regulation of smooth muscle cell migration. *Dnajc7* is predicted to be involved in heat shock protein binding activity. Among the downregulated genes, *Camk2b* enables calcium/calmodulin-dependent protein kinase activity and is involved in the regulation of neuron migration. *Srcin1* enables protein kinase binding activity and involved in actin cytoskeleton organization.

Overall, these results suggest that aging is a major regulator of gene expression related to neuroendocrine signaling in the MFP tissue of the transgenic MMTV-TGF- $\alpha$  breast cancer mouse model, potentially shaping a microenvironment supports the tumor initiation and progression in this model.

### 3.2. Mid-term effects of chronic or intermittent caloric restriction on mammary fat pad tissue transcriptome in adult mice

RNA sequencing results of the CCR, ICR-R, and ICR-RF groups were compared to the AL group in adult mice to investigate the mid-term effects of different dietary interventions (chronic or intermittent CR) on MFP transcriptome. PCA showed no significant differences in the global transcriptome profiles of MFP tissue between the groups in adult mice ( $p > 0.05$ ) (Fig 2A). Although PCA did not reveal significant global distinction in whole transcriptome profiles, differential expression analysis identified specific gene-level changes associated with diet, suggesting localized transcriptomic shifts. The heatmap of unsupervised hierarchical clustering displays the expression patterns of the top 30 most variable genes between the different dietary groups in adult mice (Fig 2B).

Differential expression analyses revealed specific DEGs between the dietary groups in adult mice. In the CCR group, there were 10 DEGs compared to the AL group (5↑, 5↓). Among the upregulated genes, *Stxbp1* and *Snph* has a role in membrane fusion and vesicle organization (Fig 2C). In contrast to CCR, the ICR-R demonstrated a more pronounced impact on the transcriptomic profile of MFP tissue, with 637 DEGs identified compared to the AL group (455↑, 182↓) (Fig 2D). In the ICR-R group, upregulated genes include *Slc17a*, an L-glutamate transmembrane transporter, and *Pcsk1n*, which enables serine-type endopeptidase inhibitor activity and is involved in peptide hormone processing, response to cold, and response to dietary excess. Upregulated genes in the ICR-R group were mostly enriched in the vesicle-mediated transport in synapse, cognition, and neurotransmitter transport, indicating potential neuroprotective effects (Fig 2E). Among the downregulated genes, *Col1a1* and *Col1a2* encode collagen, which is primarily found in connective tissues. The *Tert* gene encodes the telomerase enzyme, whose activity is associated with angiogenesis. Downregulated



**Fig 2. Mid-term effects of the different dietary interventions in the MFP tissue transcriptome and the biological pathways of the breast cancer mouse model in the adult age.** **A)** PCA analysis of the samples belong to different dietary groups at adult age. **B)** Heatmap displays the unsupervised hierarchical clustering of the expression patterns of the top 30 most variable genes in different dietary groups at adult age. **C)** Network plot displays the relationship between the upregulated genes in the CCR group and the enriched pathways. **D)** Volcano graph displays the DEGs between ICRR and

AL group, at adult age. **E)** Upset plot represents the enriched pathways of the DEGs in the ICR-R group in adult mice, with the common gene counts. **F)** Tree plot represents the enriched pathways of downregulated genes in the ICR-R group in adult mice. PC: Principal component. For volcano graphs, absolute log2 fold-change value of  $> 1$  and adjusted p value of 0.1 were considered statistically significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0331898.g002>

genes in ICR-R, compared to the AL group, were mostly enriched in extracellular matrix organization and positive regulation of angiogenesis, suggesting potential downregulation in tissue remodeling and pathways related to the cancer development in the MFP microenvironment (Fig 2F). In the ICR-RF group, there were 73 DEGs compared to the AL group in adult mice (3 $\uparrow$ , 70 $\downarrow$ ), indicating a three-week re-feeding period resulting in the loss of significant differences in a vast number of genes (S1 Fig).

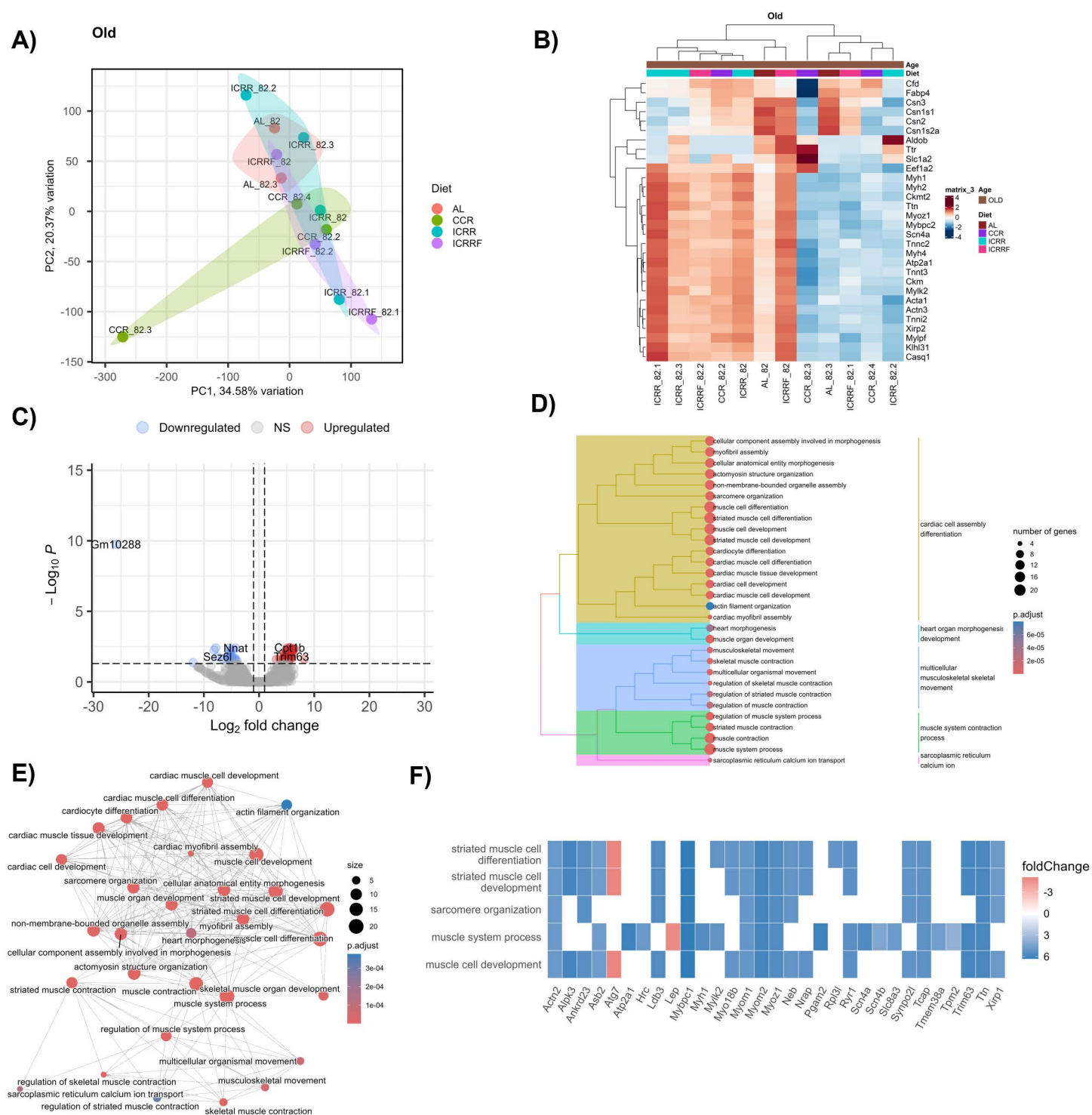
Overall, these results suggest the ICR application was much more effective than the CCR application on MFP tissue whole transcriptome in adult mice, considering the number of DEGs in the groups. On the other hand, ICR application mostly upregulated the pathways related to neurotransmitter support and regulation of synaptic plasticity, with potential neuroprotective effects, while downregulating the extracellular matrix organization and angiogenesis, a possible tumor-supporting microenvironment.

### 3.3. Long-term effects of chronic or intermittent caloric restriction on mammary fat pad tissue transcriptome in old mice

The transcriptomic profile of MFP tissue of the CCR, ICR-R, and ICR-RF groups was compared to that of the AL group old mice to investigate the long-term effects of CR on the MFP tissue transcriptome. PCA showed no significant global transcriptomic distinctions among dietary groups in old mice ( $p > 0.05$ ), though individual variability suggested localized transcriptional alterations (Fig 3A). Although PCA showed no significant global distinction in whole transcriptome profiles, differential expression analysis highlighted specific gene-level alterations with diet. The heatmap of unsupervised hierarchical clustering displays the top 30 most variable genes between the dietary groups in old mice (Fig 3B).

Differential expression analysis revealed distinct responses to different dietary interventions in old mice. Notably, there were no DEGs were identified in the CCR group compared to AL-fed old mice suggesting that continuous application of CR, when sustained long-term, did not effectively counteract the age-related changes in MFP tissue transcriptome. On the other hand, long-term ICR-R application resulted in 90 DEGs (57 $\uparrow$ , 33 $\downarrow$ ) compared to AL feeding (Fig 3C). Among the upregulated genes, *Cpt1b* is a member of carnitine/choline acetyltransferase family which rate-controls long-chain fatty acid beta-oxidation pathway in muscle mitochondria, which indicates a possible metabolic adaptation response to ICR in the long-term. *Trim63* is a RING zinc-finger protein family which mostly found in striated muscles. In the ICR-R group, upregulated genes were predominantly enriched in pathways related to muscle development and differentiation, indicating a potential diet-induced enhancement of muscle-related processes, which may counteract age-associated decline (Fig 3D, S2 Fig). Enriched terms in the ICR-R group in old mice revealed that ICR-R strongly modified muscle development since most of the enriched terms are intensely connected (Fig 3E). While most of the genes related to these enriched terms were upregulated, downregulated genes including *Lep*, which is an appetite regulator and has a role in cytokine signaling and metabolism, and *Atg7* is involved in autophagy and modulates p53-dependent cell cycle signaling. (Fig 3F). Among the downregulated genes, *Nnat* has a role in the positive regulation of insulin secretion and response to glucose. *Sez6l* gene is predicted to be involved in protein kinase-C signaling and synapse maturation (S3 Fig). Interestingly, there were no DEGs in the ICR-RF group compared to the AL group in old mice. The absence of DEGs in the ICR-RF group suggests that re-feeding reverted the transcriptomic modifications induced by restriction, potentially reflecting a loss of CR's beneficial effects (S4 Fig).

These findings suggest that ICR application, when applied in the long term up to 82 weeks of mouse age, could modify the age-related transcriptomic changes in the MFP tissue of the breast cancer mouse model. On the other hand, continuous application of more moderate restriction (CCR) was not effective in transcriptomic regulation since there were no



**Fig 3. Long-term effects of the different dietary interventions in the MFP tissue transcriptome and the biological pathways of the breast cancer mouse model at old age.** **A)** PCA analysis of the samples belong to different dietary groups at old age. **B)** Heatmap displays the unsupervised hierarchical clustering of the expression patterns of the top 30 most variable genes in different dietary groups at old age. **C)** Volcano graph displays the DEGs in the ICR-R group compared to AL group at old age. **D)** Tree plot represents the hierarchical clustering of the enriched pathways of the DEGs

in the ICR-R group. **E)** Network plot display the connection of genes with the enriched pathways in ICR-R group at old age. PC: Principal component. For volcano graphs, absolute log<sub>2</sub> fold-change value of >2 and adjusted p value of 0.1 were considered statistically significant. **F)** Heat plot displays the relationship between the DEGs and the enriched pathways with fold-change values.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0331898.g003>

DEGs in the CCR group compared to AL-fed old mice. DEGs in the ICR-R group were mostly involved in muscle development, indicating the diet-induced regulations in the muscle system process.

## 4. Discussion

In the current study, we performed RNA sequencing on MFP tissue of the transgenic breast cancer mouse model subjected to different dietary regimens (AL, CCR, or ICR) from week 10 up to 82 to investigate transcriptomic alterations. Differential expression analysis revealed significant age-associated shifts, including a downregulation in neuronal communication, presynapse organization, cellular response to dopamine, monoamine, and cotacholamine, which suggests possible neuroendocrine dysfunction. In this context, Willows et al. demonstrated that subcutaneous adipose tissue contains myelinated and unmyelinated nerves and is densely populated with Schwann cells associated with synaptic vesicle-containing nerve terminals [29]. In addition, a previous study demonstrated that hypothalamic-adipose interconnection regulates aging and lifespan in mice [30]. Consistent with our findings, prior studies have reported an age-related decline in neuroendocrine signaling [31,32]. This suggests a potential systemic mechanism that impacts not only neuronal tissues but also distinct environments like MFP. The consistent downregulation of synaptic function-related genes in MFP tissue could reflect an age-associated reduction in neuroendocrine signaling, potentially contributing to impaired metabolic regulation or local tissue remodeling.

In the present study, we reported a consistent age-related increase in *Csn1s1* and *Csn2* expression in AL-fed mice. While these genes primarily function in lactation, a previous study using TCGA breast cancer datasets reported lower *CSN1S1* expression in breast cancer tissues compared to healthy breast tissue, and this lower expression is associated with better prognosis [33]. On the other hand, Peng et al. found that *CSN1S1* was upregulated in breast cancer patients with distant metastases, compared to those without [34]. However, the molecular evidence remains limited regarding how these genes contribute to breast cancer initiation and progression, highlighting the need for further investigation into both *CSN1S1* and *CSN2* as potential prognostic markers.

Notably, an age-related increase in *Malat1* expression level was observed in adult mice, while no such change was detected in old mice. *Malat1* gene product is a long non-coding RNA that regulates gene expression and is linked to various types of cancer [35,36]. Xiping et al. reported that *MALAT1* expression was positively correlated with metastatic lymph nodes in breast cancer patients and promotes proliferation and invasion abilities through XPB1-HIF-1 $\alpha$  and Her2 pathways in MDA-MB-231 and MDA-MD-435 breast cancer cell lines, respectively [37]. In contrast to our findings, previous studies reported reduced *MALAT1* expression with age in skeletal muscle and adipose tissue [38,39]. However, Arshi et al. reported consistent and age-independent upregulation of *MALAT1* levels in women with breast cancer [40]. In the present study, we did not observe any change in *Malat1* expression with CR, which might indicate *Malat1*-associated pathways are less responsive systemic modulations in the metabolism of this model. This could reflect a possible susceptibility to oncogenic molecular changes despite a CR protocol in a breast cancer mouse model, supported by the previous findings [41].

After demonstrating the age-related transcriptomic alterations in MFP tissue, we next explored how dietary interventions might counteract these changes. CCR has been extensively studied for its beneficial effects on longevity and metabolic health and has shown varying impacts in different tissues [42]. Here, we assessed whether mid- and long-term CCR could mitigate the age-associated transcriptomic shifts observed in MFP tissue. The findings revealed that CCR limitedly affected gene expression when applied to the mid-term, contrasting with previous findings [43,44]. *Stxbp1* and *Snph* were among the upregulated genes with CCR, which are involved in key signaling pathways related to release of

neurotransmitters, synaptic vesicle docking, and mitochondrial trafficking. In humans, *SNPH* encodes a mitochondria anchoring protein negatively regulates mitochondrial trafficking in neurons. *SNPH* has been reported to be downregulated among distinct tumor types, including breast tumors, and its loss is associated with tumor progression, metastasis, and poor prognosis of the patients [45,46]. In this context, the upregulation of *Snph* with CCR may suggest a potential protective effect against the breast cancer initiation and metastasis through altered mitochondrial trafficking in the MFP. In addition, *STXBP1* is a regulator of lysosome-dependent cell death and has been shown to be downregulated in HR+/HER- breast cancer, compared to adjacent healthy tissues. Although *STXBP1* downregulation has been associated with better prognosis, the precise role of *STXBP1* gene in breast remains unclear and requires further investigation [47]. Overall, the limited number of DEGs in observed with mid-term CCR suggests a subtle impact on the MFP transcriptome that appears insufficient to counteract the broader age-related transcriptomic alterations.

Interestingly, long-term CCR-applied mice showed no significant alterations in the whole transcriptome, compared to AL-fed mice. This could be attributed to its less intense restriction amount. Unlike ICR, which includes refeeding cycles that may enhance metabolic flexibility and stress adaptation, CCR imposes a continuous but moderate caloric deficit. For instance, a previous study reported the reduced impact of CR over prolonged periods [48], while Higami et al. reported 9-month of CR was much more effective than 23 days of CR 10-month-old mice [49]. These findings emphasize the importance of dietary intervention strategies in modulating age-related transcriptomic changes and suggest that the intensity and pattern of CR play crucial roles in determining their effectiveness.

Intermittent fasting, or ICR, was previously reported to regulate gene expression [50], ameliorate adipose tissue-associated inflammation [51], and promote energy expenditure [52]. In the present study, long-term ICR significantly altered MFP transcriptome compared to AL-feeding, more effectively than CCR. ICR-R upregulated genes, such as *Pcsk1n*, and *Slc17a7*, which are involved in transmembrane transport, membrane potential, synaptic plasticity, and neurotransmitter support, pointing to potential neuroprotective and metabolic effects. *PCSK1N* regulates neuropeptide processing essential for energy homeostasis and appetite regulation [53], and its expression has been linked to body mass index (BMI), age, and type 2 diabetes [54–56], while contradictory findings were also reported [53]. *SLC17A7* encodes VGLUT1, which modulates neuronal communication and synaptic plasticity [57]. Its expression in the mouse hypothalamus was upregulated with a high-fat diet [58], while it was downregulated with a ketogenic diet [59] indicating the potential regulatory role of *Slc17a7* in different dietary interventions. These signaling pathways related to membrane potential and synaptic communication were downregulated with aging. However, ICR appeared to counteracts these age-related alterations, suggesting a potential role in mitigating age-related neuroendocrine dysfunction associated with aging. On the other hand, downregulated genes in ICR-R, compared to the AL group, were mostly enriched in extracellular matrix organization and positive regulation of angiogenesis, suggesting potential downregulation in tissue remodeling and pathways related to the cancer development in the MFP microenvironment [60,61].

Notably, we reported reduced leptin (*Lep*) expression with ICR in old mice, consistent with the previous findings [49,62]. Leptin and adiponectin are key adipokines secreted from adipose tissue that regulate energy homeostasis and metabolic response, with an abnormal adiponectin/leptin ratio linked to diseases including obesity [63,64]. Earlier studies also reported increased adiponectin/leptin ratio in serum and plasma with CR [65,66] and their role in breast cancer incidence [21]. In this context, changes in leptin or adiponectin signaling-related miRNAs have also been described [22]. Leptin exerts its biological functions through selective binding to its receptor (LEPR), which is expressed in many tissues including the mammary glands [67]. Prior studies demonstrated that leptin stimulates the growth of human breast cancer cells *in vitro* and promotes angiogenesis via vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (VEGF2) pathways [68].

Beyond their involvement in breast cancer progression, leptin and adiponectin plays a central role in metabolism, regulating appetite, energy balance, and adipose tissue function. A previous study in Wistar rats reported that just two days of refeeding upregulated the *Lep* levels and reversed the CR effect [69]. Similarly, Liu et al. reported a 32.8% reduction in the *Adipoq* expression, after the two-day refeeding period [70]. In line with these findings, our study showed that a three-week

re-feeding period in ICR reversed many transcriptomic differences and resulted in a marked reduction in DEGs. This may reflect an adaptive response to short-term caloric intake variations, consistent with prior reports [69,71]. Therefore, dietary interventions like ICR could be optimized to balance benefits with minimal adverse effects from refeeding.

We previously reported a significant decrease in MT development in mice exposed to ICR for up to 74 weeks compared to the AL-fed mice [21]. However, the exact molecular mechanisms of the protective effects of ICR are still unclear, although several molecular pathways have been associated with this phenomenon, including oxidative stress [13]. Therefore, the findings in the present study indicate that ICR may have a protective role by globally modulating the MFP tissue gene expression profile against age-related alterations.

Nevertheless, our study has a few limitations. For example, the functional reflections of transcriptomic alterations are yet to be clarified, therefore it is important to examine the effects of CR on gene expression in MFP tissues by experimentally validating the findings, including qPCR, western blot, or immunohistochemistry techniques. In future studies, more omics studies are needed for an integrative approach. In addition, the absence of global transcriptomic distinctions in PCA, despite the significant number of DEGs might reflect sample size limitation or variability. Moreover, we did not include wild-type mice in the current study, since all mice have MMTV-TGF- $\alpha$  genetic background. Previous studies demonstrated that the genetic background of the animals could affect the metabolic response to CR [72,73].

We acknowledge that the use of a single transgenic breast cancer mouse model used in this study, MMTV-TGF- $\alpha$ , may not fully capture the heterogeneity of breast cancer subtypes. This model was chosen to investigate the long-term effects of CR against MT development, as it develops MTs with a long latency (6–15 months) [24]. However, other widely used models, such as FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J and FVB/N-Tg(MMTV-ErbB2\* $_{-cre}$ )1Mul/J [74,75] do not require multiple pregnancies for rapid tumor development. Notably, a prior study applying the same ICR protocol to MMTV-neu mice -previously applied to MMTV-TGF- $\alpha$  mice- reported tumor incidences 37% in AL-fed mice and 22% in ICR mice [76], suggesting that ICR might be effective in reducing the MT incidence regardless of the model. Given the hormone-independent and aggressive nature of MMTV-neu and ErbB-2 driven tumors, compared to MMTV-TGF- $\alpha$  mice used in the current study, it is possible that CR interventions may exert distinct molecular impact. Therefore, while the protective effects of CR, particularly ICR, appear promising, further comparative studies including multiple transgenic breast cancer models are needed to determine how ICR influences the tissue transcriptome and MT development across diverse genetic backgrounds.

## 5. Conclusion

In conclusion, we demonstrated for the first time the long-term application of ICR, but not CCR, substantially alters the global transcriptome of MFP tissue of the transgenic breast cancer mouse model. While ICR holds potential as a non-pharmaceutical prevention strategy against age-related transcriptomic alterations, further research is needed to comprehend the underlying epigenetic mechanisms. Identifying molecular signatures related to ICR-mediated gene expression could lead to the development of personalized dietary interventions targeting age-related metabolic and transcriptional dysregulation.

## Supporting information

**S1 File. Dietary composition of the food given to the mice throughout the study (Altromin TPF1414).**  
(PDF)

**S1 Table. Number of the MFP tissue samples for each dietary group at each time point of the study.**  
(DOCX)

**S1 Fig. Genes affected by refeeding at adult age.** Volcano graph displays the differentially expressed genes (DEGs) in the ICR-RF group compared to the ICR-R group at adult age. Absolute log<sub>2</sub> fold-change value of >2 and adjusted p value of 0.1 were considered statistically significant.  
(TIF)

**S2 Fig. Enriched pathways of the upregulated genes with ICR-R at old age.** Dot plot represents the enriched pathways of the upregulated genes in the ICR-R group compared to the AL group at old age. Adjusted p value of 0.1 were considered statistically significant.

(TIF)

**S3 Fig. Enriched pathways of the downregulated genes with ICR-R at old age.** Dot plot represents the enriched pathways of the downregulated genes in the ICR-R group compared to the AL group at old age. Adjusted p value of 0.1 were considered statistically significant.

(TIF)

**S4 Fig. Pathways affected by refeeding at old age.** Circular network plot displays the relationship between the DEGs and the enriched pathways in the ICR-RF group compared to the ICR-R group at old age, with fold-change values. Absolute log<sub>2</sub> fold-change value of >2 and adjusted p value of 0.1 were considered statistically significant.

(TIF)

## Acknowledgments

The authors thank Dr. Margot P. Cleary (University of Minnesota, MN, USA) for generously donating the breeding colony of the MMTV-TGF- $\alpha$  transgenic mice. The authors thank both graduate and undergraduate students who helped with the daily feeding and handling of mice. The authors also thank Yeditepe University Animal Facility (YUDETEM) staff for taking care of the animals.

## Author contributions

**Conceptualization:** Bilge Guvenc Tuna, Soner Dogan, Sulev Koks.

**Data curation:** Bilge Guvenc Tuna, Nazim Arda Keles, Sulev Koks.

**Formal analysis:** Bilge Guvenc Tuna, Nazim Arda Keles, Munevver Burcu Cicekdal, Sulev Koks.

**Funding acquisition:** Sulev Koks.

**Investigation:** Bilge Guvenc Tuna, Soner Dogan, Sulev Koks.

**Methodology:** Bilge Guvenc Tuna, Nazim Arda Keles, Munevver Burcu Cicekdal, Soner Dogan, Sulev Koks.

**Project administration:** Soner Dogan.

**Resources:** Soner Dogan.

**Software:** Nazim Arda Keles.

**Supervision:** Bilge Guvenc Tuna, Munevver Burcu Cicekdal, Soner Dogan, Sulev Koks.

**Validation:** Nazim Arda Keles, Munevver Burcu Cicekdal, Soner Dogan, Sulev Koks.

**Visualization:** Nazim Arda Keles.

**Writing – original draft:** Bilge Guvenc Tuna, Nazim Arda Keles, Soner Dogan.

**Writing – review & editing:** Bilge Guvenc Tuna, Nazim Arda Keles, Munevver Burcu Cicekdal, Soner Dogan, Sulev Koks.

## References

1. Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science*. 1999;285(5432):1390–3. <https://doi.org/10.1126/science.285.5432.1390> PMID: [10464095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10464095/)
2. Wu C, Tu T, Xie M, Wang Y, Yan B, Gong Y, et al. Spatially resolved transcriptome of the aging mouse brain. *Aging Cell*. 2024;23(5):e14109. <https://doi.org/10.1111/acer.14109> PMID: [38372175](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38372175/)

3. Aine M, Boyaci C, Hartman J, Häkkinen J, Mitra S, Campos AB, et al. Correction to: Molecular analyses of triple-negative breast cancer in the young and elderly. *Breast Cancer Res.* 2021;23(1):28. <https://doi.org/10.1186/s13058-021-01405-y> PMID: 33627140
4. Aine M, Boyaci C, Hartman J, Häkkinen J, Mitra S, Campos AB, et al. Molecular analyses of triple-negative breast cancer in the young and elderly. *Breast Cancer Res.* 2021;23(1):20. <https://doi.org/10.1186/s13058-021-01392-0> PMID: 33568222
5. Chatsirisupachai K, Lesluyes T, Paraoan L, Van Loo P, de Magalhães JP. An integrative analysis of the age-associated multi-omic landscape across cancers. *Nat Commun.* 2021;12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22560-y>
6. Liu J, Zhang R, Ma L, Yang P, Wu Z, Chen Y, et al. Association of dietary carbohydrate ratio, caloric restriction, and genetic factors with breast cancer risk in a cohort study. *Sci Rep.* 2025;15(1):6263. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-90844-0> PMID: 39979527
7. Christensen RAG, Kirkham AA. Time-Restricted Eating: A Novel and Simple Dietary Intervention for Primary and Secondary Prevention of Breast Cancer and Cardiovascular Disease. *Nutrients.* 2021;13(10):3476. <https://doi.org/10.3390/nu13103476> PMID: 34684476
8. Koubova J, Guarente L. How does calorie restriction work?. *Genes Dev.* 2003;17(3):313–21. <https://doi.org/10.1101/gad.1052903> PMID: 12569120
9. Lkhagvadorj S, Qu L, Cai W, Couture OP, Barb CR, Hausman GJ, et al. Gene expression profiling of the short-term adaptive response to acute caloric restriction in liver and adipose tissues of pigs differing in feed efficiency. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;298(2):R494–507. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00632.2009> PMID: 19939971
10. Herrera Uribe J, Vitger AD, Ritz C, Fredholm M, Bjørnrvad CR, Cirera S. Physical training and weight loss in dogs lead to transcriptional changes in genes involved in the glucose-transport pathway in muscle and adipose tissues. *Vet J.* 2016;208:22–7. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.11.002> PMID: 26701817
11. Armenise C, Lefebvre G, Carayol J, Bonnel S, Bolton J, Di Cara A, et al. Transcriptome profiling from adipose tissue during a low-calorie diet reveals predictors of weight and glycemic outcomes in obese, nondiabetic subjects. *Am J Clin Nutr.* 2017;106(3):736–46. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.156216> PMID: 28793995
12. Dedual MA, Wuest S, Borsigova M, Konrad D. Intermittent fasting improves metabolic flexibility in short-term high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2019;317(5):E773–82. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00187.2019> PMID: 31503513
13. Cicekda MB, Tuna BG, Charehsaz M, Cleary MP, Aydin A, Dogan S. Effects of long-term intermittent versus chronic calorie restriction on oxidative stress in a mouse cancer model. *IUBMB Life.* 2019;71(12):1973–85. <https://doi.org/10.1002/iub.2145> PMID: 31424629
14. Iyengar NM, Zhou XK, Gucaip A, Morris PG, Howe LR, Giri DD, et al. Systemic Correlates of White Adipose Tissue Inflammation in Early-Stage Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016;22(9):2283–9. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2239> PMID: 26712688
15. Burhans MS, Hagman DK, Kuzma JN, Schmidt KA, Kratz M. Contribution of Adipose Tissue Inflammation to the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. *Comprehensive Physiology.* Wiley. 2018. 1–58. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170040>
16. Dogan S, Ray A, Cleary MP. The influence of different calorie restriction protocols on serum pro-inflammatory cytokines, adipokines and IGF-I levels in female C57BL6 mice: short term and long term diet effects. *Meta Gene.* 2017;12:22–32. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2016.12.013> PMID: 28373962
17. Starr ME, Hu Y, Stromberg AJ, Carmical JR, Wood TG, Evers BM, et al. Gene expression profile of mouse white adipose tissue during inflammatory stress: age-dependent upregulation of major procoagulant factors. *Aging Cell.* 2013;12(2):194–206. <https://doi.org/10.1111/accel.12040>
18. Kar A, Alvarez M, Garske KM, Huang H, Lee SHT, Deal M, et al. Age-dependent genes in adipose stem and precursor cells affect regulation of fat cell differentiation and link aging to obesity via cellular and genetic interactions. *Genome Med.* 2024;16(1):19. <https://doi.org/10.1186/s13073-024-01291-x> PMID: 38297378
19. Miller KN, Burhans MS, Clark JP, Howell PR, Polewski MA, DeMuth TM, et al. Aging and caloric restriction impact adipose tissue, adiponectin, and circulating lipids. *Aging Cell.* 2017;16(3):497–507. <https://doi.org/10.1111/accel.12575> PMID: 28156058
20. Glass D, Viñuela A, Davies MN, Ramasamy A, Parts L, Knowles D, et al. Gene expression changes with age in skin, adipose tissue, blood and brain. *Genome Biol.* 2013;14(7). <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-7-r75>
21. Dogan S, Rogozina OP, Lokshin AE, Grande JP, Cleary MP. Effects of chronic vs. intermittent calorie restriction on mammary tumor incidence and serum adiponectin and leptin levels in MMTV-TGF- $\alpha$  mice at different ages. *Oncology Letters.* 2010;1(1):167–76. <https://doi.org/10.3892/ol.00000031>
22. Dogan S, Cicekda MB, Ozorhan U, Karabiyik G, Kazan BT, Ekici ID, et al. Roles of adiponectin and leptin signaling-related microRNAs in the preventive effects of calorie restriction in mammary tumor development. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2021;46(8):866–76. <https://doi.org/10.1139/apnm-2020-1000> PMID: 33493087
23. Köks S, Dogan S, Tuna BG, González-Navarro H, Potter P, Vandenbroucke RE. Mouse models of ageing and their relevance to disease. *Mech Ageing Dev.* 2016;160:41–53. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.10.001> PMID: 27717883
24. Matsui Y, Halter SA, Holt JT, Hogan BL, Coffey RJ. Development of mammary hyperplasia and neoplasia in MMTV-TGF  $\alpha$  transgenic mice. *Cell.* 1990;61(6):1147–55. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90077-r](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90077-r) PMID: 2161707
25. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods.* 2017;14(4):417–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>
26. Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS: A Journal of Integrative Biology.* 2012;16(5):284–7. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>

27. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8> PMID: 25516281
28. Li A, Barber RF. Multiple Testing with the Structure-Adaptive Benjamini–Hochberg Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society Series B: Statistical Methodology.* 2018;81(1):45–74. <https://doi.org/10.1111/rssb.12298>
29. Willows JW, Gunsch G, Paradie E, Blaszkiewicz M, Tonniges JR, Pino MF, et al. Schwann cells contribute to demyelinating diabetic neuropathy and nerve terminal structures in white adipose tissue. *iScience.* 2023;26(3):106189. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106189> PMID: 36895649
30. Tokizane K, Brace CS, Imai S-I. DMHPpp1r17 neurons regulate aging and lifespan in mice through hypothalamic-adipose inter-tissue communication. *Cell Metab.* 2024;36(2):377–392.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2023.12.011> PMID: 38194970
31. Berchtold NC, Coleman PD, Cribbs DH, Rogers J, Gillen DL, Cotman CW. Synaptic genes are extensively downregulated across multiple brain regions in normal human aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2013;34(6):1653–61. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.024> PMID: 23273601
32. Song H-D, Kim SN, Saha A, Ahn S-Y, Akindehin S, Son Y, et al. Aging-Induced Brain-Derived Neurotrophic Factor in Adipocyte Progenitors Contributes to Adipose Tissue Dysfunction. *Aging and disease.* 2020;11(3):575. <https://doi.org/10.14336/ad.2019.0810>
33. Mou MA, Keya NA, Islam M, Hossain MJ, Al Habib MS, Alam R, et al. Validation of CSN1S1 transcriptional expression, promoter methylation, and prognostic power in breast cancer using independent datasets. *Biochem Biophys Rep.* 2020;24:100867. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100867> PMID: 33381666
34. Peng W, Lin C, Jing S, Su G, Jin X, Di G, et al. A Novel Seven Gene Signature-Based Prognostic Model to Predict Distant Metastasis of Lymph Node-Negative Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol.* 2021;11:746763. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.746763> PMID: 34604089
35. Li J, Dhilipkannah P, Holden VK, Sachdeva A, Todd NW, Jiang F. Dysregulation of lncRNA MALAT1 Contributes to Lung Cancer in African Americans by Modulating the Tumor Immune Microenvironment. *Cancers (Basel).* 2024;16(10):1876. <https://doi.org/10.3390/cancers16101876> PMID: 38791954
36. Naveed M, Malik A, Anjum H, Ijaz B. LncRNA MALAT1 Expression Regulates Breast Cancer Progression via PI3K/AKT/mTOR Pathway Modulation. *Biochem Genet.* 2023;62(5):3421–38. <https://doi.org/10.1007/s10528-023-10592-6>
37. Xiping Z, Bo C, Shifeng Y, Feijiang Y, Hongjian Y, Qihui C, et al. Roles of MALAT1 in development and migration of triple negative and Her-2 positive breast cancer. *Oncotarget.* 2017;9(2):2255–67. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23370> PMID: 29416769
38. Ruan L, Mendhe B, Parker E, Kent A, Isaacs CM, Hill WD, et al. Long Non-coding RNA MALAT1 Is Depleted With Age in Skeletal Muscle in vivo and MALAT1 Silencing Increases Expression of TGF- $\beta$ 1 in vitro. *Front Physiol.* 2022;12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.742004>
39. Carter S, Miard S, Boivin L, Sallé-Lefort S, Picard F. Loss of Malat1 does not modify age- or diet-induced adipose tissue accretion and insulin resistance in mice. *PLoS One.* 2018;13(5):e0196603. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196603> PMID: 29746487
40. Arshi A, Sharifi FS, Khorramian Ghahfarokhi M, Faghih Z, Doosti A, Ostovari S, et al. Expression Analysis of MALAT1, GAS5, SRA, and NEAT1 lncRNAs in Breast Cancer Tissues from Young Women and Women over 45 Years of Age. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2018;12:751–7. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.07.014> PMID: 30126830
41. Olson LK, Tan Y, Zhao Y, Aupperlee MD, Haslam SZ. Pubertal exposure to high fat diet causes mouse strain-dependent alterations in mammary gland development and estrogen responsiveness. *Int J Obes (Lond).* 2010;34(9):1415–26. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.51> PMID: 20231845
42. Chen D, Bruno J, Easlon E, Lin S, Cheng H, Alt FW. Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes Dev.* 2008;17:1753–7. <https://doi.org/10.1101/gad.1650608>
43. Bouchard L, Rabasa-Lhoret R, Faraj M, Lavoie M-E, Mill J, Pérusse L, et al. Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(2):309–20. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28085> PMID: 19939982
44. Linford NJ, Beyer RP, Gollahon K, Krajcik RA, Malloy VL, Demas V, et al. Transcriptional response to aging and caloric restriction in heart and adipose tissue. *Aging Cell.* 2007;6(5):673–88. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00319.x> PMID: 17874999
45. Caino MC, Seo JH, Aguinaldo A, Wait E, Bryant KG, Kossenkov AV, et al. A neuronal network of mitochondrial dynamics regulates metastasis. *Nat Commun.* 2016;7:13730. <https://doi.org/10.1038/ncomms13730> PMID: 27991488
46. Furnish M, Caino MC. Altered mitochondrial trafficking as a novel mechanism of cancer metastasis. *Cancer Rep (Hoboken).* 2020;3(1):e1157. <https://doi.org/10.1002/cnr2.1157> PMID: 32671955
47. Mao S, Zhao Y, Xiong H, Gong C. Excavating regulated cell death signatures to predict prognosis, tumor microenvironment and therapeutic response in HR+/HER2- breast cancer. *Transl Oncol.* 2024;50:102117. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2024.102117> PMID: 39241556
48. Govic A, Nasser H, Levay EA, Zelko M, Ebrahimieh E, Dehcheshmeh MM. Long-term calorie restriction alters anxiety-like behaviour and the brain and adrenal gland transcriptomes of the ageing male rat. 2022.
49. Higami Y, Pugh TD, Page GP, Allison DB, Prolla TA, Weindruch R. Adipose tissue energy metabolism: altered gene expression profile of mice subjected to long-term caloric restriction. *FASEB J.* 2004;18(2):415–7. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0678fje> PMID: 14688200
50. Karbowska J, Kochan Z. Intermittent fasting up-regulates Fsp27/Cidec gene expression in white adipose tissue. *Nutrition.* 2012;28(3):294–9. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.06.009>

51. Castela I, Rodrigues C, Ismael S, Barreiros-Mota I, Morais J, Araújo JR, et al. Intermittent energy restriction ameliorates adipose tissue-associated inflammation in adults with obesity: A randomised controlled trial. *Clin Nutr*. 2022;41(8):1660–6. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.06.021> PMID: [35772219](#)
52. Liu B, Page AJ, Hutchison AT, Wittert GA, Heilbronn LK. Intermittent fasting increases energy expenditure and promotes adipose tissue browning in mice. *Nutrition*. 2019;66:38–43. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.03.015> PMID: [31207437](#)
53. Meier DT, Rachid L, Wiedemann SJ, Traub S, Trimiglozzi K, Stawiski M, et al. Prohormone convertase 1/3 deficiency causes obesity due to impaired proinsulin processing. *Nat Commun*. 2022;13(1):4761. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32509-4> PMID: [35963866](#)
54. Inglis A, Ubungen R, Farooq S, Mata P, Thiam J, Saleh S, et al. Strain-based and sex-biased differences in adrenal and pancreatic gene expression between KK/HIJ and C57BL/6J mice. *BMC Genomics*. 2021;22(1):180. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07495-4> PMID: [33711921](#)
55. Wang W, Jiang W, Hou L, Duan H, Wu Y, Xu C, et al. Weighted gene co-expression network analysis of expression data of monozygotic twins identifies specific modules and hub genes related to BMI. *BMC Genomics*. 2017;18(1):872. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4257-6> PMID: [29132311](#)
56. Pan J, Ma N, Yu B, Zhang W, Wan J. Transcriptomic profiling of microglia and astrocytes throughout aging. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):97. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01774-9> PMID: [32238175](#)
57. Martineau M, Guzman RE, Fahlke C, Klingauf J. VGLUT1 functions as a glutamate/proton exchanger with chloride channel activity in hippocampal glutamatergic synapses. *Nat Commun*. 2017;8(1):2279. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02367-6> PMID: [29273736](#)
58. Lee AK, Mojtahed-Jaberi M, Kyriakou T, Astarloa EA-O, Arno M, Marshall NJ, et al. Effect of high-fat feeding on expression of genes controlling availability of dopamine in mouse hypothalamus. *Nutrition*. 2010;26(4):411–22. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.05.007> PMID: [19811894](#)
59. Juge N, Gray JA, Omote H, Miyaji T, Inoue T, Hara C, et al. Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron*. 2010;68(1):99–112. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.002> PMID: [20920794](#)
60. De Lorenzo MS, Baljinnyam E, Vatner DE, Abarzúa P, Vatner SF, Rabson AB. Caloric restriction reduces growth of mammary tumors and metastases. *Carcinogenesis*. 2011;32(9):1381–7. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr107> PMID: [21665891](#)
61. de Sousa Neto IV, Durigan JLQ, da Silva ASR, de Cássia Marqueti R. Adipose Tissue Extracellular Matrix Remodeling in Response to Dietary Patterns and Exercise: Molecular Landscape, Mechanistic Insights, and Therapeutic Approaches. *Biology (Basel)*. 2022;11(5):765. <https://doi.org/10.3390/biology11050765> PMID: [35625493](#)
62. Park CY, Park S, Kim MS, Kim H-K, Han SN. Effects of mild calorie restriction on lipid metabolism and inflammation in liver and adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;490(3):636–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.090> PMID: [28630003](#)
63. López-Jaramillo P, Gómez-Arbeláez D, López-López J, López-López C, Martínez-Ortega J, Gómez-Rodríguez A, et al. The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. *Horm Mol Biol Clin Invest*. 2014;18(1):37–45. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2013-0053> PMID: [25389999](#)
64. Yildiz BO, Suchard MA, Wong M-L, McCann SM, Licinio J. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(28):10434–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403465101> PMID: [15231997](#)
65. Capel F, Viguerie N, Vega N, Dejean S, Arner P, Klimcakova E, et al. Contribution of energy restriction and macronutrient composition to changes in adipose tissue gene expression during dietary weight-loss programs in obese women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11):4315–22. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0814> PMID: [18782868](#)
66. Christiansen T, Paulsen SK, Bruun JM, Pedersen SB, Richelsen B. Exercise training versus diet-induced weight-loss on metabolic risk factors and inflammatory markers in obese subjects: a 12-week randomized intervention study. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;298(4):E824–31. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00574.2009> PMID: [20086201](#)
67. Barb CR, Hausman GJ, Czaja K. Leptin: a metabolic signal affecting central regulation of reproduction in the pig. *Domest Anim Endocrinol*. 2005;29(1):186–92. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.02.024> PMID: [15927773](#)
68. Gonzalez RR, Cherfils S, Escobar M, Yoo JH, Carino C, Styer AK, et al. Leptin signaling promotes the growth of mammary tumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R2). *J Biol Chem*. 2006;281(36):26320–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601991200> PMID: [16825198](#)
69. Sucajtyś-Szulc E, Goyke E, Korczynska J, Stelmanska E, Rutkowski B, Swierczynski J. Refeeding after prolonged food restriction differentially affects hypothalamic and adipose tissue leptin gene expression. *Neuropeptides*. 2009;43(4):321–5. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2009.05.001> PMID: [19539991](#)
70. Liu Y-M, Lacorte J-M, Viguerie N, Poitou C, Pelloux V, Guy-Grand B, et al. Adiponectin gene expression in subcutaneous adipose tissue of obese women in response to short-term very low calorie diet and refeeding. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(12):5881–6. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030886> PMID: [14671185](#)
71. Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD. Effect of short-term fasting and refeeding on transcriptional regulation of metabolic genes in human skeletal muscle. *Diabetes*. 2003;52(3):657–62. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.3.657> PMID: [12606505](#)
72. Green CL, Pak HH, Richardson NE, Flores V, Yu D, Tomasiewicz JL, et al. Sex and genetic background define the metabolic, physiologic, and molecular response to protein restriction. *Cell Metab*. 2022;34(2):209–226.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.12.018> PMID: [35108511](#)

73. Allison DB, Miller RA, Austad SN, Bouchard C, Leibel R, Klebanov S, et al. Genetic variability in responses to caloric restriction in animals and in regulation of metabolism and obesity in humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001;56 Spec No 1:55–65. [https://doi.org/10.1093/gerona/56.suppl\\_1.55](https://doi.org/10.1093/gerona/56.suppl_1.55) PMID: [12088213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12088213/)
74. Ma Z, Parris AB, Howard EW, Shi Y, Yang S, Jiang Y, et al. Caloric restriction inhibits mammary tumorigenesis in MMTV-ErbB2 transgenic mice through the suppression of ER and ErbB2 pathways and inhibition of epithelial cell stemness in premalignant mammary tissues. *Carcinogenesis*. 2018;39(10):1264–73. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy096> PMID: [30107476](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30107476/)
75. Rossi EL, Dunlap SM, Bowers LW, Khatib SA, Doerstling SS, Smith LA, et al. Energy Balance Modulation Impacts Epigenetic Reprogramming, ER $\alpha$  and ER $\beta$  Expression, and Mammary Tumor Development in MMTV-neu Transgenic Mice. *Cancer Res*. 2017;77(9):2500–11. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2795> PMID: [28373182](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28373182/)
76. Pape-Ansorge KA, Grande JP, Christensen TA, Maihle NJ, Cleary MP. Effect of moderate caloric restriction and/or weight cycling on mammary tumor incidence and latency in MMTV-Neu female mice. *Nutr Cancer*. 2002;44(2):162–8. [https://doi.org/10.1207/S15327914NC4402\\_07](https://doi.org/10.1207/S15327914NC4402_07) PMID: [12734063](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12734063/)