

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA
HUMANA**



TESIS DOCTORAL

**“CICLO CELULAR Y APOPTOSIS COMO DIANAS DE
NUEVOS FÁRMACOS ANTITUMORALES. ESTUDIO
EXPERIMENTAL EN CÁNCER DE MAMA”**

Memoria presentada por Dña. Inés Isabel Suárez Vergara para
optar al grado de Doctor Europeo en ciencias Biológicas.

Granada, 6 de Mayo de 2005

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Inés Isabel Suárez Vergara
D.L.: Gr. 847 - 2005
ISBN: 84-338-3396-0

El trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis, ha sido realizado por la licenciada Dña INÉS ISABEL SUÁREZ VERGARA, durante los años 2001-2005 bajo la dirección de:

Dña. ANTONIA ARÁNEGA JIMÉNEZ

D. JUAN ANTONIO MARCHAL CORRALES

Dña. HOURÍA BOULAIZ

Este trabajo ha sido subvencionado por el Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigación Sanitaria) a través de los proyectos no. 01/1092 y 01/928.

Los resultados de esta tesis han sido publicados parcialmente en las siguientes revistas internacionales:

- Current Medicinal Chemistry 2005; 887-916.
- Investigational New Drugs 2004; 22: 379-389.
- Tetrahedron 2003; 59: 5457-5467.
- Tetrahedron 2003; 59: 8017-8026.

Así mismo han sido presentados en las siguientes reuniones científicas:

- XVIIth International Symposium on Medicinal Chemistry (2002).
- Le 3^{ème} Congrès National de Génétique et Biologie Moléculaire (2003).
- XVII Meeting of the European Association for Cancer Research (2002)

Dña. ANTONIA ARÁNEGA JIMÉNEZ, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que D^a Inés Isabel Suárez Vergara ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Ciclo celular y apoptosis como dianas de nuevos fármacos antitumorales. Estudio experimental en cáncer de mama”** durante los años 2001-2005, y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 5 de Mayo de 2005.

Fdo. Antonia Aránega Jiménez

D. JUAN ANTONIO MARCHAL CORRALES, PROFESOR TITULAR
DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD
DE JAEN.

HACE CONSTAR:

Que D^a Inés Isabel Suárez Vergara ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Ciclo celular y apoptosis como dianas de nuevos fármacos antitumorales. Estudio experimental en cáncer de mama”** durante los años 2001-2005, y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 5 de Mayo de 2005.

Fdo. Juan Antonio Marchal Corrales

D^a. HOURÍA BOULAIZ, PROFESORA AYUDANTE DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE JAEN.

HACE CONSTAR:

Que D^a Inés Isabel Suárez Vergara ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Ciclo celular y apoptosis como dianas de nuevos fármacos antitumorales. Estudio experimental en cáncer de mama”** durante los años 2001-2005, y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 5 de Mayo de 2005.

Fdo. Houria Boulaiz

A Sebas, por su comprensión y por haber demostrado paciencia infinita durante la elaboración de esta tesis.

A Ignacio, Javier y Alejandro, por todo el tiempo que no les he podido dedicar.

A mis Padres, por estar siempre dispuestos a ayudarme y porque espero que esta tesis los compense de alguna manera, de todos los malos ratos que han pasado por mí.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a la Profesora D^a. Antonia Aránega Jiménez y al Profesor D. Luis Álvarez Guisado, por el cariño con que me acogieron en este departamento y que siempre me demuestran, y por la posibilidad que me han brindado de realizar la tesis en él.

Un agradecimiento muy especial a las dos personas que más han “sufrido” conmigo el desarrollo de esta tesis y por las que siento un gran aprecio, el profesor D. Juan Antonio Marchal Corrales inductor de la idea, y la profesora D^a Houría Boulaiz siempre buena consejera, los cuales me han demostrado su disponibilidad y ayuda cuando la he necesitado y me han hecho partícipes de su experiencia a nivel científico.

Quisiera agradecer también de todo corazón la ayuda que siempre me han prestado Octavio Caba Pérez, Fernando Rodríguez Serrano y Antonio Martínez Amat, cuya simpatía y cordialidad en todo momento han hecho que las horas pasadas en el laboratorio fueran más pasajeras.

Un agradecimiento también muy sincero a la profesora Esmeralda Carrillo Delgado por sus buenos consejos, su optimismo y su sincera preocupación por el desarrollo de esta tesis. Al profesor José Carlos Prados Salazar que desde que comencé con mi labor investigadora siempre ha tenido palabras de ánimo y consuelo en los momentos de desesperación, y a la profesora Celia Vélez quien con su experiencia ha sabido alentar mi trabajo.

No puedo olvidarme de la profesora Consolación Melguizo, y del Profesor Juan Emilio Fernández por haberse interesado por el desarrollo de esta tesis.

Agradecer también al Profesor Joaquín Campos y a la Dra. Estrella Saniger, el haber sintetizado y proporcionado los fármacos utilizados en esta tesis y por el interés mostrado por su consecución.

Agradecer al Dr. Ángel Concha, a Rosa Montes y a la Dra. Esther Vergara, su desinteresada colaboración en el desarrollo de las investigaciones inmunocitoquímicas y en su interpretación.

Agradecer de igual manera a David Martín del Instituto Sánchez Mora, el trabajo realizado con el microscopio confocal y sus acertadas interpretaciones. A Rosa Méndez del Servicio de Análisis Clínicos del hospital Virgen de las Nieves, su ayuda desinteresada y al Dr. Jaime Lazuén, al Dr. Javier Cifuentes, al Dr. David Porcel y a la Dra. Concepción Hernández, agradecer su asistencia técnica y sus consejos.

Me gustaría agradecer también la colaboración de aquellas personas que de alguna u otra manera han aportado material, ayuda y conocimientos para el desarrollo de esta tesis.

Y por último, quisiera expresar mi agradecimiento de una manera muy especial, a la persona que sin duda ha sido la que ha hecho posible esta realidad, ya que sin su permanente apoyo y sin su generosidad, el desarrollo de este trabajo de investigación no hubiera sido posible. A mi compañera y amiga Ana Isabel Núñez Cepeda, gracias por todo.

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. LA MAMA ESTRUCTURA MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA.....	1
1.1. ANATOMÍA DE LA MAMA.....	1
1.2. HISTOLOGÍA DE LA MAMA.....	2
1.3. MODIFICACIONES EN EL CICLO MENSTRUAL.....	5
1.4. MODIFICACIONES DURANTE EL EMBARAZO Y LA LACTANCIA.....	5
1.5. INVOLUCIÓN POSTMENOPÁUSICA.....	6
2. CÁNCER DE MAMA.....	7
2.1. INCIDENCIA Y PREVALENCIA.....	8
2.2. ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO.....	10
2.2.1. Factores Hormonales.....	12
2.2.2. Factores Ambientales.....	14
2.2.3. Factor Genético y familiar.....	14
2.2.4. Enfermedad benigna de la mama.....	15
2.2.5. Antecedentes personales de cáncer.....	15
2.3. DIAGNÓSTICO.....	15
2.4. PRONÓSTICO.....	18
2.4.1. Factores pronóstico clínicopatológicos.....	18
2.4.2. Factores pronóstico moleculares.....	19
2.4.2.1. Hormonodependencia.....	21
2.4.2.2. Crecimiento del tumor.....	21
2.4.2.3. Oncogenes/factores de crecimiento.....	22
2.4.2.4. Antioncogenes.....	24
2.4.2.5. Apoptosis.....	25
2.4.2.6. Invasión/metástasis.....	26
2.4.2.7. Inestabilidad genómica.....	26
2.4.2.8. Respuesta a quimioterapias.....	26
2.5. TRATAMIENTO.....	27
2.6. MCF-7 COMO MODELO EXPERIMENTAL DE CÁNCER DE MAMA.....	35
2.7. MECANISMOS MOLECULARES RESPONSABLES DE LA PROGRESIÓN TUMORAL.....	36
3. CICLO CELULAR.....	38
3.1. DEFINICIÓN.....	38
3.2. FASES DEL CICLO CELULAR.....	39
3.3. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS NORMALES.....	41
3.3.1. Ciclinas.....	42
3.3.2. Kinasas dependientes de ciclinas (cdk's).....	47
3.3.3. Inhibidores de ciclinas.....	49

3.4.	CICLO CELULAR Y CÁNCER.....	51
3.4.1.	<i>Ciclinas y su relación con el cáncer</i>	52
3.4.2.	<i>Inhibidores de ciclinas y su relación con el cáncer</i>	53
4.	APOPTOSIS	55
4.1.	DEFINICIÓN.....	55
4.2.	MECANISMOS MOLECULARES DE LA APOPTOSIS.....	56
4.2.1.	<i>P53</i>	57
4.2.2.	<i>Familia Bcl-2</i>	58
4.3.	APOPTOSIS EN CÉLULAS NORMALES.....	61
4.4.	APOPTOSIS EN CÉLULAS TUMORALES.....	63
5.	FÁRMACOS QUE ACTUAN SOBRE EL CICLO CELULAR Y LA APOPTOSIS	65
5.1.	FÁRMACOS MODULADORES DEL CICLO CELULAR.....	65
5.2.	INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR AGENTES QUÍMICOS NATURALES Y FARMACOLÓGICOS.....	68
5.3.	ANTIMETABOLITOS DE PURINAS Y PIRIMIDINAS.....	71
5.3.1.	<i>5-FU</i>	73
5.3.1.1.	<i>Timidilato sintetasa</i>	75
5.4.	NUEVOS FÁRMACOS DERIVADOS DEL 5-FU.....	77
5.4.1.	<i>Ftorafur</i>	79
5.4.2.	<i>Capecitabina</i>	80
5.4.3.	<i>Aciclonucleósidos pirimidínicos</i>	81
6.	NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS SELECTIVAS FRENTE A DIANAS MOLECULARES	82
6.1.	ANTICUERPOS MONOCLONALES DIRIGIDOS.....	82
6.2.	TERAPIA GÉNICA.....	83
6.3.	NUEVOS FÁRMACOS SELECTIVOS FRENTE A CICLO CELULAR Y APOPTOSIS.....	86
II.	OBJETIVOS	88
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	90
1.	CULTIVOS CELULARES	91
1.1.	LÍNEA CELULAR.....	91
1.2.	CONDICIONES DE CULTIVO.....	91
1.3.	MÉTODO DE CONGELACIÓN CELULAR.....	91
1.4.	MÉTODO DE DESCONGELACIÓN CELULAR.....	92
2.	AGENTES FARMACOLÓGICOS	92
2.1.	5-FLUOROURACILO (5-FU).....	92

2.2.	FTORAFUR	93
2.3.	PROFÁRMACOS DEL 5- FU.....	93
3.	TRATAMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR MCF-7 CON LOS FÁRMACOS	97
4.	ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	98
4.1.	CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (CI ₅₀)	98
4.2.	CURVAS DE CRECIMIENTO.....	98
4.2.1.	<i>Primer método</i>	98
4.2.2.	<i>Segundo método</i>	99
4.3.	PROLIFERACIÓN CELULAR.....	99
5.	ANÁLISIS DE DISTRIBUCIÓN DEL CICLO CELULAR	100
5.1.	FIJACIÓN DE LAS CÉLULAS	100
5.2.	TINCIÓN DE LAS CÉLULAS.....	100
6.	ENSAYOS DE APOPTOSIS.	100
6.1.	ESTUDIO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	101
6.2.	ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL	101
7.	OBTENCIÓN DE ADN.....	102
7.1.	EXTRACCIÓN DE ADN	102
7.2.	CUANTIFICACIÓN DE ADN.....	102
7.3.	DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN	103
7.4.	ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA	103
7.4.1.	<i>Preparación del gel de agarosa</i>	103
7.4.2.	<i>Electroforesis</i>	103
8.	ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LAS CÉLULAS	104
8.1.	MICROSCOPIA ÓPTICA.....	104
8.2.	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	104
8.3.	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	105
8.3.1.	<i>Fijación de las células</i>	105
8.3.2.	<i>Inclusión de la muestra</i>	105
8.3.3.	<i>Método de tinción</i>	106
9.	DETERMINACIÓN DE LOS MARCADORES CELULARES MEDIANTE INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA.....	107
10.	ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO	108
10.1.	PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS	108
10.2.	DETECCIÓN INMUNOCITOQUÍMICA.....	108
11.	OBTENCIÓN DE ARN.....	109

11.1.	EXTRACCIÓN DE ARN.....	109
11.2.	CUANTIFICACIÓN DE ARN.....	109
11.3.	DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ARN	110
12.	TRANSCRIPTASA REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).....	110
12.1.	TRANSCRIPTASA REVERSA	110
12.2.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	111
IV.	RESULTADOS.....	113
1.	ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.....	114
1.1.	ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR EN LA LÍNEA MCF-7 INDUCIDA CON AGENTES FARMACOLÓGICOS.....	114
2.	ANÁLISIS DE DISTRIBUCIÓN DEL CICLO CELULAR	119
2.1.	EFFECTOS DE LOS COMPUESTOS DEL GRUPO I SOBRE EL CICLO CELULAR	121
2.2.	EFFECTOS DE LOS COMPUESTOS DEL GRUPO II SOBRE EL CICLO CELULAR	123
3.	ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LA LÍNEA MCF-7 DE CÁNCER DE MAMA.....	127
3.1.	5-FLUOROURACILO.....	128
3.2.	FTORAFUR	129
3.3.	COMPUESTOS DEL GRUPO I.....	130
3.4.	COMPUESTOS DEL GRUPO II.....	135
4.	ENSAYOS DE LA INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA O APOPTOSIS	137
4.1.	ESTUDIO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	137
	4.1.1. <i>Compuestos del grupo I</i>	137
	4.1.2. <i>Compuestos del grupo II</i>	138
4.2.	ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL	142
4.3.	ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN.....	145
5.	ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE LA LÍNEA MCF-7 SIN INDUCIR E INDUCIDA CON FÁRMACOS.....	147
5.1.	ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA.....	147
5.2.	ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	150
5.3.	ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	157
6.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES CELULARES EN LA LÍNEA MCF-7 SIN INDUCIR E INDUCIDA CON FÁRMACOS	161

6.1.	ESTUDIO MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA	161
6.2.	ESTUDIO MEDIANTE INMUNOCITOQUÍMICA	168
6.3.	ESTUDIO MEDIANTE TRANSCRIPTASA REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).....	172
V.	DISCUSIÓN	174
VI.	CONCLUSIONES.....	197
VII.	BIBLIOGRAFÍA	200

I. INTRODUCCIÓN

1. LA MAMA ESTRUCTURA MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA

1.1 ANATOMÍA DE LA MAMA

La mama es un órgano que presenta grandes variaciones según la etnia y el individuo. Requiere de un período más prolongado que cualquier otro órgano para completar su desarrollo orgánico y maduración funcional, la cual se consigue en el momento de la lactancia. En el varón la glándula mamaria, carente de los estímulos biológicos, se transforma en un órgano rudimentario. En la mujer sufre diferentes modificaciones durante los diferentes períodos de la vida: nacimiento, pubertad, madurez, embarazo, lactancia y menopausia. Las mamas están situadas en el tórax en la región pectoral o mamaria, son órganos pares y se hallan entre la piel y la cara anterior del músculo pectoral mayor, apoyándose en su mayor parte, sobre éste y, en una pequeña zona de su porción externa, en el músculo serrato mayor (Ruiz, 1993; Russo y Russo, 2000).

La mama completamente desarrollada de una adulta joven, tiene forma de un segmento de esfera, con su parte plana adaptada a la pared torácica a ambos lados de la región esternal; ocupando, en sentido longitudinal, desde la segunda a la sexta costilla y lateralmente hasta la línea axilar media, estando separadas entre sí mediante un surco. La zona más prominente de la mama está constituida por la areola y el pezón. El pezón es una prominencia de aspecto papilar o cilíndrico, de superficie rugosa y con pequeñas depresiones en su vértice que constituyen la desembocadura de los conductos galactóforos. La areola, en cuyo centro se encuentra el pezón, está recubierta por una piel fina y pigmentada de forma anular de tres a cinco centímetros de diámetro y a su alrededor asientan glándulas sebáceas, sudoríparas y alguna mamaria rudimentaria (Ruiz, 1993; Lester *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2000).

La forma global de la mama, su volumen, dimensión y el aspecto del pezón y areola pueden variar sensiblemente de acuerdo a factores genéticos, estado nutricional y funcional o patológico (García, 2002).

1.2. HISTOLOGÍA DE LA MAMA

La mama no es más que una glándula sudorípara cutánea modificada. Esta glándula exocrina compuesta tubuloalveolar, tiene la función especializada de nutrir al recién nacido. Al corte y de dentro hacia fuera, está formada por tres componentes: el tejido glandular o glándula mamaria propiamente dicha, un revestimiento de tejido conjuntivo adiposo y la envoltura cutánea.

Aunque suele considerarse cada mama como una glándula secretoria única, en realidad, la mama adulta está constituida por 15 a 25 lóbulos que no son macroscópicamente identificables, separados unos de otros por tejido conjuntivo y adiposo, y cada uno de los cuales forma una unidad autónoma llamada lóbulo mamario. Cada uno de estos lóbulos está formado por un sistema de lobulillos y ductos que abocan su secreción al pezón por un mismo conducto colector. Los conductos mamarios reciben nombres diferentes en sus distintas partes, reconociéndose así, desde el pezón y en sentido distal para cada lóbulo, el conducto colector, el seno galactóforo, el conducto galactóforo, los ductos mayores y las unidades terminales ductales, que constituyen los lobulillos mamarios. Este sistema ductal constituye la unidad funcional de la mama, pero la mayor parte de la masa mamaria está constituida por el tejido fibroadiposo acompañante (Romrell, 2000; Marquez y Ordi, 2003).

Los lobulillos están separados unos de otros por un tejido conjuntivo laxo, rico en células y vasos, y pobre en células adiposas, mientras que cada lóbulo está separado de los otros por tejido conectivo denso que posee gran cantidad de células adiposas. El panículo adiposo subcutáneo se adelgaza gradualmente desde la periferia hasta la areola.

La piel que recubre la superficie de la mama, salvo en la zona areolar y en el pezón, no presenta característica particular alguna. Está formada por tejido cutáneo con su epidermis, epitelio plano poliestratificado queratinizado y la dermis (papilar y reticular), que descansan sobre un tejido conjuntivo denso e irregular con vasos y nervios. A nivel de la areola, la piel es más delgada, pigmentada y descansa sobre un sustrato de fibrocélulas musculares lisas en

disposición circular y radial llamado músculo areolar de Sappey. La contracción de este músculo produce la erección del pezón y favorece el vaciamiento de los senos lactíferos durante la lactancia. A nivel del pezón la piel también es muy delgada con numerosas papilas, no tiene folículos pilosos ni glándulas sudoríparas, sólo sebáceas. Las fibras musculares son radiales y constituyen el músculo papilar (García, 2002).

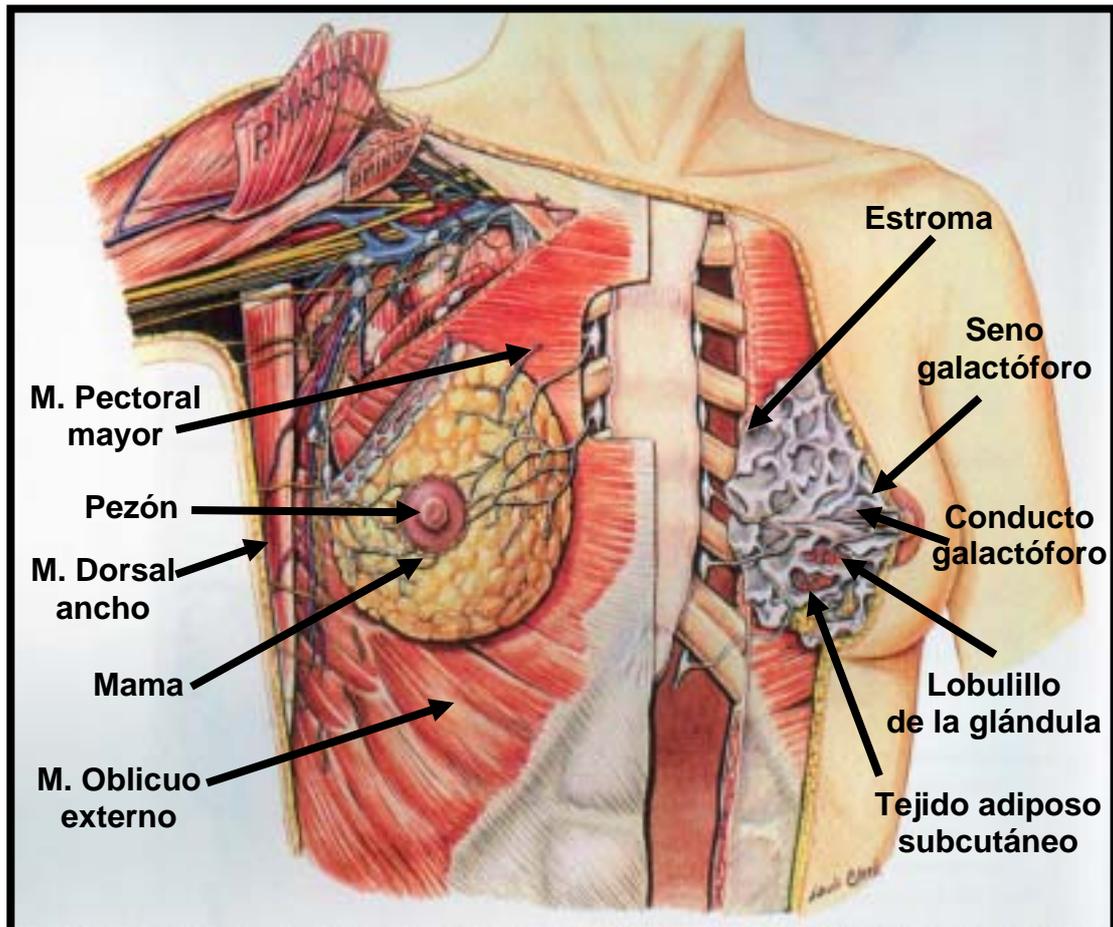


FIG.1. CORTE DE LA MAMA Y PARED TORÁCICA

El desarrollo y el aspecto histológico de la mama sufren durante la vida importantes variaciones relacionadas con influjos hormonales. Las hormonas más involucradas en este proceso son los estrógenos, que promueven el crecimiento y el desarrollo del sistema ductal; la progesterona, que estimula el crecimiento lobulillar, y la prolactina, necesaria para ambos procesos (Marquez y Ordi, 2003). Sin embargo, ninguna hormona, sola o combinada, garantiza el crecimiento y desarrollo óptimo de las mamas. La diferenciación completa de la

glándula también requiere insulina, cortisol, tiroxina, y hormona de crecimiento. Los factores de crecimiento ubicuos también intervienen aunque sus mecanismos de acción moleculares se desconocen (Speroff *et al.*, 2000).

En la mayoría de las niñas, donde el sistema ductal está mínimamente ramificado antes de la pubertad, la primera respuesta al incremento de los niveles de estrógenos, es un aumento de tamaño y pigmentación de la areola, y la formación de una masa de tejido mamario justo por debajo de ella. Esto es debido al crecimiento y ramificación del sistema ductal y lobulillar con proliferación del estroma periductal.

Durante la pubertad tiene lugar un crecimiento alométrico mediado por la prolactina y parcialmente por la hormona del crecimiento (GH), hormona adrenocorticotropa (ACTH) y hormona estimulante del tiroides (TSH). El desarrollo de las yemas mamarias se relaciona con el aumento de estrógenos y del factor semejante a la insulina tipo I (IGF-I). Los estrógenos también estimulan la proliferación del epitelio ductal, células mioepiteliales y células del estroma. La progesterona junto a los estrógenos inicia la formación de los componentes secretores acinares en la porción más distal de los ductos. Con la menarquia, el incremento cíclico de estrógenos y progesterona produce un desarrollo ductal adicional con la formación definitiva de los lóbulos. Ambas hormonas estimulan la proliferación del tejido conectivo que reemplaza al tejido adiposo. Los esteroides ováricos también estimulan la proliferación del tejido adiposo, produciendo el aumento proporcional y la pigmentación de la areola y el pezón (Rosenbloom, 2000; Larrad, 2002).

La diferenciación mamaria completa es un proceso gradual que tarda muchos años y se puede asumir que en las mujeres que nunca tienen un embarazo nunca llegan a completarla (Russo y Russo, 2000).

Durante la edad reproductiva, la mama presenta cambios muy notables entre su estructura en reposo y su estructura durante los períodos de gestación y de lactancia. La mama se considera un efector que responde a las influencias cambiantes del ciclo menstrual y a la involución relacionada con el climaterio.

1.3. MODIFICACIONES EN EL CICLO MENSTRUAL

Se han descrito en la mama en reposo una serie de cambios morfológicos cíclicos, que seguirían los cambios hormonales del ciclo menstrual. Durante el ciclo menstrual la mama aumenta de volumen durante la fase lútea y, en el período premenstrual tiene lugar un aumento de densidad, nodularidad y sensibilidad (Larrad, 2002). Las diferencias cíclicas más obvias son la existencia en la fase proliferativa de actividad mitótica en las células epiteliales, con luces colapsadas en los ductos y un estroma más denso, mientras que en la fase postovulatoria se observa un estroma edematoso, luces glandulares abiertas y con secreción, ausencia de actividad mitótica y vacuolización de las células mioepiteliales (Marquez y Ordi, 2003). Este efecto de edematización es mediado en parte por el progresivo incremento de los estrógenos.

1.4. MODIFICACIONES DURANTE EL EMBARAZO Y LA LACTANCIA

Durante el embarazo, la mama expuesta a una serie de influjos hormonales, sufre un dramático incremento de tamaño, caracterizado por una marcada ramificación de los ductos y diferenciación de las yemas terminales para formar los alvéolos que se agrupan constituyendo los lóbulos. Se produce, además, un cúmulo progresivo de material de secreción, que comienza en el segundo trimestre de la gestación, y una atenuación de la capa de células mioepiteliales. Hacia el final del embarazo se aprecian vacuolas secretoras en las células epiteliales y, aunque dentro de los conductos puede observarse material secretor, la lactación no se produce hasta después del parto (entre el segundo y el quinto día).

La mama lactante presenta una marcada prominencia de los cambios gestacionales (distensión de los acinos, atenuación de la capa de células mioepiteliales), junto con la presencia de vacuolización de las células epiteliales y secreción luminal. Los cambios lactacionales inician su regresión siete a diez días tras finalizar la estimulación del pezón, pero la mama no vuelve a adoptar por completo sus características de reposo hasta que no han transcurrido tres o

cuatro meses (Lester *et al.*, 1999; Marquez y Ordi, 2003). Este proceso de mamogénesis es dependiente de una serie de interacciones hormonales, (Larrad, 2002; Lombardía y Fernández, 2002; Santonja y Sanz, 2003) entre las que destacamos:

- Lactógeno placentario o prolactina, que además de estimular el crecimiento y la maduración de los acinos a alvéolos, promueve la síntesis de las proteínas de la leche, la lactosa y el metabolismo lipídico.
- Estrógenos, cuyo papel en este proceso parece secundario, estimulando la proliferación de conductos, e induciendo la aparición de receptores de progesterona y prolactina .
- Progesterona, que aunque estimula el desarrollo lobuloalveolar parece también antagonizar los efectos terminales inducidos por la prolactina, ya que los niveles elevados de progesterona producen un bloqueo selectivo de la síntesis de lactosa y de la de proteínas.
- Cortisol, que potencia la acción de la prolactina en la diferenciación mamaria.
- Insulina, hormona del crecimiento, glucocorticoides suprarrenales, que permiten la acumulación de colágena tipo IV, y se requieren para contar con los aminoácidos, ácidos grasos, glucosa y calcio necesarios para la producción de leche.

1.5. INVOLUCIÓN POSTMENOPÁUSICA

Tras la menopausia, la mama inicia un proceso de involución de sus elementos parenquimatosos, originado por la disminución de la secreción ovárica de estrógenos y progesterona, con disminución del número de acinos y atrofia y atenuación de las células epiteliales, engrosamiento de la membrana basal y transformación del estroma periductal en un tejido colágeno denso (Larrad, 2002; Marquez y Ordi, 2003). La regresión postmenopáusica es un

proceso gobernado por un aumento de la apoptosis, al igual que ocurre durante las fases del ciclo menstrual y la involución postlactacional.

2. CÁNCER DE MAMA

Habitualmente se utiliza de forma indistinta los términos cáncer, neoplasia y tumor. La enfermedad que denominamos cáncer se define por 4 características que describen la forma en que las células cancerosas actúan de modo distinto a las células normales de las que proceden:

1º) Clonalidad: el cáncer se origina de una única célula progenitora que prolifera y da lugar a un clon de células malignas.

2º) Autonomía: el crecimiento no es regulado de forma adecuada por las influencias bioquímicas y físicas normales del ambiente.

3º) Anaplasia: existe una ausencia de diferenciación celular normal y coordinada.

4º) Metástasis: las células cancerosas tienen la capacidad de crecer y diseminarse a otras partes del cuerpo.

Estas propiedades pueden ser expresadas por las células normales no malignas durante épocas adecuadas, por ejemplo durante la embriogénesis, no obstante en las células cancerosas, estas características tienen un grado inapropiado o excesivo. Los tumores benignos son clonales y tienen un cierto grado de autonomía, pero permanecen diferenciados y no metastatizan. El proceso mediante el que una célula normal se convierte en una célula maligna que presenta estas características se denomina transformación maligna (Isselbacher *et al.*, 1994).

El cáncer ha sido definido como un crecimiento neoplásico que tiene la capacidad de invadir los tejidos circundantes y diseminarse por la corriente

sanguínea y/o linfática. Los tumores pueden originarse en cualquier célula del organismo, pero es raro observar tumores a partir de células cuyo índice mitótico es bajo o nulo. Algunos proceden de una única estirpe celular, pero, el pleiomorfismo y la variabilidad son las propiedades más comunes a las células cancerosas.

El cáncer de mama es una neoplasia, que se presenta con mayor frecuencia en los tumores de estirpe epitelial (en el epitelio ductal en un 70-80% de los casos y en el lobulillar en un 5-10%), aunque cualquiera de los tejidos que componen la mama puede albergar un cáncer. En la actualidad se emplean de forma generalizada los términos cáncer y carcinoma aplicados a los tumores epiteliales malignos (Ruiz, 1993).

Desde el punto de vista biológico el cáncer de mama es una enfermedad altamente heterogénea lo cual a su vez se correlaciona con las distintas formas histopatológicas, los diversos grados de velocidad de crecimiento, las variaciones en la capacidad de dar metástasis, las distintas respuestas a terapias hormonales, etc. Todas estas variaciones son un reflejo (fenotipo) de las diversas modificaciones a nivel genómico que han ocurrido durante el proceso de transformación tumoral: alteraciones recesivas de antioncogenes o genes supresores de tumores, con pérdida de sus funciones inhibitoras, y alteraciones dominantes en oncogenes, que habitualmente tienen como resultado una ganancia de sus funciones estimuladoras, (Ciocca y Gago, 2000).

2.1. INCIDENCIA Y PREVALENCIA

El cáncer de mama es la neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia en la mujer y la segunda causa de muerte por cáncer. Es más frecuente en Estados Unidos, Canadá y países de Europa septentrional; se observa con menos frecuencia en Asia, América Latina y África. Dentro de cada país las zonas urbanas tienen mayor incidencia y mortalidad por cáncer de mama que las zonas rurales, lo que iría a favor de que los factores ambientales

desempeñan un papel importante en la génesis de esta enfermedad (Aguilar y Barrón, 1998).

La incidencia de la enfermedad se ha incrementado de forma importante en las últimas décadas, de manera que el riesgo de desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida es de un 12,2% (una de cada ocho mujeres). La mayor incidencia de enfermedad la presentan las mujeres de raza blanca, y es menos frecuente entre las mujeres de raza negra, y menor aún entre las de origen asiático (Zamora *et al.*, 2001). Por otro lado, las tasas de mortalidad por esta neoplasia ajustadas a la edad se han mantenido constantes. El riesgo de muerte por cáncer de mama a lo largo de la vida es de un 3,6% (una de cada 282 mujeres) (Falcón y Falcón, 2002).

En las mujeres españolas, la tasa de incidencia del cáncer de mama en 1990 fue de 46,2 casos por 100.000 /habitantes /año, con una tasa de 17,2 muertes, siendo el tumor que más mortalidad tiene entre el sexo femenino. En el resto de los países occidentales las cifras son aún más elevadas (Zamora *et al.*, 2001). En Estados Unidos en el año 2000 el cáncer de mama supuso el 15% de las muertes por cáncer entre las mujeres.

Los diversos registros poblacionales existentes en España indican una amplia variabilidad en la incidencia de cáncer de mama en el período 1988-1992, siendo la más alta la de Navarra (61,7) y la más baja, la de Granada (37,4), mientras que en el período 1994-1995 la tasa más alta correspondía a Girona (Xercavins *et al.*, 2003). La tendencia de la incidencia es al aumento leve pero progresivo en la mayoría de países, con un incremento mayor en aquellas poblaciones que tenían previamente las tasas más bajas.

La frecuencia de cáncer de mama aumenta con la edad hasta la menopausia y posteriormente continúa elevándose pero a menor velocidad (Guinee, 2000; Zamora *et al.*, 2001; Falcón y Falcón, 2002; Xercavins *et al.*, 2003). Casi el 77% del total ocurre en mujeres de más de 50 años; sólo el 6,5% del total ocurre en menores de 40 años y el 15%, en menores de 50. El riesgo de una mujer de 70 años es casi 16 veces mayor que el de una de 40. Sin

embargo, después de la menopausia y aunque la tasa de incidencia continúa aumentando, el aumento es menos dramático que antes de la menopausia (Speroff *et al.*, 2000). En la Unión Europea la mortalidad por cáncer de mama disminuyó un 7% entre 1988 y 1996. Esto podría explicarse por los grandes avances en el diagnóstico y tratamiento en mujeres menores de 70 años, así como por una posible mejoría en la supervivencia tras el cribaje del cáncer de mama. La supervivencia depende fundamentalmente de la diseminación tumoral (Aguilar y Barrón, 1998). En todos los países de Europa Occidental, la mortalidad por cáncer de mama entre los 20-49 años ha disminuido. En los países de Europa del Este el patrón es contradictorio, y son los países que presentan, por otra parte, los porcentajes más bajos de cáncer de mama. Del mismo modo, en el grupo de 50-69 años la mayoría de países de Europa occidental, muestran una caída de la mortalidad, con un promedio del 8,6% en la Unión Europea. En Europa del Este los valores son estables o ascendentes. A la edad de 70-79 años, la disminución global en la Unión Europea fue del 4% (Xercavins *et al.*, 2003).

En los últimos diez años se ha comenzado a apreciar una reducción importante de las tasas de muerte por esta enfermedad. Las razones para esta disminución no están completamente claras, pero se sospecha que varios factores han podido contribuir: la generalización de las campañas de detección precoz, los mejores tratamientos loco-regionales, los tratamientos quimioterápicos adyuvantes y, por último, el uso generalizado del tamoxifeno.

2.2. ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

Los estudios actuales acerca de la carcinogénesis han alcanzado una serie de puntos clave relacionando los factores causantes de las neoplasias con las modificaciones que aparecen a nivel genético. Entre estos factores, se pueden citar: los virus, las radiaciones ionizantes, la contaminación ambiental y el envejecimiento de la población. Se desconoce cuál es el primer paso en el desarrollo tumoral y si la evolución es escalonada desde la hiperplasia atípica al carcinoma *in situ* y posteriormente hasta la invasión a distancia.

En general se cree que el inicio del cáncer de mama es el resultado de la proliferación celular incontrolada y/o apoptosis aberrantes, como consecuencia de la acumulación de lesiones genéticas que dan lugar a alteraciones que activan los protooncogenes e inactivan los genes supresores de los tumores. Las alteraciones genéticas, a su vez, pueden ser heredadas como mutaciones de la línea germinal o como mutaciones somáticas adquiridas. Estas últimas podrían ocurrir como resultado de la exposición a carcinógenos ambientales, ya sean físicos (ej. Radiaciones ionizantes excesivas), químicos (ej. hidrocarburos policíclicos, nitrosoureas) y/o biológicos (ej. virus) (Martínez, 1995 ; Russo y Russo, 2000).

El factor hormonal, representado fundamentalmente por el estímulo estrogénico, desempeña un importante papel en la génesis del cáncer de mama. Los estrógenos actúan como promotores o inductores del crecimiento del cáncer de mama sólo cuando la transformación maligna ya se ha iniciado (González, 2000).

El devenir de una célula normal a tumoral transcurre por mecanismos no conocidos, pero que parece estar relacionado con dos procesos opuestos: desdiferenciación y envejecimiento (Iglesias y Veiras, 2000). No hay un patrón definido en los cambios bioquímicos que acompañan a una manifestación tumoral, pero se puede realizar una enumeración de los mismos:

- 1º) Aumento del catabolismo glucídico.
- 2º) Modificación del metabolismo lipídico.
- 3º) Aparición de vías metabólicas no usuales.
- 4º) Modificación del metabolismo proteico:
 - Aumento de la síntesis de ácidos nucleicos.
 - Aparición de las isoenzimas fetales.
 - Desarrollo de antígenos tumorales.

Existen una serie de factores que pueden aumentar o disminuir el riesgo de cáncer de mama, aunque un factor de riesgo no es suficiente para que

aparezca este tumor ni es equivalente a un factor causal. Es claro que la etiología es desconocida.

El 80% de los cánceres de mama no tienen riesgo explicado, aunque aparentemente el cáncer de mama depende de una conjunción de ellos.

Dos grandes grupos de factores de riesgo íntimamente relacionados se consideran los más importantes. Por un lado están los **factores hormonales** y por otro se encuentran los **factores ambientales** entre los que se incluyen aspectos como la dieta, xenoestrógenos, los hábitos tóxicos etc, que van a influir en el riesgo de padecer cáncer de mama a través de las modificaciones que ejercen en el perfil hormonal. Otro factor importante aunque poco significativo desde el punto de vista estrictamente numérico, es el **factor genético y familiar**, ya que nos puede ayudar a comprender algunos mecanismos del desarrollo tumoral. También se pueden considerar factores de riesgo la **patología mamaria benigna** y los **antecedentes personales de cáncer**.

2.2.1. Factores Hormonales

La *edad* y el *sexo* son los factores de riesgo más importantes, ya que el riesgo de cáncer de mama aumenta conforme va aumentando la edad, y el 99% de los cánceres de mama aparecen en mujeres (Zamora *et al.*, 2001).

La *menarquia precoz* y la *menopausia tardía* son factores de riesgo en la mujer al existir una actividad ovárica más prolongada en estas mujeres. La *menopausia precoz* tiene un fuerte efecto protector del cáncer de mama, mientras que el riesgo aumenta un 50% si la menopausia ocurre después de los 55 años (Aguilar y Barrón, 1998).

Las mujeres *nulíparas* tienen un mayor riesgo que las que han tenido hijos aunque parece desaparecer después de los 45 años.

En un *embarazo a término*, la diferenciación que experimenta el tejido mamario como consecuencia de los múltiples cambios hormonales, confiere a estas células diferenciadas una mayor resistencia a la transformación maligna, mientras que en un *embarazo incompleto*, la mama sólo se expone a los niveles elevados de estrógenos del principio de la gestación, lo que puede ser responsable del mayor riesgo observado en estas mujeres (Guinee, 2000).

Algunos autores consideran que si la *lactancia materna* es prolongada se reduce el riesgo de cáncer de mama en la mujer premenopáusica aunque en la actualidad los estudios sobre lactancia materna ofrecen resultados contradictorios (Xercavins *et al.*, 2003).

El establecimiento de *ciclos ovulatorios regulares* presenta una fuerte asociación con el riesgo de aparición de cáncer de mama, mientras que ciclos menstruales menores de 26 días o mayores de 39 días disminuyen este riesgo (Winer *et al.*, 2001).

El *ejercicio físico* se ha asociado con una disminución del riesgo de cáncer de mama ya que puede disminuir el número de ciclos ovulatorios.

En cuanto a la *administración de hormonas exógenas* en forma de *tratamiento hormonal sustitutivo* y de *anticonceptivos orales* el riesgo de cáncer de mama no se ha establecido, ya que los resultados son dispares y contradictorios. Se tiende a comparar el efecto cuantitativo de la terapia hormonal sustitutiva, con la prolongación de la edad de la menopausia, por lo que existiría un aumento de la mortalidad por cáncer de mama debido al uso de hormonas. Sin embargo, los estudios han indicado una disminución del riesgo en la mortalidad por cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas usuarias de hormonas. Según Hulka *et al.* (1994), el uso de la estrogénoterapia sustitutiva postmenopáusica, puede producir un aumento leve en el riesgo de cáncer de mama que decae después de suspendido el consumo. El riesgo máximo se observa en las pacientes que utilizaron estrógenos durante más de quince años. También existen diversos informes que indican que las mujeres en las que se desarrolla un cáncer de mama mientras están recibiendo terapia

estrogénica sustitutiva parecen tener un mejor pronóstico que las mujeres que no han recibido estrógenos (Palacios, 2002). En cuanto a los anticonceptivos orales por sí mismos, quitando los factores de riesgo asociados (retraso del primer embarazo o no existencia del mismo, tipo de alimentación, etc), no parecen aumentar el riesgo relativo de cáncer de mama (Fernández y Lombardía, 2002).

2.2.2. Factores Ambientales

Clásicamente se ha hablado de *factores dietéticos* como el consumo de grasa e ingesta de alcohol como factores de riesgo de esta enfermedad. El etanol parece aumentar el riesgo, probablemente por el aumento de los niveles de estradiol en la fase periovulatoria. Sin embargo en cuanto a la ingesta de grasa no hay estudios concluyentes, en la mayoría no parece haber asociación entre riesgo de cáncer de mama y el consumo de grasa en adultos, aunque no se descarta un efecto durante la infancia o la adolescencia y en la postmenopausia (Falcón y Falcón, 2002).

El *tabaco* parece que sí aumenta el riesgo relativo e incluso algunos trabajos describen el aumento de la agresividad del tumor (Zamora *et al.*, 2001).

La *exposición a radiaciones ionizantes* es un factor de riesgo dependiendo de la dosis total y de la edad de exposición.

Los *xenoestrógenos* pueden actuar modificando la producción y el metabolismo de los estrógenos, por lo que pueden tener su papel en el aumento de cáncer de mama en las sociedades industrializadas (Xercavins *et al.*, 2003).

2.2.3. Factor Genético y familiar

Los factores hereditarios representan un 30% en los tumores diagnosticados antes de los 30 años, y entre un 5-10% del total de los cánceres de mama. Respecto al riesgo familiar se ha estimado en un 20-30% de los

casos (Lynch *et al.*, 2000). Existen tres genes asociados a cáncer de mama: BRCA1, BRCA2 y BRCA3, así una única mutación en BRCA1 por ejemplo, aumenta el riesgo en las mujeres de desarrollar cáncer de mama, y también se sabe que cánceres de mama asociados a BRCA1, son tumores altamente proliferantes y de mayor grado (Dahiya y Deng, 1998). En algunos estudios morfológicos se ha sugerido que tumores BRCA1 difieren de tumores BRCA2 y de cáncer de mama esporádico (Osin y Lakhani, 1999).

2.2.4. Enfermedad benigna de la mama

Las lesiones benignas no proliferativas, no se asocian a un mayor riesgo de cáncer de mama, sin embargo, las lesiones proliferativas sin atipias conllevan un pequeño riesgo (Guinee, 2000).

2.2.5. Antecedentes personales de cáncer

Las pacientes tratadas por un tumor primario de mama tienen un riesgo de desarrollar un segundo cáncer de mama de 3 a 5 veces más alto que la población general al igual que si hay antecedentes de carcinoma de ovario, carcinoma endometrial o cáncer de colon (Winer *et al.*, 2001).

2.3. DIAGNÓSTICO

Por la historia natural del cáncer de mama, se sabe, que desde las lesiones precancerosas hasta su diseminación sistémica transcurren de diez a quince años como media, y que existe una fase preclínica en la que el tumor es detectable, la cual dura de uno a tres años. Es en esta fase en la que se practica fundamentalmente el diagnóstico precoz, el cual pone de manifiesto tumores localizados y muchas veces ocultos de menos de 1-2 cm, sin afectación ganglionar, lo cual disminuye significativamente la mortalidad en mujeres de 40 a 65 años (Román *et al.*, 1998).

La principal posibilidad de alterar la evolución natural del cáncer de mama, es conseguir un diagnóstico temprano, en estadíos precoces, cuando el

pronóstico de curación es excelente. El correcto enfoque de una mujer con sospecha de padecer un cáncer de mama incluye la confirmación diagnóstica, la evaluación del estadio de la enfermedad y por último la decisión de una estrategia terapéutica. Las tres pruebas de cribado más importantes para la detección precoz del cáncer de mama son: la autoexploración mamaria, el examen clínico y la mamografía (López y Rodríguez, 2002). La mamografía es el método de cribado más efectivo para la detección de lesiones no palpables y cánceres de mama mínimos, pero no es efectiva al 100% (Cristóbal y Quevedo, 1998).

La ecografía es un método de diagnóstico complementario especialmente útil en el diagnóstico y estudio de las lesiones quísticas. La resonancia magnética es la más prometedora de las nuevas técnicas diagnósticas aplicadas al estudio de la mama ya que permite la estadificación de lesiones mal definidas mediante la mamografía o la ecografía, así como para la búsqueda de tumores ocultos en pacientes en las que se sospecha de cáncer de mama. Actualmente existen otras técnicas en estudio y desarrollo: interpretación mamográfica por ordenador, telemamografía, y mamografía digital donde se sustituye la placa radiográfica por una imagen digital que puede ser manipulada para aumentar así su sensibilidad (Zamora *et al.*, 2001).

Una vez establecido el diagnóstico de sospecha por pruebas clínicas y/o de imagen se ha de confirmar dicho diagnóstico mediante citología y/o biopsia, y tras confirmar la naturaleza neoplásica de la lesión ha de realizarse un estudio de extensión para determinar si existe enfermedad a distancia, y en función del estadio de la enfermedad se decidirá la estrategia terapéutica adecuada en cada caso.

Existen dos formas de llevar a cabo el diagnóstico de la lesión mediante el estudio anatomopatológico de la muestra: una se realiza inmediatamente después de obtener la muestra, a fin de recabar información de utilidad para orientar al cirujano, y cuyo estudio sirve primordialmente para distinguir las lesiones benignas de las malignas; y la otra forma o forma diferida, se trata de un estudio extemporáneo, para permitir el estudio pausado, utilizando la fijación

adecuada de la muestra y procediendo al estudio microscópico, una vez obtenidos cortes histológicos permanentes (Grases, 2003).

La mayoría de los cánceres de mama son neoplasias epiteliales puras, es decir carcinomas, y se suelen originar en la unidad ducto-lobulillar terminal. Al proceder de una glándula, se denominan más adecuadamente adenocarcinomas. Existen otros tipos tumorales malignos que no son epiteliales puros como el tumor filoides maligno (mixto epitelial y mesenquimal), o son no epiteliales y muy poco frecuentes como: sarcomas, linfomas, tumores cutáneos, tumor de células granulares, y los tumores metastásicos en la mama. Siguiendo la clasificación histológica de la OMS (1981), de los tumores mamarios malignos, podemos dividir a los *tumores epiteliales* según la clasificación mostrada en la tabla:

In situ	Ductal (CDIS)	Proliferación epitelial que no sobrepasa el límite de la membrana basal, con mitosis más numerosas que en las hiperplasias atípicas, y donde es muy característico el solapamiento nuclear. Se han descrito cinco subtipos de CDIS: <i>comedoniano, sólido, cribiforme, papilar, y micropapilar.</i>
	Lobulillar (CLIS)	Proliferación epitelial de células pequeñas que no sobrepasan la membrana basal, y que van a rellenar ductos terminales y ductúlos, cuyo volumen suele ser mayor que el de los no afectados.
Microinvasores		Existe presencia de invasión focal por células mioepiteliales alrededor de las sospechosas.
Invasores	Ductal	La invasión de los tejidos normales adyacentes es por células epiteliales propias de los conductos mamarios. La mayor parte de la masa tumoral no posee rasgos especiales, excepto tendencia variable a formar estructuras glanduloides y mostrar signos de secreción. Existen dos tipos de carcinomas ductales invasores: <i>inespecíficos y especiales</i> como el <i>tubular, medular, mucinoso, metaplásico, epidermoide, papilar, apocrino, con células gigantes osteoclastoides y con diferenciación endocrina.</i>
	Lobulillar	Se suele diferenciar del ductal, tanto por las características de sus células, como por el patrón de invasión.
	Combinados ductal-lobulillar	
	Inusuales	Tienen una presentación clínica inusual, como el <i>ductal invasor asociado con enfermedad de Paget mamaria, inflamatorio, oculto con metástasis ganglionar, en tejido mamario ectópico, o en la gestación y lactancia.</i>

2.4 PRONÓSTICO

En el cáncer de mama no existe ningún marcador específico, por lo que se han estudiado un gran número de parámetros con el fin de establecer un pronóstico que pueda indicar una terapéutica eficaz y predecir la supervivencia. A pesar de las innumerables investigaciones en este sentido, actualmente no existe un consenso para caracterizar un perfil que determine un número determinado de parámetros con los que poder obtener una sensibilidad y especificidad óptimas para su uso clínico y que explique el curso de la enfermedad en todos los casos de cáncer de mama. El conocer el pronóstico de un tumor es muy complicado pero de suma utilidad para poder planificar el tratamiento y el seguimiento del paciente. En la actualidad, a fin de establecer un índice pronóstico efectivo, se necesita realizar y conjugar criterios clínicos, histopatológicos, biológicos, bioquímicos e inmunohistoquímicos del tumor.

Un *factor pronóstico*, se define, como una medida biológica o clínica que está asociada con supervivencia global o período libre de enfermedad en la ausencia de terapia adyuvante sistémica y que es capaz de proporcionar en el momento del diagnóstico información importante sobre el curso clínico del proceso. Un *factor predictivo*, es una medida asociada con respuesta o carencia de respuesta a una terapia particular permitiendo seleccionar a las pacientes para un adecuado tratamiento. Existen una serie de factores pronóstico analizados por diferentes autores, de los que obtienen similares conclusiones, y que podemos dividir en ***clínicopatológicos*** y ***moleculares***.

2.4.1. Factores pronóstico clínicopatológicos

Históricamente, el tamaño tumoral, junto con la afectación de los ganglios regionales y la presencia de metástasis, se consideraron como únicos determinantes del curso clínico del cáncer de mama.

- El *tamaño tumoral*, referido al máximo tamaño de los componentes invasivos medidos en secciones microscópicas, correlaciona con el número de nodos involucrados histopatológicamente pero tiene independiente significado

pronóstico. Así pacientes con nodos negativos y tamaño tumoral menor de 1 cm, tienen un pronóstico favorable (Styblo y Wood, 2000; Grases, 2003).

- El factor pronóstico mejor establecido es el número de *ganglios linfáticos axilares* positivos, la mayoría de los oncólogos piensan que todas las mujeres con ganglios linfáticos comprometidos deben recibir una terapéutica adyuvante (Galimberti *et al.*, 2000).

- Factores patológicos como *invasión linfática y vascular*, y la *frecuencia de necrosis* son importantes factores pronósticos en series individuales, pero está limitado por pobre reproducibilidad como ocurre con otro factor pronóstico como es el *grado tumoral* (Hemachandran *et al.*, 2002).

- El valor pronóstico de la *angiogénesis* va a depender de la zona del tumor que se evalúa, demostrándose un pronóstico más desfavorable en pacientes con tumores asociados con actividad angiogénica elevada. La densidad de microvasos intratumoral no está asociada con otras variables biológicas como ploidía y cinética celular, expresión de proteína p53, HER-2/neu y receptores de hormona (Arciero *et al.*, 2003). Entre los factores angiogénicos testados a nivel de tejido tumoral, VEGF parece ser el único que proporciona la información pronóstica más relevante (Gasparini, 2001). En cuanto al valor pronóstico de las *micrometástasis* es aún controvertido, parece ser de mal pronóstico en tumores pequeños y, en tumores mayores de 2 cm parece ser que tiene el mismo valor pronóstico que el estado ganglionar (Donegan, 1997).

- Entre los factores clínicos se encuentra la *edad* de los pacientes y el *estado hormonal*, siendo un factor pronóstico adverso en mujeres de menor edad o embarazadas, o en premenopáusicas (Winer *et al.*, 2001).

2.4.2. Factores pronóstico moleculares

Un marcador tumoral se define como una aberración biológica que es expresada por alteraciones bioquímicas o metabólicas que preceden o señalan

la presencia de un tumor. Constituyen un grupo de moléculas involucradas en los eventos de señalización, división, diferenciación y muerte celular (Larrad y Louredo, 2002). Es importante señalar que la mayoría de estos marcadores no son específicos de una enfermedad cancerosa determinada, pudiendo encontrarse en otras patologías distintas. Los marcadores tumorales permiten el estudio de detección de tumores en personas de alto riesgo, establecen el diagnóstico de neoplasia, controlan la eficacia del tratamiento, detectan con prontitud las recidivas y consiguen la inmunodetección de las localizaciones metastásicas utilizando anticuerpos marcados radiactivamente frente a los marcadores (Isselbacher, 1994).

El marcador tumoral ideal debe reunir una serie de características (San Miguel, 1991):

- Debe permitir un diagnóstico precoz, estableciendo diferencias significativas con los enfermos no cancerosos y controles normales.
- Debe ser altamente específico y sensible, presentando correlación con la masa tumoral en el espacio y en el tiempo.
- Debe presentar una fácil determinación analítica y estabilidad en el transporte de muestras.

Para que un marcador tumoral sea eficaz, debe cumplir los siguientes criterios (Hunt *et al.*, 2000):

- 1º) Ser producido por el tumor primario y sus metástasis
- 2º) Ser específico del tumor y no estar presente en trastornos benignos.
- 3º) Detectarse en una etapa temprana del crecimiento tumoral.
- 4º) Reflejar los cambios en el crecimiento celular y estar correlacionado con el tratamiento.
- 5º) Ser mensurable mediante métodos reproducibles.
- 6º) Tener efectividad en relación con el costo.

Los marcadores de cáncer de mama pueden clasificarse según el aspecto biológico sobre el que informan:

2.4.2.1 Hormonodependencia

De las medidas bioquímicas, los factores pronóstico moleculares más importantes son la presencia o ausencia de *receptores de estrógenos (RE)* y *receptores de progesterona (RP)* en el tumor. El status del RE es una medida de capacidad proliferativa y del potencial metastásico, además de ser un factor predictivo para terapia hormonal y también pronóstico (Russo y Russo, 2000). La determinación de estos receptores hormonales se efectúa por métodos bioquímicos o inmunohistoquímicos considerando el porcentaje de células que se tiñen y la intensidad con que lo hacen (Grases, 2003). La positividad para RE y RP es indicadora de tumores menos agresivos y de mejor pronóstico (Styblo, 2000). El 60% de los RE+, responden a la terapia endocrina, mientras que sólo un 10% de los negativos lo hace. Si el tumor además de ser RE+, es RP+, responde un 77% de las veces a dicha terapia. Sólo un 10% de los RE negativo y RP negativo responden a la terapia (Calero, 2003).

Existen otros factores pronóstico moleculares de segunda generación que surgieron con posterioridad a los receptores hormonales de estrógenos y progesterona. Así la expresión de la proteína *pS2* (inducida por los estrógenos) en el citoplasma de las células tumorales, es indicativa de buen pronóstico y de mejor respuesta al tamoxifeno; La expresión de *bcl-2* se asocia con la expresión de receptores para estrógenos y se acompaña de mayor supervivencia sin recaída y mejor respuesta al tamoxifeno (López y Roldán, 2002).

2.4.2.2 Crecimiento del tumor

A mayor proliferación mayor agresividad. Se incluyen métodos directos de medida como el *índice de marcación con timidina tritiada*, que indica el porcentaje de células que están sintetizando ADN o en fase S, y, el *grado de ploidía* obtenido por citometría de flujo; como métodos indirectos se utilizan la detección mediante inmunohistoquímica de ciertas proteínas que se expresan

durante fases específicas del ciclo celular, como el *antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)* y el *Ki67* (López y Roldán, 2002).

PCNA es una ciclina que aparece en el núcleo cuando éste se halla en fase S, y su incremento en un tumor se ha relacionado con el riesgo de recidiva (Russo, 1994).

El anticuerpo Ki-67 (MIB-1), es un anticuerpo monoclonal que reacciona con el antígeno nuclear Ki-67 que sólo se detecta en las células en proliferación y no en las que están en reposo. Su síntesis se inicia en la fase G₁ del ciclo celular y adquiere su máxima expresión al final de la fase S. La expresión del antígeno nuclear Ki67, es un indicativo de alto riesgo de recurrencia de la enfermedad (Grases, 2003), que está en relación con el tamaño tumoral, pero no con el grado histológico. Ki-67 se encuentra sobreexpresado en más del 50% de las células tumorales de un paciente.

Existen otros marcadores de proliferación celular como las *ciclinas*, que también son estudiadas mediante técnicas inmunohistoquímicas, y las proteínas que forman parte de regiones organizadoras nucleolares (*AgNOR*), que son estudiadas por técnicas histoquímicas empleando sales de plata. Su análisis toma en consideración el estatus del ciclo celular y tiene significación pronóstica cuando se toma en cuenta la valoración de las células activas o inactivas (Kruger, 2000). El índice mitótico referido al número de células detenidas en fase M, respecto del número total de células, es otro factor pronóstico utilizado en la clínica, puesto que se reduce con el uso de agentes antitumorales (Ikeda *et al.*, 2000).

2.4.2.3 Oncogenes/factores de crecimiento

Los protooncogenes, tienen un papel fisiológico esencial en el tejido normal, estando involucrados, en la regulación de la proliferación celular y la diferenciación. Dichos genes, codifican proteínas, que regulan las rutas de señalización necesarias, para la estructura, crecimiento y actividad mitótica de las células. Así un protooncogen, es un gen celular normal, que cuando se

altera en su estructura o expresión, es responsable del inicio y mantenimiento del fenotipo maligno. Por tanto los oncogenes se refieren a aquellos genes cuya activación puede contribuir al desarrollo del cáncer. La activación de estos oncogenes, puede ser provocada, bien por mutación, por translocación cromosómica, o bien, por amplificación e inactivación de genes reguladores. En general, cualquier alteración de un protooncogen en un tumor maligno indica mayor agresividad y peor pronóstico.

De la multitud de oncogenes identificados, una alta proporción han sido agrupados como factores de crecimiento. Los factores de crecimiento y sus receptores juegan un papel importante en el control de la proliferación celular del cáncer de mama (Dickson y Lippman, 1995).

La expresión del *factor de crecimiento epidérmico Erb-B1* y sus receptores se asocia con un pronóstico desfavorable y resistencia hormonal en pacientes con ganglios linfáticos positivos y negativos (Holbro *et al.*, 2003).

Erb-B2 (oncoproteína HER-2/neu), se encuentra sobreexpresada en un 20% de los casos y se asocia con un pronóstico desfavorable, menor tiempo libre de enfermedad y menor tasa de supervivencia (Hamilton y Piccart, 2000; Lohrisch y Piccart, 2001; Wang y Hung, 2001). En pacientes con ganglios linfáticos positivos donde se coexpresa con receptores para el factor de crecimiento epidérmico, el pronóstico es particularmente malo (Pegram *et al.*, 1998). Esta sobreexpresión de Erb-B2, se traduce también en un incrementado riesgo de metástasis y resistencia a muchos tipos de terapia (Eccles, 2001).

La sobreexpresión de *c-myc* contribuye al desarrollo de cáncer de mama y se asocia con una reducción de la supervivencia libre de enfermedad y de la supervivencia global.

En la actualidad están en estudio otros factores como *IGF (factor de crecimiento insulínico)*, *IGF-r (receptor de IGF)* y *TGF α (factor de crecimiento transformante)*, pero por el momento no hay datos definidos sobre su valor pronóstico (Esteva y Hortobagyi, 2004).

2.4.2.4 Antioncogenes

Los llamados “genes supresores de tumores”, “antioncogenes” u “oncogenes recesivos”, son términos que definen el aspecto específico, de la función que cumplen en las células. Es conocido, que los productos de estos genes inhiben la formación de tumores, y, cuando estos productos son defectuosos, o se pierden en la célula, permiten el desarrollo de un tumor. Las funciones de los genes supresores de tumores, incluyen el control de las actividades normales de la célula, como proliferación, diferenciación y la senescencia. Las alteraciones de estos genes supresores de tumores, como las comentadas en los oncogenes (mutaciones, pérdida de función....), son las responsables del desarrollo del cáncer y así se encuentra una sobreexpresión de estos genes alterados en diferentes tipos de tumores.

Los antioncogenes codifican proteínas, que por distintos mecanismos actúan frenando la proliferación celular. Dos de los más importantes son el *retinoblastoma (Rb)* y el *p53*.

El gen del retinoblastoma (Rb), se localiza en el cromosoma 13q14 y codifica una fosfoproteína nuclear de 105 Kda. Aunque la cantidad total se mantiene constante a lo largo del ciclo celular, el estado de fosforilación de la proteína Rb es ciclo dependiente, siendo esta proteína el principal sustrato de los complejos ciclina-cdk. La proteína Rb se encuentra hipofosforilada en G₁ temprano, y conforme la célula avanza en G₁ se va fosforilando, permaneciendo así en S, G₂, y M. La forma hipofosforilada parece ser la forma funcionalmente activa de Rb. La fosforilación de ésta, conlleva a la liberación del factor de transcripción E2F, que estimulará la transcripción de una serie de genes, que permiten la progresión a través del ciclo celular. La alteración del funcionamiento de pRb, es uno de los hallazgos más comunes en todas las líneas celulares tumorales y en los tumores clínicos (Rodríguez y Rodríguez, 2000).

El gen p53 está localizado en el cromosoma 17p13 y codifica una proteína nuclear de 53 Kda, que en su forma normal se encuentra presente en

muy bajas concentraciones, y juega un importante papel en la supresión tumoral, pudiendo intervenir en el control de la transcripción, ciclo celular y apoptosis (Elledge y Allred, 1998; Jeffrey *et al.*, 2003). Bajo condiciones normales, p53 actúa como un regulador de la división celular, y cuando se daña el ADN, por efectos de quimioterapia o irradiación gamma, se asocia con un rápido incremento en el contenido celular de la proteína (Levine, 1997). Cuando p53 es activado puede interactuar directamente con el ADN para producir la transcripción de numerosos genes como el p21. Esto provoca la detención temporal del ciclo celular en la fase G1 o en la fase G2/M, previa a mitosis, para permitir la reparación del ADN.

El p53 mutado e inactivado está presente en aproximadamente el 50% de las lesiones invasoras de mama, siendo relacionado con mal pronóstico incluso en pacientes con ganglios negativos. Su nivel de expresión es también elevado en lesiones cancerosas preinvasoras, indicando que este antioncogen se inactiva en las etapas tempranas de la oncogénesis mamaria. En pacientes con cáncer de mama se han encontrado anticuerpos anti-p53 que no diferencian a la proteína salvaje de la mutada (Garrido y López, 2000). Lenner *et al.* (1999), llevaron a cabo una evaluación epidemiológica del valor predictivo de autoanticuerpos p53 en cáncer de mama, llegando a la conclusión de que los anticuerpos anti p53 son de importancia para el riesgo de padecer cáncer de mama y el riesgo de morir de cáncer de mama.

2.4.2.5 Apoptosis

Existen otros factores pronóstico relacionados con la apoptosis como el índice apoptótico, la proteína p53, Bax, Bcl-2, etc (Daidone *et al.*, 1999; Sirvent *et al.*, 2004). Un alto *índice apoptótico* se relaciona con características celulares malignas y es indicador de proliferación e invasión celular en cáncer de mama (Lipponen, 1999). *Bcl-2* es una proteína cuya sobreexpresión está asociada con resistencia a la apoptosis. La expresión de bcl-2 se asocia con la expresión de receptores para estrógenos (Linjawi *et al.*, 2004) y se acompaña de mayor supervivencia sin recaída y mejor respuesta al tamoxifeno. Sin embargo su

relevancia en la respuesta a radiación tanto in vivo como in vitro no está aún definida (Belka y Budach, 2002).

El valor pronóstico y predictivo de los marcadores apoptóticos en cáncer de mama no está del todo comprendido, y no hay evidencias suficientes para modificar tratamientos basándose en estos marcadores de la apoptosis (Jager *et al.*, 2002)

2.4.2.6 Invasión/metástasis

Existen determinadas proteínas que están actualmente en estudio, como *nm23*, *uPA* (*activador del plasminógeno de uroquinasa*), *catepsina D*, etc, que juegan un papel importante en el control de la membrana basal y en la motilidad celular e invasividad, pudiendo indicar el potencial metastásico del tumor (Dahiya y Deng, 1998; Coradini y Daidone, 2004).

2.4.2.7 Inestabilidad genómica

La información sobre la inestabilidad genómica la proporcionan entre otros, los microsatélites, la pérdida de heterocigosidad, aberraciones cromosómicas, y la ploidía. Aunque todos estos marcadores, han sido asociados con transformación maligna en cáncer de mama, sin embargo, no se han encontrado evidencias, de la relación causa-efecto con este tipo de cáncer (Stepanova *et al.*, 2003).

2.4.2.8 Respuesta a quimioterapias

La exposición de las células a agentes nocivos químicos produce una rápida e intensa síntesis de *proteínas de choque térmico*, de *GST pi*, *HER-2/neu*, *p53* y *glicoproteína p170* (codificada por el gen *mdr1*). Niveles elevados de las mismas se han asociado con estadíos avanzados, invasión vascular, disminución del período libre de enfermedad y de la supervivencia global. Las Interacciones entre expresión de HER-2, expresión de p53 y dosis de poliquimioterapia, subrayan la complejidad de los marcadores predictivos que pueden confundir los resultados (Thor *et al.*, 1998). En estudios recientes se

tiende a evaluar conjuntamente los valores predictivos de distintos marcadores, tras quimioterapia (Petit *et al.*, 2004).

Siempre hay que tener en cuenta a la hora de elegir un factor pronóstico que el estudio del mismo éste apoyado por una hipótesis biológica probada (basarse en estudios experimentales probados) y evaluarlo en un número adecuado de casos, en un grupo más o menos homogéneo de pacientes y conocer en detalle las técnicas con las que se evaluó, esperando que su utilidad sea confirmada por otros grupos de investigación (De McGuire, 1991).

2.5. TRATAMIENTO

Existen cuatro modalidades de tratamiento: cirugía, radioterapia (RT), quimioterapia (QT) y terapia hormonal (TH). La orientación del tratamiento es multidisciplinar y la toma de decisiones debe implicar a un equipo de cirujanos, ginecólogos, radiólogos, anatomopatólogos, oncólogos y médicos de familia.

La cirugía conservadora de la mama asociada a radioterapia postoperatoria, tiene la misma supervivencia que la mastectomía, aunque con mayor incidencia de recidiva local (Fowble *et al.*, 2000; Veronesi, 2000). El tipo de tratamiento depende de la extensión del tejido extirpado (Pacheco *et al.*, 2000). La mastectomía radical clásica está en progresivo desuso, reservándose a los casos de tumores avanzados fijos al pectoral mayor (Bland y Copeland III, 2000). La mastectomía radical modificada, preservando uno o los dos pectorales, está indicada, especialmente, en pacientes que rechacen la cirugía conservadora o en casos de tumores infiltrantes más agresivos (Román, 1998; Menke *et al.*, 2000; Bland *et al.*, 2000).

Existe un tratamiento neoadyuvante que se administra previamente a la intervención quirúrgica de un tumor, con el propósito principal de reducir la extensión de la cirugía. La quimioterapia (QT) neoadyuvante incrementa la proporción de mujeres que pueden ser tratadas con cirugía conservadora en vez de con mastectomía, mejora la supervivencia de la mujer y puede indicar,

la quimiosensibilidad del tumor (a mayor sensibilidad, mayor probabilidad de que la QT modifique la supervivencia de la paciente), (Chacón y Álvarez, 2002).

El tratamiento complementario o adyuvante del cáncer de mama es aquél que se administra después del tratamiento quirúrgico, con el fin de destruir o impedir el crecimiento de las micrometástasis, cuya existencia se supone, pero no se puede demostrar en el momento de la cirugía (Jonson *et al.*, 2003). Estos tratamientos coadyuvantes se llevan a cabo mediante QT, RT y TH (Pérez y Martín, 1998; Osborne y Ravdin, 2000; Calero, 2003).

La radioterapia se basa en el empleo de radiaciones ionizantes y su interacción con la materia viva, con el fin de destruir un proceso neoplásico. Su objetivo es la irradiación de la zona tumoral, evitando en lo posible los órganos críticos (Moreno y Rodríguez-Escudero, 2003). En pacientes consideradas de alto riesgo tras mastectomía, se administra radioterapia (RT), sobre pared torácica y áreas ganglionares regionales, ya que aumenta la supervivencia global y disminuye la recaída locorregional incluso entre las que reciben QT (Navarrete, 2000; Hagan y Mendenhall, 2000). En aquellas pacientes en las que se ha practicado cirugía conservadora, si no se añade RT, aumenta la tasa de recidivas (Hagan y Mendenhall, 2000). La cirugía conservadora junto con la RT es un tratamiento en estadios precoces con la misma supervivencia que la mastectomía (Lanzós, 1998).

El objetivo de la QT es la destrucción del mayor número de células posibles (Moreno y Rodríguez-Escudero, 2003). Tras el análisis de una serie de estudios randomizados a muy largo plazo, De la Cruz *et al.* (2002), llegan a las siguientes conclusiones:

- La QT complementaria mejora la supervivencia libre de enfermedad y también la supervivencia global.
- La poliquimioterapia es superior a la monoterapia.
- La QT de corta duración es igual de efectiva que la de larga duración.

- La QT complementaria beneficia a las pacientes premenopáusicas y a las postmenopáusicas; a las que tienen ganglios axilares afectados y a las que no.
- la combinación de QT y TH es superior a la utilización de cada una de ellas por separado.

La combinación de QT y TH tiene mayor tasa de respuesta que si se utiliza la quimiohormonoterapia secuencial , aunque el tiempo hasta la progresión y la supervivencia global de las pacientes suele ser igual con quimiohormonoterapia concomitante o secuencial (Márquez y Alba, 1998).

La TH, se aplica en pacientes con receptores para estrógenos o progesterona positivos, con metástasis óseas o en partes blandas, con intervalo libre de enfermedad prolongado, con enfermedad poco sintomática, y en la mayoría de pacientes de edad avanzada (Piera, 1998). Existen diversas opciones con mecanismos de acción distintos que posibilitan el empleo de varias líneas de tratamiento (Cyr y Moulton, 2000).

Existen medidas ablativas entre las que destaca la ovariectomía, la hipofisectomía y la adrenalectomía que van a anular la función normal de estos órganos, aunque en la actualidad estas técnicas están siendo sustituidas por fármacos, como los análogos de la LH-RH y los inhibidores de la aromataasa, que provocan una supresión completa de la actividad ovárica y adrenal, respectivamente.

Según el metaanálisis del “Early Breast Cancer Trialists’ Collaborative Group” publicado en Lancet en 1998, el empleo durante más de tres años de tamoxifeno (compuesto no esteroideo con efectos antiestrogénicos y estrogénicos), beneficia a las pacientes con receptores hormonales positivos tanto premenopáusicas como postmenopáusicas, así como a aquellas con ganglios axilares positivos y negativos, aunque la administración durante períodos mayores de cinco años no se sabe todavía si es beneficiosa. Se observa una reducción anual de la tasa de recaída del 50% y de la de mortalidad en el 16%.

El tratamiento quimioterápico adyuvante locorregional en el cáncer de mama en *estadios I, II, IIIA y operable IIIC*, suele ser un tratamiento multimodal. El grupo internacional de expertos ha propuesto una clasificación de riesgo de tres estadios para las pacientes con ganglios linfáticos axilares negativos. Esta clasificación, ligeramente modificada, se describe a continuación:

Cuadro 1: Categorías de riesgo para mujeres con cáncer de mama y ganglios negativos

	Bajo riesgo: tiene todos los factores enumerados	Riesgo intermedio: riesgo clasificado entre las otras 2 categorías	Alto riesgo: tiene por lo menos 1 de los factores enumerados
Tamaño del tumor	≤1 cm.	1-2 cm.	>2 cm.
Estado de RE o RP	positivo	positivo	negativo
Grado del tumor	grado 1	grado 1-2	grado 2-3

La clasificación original del Grupo internacional de expertos requería también que las mujeres tuvieran 35 años de edad o más para ser incluidas en el grupo de bajo riesgo e incluía a las mujeres de 35 años de edad y más jóvenes en el grupo de alto riesgo.

Cuadro 2: Opciones de tratamiento sistémico adyuvante para mujeres con cáncer de mama y ganglios axilares negativos

Grupo de pacientes	Tratamientos		
	Bajo riesgo	Riesgo intermedio	Riesgo intermedio
Premenopáusica, RE-positivo o RP-positivo	Ninguno o tamoxifeno	Tamoxifeno y quimioterapia, tamoxifeno solo, ablación ovárica, análogo de la GnRH*	Quimioterapia y tamoxifeno, quimioterapia y ablación o análogo de la GnRH*, quimioterapia con tamoxifeno y ablación ovárica o GnRH*, más ablación ovárica sola o con tamoxifeno o GnRH solo o con tamoxifeno
Premenopáusica, RE-negativo o RP-negativo	-	-	Premenopáusica, RE-negativo o RP-negativo
Posmenopáusica, RE-positivo o RP-positivo	Ninguno o tamoxifeno	Tamoxifeno y quimioterapia, tamoxifeno solo	Tamoxifeno y quimioterapia, tamoxifeno solo
Posmenopáusica, RE (-) o RP(-)	-	-	Quimioterapia
>70 años	Ninguno o tamoxifeno	Tamoxifeno solo, tamoxifeno y quimioterapia	Tamoxifeno; considerar quimioterapia si RE- negativo o RP-negativo

Cuadro 3: Opciones de tratamiento para mujeres con cáncer de mama y ganglios axilares positivos

Grupo de pacientes	Tratamientos
Premenopáusica, RE-positivo o RP-positivo	Quimioterapia y tamoxifeno, quimioterapia con ablación ovárica/análogo de la GnRH, quimioterapia con tamoxifeno y ablación ovárica/análogo de la GnRH*, ablación ovárica solo o con tamoxifeno GnRH solo o con tamoxifeno
Premenopáusica, RE-negativo o RP-negativo	Quimioterapia
Posmenopáusica, RE-positivo o RP-positivo	Tamoxifeno y quimioterapia, tamoxifeno solo
Posmenopáusica, RE-negativo o RP-negativo	Quimioterapia
>70 años	Tamoxifeno solo, considerar quimioterapia si receptores negativos

* Esta opción de tratamiento está bajo estudio.

En el cáncer de mama en *estadio IIIB, inoperable IIIC o inflamatorio*, la administración de terapia multimodal con intento curativo es el tratamiento estándar para las pacientes con enfermedad en estadio clínico IIIB. El tratamiento inicial quimioterápico que tiene de base la antraciclina o la terapia que tiene de base taxano es la norma.

Para las pacientes que responden a la quimioterapia neoadyuvante, la terapia local podría consistir en mastectomía total con disección de los ganglios linfáticos axilares seguida de radioterapia postoperatoria a la pared torácica y a los linfáticos regionales. La hormonoterapia debe administrarse a las pacientes cuyos tumores tienen receptores estrogénicos positivos o de estado desconocido.

En el cáncer de mama en *estadio IV, recurrente y metastásico*, A menudo, el cáncer recurrente de mama responde a terapia a pesar de que el tratamiento rara vez cura en este estadio de la enfermedad. Sin embargo, las pacientes con recaídas ubicadas en la pared torácica y el seno pueden sobrevivir a largo plazo con el empleo de la terapia apropiada. Por lo tanto, antes de tratar el cáncer recurrente o metastásico, se debe realizar otra vez la clasificación para evaluar la diseminación de la enfermedad. Al seleccionar la terapia se debe tomar en cuenta el estado de los (RE) y de (RP) así como la positividad del HER2/neu al presentarse la recurrencia y el tratamiento aplicado previamente, si se conoce.

En el cáncer de mama *locorregional recurrente*, las pacientes con recurrencia locorregional en la mama pueden sobrevivir a largo plazo con la terapia apropiada. La recurrencia local en la pared torácica después de una mastectomía, suele ser precursora de una propagación amplia de la enfermedad pero, en un subconjunto de pacientes, puede ser el único sitio de recurrencia. Para las pacientes que integran este subconjunto, la cirugía o la radioterapia pueden ser curativas. Debe pensarse en administrar terapia sistémica a las pacientes que tienen recaídas locorregionales debido al alto riesgo de metástasis posterior.

En la enfermedad en *estadio IV o metastásica*, el tratamiento de la enfermedad sistémica tiene fines paliativos. El tratamiento tiene por objeto mejorar la calidad de vida y prolongarla. El tratamiento para el cáncer metastásico de mama suele comprender la hormonoterapia, la quimioterapia o ambas, con trastuzumab (Herceptin) o sin el. La radioterapia, la cirugía o ambas están indicadas para las pacientes con metástasis sintomática limitada.

Los protocolos de tratamiento sistémico adyuvante, que actualmente se utilizan en el “hospital universitario Virgen de las Nieves” de Granada, para los casos de cáncer de mama no metastásico, son los siguientes:

- ESTADIO PRECOZ (E I-IIA)

-*Quimioterapia*, siempre en pacientes con edad ≤ 35 años, con receptores de estrógeno y/o progesterona (-), G3, tamaño tumoral ≥ 2 cms o afectación axilar. Se utilizarán a ser posible regímenes que contengan antraciclinas.

-a) EC: Epirubicina/Ciclofosfamida 100/600 mg/m² iv, D1, c/21 días x 4 ciclos (Ganglios negativos).

-b) EC y T: Epirubicina/Ciclofosfamida 100/600 mg/m² iv, D1, c/15 días x 4 ciclos seguido de Taxol 175 mg/m² iv, D1 c/15 días x 4 ciclos con soporte de FSCC (Ganglios positivos).

En casos de RE y/o RP (+), se añadirá TH como se indica en el caso de hormonoterapia exclusiva, valorándose en casos de alto riesgo la ablación ovárica con análogos de la LH-RH.

-*Hormonoterapia exclusiva*, pacientes mayores de 35 años, con RE y/o RP (+), G1 y tamaño tumoral ≤ 2 cms. Se podrá utilizar tamoxifeno a dosis de 20 mg/día durante 5 años o el IA anastrozol (Arimidex^R) a dosis de 1 mg/día.

- CÁNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANZADO (E IIB-IIIC)

Quimioterapia primaria en régimen de Epirubicina/Ciclofosfamida 100/600 mg/m² iv, D1, c15 días x 4 ciclos, seguido de Taxol 175 mg/m² iv, D1, c15 días x 4 ciclos, con soporte de FSCC.

Valoración de respuesta clínica:

- Respuesta completa: cirugía conservadora con RT locorregional.
- Respuesta parcial: cirugía conservadora vs MRM.

- No respuesta o progresión tras 3-4 ciclos: mastectomía radical modificada.

Se valorará quimioterapia adyuvante en función de la respuesta patológica del tumor primario y/o afectación axilar.

Trastuzumab (Herceptin[®]) puede añadirse al tratamiento adyuvante/neoadyuvante en pacientes que sobreexpresen Her-2. La duración del tratamiento es de 1 año y se administra cada 3 semanas.

2.6. MCF-7 COMO MODELO EXPERIMENTAL DE CÁNCER DE MAMA

Las líneas celulares de cáncer han sido desde hace décadas de suma importancia para la investigación, siendo usadas como excelentes modelos experimentales, para mejorar la eficacia de diferentes terapias, antes de su uso en pacientes.

Dentro de las líneas de cáncer de mama utilizadas experimentalmente para ensayos *in vitro*, existe una amplia variedad, que se encuentra catalogada por ejemplo, en la European Collection of Cell Cultures (ECACC), cuya dirección es: <http://www.ecacc.org.uk>. Dichas líneas han sido establecidas procedentes de adenocarcinomas (MDA-MB-361, MDA-MB-231, MCF7..), tumores epiteliales (HMT-3522 S1, HMT-3522 S2, HMT-3522 T4-2...) o transformadas (fR2, fR5, SVCT, SVCT-MI2...).

Las células MCF-7, han sido las primeras células de cáncer de mama humano en ser permanentemente mantenidas en cultivo celular. La distribución de la línea celular a laboratorios de todo el mundo, ha conllevado el desarrollo de variedades aparentes de células MCF-7, ya que se observan diferentes características entre células mantenidas en distintos laboratorios. Esta línea es la que más ampliamente se ha utilizado para llevar a cabo estudios experimentales de cáncer de mama. Una de las características de la línea MCF-7 es la de ser salvaje para p53, no expresando la forma mutada, como

ocurre con la línea MDA-MB-361. Una mayoría de estudios establecen que las células MCF-7 no sufren fragmentación apoptótica del ADN aunque muestran aparente inducción morfológica de apoptosis, exhibiendo cambios en la estructura nuclear (Gooch y Yee, 1999).

La línea celular MCF-7, fue derivada de una mujer de raza blanca de 69 años, que sufría de un adenocarcinoma de mama metastásico, y se obtuvo por efusión pleural en el año 1970. Desde entonces ha sido un modelo de sistema prominente para el estudio del cáncer de mama RE+ (Levenson y Jordan, 1997). Las células exhiben algunas características de epitelio mamario diferenciado, incluyendo síntesis de estradiol y expresan receptores de estrógenos originales y variantes, además de receptores de progesterona.

2.7. MECANISMOS MOLECULARES RESPONSABLES DE LA PROGRESIÓN TUMORAL

El desarrollo de un cáncer es autónomo, progresivo e irreversible en la mayor parte de los casos, y si no se toma alguna medida terapéutica, se extiende localmente y, por vía linfática y/o hemática a otros tejidos. Generalmente, esta extensión, la realiza siguiendo este orden: Local, infiltrando y comprimiendo los tejidos vecinos y destruyendo las separaciones naturales; por vía linfática, colonizando los ganglios y por invasión a distancia afectando otros órganos y tejidos, que no tienen que ver con el tejido de procedencia (Iglesias y Veiras, 2000). El desarrollo del potencial metastásico quizá también esté relacionado con procesos mediados por oncogenes y mitogenes.

La *transformación maligna* comienza cuando las proteínas reguladoras normales de una célula, se alteran de manera tal que pierden el control de la división celular. Este fenómeno puede ocurrir por la activación de oncogenes, la pérdida de genes supresores de tumores o por ambos mecanismos (Jardines y Berger, 2000). Una vez que la célula sufre la alteración heredable que le produce insensibilidad al control del crecimiento, genera en los tejidos una subpoblación de células sometidas a una extrema

presión de selección que favorece continuamente el surgimiento de células con potencial aumentado para crecer (Harris,1993). Es posible que estas subpoblaciones de células se encuentren alteradas genéticamente; un pequeño porcentaje de estas células sobrevive y adquieren dominancia sobre otras células normales y tumorales de progresión más lenta (Dickson y Lippmam, 2000).

Una de las particularidades de las células tumorales es la pérdida de diferenciación tisular, comportándose en muchas ocasiones como unas células pluriipotentes y biosintetizando sustancias fetales, lo que puede indicar una especie de rejuvenecimiento, aunque estadísticamente, muchas neoplasias aparecen con más frecuencia en personas de edad avanzada.

Desde el punto de vista molecular, la entrada de una célula en fase proliferativa, necesita de una serie de factores de crecimiento y maduración, así como de receptores de estos estímulos y hormonas. En todo este proceso intervienen una serie de protooncogenes que se van expresando a medida que se cumplen los distintos pasos. Así el control estrogénico de los factores de crecimiento y los componentes de la membrana basal, y la disfunción progresiva de los mecanismos de adherencia intercelulares y entre las células y sus sustratos, desempeñan un papel fundamental en la progresión tumoral (Dickson y Lippmam, 2000).

Los procesos que controlan el crecimiento del cáncer de mama no se limitan al tejido canceroso propiamente dicho, si no que depende de una íntima relación entre el tejido tumoral y los tejidos normales del huésped.

Los pasos esenciales para la formación de una metástasis (similares en todos los tumores) han sido resumidos por Ellis *et al.* (2000), y consisten en los siguientes mecanismos:

1º) Proliferación de las células neoplásicas, tras la transformación neoplásica, sustentada por factores de crecimiento paracrino, o autocrino.

2º) Procesos de neovascularización o angiogénesis.

3º) Regulación a la baja por parte de las células tumorales de la expresión de moléculas cohesivas, aumentando su motilidad y desprendiéndose de la lesión primaria, seguido de la invasión del estroma de la célula huésped.

4º) Desprendimiento y embolización de células tumorales aisladas o conglomerados de células tumorales y su transporte en la circulación.

5º) Adherencia de las células tumorales a células endoteliales capilares o a la membrana basal subendotelial expuesta.

6º) Paso de las células al parénquima orgánico, por extravasación, a través de mecanismos similares a los responsables de la invasión tumoral.

7º) Proliferación en el parénquima orgánico de las células tumorales en respuesta a estímulos de factores de crecimiento autocrinos y paracrinos.

3. CICLO CELULAR

3.1. DEFINICIÓN

Se habla de ciclo celular para describir el proceso que se inicia al término de una división celular y que acaba con el final de la siguiente división. Las células se reproducen mediante un ciclo de división en el que primero se duplica su contenido, y luego se dividen en dos células hijas genéticamente idénticas. Por lo tanto, el tiempo que transcurre desde que una célula se forma por división de una preexistente, hasta que se divide y da lugar a dos células hijas, se conoce como ciclo celular. Los detalles de la división celular pueden variar, pero hay dos requerimientos imprescindibles: que el ADN de la célula madre se replique exactamente y que los cromosomas replicados se segreguen entre las dos células hijas.

En los organismos pluricelulares, la división celular es imprescindible para el crecimiento del organismo y la regeneración de células envejecidas o deterioradas. En los adultos no todas las células diferenciadas tienen la capacidad de dividirse, como ocurre en el caso de células musculares estriadas y las neuronas. Las células madre, se encargan continuamente de formar nuevos ejemplares de su tipo, que ya no tienen capacidad de división, como

ocurre con las células madre de los eritrocitos, linfocitos o los epitelios mucosos de los vertebrados.

3.2. FASES DEL CICLO CELULAR

En las células eucariotas, el ciclo celular se divide en una serie de etapas por las que cronológicamente va pasando la célula, hasta que se produce la división. Básicamente el ciclo celular se divide en dos etapas funcionales (fase M o de mitosis y fase S o de síntesis de ADN) y dos etapas preparatorias (G_1 y G_2). La mayoría de las células duplican su tamaño entre una mitosis y la siguiente (Lundberg y Weinberg, 1999).

La fase G_1 , que transcurre entre el final de una mitosis y el inicio de la síntesis del ADN, es una fase en la que la célula desarrolla una intensa actividad metabólica, aumentando de tamaño y generando nuevos orgánulos (ribosomas, mitocondrias y estructuras membranosas). Igualmente se producen los desoxiribonucleótidos y los enzimas necesarios para la replicación. En esta fase también se inicia la replicación de los centriolos, que no se completará hasta el comienzo de la mitosis, y aumenta el número de microtúbulos. La célula, por lo tanto, aumenta de volumen hasta alcanzar el tamaño de su forma celular típica.

El crecimiento de los tejidos depende principalmente de la duración del ciclo celular, siendo G_1 la fase de duración más variable (unas 11 horas en células humanas de proliferación rápida, con una duración total del ciclo de unas 24 horas) incluso entre células de la misma estirpe y dentro del mismo cultivo. La duración de la fase G_1 parece depender en gran medida de las condiciones de crecimiento celular (Agami y Bernards, 2002). Hay células que cesan por completo su división en condiciones subóptimas de crecimiento y otras que sólo se dividen ocasionalmente, cuando es necesario reemplazar la pérdida de células por lesión o muerte celular, ej: fibroblastos de la piel. En estos casos, si las células permanecen durante un tiempo, que puede ser indefinido, en estado quiescente o de reposo, a esta fase se la denomina G_0 (Viallard *et al.*, 2001). El paso a una célula diferenciada se produce después de

una mitosis o a partir de una célula en fase G_0 . La duración del resto de las fases es prácticamente constante (S: 7-12 h, G_2 : 1-6 h, M: 1-2 h) .

La *fase S*, es la fase de síntesis de ADN y ADN-polimerasa. En esta fase se sintetizan las proteínas histonas, asociadas al ADN en las células eucariotas. Al final de la fase cada cromosoma queda duplicado y formado por dos cromátidas idénticas.

La *fase G_2* o premitótica, es la fase donde se sintetizan las enzimas necesarias para la mitosis. Puede haber cierto crecimiento celular y la fase acaba cuando los cromosomas empiezan a condensarse al inicio de la mitosis. Esta fase proporciona un lapso de seguridad, que permite a la célula confirmar que se ha completado con éxito la replicación del ADN, antes de iniciar la mitosis (Viallard *et al.*, 2001).

La *fase M* (o de mitosis), desarrolla una gran actividad celular y es donde ocurre la división del núcleo (cariocinesis), y sincronizadamente la división celular (citocinesis). Los cromosomas duplicados se distribuyen de manera idéntica en cada una de las células hijas, aunque es frecuente que el contenido citoplasmático no se reparta equitativamente entre las células hijas, pudiendo producir divergencias en los volúmenes de las células hijas superiores al 10% (Lundberg y Weinberg, 1999).

El paso de la fase G_1 a la fase S y el paso de la fase G_2 a la fase M viene controlado por los denominados “*check points*” o *puntos de restricción*, de tal forma que no se puede avanzar en el ciclo hasta que las condiciones no sean apropiadas, o haya inducción por señales extracelulares, de manera que la progresión a través del ciclo celular se para en el punto de restricción y se entra en G_0 . El programa de la fase M se pone en marcha durante la fase G_2 , donde se sintetizan proteínas como la tubulina para que pueda producirse la división física de la célula. Algunos ciclos celulares se regulan en G_2 , como es el caso de los oocitos de vertebrados, que pueden permanecer detenidos en G_2 durante largos períodos de tiempo, hasta que son estimulados hormonalmente, y se activa su paso a fase M.

La coordinación entre las diferentes fases del ciclo celular, depende de un sistema de *puntos de control* y de controles por retroalimentación que evitan la entrada en la siguiente fase del ciclo celular hasta que se haya completado la anterior. Los puntos de control más importantes son dos: uno se encuentra al final de G_1 , permitiendo que se repare el ADN dañado antes de ser replicado en la fase S, y, el otro en G_2 antes de entrar en mitosis. El punto de control en G_2 , detecta el ADN que no ha sido replicado y/o el ADN dañado, generando una señal que evita que comience la fase M antes de que se haya completado la fase S, permaneciendo la célula en G_2 (Lukas *et al.*, 2004).

Existe otro punto de control al final de la mitosis, que supervisa que los cromosomas se alineen correctamente en el huso mitótico, asegurando la distribución de un juego completo de cromosomas a cada célula hija.

En las células normales de mamíferos, la detención en el punto de control de G_1 , está mediada por la acción de una proteína conocida como p53, que se induce rápidamente en respuesta al ADN dañado.

3.3. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS NORMALES

El ciclo celular de todos los eucariotas está controlado por un conjunto de proteínas kinasas o cdk's (kinasas dependientes de ciclinas), responsables de inducir el paso de un estado del ciclo celular a otro. La progresión a través del ciclo celular se lleva a cabo por miembros de cdk's que se asocian con ciclinas específicas (Jonson y Wlaker, 1999; Nigg, 2001).

El paso de la fase G_1 a S, y más concretamente la progresión a través del punto de restricción, se lleva a cabo por complejos cdk/ciclinas (cdk₄/ciclina D y cdk₆/ciclina D), y más tarde, el tránsito se lleva a cabo por el complejo cdk₂/ciclina E, que además se requerirá posteriormente para la síntesis de ADN. La progresión a través de la fase S, se lleva a cabo por el complejo cdk₂/ciclina A. El paso de G_2 a M, está regulado por el complejo cdk₁/ciclina B (Malumbres y Barbacid, 2001).

3.3.1. Ciclinas

El término ciclina fue inicialmente usado para describir una familia de proteínas que tenían un aumento cíclico en su expresión, en diferentes momentos del ciclo celular, y que regulaban la activación de kinasas dependientes de ciclinas.

Las ciclinas se pueden definir, como proteínas activadoras de serín/treonín kinasas, cuya concentración celular, oscila en función de la fase del ciclo celular de que se trate y que controlan la progresión dentro del ciclo. Tienen una alta similitud en cuanto a su composición en aminoácidos, ya que tienen en común una región de 100 aminoácidos llamada “box de las ciclinas”, que sirve para unir y activar a las kinasas dependientes de ciclinas.

Desde la ciclina A hasta la ciclina H, actúan como subunidades reguladoras para cdk's y son clave en la regulación del ciclo celular (Steege y Zhou, 1998). Existen cinco ciclinas principales, denominadas de la A a la E, cada una de las cuales alcanza una concentración máxima en un momento distinto del ciclo. Así, las ciclinas C, D (D1, D2, D3), y E alcanzan su pico máximo en G₁, por lo que se las considera reguladoras de la transición de G₁ a S. En células normales, los niveles de ciclina D1 fluctúan en respuesta a estímulos externos. Por otro lado las ciclinas A, y B (B1 y B2) tienen su máximo en S y G₂ por lo que controlan el ciclo en G₂ y M (Rodríguez y Rodríguez, 2000; Viallard *et al.*, 2001). Podemos por lo tanto considerar que existen dos clases dentro de la familia de las ciclinas: las ciclinas G₁ (C, D, y E), y las ciclinas G₂ o mitóticas (A y B).

La *ciclina A* es requerida para la progresión a través de la fase S del ciclo celular y para la entrada en mitosis. Esta doble función es el resultado de su capacidad de unir a las kinasas dependientes de ciclinas cdk₁ y cdk₂ (Noble *et al.*, 1997). En la fase S, la fosforilación de componentes de la maquinaria de replicación del ADN por ciclina A/cdk, es importante para el inicio de la replicación y para restringirlo a solamente una vez por ciclo. En mitosis, el papel exacto de ciclina A todavía no está del todo aclarado, aunque se sabe

que puede contribuir al control de la estabilidad de la ciclina B. De manera parecida a la mayoría de las ciclinas, la ciclina A aparece en el núcleo acumulándose durante la fase S y permanece en él hasta su degradación antes de la metafase, y su síntesis, es controlada principalmente a nivel transcripcional, involucrando a E2F y a otros factores de la transcripción (Viallard *et al.*, 2001; Yam *et al.*, 2002). Su destrucción se lleva a cabo a través de la proteólisis dependiente de la ubiquitina, al igual que el resto de ciclinas, excepto la ciclina F.

La *ciclina B* es una subunidad reguladora que se requiere para la actividad catalítica de la proteína quinasa cdk_1 . La síntesis de la ciclina B comienza en la fase S, acumulándose y formando complejos con cdk_1 durante las fases S y G_2 . Al formarse estos complejos, cdk_1 se fosforila en dos lugares críticos para su regulación. Una de estas fosforilaciones inhibe la actividad de cdk_1 , y lleva a que se acumulen complejos inactivos cdk_1 /ciclina B durante S y G_2 . La activación de este complejo por defosforilación de uno de los lugares críticos, permite el paso de G_2 a M. La actividad de cdk_1 provoca la degradación de la ciclina B, que ocurre por proteólisis mediada por la ubiquitina. Esta destrucción proteolítica lleva a la célula a salir de la mitosis y a volver a la interfase (Hershko, 1999). La ciclina B es inicialmente localizada en el citoplasma durante la fase S y la fase G_2 , y translocada al núcleo al comienzo de la mitosis. Esta localización citoplasmática de la ciclina B1 es el resultado de la continua exportación desde el núcleo (Smits y Medema, 2001).

La *ciclina C*, tiene como pareja catalítica a la kinasa dependiente de ciclinas cdk_8 y se cree que controla la función de ARN polimerasa II, ya que forma parte del complejo multiprotéico formado por ciclina C, cdk_8 y ARN pol II (Leclerc y Léopold, 1996), sin embargo no hay evidencias, de que junto a su pareja catalítica cdk_8 , tenga ningún papel en la regulación del ciclo celular (Barette *et al.*, 2001). Otra función de la ciclina C, puede ser como regulador fisiológico de la salida de las células de G_0 , ya que combinado con cdk_3 , estimula la fosforilación de pRb, que se requiere para esta salida (Ren y Rollins, 2004).

La síntesis de la *ciclina D* se induce en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento, sin embargo, las ciclinas de tipo D también se degradan rápidamente, por lo que su concentración intracelular desciende bruscamente en ausencia de factores de crecimiento. Así si se eliminan estos factores antes del punto de restricción, las células no pasarán a través de G_1 a S, inactivándose y entrando en G_0 .

El papel exacto de las ciclinas D no está del todo claro aunque parece que sólo ejecutan acciones fundamentales en células que tienen proteína Rb funcional (pRb) o proteína del retinoblastoma. El gen Rb, es el prototipo del gen supresor de tumores, cuya inactivación contribuye al desarrollo del tumor. Así los complejos Cdk_{4,6}/ciclina D, fosforilan a pRb a su paso por el punto de restricción en G_1 , y esto implica su disociación del factor de transcripción E2F (al que estaba unido en su estado poco fosforilado). Esta fosforilación parcial prepara a pRb para la subsiguiente hiperfosforilación por parte del complejo Cdk₂/ciclina E, y esta inactivación permite a la célula avanzar a lo largo de G_1 tardío (Lundberg y Weinberg, 1999). Consecuentemente E2F liberado, activa la transcripción de sus genes diana, que codifican productos necesarios para la progresión por la fase S (Figura 2). Esta regulación de la expresión génica, por parte de los complejos de Cdk_{4,6}/ciclina D, depende de la disponibilidad de factores de crecimiento en G_1 (Evan y Vousden, 2001).

La ciclina D1, fue el primer miembro de la familia de ciclinas G_1 en ser identificada, y se le han atribuido funciones, como estimulador del crecimiento (mediante fosforilación de pRb), o inhibidor de la progresión del ciclo celular por inactivación de PCNA o antígeno nuclear de proliferación celular (proteína accesoria para ADN polimerasa γ y ϵ). También puede actuar como estimulador de la actividad transcripcional del RE y modulador de la expresión de genes específicos a través de distintos mecanismos de control del ciclo celular, y dependiendo de los niveles de expresión, del tipo celular y las condiciones de crecimiento puede inducir la senescencia y la apoptosis, (Han *et al.*, 1999). Aunque el papel fundamental de la ciclina D1, es regulación y control del ciclo celular normal, también puede desarrollar funciones que no son

propias del ciclo celular. Así se sabe, que une a PCNA, y por lo tanto está involucrada en replicación y reparación de ADN. Además puede servir para inhibir la inducción de síntesis de ADN sobre daño UV o similar, posiblemente a través de la modulación de niveles de PCNA libre (Steege y Zhou, 1998).

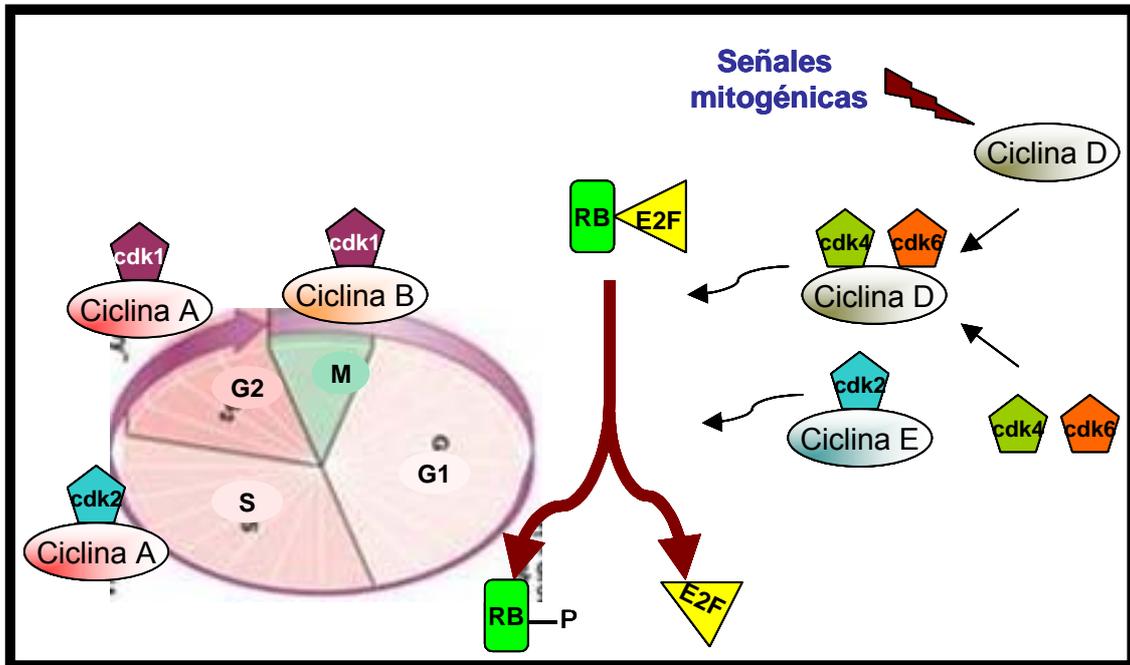


FIG. 2. FOSFORILACIÓN DE PRB

La *ciclina E* se expresa en G₁ tardío, y los complejos cdk₂/ciclina E se requieren para el paso de G₁ a S, y el inicio de la síntesis del ADN. Estos complejos adquieren una fuerte actividad kinasa justo antes de entrar las células en la fase S, fosforilando la proteína del retinoblastoma de manera similar a la ciclina D (Figura 2), y permitiendo que se libere E2F, para continuar la progresión del ciclo a través de la fase S. En el curso de la fase S, la expresión de la ciclina E disminuye por la degradación proteosómica por parte de la ubiquitina.

La estructura cristalina de la *ciclina F*, la relaciona cercanamente con las ciclinas A y B. El ARNm de la ciclina F fluctúa drásticamente a través del ciclo celular, alcanzando un pico en G₂ parecido al de la ciclina A y decreciendo previo al declive del ARNm de la ciclina B (Bai *et al.*, 1994). La proteína ciclina F se acumula en la interfase y es degradada en mitosis por mecanismos

fundamentalmente distintos a los de otras ciclinas, ya que no utilizan la ubiquitinación y sí involucra a las metaloproteasas (Fung *et al.*, 2002). En la mayoría de las células es localizada en el núcleo y regula la localización nuclear de la ciclina B1 (Kong *et al.*, 2000). La sobreexpresión de la ciclina F implica un incremento significativo en la población celular en G₂, lo que demuestra que esta ciclina interviene en la regulación del tránsito a través del ciclo celular.

Las funciones de la *ciclina G* no son del todo conocidas, este gen ha sido identificado como una nueva diana transcripcional de p53 (Okamoto y Beach, 1994), y contribuye a la detención de las células en la fase G₂/M en respuesta a daño celular (Shimizu *et al.*, 1998). Si ocurre daño en el ADN se desencadena el agrupamiento de la ciclina G en compartimentos nucleares altamente organizados, que contienen proteínas asociadas a la replicación, y esto proporciona una conexión adicional, entre la detención del crecimiento mediada por p53, y la regulación del ciclo celular. Esto sugiere, que la ciclina G puede actuar como un efector de los eventos mediados por p53, a través de asociación funcional con las proteínas de los focos de replicación (Reimer *et al.*, 1999). La ciclina G es sobreexpresada en células de cáncer de mama. La ciclina G puede jugar un papel modulando la apoptosis inducida por diferentes estímulos (Okamoto y Prives, 1999). Se han aislado en células humanas dos ciclinas G (G1 y G2) inducidas por daño en el ADN a causa de la actinomicina D. La inducción de ciclina G1 es p53 dependiente, mientras que la expresión de G2 ha sido observada en ausencia de p53 (Bates *et al.*, 1996).

La *ciclina H* funciona como subunidad reguladora de un complejo trimérico (CAK), compuesto por subunidades de, cdk₇, ciclina H y una tercera proteína llamada MAT1, que interviene en la regulación del ciclo celular. También se considera que funciona como un sustrato de la proteína quinasa CK2 requerida para la viabilidad celular y para la progresión del ciclo celular, así la fosforilación de la ciclina H por CK2 es necesaria para una completa activación del complejo CAK (Faust *et al.*, 2002). Los niveles de CAK y los componentes individuales no varían a través del ciclo celular. La débil asociación de ciclina H a cdk₇, puede ser promovida por MAT1 o por residuos de treonina fosforilada, y

tiene considerables similitudes con la interacción entre ciclina A y cdk2, ya que la estructura cristalina de ambas ciclinas es muy similar. Una significativa proporción de CAK se asocia a un complejo factor de transcripción (TFIIB) esencial para la transcripción y para la reparación de nucleótidos escindidos, promoviendo la fosforilación de la ARN polimerasa, en un mecanismo regulatorio. Puede también formar parte de las rutas de señalización en la transducción, y en el caso de daño en el ADN, promueve señales que son coordinadas con la maquinaria del ciclo celular y de la apoptosis (Noble *et al.*, 1997). La actividad de CAK no es inhibida por el inhibidor de ciclinas p27.

3.3.2. Kinasas dependientes de ciclinas (cdk's)

El tránsito a través del ciclo celular depende de la activación secuencial de Kinasas dependientes de ciclinas. Al contrario de las ciclinas, las cdk's son relativamente constantes a través del ciclo celular y están estratégicamente situadas a través de las fases del ciclo celular. Hay actualmente identificadas nueve cdk's, que cuando son activadas promueven fosforilación de otras proteínas, y que son reguladas positivamente por ciclinas, y negativamente por inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas (Olashaw y Pledger, 2002; Osborne *et al.*, 2004). La unión de las cdk's con las ciclinas se lleva a cabo en la región conocida como "box de las ciclinas", y aunque esta unión no es específica muestran ciertas preferencias (Figura 3):

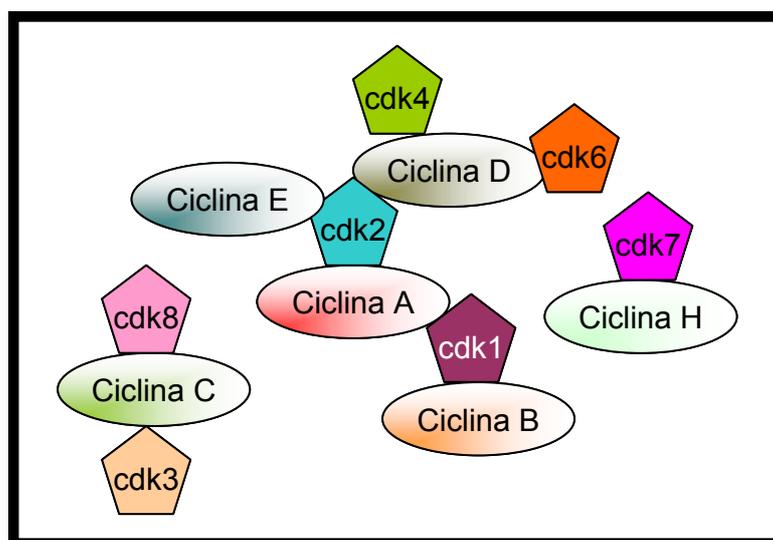


FIG. 3. POSIBILIDADES DE COMPLEJOS CICLINA/CDK

La kinasa 1 dependiente de ciclina (cdk_1), también es conocida por Cdc2 o $p34^{cdc2}$. El inicio de la mitosis está dirigido por una cascada de fosforilaciones de proteínas que conllevan a la activación de los complejos cdk_1 /ciclina B. Durante la fase S se asocia a la ciclina B sintetizada de novo. Su activación depende de su unión a su pareja catalítica la ciclina B. Es específicamente requerida para la mitosis, y también hay evidencias de que se requiere para la apoptosis (Castedo, *et al.*, 2002). Cdk_1 puede también unirse a la subunidad catalítica ciclina A, y así continuar la progresión del ciclo celular a través de la fase S.

La Kinasa 2 dependiente de ciclina (cdk_2), es esencial para la progresión durante la fase G_1/S . Adquiere su actividad kinasa en asociación con las ciclinas A o E. Durante la fase S, la ciclina E es reemplazada de su complejo por la ciclina A. Cdk_2 , también se ha visto que tiene un papel específico en el bloqueo de la apoptosis (Golsteyn, 2005).

Las Kinasas 4 y 6 dependientes de ciclinas (cdk_4 y cdk_6), son las parejas reguladoras de las ciclinas D. Los complejos ciclina D/ $cdk_{4/6}$, comienzan su actividad kinasa en mitad de la fase G_1 y tienen su actividad máxima en la transición de G_1/S (Viallard *et al.*, 2001).

La Kinasa 7 dependiente de ciclinas (cdk_7), se une a la ciclina H adquiriendo su actividad kinasa. Ni la expresión de la proteína cdk_7 , ni su actividad varían en el curso del ciclo mitótico de las células proliferantes (Faust *et al.*, 2002).

Las kinasas 8 y 3 dependientes de ciclinas (cdk_8 y cdk_3), son las parejas reguladoras de la ciclina C (Barette *et al.*, 2001; Ren y Rollins, 2004).

La regulación de su actividad por tanto, puede quedar resumida en al menos cuatro mecanismos moleculares:

- 1) Asociación de las cdk's con las ciclinas correspondientes (la formación de los complejos está regulada por la síntesis y degradación de las ciclinas).
- 2) Activación de los complejos cdk/ciclina por la fosforilación de un residuo de la treonina de la cdk alrededor de la posición 160.
- 3) Fosforilación inhibidora de treonina 14 y tirosina 15. Las cdk's se activan por defosforilación de estos residuos.
- 4) Asociación con inhibidores de cdk's (ckl_s), a los complejos de cdk/ciclina.

3.3.3. Inhibidores de ciclinas

La continua fosforilación de pRb en sí, actúa como un estimulador de la expresión de ciclina D₁ y ciclina E, perpetuando de ese modo esta fosforilación. Tal sistema de feedback potencialmente peligroso, necesita encarecidamente regulación para prevenir los continuos ciclos de proliferación celular a que están sometidos y así evitar una proliferación anormal. Este control se lleva a cabo por una serie de inhibidores de Kinasas dependientes de ciclinas (cdki), que son específicas de una o más cdk's. Estos reguladores negativos del ciclo celular son considerados genes supresores de tumores, en los que la pérdida de su función puede contribuir a comportamiento maligno.

Existen dos familias de inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas: la familia INK4, formada por las proteínas p16, p15, p18 y p19, y la familia Cip/Kip, formada por las proteínas p21, p27 y p57. Las proteínas de la familia INK4 son unos inhibidores que unen únicamente a Cdk₄-Cdk₆ y no a ciclinas, y por lo tanto son específicas para la fase G1 temprana. Las proteínas de la segunda familia de inhibidores van a inhibir todos los complejos de cdk/ciclinas, no son específicos de una fase particular y a diferencia de las proteínas de la familia INK4, no van a disociar los complejos cdk/ciclinas. Las proteínas Cip/Kip forman complejos triméricos con cdk₂ unido a ciclina E o ciclina A, e inactivan su actividad enzimática. La interacción de estas proteínas con cdk_{4/6} es sin embargo más compleja, porque a concentraciones fisiológicas, p21 y p27 promueven la formación de complejos activos de cdk_{4/6}/ciclina D, mientras que

a mayores niveles preferentemente unen a cdk's reduciendo la capacidad de ciclina para activar la enzima e inhibiendo la actividad de cdk_{4/6}. Por lo tanto la función de los complejos cdk_{4/6}/ciclina D es secuestrar p21 y p27 alejándolos de los complejos cdk₂/ciclina E o cdk₂/ciclina A, facilitando su activación y la transición a través de G₁/S (Steege y Zhou, 1998; Reed, 2002). Sin embargo Bagui *et al.* (2003), concluyeron en un estudio que complejos cdk₄/ciclina D se forman y se vuelven activos en la ausencia de p27 y p21, aunque sugieren que estos se vuelven más estables cuando unen a p27 y p21. Las proteínas de la familia Cip/kip pueden tener papeles adicionales que cuentan con diferentes localizaciones celulares y diferentes dianas presentes en el citoplasma y en el núcleo y probablemente también en el ADN (Coqueret, 2003). Así pueden actuar como reguladores citoplasmáticos potenciales como factores de ensamblaje, reguladores de apoptosis, o reguladores de migración celular y pueden funcionar como cofactores transcripcionales en el núcleo. Las proteínas p21 y p27 sufren eventos de fosforilación que determinan su localización celular y así median funciones como supresores de tumores en su localización nuclear y adoptan un papel oncogénico en el citoplasma (Swanton, 2004).

p21 es una diana transcripcional de p53 y juega un papel en senescencia, diferenciación y en la coordinación de reparación del daño del ADN con detención del ciclo celular. Además de inhibir la progresión del ciclo celular mediante su interacción con cdk's, p21 puede inhibir directamente la replicación del ADN en fase S, uniéndose al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). La gran similitud estructural entre p21 y p27, no impide que respondan diferentemente a diversas señales mitogénicas. Muchas señales antiproliferativas (ausencia de mitógenos/citoquinas, contacto célula-célula...) inducen la acumulación de p27 (Clurman y Porter, 1998). Se ha sugerido que p27 puede jugar un importante papel regulador negativo en células quiescentes y en G₁, mientras que p21, cuya expresión está normalmente reducida o ausente en células quiescentes, puede estar involucrada en el control de la actividad de cdk en proliferación celular (Cariou *et al.*, 1998). Los niveles de p27 son regulados primariamente por degradación proteolítica a través de la ruta de la ubiquitina, a nivel transcripcional (Slingerland y Pagano, 2000). La fosforilación de p27 en la treonina 187, por el complejo cdk₂/ciclina E, conlleva

a un declive en la concentración de p27, así el reconocimiento de la forma fosforilada de p27 por la ligasa ubiquitina SCF (Skp2) finaliza con la degradación de p27 (Swanton, 2004). Otro factor que contribuye a la degradación de p27 es su localización, así cuando p27 tiene localización nuclear va a inhibir la actividad de cdk2/ciclina E, y la fosforilación de p27 en la serina 10 va a desviar una fracción de p27 del núcleo al citoplasma (Boehm *et al.*, 2002), permitiéndose por tanto la actividad de los complejos cdk2/ciclina E y en consecuencia la fosforilación de p27 en la treonina 187 y su consecuente ubiquitinación y degradación en el núcleo (Bloom y Pagano, 2003). P27 desarrolla un importante papel en el paso de proliferación a diferenciación de precursores celulares en varias líneas celulares (Sgambato, *et al.*, 2000).

3.4. CICLO CELULAR Y CÁNCER

El conocimiento del ciclo celular es fundamental para comprender los mecanismos moleculares que controlan la proliferación celular y por tanto los mecanismos responsables del crecimiento de los tumores. Mientras que la duración de un ciclo para una célula normal puede ser de 24-48 horas, la duración de un ciclo en una célula tumoral está entre 72-120 horas. Esta maquinaria molecular opera dentro del núcleo de tal forma que controla la decisión de la célula para proliferar, para entrar en una fase de quiescencia reversible o incluso para entrar en un estado de diferenciación postmitótico. Se conoce que una de las principales propiedades de las células cancerígenas es su incrementada y deregulada actividad proliferativa, y que anomalías en muchos moduladores positivos y negativos del ciclo celular son frecuentes en muchos tipos de cáncer (Sandhu y Slingerland, 2000). Así podemos citar entre estas anomalías la función defectuosa del gen Rb y de los inhibidores de cdk, además de la sobreexpresión de ciclinas, observándose a menudo interacciones entre ellas (Fernández *et al.*, 1998). Hiromura *et al.* (2002), propusieron que la localización subcelular de cdk2, determina el destino proliferativo o apoptótico de la célula, así en células proliferando el complejo cdk2/ciclina A tuvo localización nuclear, pero la inducción de apoptosis en células proliferando, coincidió con un aumento en la actividad del complejo cdk2/ciclina A en el citoplasma

3.4.1. Ciclinas y su relación con el cáncer

Los niveles de ciclina D1 en líneas celulares transformadas, es extremadamente variable y reporta resultados diferentes, incluso para la misma línea de diferentes laboratorios, reflejando probablemente variación local en la evolución de la línea (Barnes y Gillet, 1998).

El gen de la ciclina D1 (CCND1), se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 (11q13), y esta región del cromosoma a menudo se encuentra amplificada en el cáncer humano, ocurriendo esta amplificación en un 13 a 32% de los cánceres de mama humanos (McIntosh, *et al.*, 1995). En una serie de estudios clínicos, que han comparado la amplificación de CCND1, con la expresión de la ciclina D1, se demuestra que existe sobreexpresión de ARNm y proteínas en los casos en los que ha habido amplificación génica, aunque en la mayoría de los tumores ocurre esta sobreexpresión de ARNm y de proteínas, sin que ocurra amplificación génica (Barnes y Gillet, 1998; Hosokawa y Arnold, 1998). La sobreexpresión y amplificación de ciclina D1 ha sido estudiada por Naidu *et al.* (2002), llegando a la conclusión de que existe una significativa relación entre la amplificación de ciclina D1 y metástasis en ganglios linfáticos, pero no existe una significativa relación con el grado histológico, el estatus del RE y el índice de proliferación (Ki-67 y PCNA). Sin embargo, sobreexpresión de ciclina D1 fue estadísticamente asociada con tumores bien diferenciados y positividad del RE, no se encontró relación sin embargo con el estatus nodal ni con el índice de proliferación. La amplificación y sobreexpresión de ciclina D1 puede ser independiente de la edad de la paciente.

La sobreexpresión de ciclina E, también se ha demostrado en cánceres de mama, y las alteraciones de ésta se asocian con un estadio más avanzado y un grado más alto del tumor (Keyomarsi *et al.*, 1994). Raramente la ciclina E y la ciclina D₁ son conjuntamente sobreexpresadas, Lodén *et al.* (2002) propusieron un modelo en el que la ciclina D1 y la ciclina E estaban sobreexpresadas representando dos mecanismos alternativos para inactivar la ruta pRb y por lo tanto llevar a cabo crecimiento incontrolado en la tumorigénesis del cáncer de mama. Una sobreexpresión de ciclina E provoca

una hiperfosforilación de pRb, e incrementa la actividad proliferativa, al igual que ciclina D₁. Tumores con ciclina E sobreexpresada están asociados con peor pronóstico que tumores con sobreexpresión de ciclina D₁. El gen que codifica la ciclina E está localizado en el cromosoma 19q12 y raramente se encuentra amplificado en cáncer de mama (2%); sin embargo, la sobreexpresión y alteraciones en la ruta de degradación, dan lugar a la acumulación de isoformas de bajo peso molecular, que han sido demostradas en el 20-30% de cánceres de mama (Osborne *et al.*, 2004). Se ha observado una fuerte correlación entre la sobreexpresión de ciclina E y la carencia de expresión de RE (Steege y Zhou, 1998). Mientras que la ciclina D₁ es sintetizada en respuesta a factores de crecimiento, la ciclina E no, así la supresión de factores de crecimiento una vez atravesado el punto de restricción no va a afectar el hecho de que el complejo cdk2/ciclina E, regule el paso a través de G₁ tardío a S. Éste complejo actúa como un componente central de la regulación estrogénica de la progresión a través del ciclo celular, y por lo tanto una diana potencial que contribuye al papel de los estrógenos en la oncogénesis (Doisneau-Sixou *et al.*, 2003).

3.4.2. Inhibidores de ciclinas y su relación con el cáncer

Como inhibidor de proliferación celular, p21 juega un importante papel en supresión de tumores inducido por drogas a causa de sus funciones apoptóticas y de sensibilidad a drogas. Numerosos estudios muestran que p21 también puede asumir funciones pro o antiapoptóticas, en respuesta a agentes antitumorales dependiendo del tipo y contexto celular (Liu *et al.*, 2003). En un estudio de Zhou *et al.* (2001), en células sobreexpresando HER-2/neu se observa que éste induce a través de la activación de Akt (receptor transmembrana, involucrado en proliferación celular y con propiedades antiapoptóticas), la localización citoplasmática de p21 y por lo tanto induce actividad oncogénica. Chang *et al.* (2000), demostraron en su estudio que p21 inhibe selectivamente o induce un conjunto de genes con distintas funciones biológicas en la división celular, sugiriendo un papel para p21 en la patogénesis del cáncer y enfermedades relacionadas con la edad.

Los niveles de la proteína p27 son altos en epitelio normal mamario, mientras que en cáncer de mama se muestra un grado variable de pérdida de esta proteína, con mayor reducción en ganglios linfáticos metastásicos. La pérdida de esta proteína, se considera un factor pronóstico en diversos carcinomas ya que precede a la invasión neoplásica y correlaciona con alto grado tumoral y además ha sido evaluada como predictora de respuesta a tratamientos (Cariou *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999; Barbareschi, 1999; Tsihlias *et al.*, 1999; Slingerland y Pagano 2000; Chiarle *et al.*, 2001). La baja expresión de p27 probablemente contribuye al fenotipo tumoral por una incrementada actividad de Cdk2, y ésta pérdida de expresión de p27 también se puede relacionar en parte con un papel en la modulación de la adhesión célula-célula, y por tanto, la tendencia a la progresión metastásica (Osborne *et al.*, 2004).

La sobrerregulación de p27 y la baja regulación de ciclina D1, que conlleva una detención del ciclo celular, está asociada en células MCF-7 con la expresión de 4EBP-I, un inhibidor del factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E) esencial para la translación y cuya actividad incrementada y elevada expresión conlleva a la transformación tumorigénica (Jiang *et al.*, 2003). Aunque los genes que codifican p27 raramente están mutados en cánceres humanos, p27 es funcionalmente inactivado a través de una acelerada proteólisis por la activación oncogénica de Ras y del receptor de tirosín kinasa, a través de secuestro por complejos Cdk/ciclina D y por localización citoplasmática (Alkarain y Slingerland, 2004).

Estudios experimentales en cultivos celulares, han implicado a la proteína p27 como un inhibidor de señales de ErbB-2 (Hulit *et al.*, 2002). Varias líneas de evidencia sugieren una relación inversa entre ErbB-2 y p27 que puede ser importante en el inicio o progresión del cáncer de mama, así una reducida expresión de p27 se correlaciona con sobreexpresión de ErbB-2 (Newman *et al.*, 2001; Zhou y Hung, 2003; Musgrove, 2004). Esta reducción de p27 está causada por su incrementada degradación mediada por ubiquitina, a través de la ruta HER-2/MAPK. Además HER-2 exporta al citoplasma p27, facilitando su degradación (Yang *et al.*, 2000).

Del mismo modo se ha demostrado que la expresión de p27 está inversamente relacionada con el marcador de proliferación Ki-67 (Sgambato *et al.*, 2000), y que la expresión de receptores de estrógenos está asociada con mayores niveles de p21 y p27 (Cariou *et al.*, 2000), considerándose estas proteínas mediadores críticos de los efectos terapéuticos de antiestrógenos en cáncer de mama.

4. APOPTOSIS

4.1. DEFINICIÓN

El término de apoptosis se acuñó en 1972 para definir un mecanismo general de pérdida o delección de células aisladas, complementario a la mitosis, que posea características morfológicas, bioquímicas y genéticas específicas (Kerr *et al.*, 1972). La apoptosis es la forma de muerte celular eucariótica más común, ya que la muerte celular fisiológica, es esencial para el apropiado desarrollo y función de organismos multicelulares. Habitualmente se define como el conjunto de fenómenos intracelulares que llevan a la célula a una “muerte programada”, manteniendo así la homeostasis en organismos multicelulares.

Hay que diferenciar entre apoptosis y muerte celular programada (MCP). La MCP hace referencia a situaciones fisiológicas en las que la muerte celular está determinada para que ocurra en un momento preciso, en relación con el desarrollo y renovación normal de los tejidos, y cuando este momento llega se ponen en marcha unos mecanismos que dictan a las células el proceder suicida; sin embargo, la apoptosis puede no ser el único mecanismo utilizado por la MCP (Clavero *et al.*, 2001).

La necrosis ocurre típicamente en células traumatizadas de modo agudo, produciendo hinchazón y lisis celular y apareciendo una respuesta inflamatoria. Sin embargo la apoptosis ocurre en células que sufren traumas leves, responden a imperativos del desarrollo o sufren déficits de factores

tróficos, de una manera ordenada y sin producir una respuesta inmune en el lugar de la pérdida celular.

El concepto de apoptosis sugiere que en un determinado punto del destino de una célula ocurre una cascada irreversible de acontecimientos desencadenados por vía génica que permiten una eliminación eficiente de dicha célula sin interrumpir el funcionamiento normal del tejido (Vaux, 1993; Stellar, 1995).

4.2. MECANISMOS MOLECULARES DE LA APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso controlado y regulado genéticamente, donde pugnan genes que previenen y promueven su inicio (Krajewski *et al.*, 1999; Cory y Adams, 2002). Podemos clasificar a los reguladores de la apoptosis en 5 grupos.

- Genes de la familia bcl-2
- Sistema Fas/fasL
- Factores de respuesta al estrés oxidativo (especies reactivas de oxígeno como SOD, Glutathion-peroxidasa, Catalasa).
- Reguladores de la transcripción (p53 y c-myc).
- Proteasas citoplasmáticas (familia de genes ICE y calpain que es una proteasa activada por calcio).

La apoptosis a menudo es un proceso dependiente de las caspasas, una familia de cisteinil proteasas mitocondriales (caspasas 2, 3, 8, 9), conocidas como las ejecutoras de la apoptosis, ya que la liberación de éstas va a dar lugar a la mayoría de los distintivos morfológicos de la muerte celular, como fragmentación nuclear, rotura del citoesqueleto celular y exposición de fosfatidilserina en la superficie extracelular de la membrana plasmática. Sin embargo, se conocen ciertas formas de apoptosis independientes de caspasas, y recientes trabajos han proporcionado evidencias de que, la mitocondria juega un papel muy importante en las formas de apoptosis dependientes o independientes de caspasas (Parone *et al.*, 2002).

4.2.1. P53

El papel fisiológico de p53, parece ser de mediador crítico de dos respuestas celulares diferentes, que siguen a un daño producido en el ADN: *detención del crecimiento* en la fase G₁ del ciclo celular o *apoptosis*. Los niveles de p53 aumentan en respuesta a un daño genotóxico y este aumento, que resulta de una transcripción incrementada y estabilización protéica, es responsable del inicio de la detención del ciclo celular, la reparación del ADN y/o la apoptosis (Lane *et al.*, 1992). Se conoce que cuando ocurre un daño en el ADN, se activa p53 que frena la división celular, y permite la acción de las enzimas reparadoras del ADN, previo a la replicación del mismo. Si el daño no puede ser reparado, p53 participa en la inducción de la apoptosis previniendo, incluso permanentemente, la propagación de una célula, que podría sufrir alteraciones genómicas estables, y por lo tanto que podría tener susceptibilidad incrementada a la transformación maligna (Lane *et al.*, 1994). La inducción de la apoptosis se lleva a cabo junto a proteínas codificadas por genes como bcl-2. Estas importantísimas funciones se pierden cuando p53 está inactivado o mutado, continuando la proliferación celular y dando lugar a que los daños en el genoma celular se perpetúen, no entrando la célula en apoptosis.

El gen supresor de tumores p53 es el gen más comúnmente mutado en cáncer humano en la fase G₁/S. Según la *hipótesis de Knudson* (1971), existe un doble mecanismo de seguridad, para preservar el gen supresor de tumores p53 o cualquier otro oncosupresor, y es que, no sólo es necesario que se produzca una mutación en uno de los dos alelos normales, sino que el otro alelo debe necesariamente perderse (delección) o sufrir también una mutación (Greenblatt *et al.*, 1994; Schneider, 1995). En un estudio de Salleh *et al.* (2003), en ratones knockout hemicigóicos para p53^{+/-}, donde se usó como agente antitumoral el dietilestilbestrol, comparados con ratones normales, se concluyó que existía una peor respuesta al tratamiento, en el control del ciclo celular y de la apoptosis, y esto podría ser fundamental para el desarrollo tumoral acelerado en este modelo carcinogénico. La proteína p53 contiene varios dominios funcionales necesarios para inducir detención del ciclo celular y apoptosis. La mutación en el dominio de activación 2, entre los residuos 53-54, anula la

actividad apoptótica pero no tiene efectos significantes en la detención del ciclo celular, y la activación de este dominio induce genes proapoptóticos o inhibe genes antiapoptóticos (Zhu *et al.*, 2000).

La primera demostración de que la expresión de p53 indujo apoptosis, fue realizada en la línea celular leucémica M1, desprovista de p53 endógena, donde se introdujo una proteína mutante p53 sensible a temperatura, y estas células rápidamente fueron sometidas a apoptosis a la temperatura permisiva, 32°C, donde p53 asumió conformación y actividad normal (Yonish-Rouach *et al.*, 1991). La decisión de una célula de someterse a apoptosis mediada por p53 versus detención en G₁, es dependiente del contexto celular, ya que existen diferencias entre los tipos celulares, y éstas van a determinar el destino celular siguiendo la inducción de p53 (Canman y Kastan, 1997).

Se ha establecido la existencia de dos mecanismos distintos de p53, dependientes de apoptosis e independientes de apoptosis. Los mecanismos de p53 dependientes de apoptosis, requieren otras funciones de p53 que las de regulación transcripcional (Caelles *et al.*, 1994), ya que la actividad transcripcional de p53 no es suficiente para la apoptosis inducida por éste (Rowan *et al.*, 1996). El hecho de que varios genes involucrados en la regulación de la apoptosis, sean transcripcionalmente modulados por p53, sugiere un papel de p53 para la transactivación en la apoptosis. Es posible que la apoptosis inducida por p53 pueda resultar de cambios en el equilibrio Bax/Bcl-2 a favor de la apoptosis, o que p53 pueda regular diferencialmente a subgrupos de genes, involucrados en el destino de la célula; un grupo confiriendo detención en G₁, y otro apoptosis, y todo ello determinado en última medida, por la presencia de señales de supervivencia como presencia o ausencia de factores de crecimiento, y otras proteínas reguladoras del ciclo celular como Rb (Weeb *et al.*, 1997).

4.2.2. Familia Bcl-2

La familia Bcl-2 está constituida por los genes: bcl-2, Bax, bcl-x_l, bcl-x_s, MCL-1, Bag-1, Bad, Bak, y Bid.

El gen bcl-2 fue identificado originalmente en el análisis de la translocación t(14;18) la cual predispone al desarrollo de linfomas B, correlacionándose por lo tanto niveles elevados de bcl-2 y tumorigénesis. Como se ha podido confirmar tras numerosos estudios (Reed, 1944; Korsmeyer, 1995; Belinda y Kumar, 2002) el gen bcl-2 juega un papel inhibidor de la muerte celular en varios tipos celulares. La expresión elevada de este gen es capaz de bloquear la muerte celular por apoptosis actuando como antioxidante y suprimiendo la peroxidación lipídica, con lo que previene el daño celular producido por los radicales libres (Hockenberry *et al.*, 1993; Kugu *et al.*, 1998). Sin embargo, según un estudio realizado por Steinman (1995), bcl-2 actuaría como un factor pro-oxidante llevando a cabo sus efectos protectores indirectamente a través de la inducción del repertorio normal de enzimas de defensa contra el estrés oxidativo. En cualquier caso la regulación del estado redox celular probablemente no sea el único mecanismo de actuación del bcl-2, ya que estudios adicionales han implicado a esta proteína en la regulación de la homeostasis del calcio (Baffy *et al.*, 1993), y en transducción de señales asociadas a factores de crecimiento (Fernández y Bischoff, 1993).

La expresión de bcl-2 en cáncer de mama humano, ha sido asociado con buen pronóstico y se correlaciona con RE+, mientras que decrecida expresión de Bax ha sido asociada a pobre resultado clínico (Schorr *et al.*, 1999). Los efectos antiapoptóticos de estradiol y los potentes efectos proapoptóticos de algunos antiestrógenos y de inhibidores de la aromatasa, sugieren un papel potencialmente importante para bcl-2 como modulador de respuesta a terapia hormonal en cáncer de mama (Eissa *et al.*, 1999; Gompel *et al.*, 2000; Salami y Karami-tehrani, 2003; Thiantanawat *et al.*, 2003). Maloof *et al.* (1999), comprobaron que la sobreexpresión de FGF-2, bajo regula bcl-2 y promueve la apoptosis en la línea celular MCF-7.

Se han identificado varios genes de la misma familia y que actúan del mismo modo, de todos el gen Bax parece ser el más importante. Este gen actúa promoviendo la apoptosis directamente mediante la formación de homodímeros bax:bax, proceso que puede ser inhibido por la presencia del bcl-2 (Korsmeyer, 1995). De modo que el producto del gen bax se encuentra

generalmente en el citosol, y tras una señal apropiada sufre un cambio estructural (homodimerización) que le lleva a actuar sobre la mitocondria produciendo una liberación de citocromo c mitocondrial a dicho citosol. El citocromo c se une a la proteína APAF-1 (apoptotic protease activating factor), activando de este modo a la caspasa 9, la cual acelera la apoptosis activando la cascada de las caspasas que es la que produce la desestructuración celular en cuerpos apoptóticos (Kugu *et al.*, 1998). Si el bax no se une en homodímeros, sino que se heterodimeriza con el bcl-2, no se produce la activación de la apoptosis. Además, parece que las proteínas de la familia bcl-2 pueden regular la permeabilidad de la membrana mitocondrial al citocromo c (Parone *et al.*, 2002). Un nuevo estudio en la línea celular MDA-MB-231, ha encontrado que el citocromo c, no es la proteína crítica, que liberada desde la mitocondria, desencadena la apoptosis inducida por γ -tocotrienol, sino que existe un nuevo factor que media la apoptosis en estas células, y éste se trata del factor de inducción de apoptosis (AIF) (Takahahi y Loo, 2004).

Dentro de esta familia se ha descrito el gen bcl-x, el cual produce dos isoformas de ARN mensajero: una variante corta (bcl-xshort) y una larga (bcl-xlong). La primera actúa inhibiendo la acción del bcl-2, con lo que promueve la apoptosis, mientras que la isoforma larga suprime la apoptosis antagonizando al bax (Boise *et al.*, 1993; Kugu *et al.*, 1998).

En la última década se han identificado nuevos genes de la familia bcl-2 que pueden actuar inhibiendo la apoptosis mediante su interacción con el bax, como son el MCL-1 (Kozopas *et al.*, 1993) y el bag-1 (Takayama *et al.*, 1995), o promoviéndola interaccionando con el bcl-2 y bcl-xl, como los genes bad (Yang *et al.*, 1995) y bak (Chittenden *et al.*, 1995). El gen MCL1, puede actuar como clave determinante en la proliferación celular, la diferenciación y la tumorigénesis. Aunque no tiene un papel directo en programas de proliferación/diferenciación, este gen puede permitir el proceder a estos programas o prevenirlos y nos proporciona una interesante perspectiva del papel de la familia bcl-2 en la transición en el fenotipo celular. MCL1 es una proteína antiapoptótica reguladora de apoptosis y de progresión del ciclo celular, estando mediada la función reguladora del ciclo celular a través de su

interacción con el antígeno nuclear de proliferación nuclear (PCNA), (Fujise *et al.*, 2000).

Otro producto de la familia bcl-2, el BID, se encuentra en el citosol siendo activado por la caspasa 8 para actuar sobre la mitocondria del mismo modo que el bax, dando lugar a la liberación de citocromo c (Kugu *et al.*, 1998). La expresión de bag-1 se correlaciona con la expresión de bcl-2, p53, diferenciación, y los receptores de estrógenos y de progesterona (Tang *et al.*, 2004).

NOMBRE	FUNCIÓN EN APOPTOSIS	MECANISMO DE ACCIÓN
bcl-2	Inhibición	Regulación redox, homeostasis ca^{++} , interacción bax.
Bax	Activación	Activación cascada de caspasas
bcl-x _l	Inhibición	Interacción bax
bcl-x _s	Activación	Interacción bcl-2
MCL-1	Inhibición	Interacción bax
bag-1	Inhibición	Interacción bax
Bad	Activación	Interacción bcl-2/bcl-x _l
Bak	Activación	Interacción bcl-2/bcl-x _l
Bid	Activación	Activación cascada caspasas

4.3. APOPTOSIS EN CÉLULAS NORMALES

Asociados con la apoptosis, van a ocurrir unos cambios morfológicos y bioquímicos, coordinados entre el núcleo, citoplasma, organelas y membrana plasmática, que entre otros eventos van a conllevar a una reducción celular. Los cambios más característicos tienen lugar en el núcleo. Así la condensación de la cromatina implica el que la ultraestructura nuclear esté alterada, permitiendo el agrupamiento de los poros nucleares y la fragmentación del núcleo, en fragmentos que contienen cromatina, muchos de los cuales tienen

restos de la membrana nuclear. A nivel molecular una endonucleasa degrada el ADN en fragmentos nucleosomales de 180-200 pares de bases. Aunque la generación de fragmentos de ADN de tamaño oligonucleosomal se utiliza comúnmente como un indicador de apoptosis, no se asocia con apoptosis ni en todas las células tipo ni en todas las situaciones (Gooch y Yee, 1999).

Otros sucesos destacables son la preservación de la morfología normal de la mitocondria, y segmentación de la célula dentro de cuerpos apoptóticos que rápidamente son reconocidos y fagocitados por macrófagos u otras células viables circundantes (Canman y Kastan, 1997).

En el tejido mamario se llevan a cabo profundos cambios morfológicos y funcionales siguiendo la secuencia de embarazo, lactancia e involución postlactacional para volver a iniciar otro nuevo ciclo. La muerte celular extensiva y la remodelación del tejido que ocurre durante la involución postlactacional, se lleva a cabo vía apoptosis (Denmeade *et al.*, 1997). Schorr *et al.* (1999), concluyeron en su estudio, que bcl-2 es expresada en la glándula mamaria de no embarazada y en embarazo temprano. En contraste la expresión de bcl-x y bax continúa a través del embarazo tardío, es bajo regulado durante la lactancia y sobrerregulado con el comienzo de la involución. Bak y bad, son también sobrerregulados durante la involución. Estudios usando tejidos humanos, han mostrado también, que el tejido mamario normal, conlleva ciclos de proliferación y de apoptosis durante el transcurso del ciclo menstrual (Denmeade *et al.*, 1997). Se ha observado un pico mitótico del día 25-28 del ciclo, coincidente con el pico de progesterona y estrógenos durante la fase lútea. Éste es seguido por un pico apoptótico donde las células muestran cambios apoptóticos en el día 28, coincidente con la disminución de hormonas anunciando el final del ciclo. La expresión de la proteína bcl-2 es mayor justo antes de que ocurra el pico mitótico, y disminuye cuando va a ocurrir el pico apoptótico. Por esto el equilibrio entre proliferación y apoptosis es crítico para mantener la homeostasis normal del tejido mamario y el desarrollo normal del ciclo de lactación e involución.

4.4. APOPTOSIS EN CÉLULAS TUMORALES

La capacidad de la población de células tumorales para expandirse en número está determinada no sólo por la tasa de proliferación celular sino también por la tasa de desgaste celular. La apoptosis representa la mayor fuente de este desgaste, siendo un distintivo de la mayoría y quizás todos los tipos de cáncer (Hickman, 2002). El programa apoptótico está presente de forma latente en todos los tipos celulares del cuerpo y va a desencadenarse por variadas señales fisiológicas (Hanahan y Weinberg, 2000). La resistencia a apoptosis puede ser adquirida por células cancerígenas a través de variadas estrategias. Sin duda la más común involucra la mutación de p53.

La expresión de múltiples proteínas moduladoras de apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama, sugieren la complejidad en la regulación de la apoptosis en neoplasmas de origen epitelial mamario (Zapata *et al.*, 1998). Alteraciones que afectan a la familia bcl-2 empeoran la capacidad de controlar el flujo de células a través de puntos críticos, y por lo tanto permiten la inmortalización celular y el cáncer.

Ben-Hur *et al.* (2002), evaluaron en su estudio el posible papel de proteínas relacionadas con la apoptosis en el progreso de la tumorigénesis en el cáncer de mama. Analizaron inmunohistoquímicamente células epiteliales tumorales y linfocitos, llegando a la conclusión de que las células iniciando la apoptosis en tumores son dañadas por el proceso, y que la intensa apoptosis en linfocitos en tumores malignos, puede ser una de las razones, para el progreso del cáncer de mama. La sobreexpresión de bcl-2 o de bcl-x, asociada con pérdida de apoptosis en células in vivo de cáncer de mama humano, puede justificar su comportamiento metastásico. Estos genes aumentan la metástasis tumoral cuando el origen oncogénico ha desencadenado el proceso metastásico, en células donde el período de vida está extendido (Fernández, 2002). Sin embargo Berardo *et al.* (1998), encontraron que en carcinoma de mama ganglio positivo, alta expresión de bcl-2, se asoció con un número de factores pronóstico favorables y con mejores resultados clínicos. La expresión

de bcl-2 y de p53 en ganglios linfáticos metastásicos se correlaciona con su expresión, en tejidos de tumores primarios (Arun *et al.*, 2003).

Aproximadamente 2/3 de los cánceres de mama poseen receptores de estrógenos en el tiempo de la diagnosis, y a menudo responden a intervenciones hormonales como la ablación ovárica, antiestrógenos o inhibidores de la aromatasa, inhibiendo la proliferación celular y promoviendo la apoptosis (Denmeade *et al.*, 1997). Así investigadores como Warri *et al.* (1993), observan que en las células MCF-7 creciendo en cultivo, existe una morfología apoptótica después de la reducción de estrógenos, y también observan evidencias de apoptosis en un 60% de las células tras el uso del antiestrógeno Toremifeno durante tres días.

Existe 1/3 de los cánceres de mama con resistencia hormonal adquirida, que no van a responder a intervenciones endocrinas. Armstrong *et al.* (1992), en su estudio demostraron que en la línea celular de cáncer de mama RE (-), MDA-MB-468, ocurrió apoptosis en respuesta a tratamientos con un antimetabolito.

Craig (2002), sugirió un modelo que es competente, por sustentar o inhibir la viabilidad en puntos críticos del ciclo de vida celular. Estos puntos críticos representan ventanas del tiempo, durante los que la transición del destino celular es efectuada, previniendo o promoviendo continuada progresión entre varias rutas de destino celular. El grado de expresión de la familia bcl-2 en estos puntos permite la proliferación, diferenciación y continuada viabilidad en células tipo que son necesitadas, mientras que abortan estos procesos para células que son abundantes en exceso o no necesarias mayormente. La acción combinada de varios miembros de la familia bcl-2, puede por lo tanto controlar el destino celular, de los tejidos e incluso del organismo. Los efectos antiproliferativos de bcl-2 actúan principalmente a nivel de la fase G_0/G_1 del ciclo celular. Deleciones y mutaciones puntuales en bcl-2 muestran actividad antiproliferativa en algunos casos, pudiendo estar disociados de su función antiapoptótica (Bonney-Berard *et al.*, 2004).

El control de mecanismos apoptóticos parece estar involucrado en los procesos de recurrencia del tumor. Se intenta combinar los parámetros pronósticos tradicionales y los biomarcadores moleculares y así crear modelos de ecuaciones, para predecir la probabilidad de recurrencia (Konstantinidou *et al.*, 2002).

5. FÁRMACOS QUE ACTÚAN SOBRE EL CICLO CELULAR Y LA APOPTOSIS

5.1. FÁRMACOS MODULADORES DEL CICLO CELULAR

El éxito de un tratamiento de quimioterapia va a estar condicionado por el número de células eliminadas, por el número de células en proliferación supervivientes y por la aparición de resistencias. Así a la hora de establecer estrategias terapéuticas, se debe tener en consideración la heterogeneidad celular. La toxicidad de los agentes antineoplásicos es un factor limitante para la curación de la enfermedad e incluso para su uso en función del estado del paciente y sus condiciones generales. Por todo esto la buena gestión del cáncer de mama prioriza una elección adecuada del tratamiento (Lymberis *et al.*, 2004).

La mayoría de los agentes antineoplásicos que son aprobados para su uso clínico por proporcionar beneficios terapéuticos, son moléculas que dañan el ADN, bloquean la síntesis de ADN indirectamente a través de inhibición de la biosíntesis de precursores de ácidos nucleicos o conllevan disrupción de la estimulación hormonal y por tanto del crecimiento celular. Actualmente existen otras líneas de investigación que centran sus estudios en agentes antitumorales que van a actuar sobre el ciclo celular.

Según su actuación en el ciclo celular los agentes antineoplásicos se pueden dividir en tres categorías, aunque la mayoría de los agentes actúan sobre todas las células independientemente de su cinética (Rodríguez y Rodríguez, 2000):

- Agentes que actúan sobre las células tumorales independientemente de que estén o no en el ciclo celular. Son los denominados agentes cicloindependientes.
- Agentes que actúan dentro del ciclo y en una fase determinada del mismo. Son los agentes ciclodependientes y específicos de fase.
- Agentes que actúan en las células dentro del ciclo pero no dependen de fase. Son los agentes ciclodependientes inespecíficos de fase.

En el estudio del cáncer de mama se han introducido un número importante de fármacos moduladores del ciclo celular entre los que los *Taxanos* (paclitaxel y docetaxel) pueden considerarse los más activos (Márquez y Alba, 1998). Los taxanos son una nueva clase de agentes quimioterápicos cuyo mecanismo de acción se basa en su interacción con la tubulina, induciendo la polimerización y estabilización de la misma para formar microtúbulos, cuyo acúmulo desorganizado es resistente a la despolimerización fisiológica. Esto conlleva una serie de efectos deletéreos en las células en división que incluyen la inducción de la parada del ciclo celular en fase G₂/M, la inducción de apoptosis y, consecuentemente, la muerte celular (Nabholtz, 1999).

El paclitaxel es activo en el tratamiento de primera línea del cáncer de mama metastásico, así como en pacientes previamente muy tratadas (Pusztai *et al.*, 2003). Es utilizado tanto en monoterapia como en poliquimioterapia en combinación con otros agentes efectivos en cáncer de mama (De la Cruz *et al* 2002) y generalmente alcanza una alta tasa de respuesta con un perfil de toxicidad aceptable (Pérez, 2000).

El docetaxel ha demostrado ser superior al paclitaxel en varios modelos preclínicos lo cual parece ser debido a una mayor potencia en la estabilización de los microtúbulos (Hidalgo y Colomer, 2000).

En un estudio retrospectivo Van Poznak *et al.* (2002), demostraron la incapacidad, de biomarcadores seleccionados como potenciales predictores de respuesta (RE, RP, HER-2, EGFR, p53 y p27), para predecir la respuesta clínica a quimioterapia con un taxano, como único agente en pacientes con cáncer de mama metastásico. Sin embargo, Chang *et al.* (2003), postularon que los perfiles de expresión génica, pueden predecir la respuesta a docetaxel desarrollando un test clínico de sensibilidad al mismo.

Para el tratamiento del cáncer de mama han sido ampliamente estudiados los efectos de los inhibidores de cdk's en el ciclo celular, haciéndolos atractivos como potenciales agentes antitumorales (Sielecki *et al.*, 2000; Knockaert *et al.*, 2002). Existen tres razones:

- Ser potentes agentes antiproliferativos deteniendo las células en G₁ o G₂.
- Desencadenan la apoptosis sólo o en combinación con otros tratamientos.
- En algunos casos la inhibición de cdk's contribuye a la diferenciación celular.

Las estrategias terapéuticas que intervienen imitando a los inhibidores fisiológicos de cdk's, han tenido como objetivo los lugares de unión de ATP de las moléculas de cdk's. Estos nuevos agentes antitumorales ofrecen un gran potencial manipulador de los reguladores del ciclo celular, como promover la detención del crecimiento, la diferenciación o la apoptosis (Swanton, 2004). Más de cincuenta inhibidores farmacológicos de cdk's han sido descritos y algunos con potente actividad antitumoral (Dai y Grant, 2003). Así el *Flavopiridol*, primer inhibidor de cdk's sometido a evaluación clínica en humanos, interactúa con el lugar de unión de ATP de cdk₂, conllevando una reducción en la transcripción del ARNm de la ciclina D₁ (Carlson *et al.*, 1999), y la detención de las células en la fase G₁ o en la transición de G₂/M. La actividad antitumoral del flavopiridol por lo tanto se relaciona con inhibición de cdk's,

inducción de apoptosis, inhibición de transcripción y actividad antiangiogénica. Se está investigando también sobre otros agentes farmacológicos como UCN-01 que induce detención en G₁ atribuible a la disminución en la actividad de cdk₂, a través de incrementada interacción p27/cdk₂. La investigación de nuevos inhibidores de cdk's continúa con compuestos nuevos como Purvalanol A y B, Olomoucín, Roscovitín, etc...

5.2. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR AGENTES QUÍMICOS NATURALES Y FARMACOLÓGICOS

Casi todas las células en un organismo multicelular tienen un potencial para morir por apoptosis, pero las células tumorales a menudo presentan rutas apoptóticas defectuosas. Estos defectos no sólo aumentan la masa celular sino que también vuelven el tumor resistente a terapia (Yang *et al.*, 2000; Igney y Krammer, 2002).

La apoptosis ocurre en células normales y tumorales después de tratamientos con agentes quimioterápicos tanto *in vivo* como *in vitro*. Los estudios *in vivo* son más difíciles de establecer y se pueden asociar con discrepancias, ya que hay que tener en cuenta, que las células apoptóticas, son rápidamente digeridas por fagocitosis y que la ejecución de la apoptosis es completada rápidamente, en pocos minutos. En los estudios *in vitro* se ha llegado a conocer que la inducción de apoptosis parece ser independiente del objetivo inicial de estos agentes, ya que la apoptosis ha sido observada en células tratadas con taxanos, con agentes que dañan el ADN indirectamente como las topoisomerasas, o con agentes que dañan el ADN directamente como el cisplatin, o con agentes que inhiben las Cdk's como el flavopiridol o que activan las Cdk's como el UCN-01, etc (Mesner *et al.*, 1997).

Existen planteamientos que implican al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y a la proteína Her-2 y sus ligandos, como atractivas dianas terapéuticas, aunque por ejemplo, el uso de anticuerpos anti EGFR en la línea celular MDA-MB-468, que tiene una alta expresión de EGFR, no induce

apoptosis, y sí inhibe el crecimiento celular tanto *in vivo* como *in vitro* (Wu *et al.*, 1995).

El fitoestrógeno isoflavonoide natural llamado *Genistein*, usado en células MCF-7, provoca un descenso en la proliferación celular e induce MCP (Pagliacci *et al.*, 1994).

Algunos investigadores como Welsh (1994), demuestran que análogos de la vitamina D, inducen apoptosis en la línea celular MCF-7. Del mismo modo los análogos de la poliamina, van a inducir la MCP en células MCF-7 y células de la línea celular MDA-MB-468 (McCloskey *et al.*, 1995).

Varios estudios sugieren que la activación de la proteín kinasa C (PKC), bloquea la MCP en una variedad de sistemas modelos, mientras que la inhibición de PKC potencia la MCP (May *et al.*, 1994; Ponnathpur *et al.*, 1995).

La inhibición de la síntesis de ácidos grasos con agentes como el *Cerulenin*, en la línea celular derivada de cáncer de mama ZR-75-1, mostró en estas células las características normales de la apoptosis (Pizer *et al.*, 1996).

Numerosos experimentos han indicado que una elevada expresión de bcl-2 causa resistencia a la quimioterapia, mientras que la expresión normal de bcl-2 promueve una respuesta apoptótica a estos mismos agentes (Reed, 1997). Los efectos en la sensibilidad neoplásica de bcl-2, según un estudio de Del Bufalo *et al.* (2002), subrayan la idea de que bcl-2 puede tener distintos efectos biológicos dependiendo del fármaco antineoplásico usado. Poliseno *et al.* (2002), concluyeron en un estudio realizado en la línea celular MCF7/50B (bcl-2 negativa), derivada de la línea celular MCF-7 (bcl-2 positiva), que la carencia de bcl-2 acompañada por la sobreexpresión de p53, modifica la sensibilidad a drogas citotóxicas.

El hecho de que proteínas de la familia bcl-2 estén influidas por el estradiol en cáncer de mama, hace que los niveles hormonales puedan tener importantes implicaciones en la prevención terapéutica de éste, ya que la

proporción de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas va a determinar que suceda o bien la apoptosis o bien la supervivencia celular (Kumar *et al.*, 2000). En el estudio clínico de Chang *et al.* (2000), se examinaron las modificaciones en el índice apoptótico, en la expresión de bcl-2, de la proliferación y de la ploidía como potenciales indicadores de quimiorrespuesta, obteniéndose evidencias de que la quimioterapia puede aumentar la apoptosis, disminuir Ki-67, e incrementar la expresión de bcl-2 en carcinomas de mama primarios, que consecuentemente responden a la terapia.

Recientemente Buchholz *et al.* (2003), han investigado si los cambios en la expresión de apoptosis y de bcl-2 en células tumorales inmediatamente después de quimioterapia, se correlacionaron con la respuesta a cáncer de mama. Los resultados de este estudio muestran, que la apoptosis puede jugar un papel importante en determinar la respuesta del cáncer de mama a la quimioterapia, y que los niveles de apoptosis inducidos por el tratamiento, pueden tener algún valor como marcador predictivo de la evolución de la enfermedad.

En los últimos años, se han desarrollado nuevas estrategias de agentes quimioterápicos en la inducción de apoptosis, que están siendo discutidas e investigadas, como la baja regulación de las señales de supervivencia y el estudio de las anomalías moleculares particulares de las células neoplásicas (Guy, 2002).

- En este sentido Liu *et al.* (2003), han investigado sobre los ligandos de la familia de proteínas bcl-2 como drogas cancerígenas, y comprobaron que en algunos casos estos ligandos indujeron apoptosis incluso bajo condiciones de sobreexpresión de bcl-2.
- Igualmente Simstein *et al.* (2003), han demostrado que TNF- α actúa como un inductor de apoptosis en la línea celular MCF-7 tras revisar nuevos planteamientos terapéuticos en el tratamiento del cáncer de mama.

- El resveratrol, sustancia natural derivada de las uvas, inhibe la proliferación celular e induce apoptosis en la línea celular MCF-7, de una manera dependiente de p53 (Young-Ae *et al.*, 2004; Laux *et al.*, 2004).
- También la transfección de células MCF-7, con pequeños ARN de interferencia (ARNi), bajo regula bcl-2 y hace a las células sensibles a las drogas etopósido y doxorubicina, reduciendo el número de células viables si se compara con el tratamiento con estas drogas solamente, sobre todo si se analizan las células a las 48 h después de la transfección (Lima *et al.*, 2004).
- Existe un derivado del agente anticanceroso I3C (indol-3-carbinol), denominado DIM que puede inducir apoptosis en células de cáncer de mama, independientemente del estatus del RE, por un proceso mediado por la familia bcl-2 (Hong *et al.*, 2002).
- Curcumín es una molécula fitoquímica natural responsable del color amarillo de la especia cúrcuma, que puede tener un posible potencial terapéutico en pacientes con cáncer de mama, ya que en la línea celular MCF-7 donde se ha estudiado, curcumín indujo apoptosis y la expresión de p53 normal (Choudhuri *et al.*, 2002).

5.3. ANTIMETABOLITOS DE PURINAS Y PIRIMIDINAS

En general, la acción de los agentes antineoplásicos, antitumorales o citostáticos se produce bloqueando los ácidos nucleicos, e interfiriendo con el crecimiento celular, por lo que son empleados de manera habitual en el tratamiento del cáncer. Los más utilizados en ginecología oncológica, pertenecen a cinco grandes grupos según su acción (Rodríguez y Rodríguez, 2000; Barrenetxea, 2000):

- Alquilantes: establecen enlaces covalentes mediante radicales alquilo con moléculas nucleofílicas como las proteínas o los ácidos nucleicos, dando lugar a la formación de puentes intra o intercatenarios de la hélice de ADN.
- Antibióticos: se intercalan entre las bases del ADN.
- Antimetabolitos: inhiben la síntesis de los precursores del ácido nucleico, por su homología con las bases púricas o pirimidínicas.
- Fitoderivados (Alcaloides de la Vinca y Taxanos): inhiben la polimerización del sistema microtubular.
- Derivados del Podofilino: inhiben enzimas fundamentales para la normal función del ADN.

Los antimetabolitos son análogos estructurales sintéticos de sustancias que existen en la naturaleza y cumplen funciones esenciales en el metabolismo de las células en división. La estructura de los antimetabolitos difiere muy poco de sus equivalentes normales, de modo que compiten con éstos mediante una variedad de mecanismos que interfieren con sus funciones específicas, en la síntesis de las bases pirimidínicas y purínicas, en la unión de éstas en nucleósidos o en su incorporación a la cadena de ADN. Estos procesos son bloqueados en distintas etapas en la fase S del ciclo celular según los antimetabolitos, de modo que las células afectadas no se dividen y a menudo mueren (Di Paolo *et al.*, 2004). Lo mismo que todos los otros fármacos citostáticos, los antimetabolitos afectan en la misma medida a las células normales y las malignas en multiplicación, y el margen de seguridad, por lo tanto es estrecho, lo cual limita mucho su utilidad en la práctica. Las células tumorales pero no las normales que se multiplican, eventualmente se tornan resistentes a los antimetabolitos (Galton, 1993), así se ha demostrado que esta reducida sensibilidad de las células tumorales a los antimetabolitos, se debe a

la proteína p53 mutada, que es incapaz de sobrerregular bax y bajo regular bcl-2 (Zunino *et al.*, 1997).

El *aminopterín* fue el primer antimetabolito que demostró actividad clínica en el tratamiento de niños con leucemia aguda en los años 40. Fue sustituido por un antifolato, el *metotrexato*, que manifestó actividad contra un rango amplio de enfermedades humanas como la leucemia, cáncer de mama y colorectal, linfomas, etc. En los años 90, se desarrollaron nuevos antifolatos para evitar los mecanismos de resistencia al metotrexato. Así surgieron el *trimetrexato* y el *tomudex*, potente inhibidor específico de la timidilato sintetasa. Otros antifolatos han sido desarrollados como el LY231514, y han demostrado actividad contra células de cáncer de pulmón de células pequeñas (Chu *et al.*, 2001).

5.3.1. 5-FU

El análogo mejor conocido de las pirimidinas es el 5-fluorouracilo. El 5-FU es un uracilo cuyo átomo de hidrógeno en la posición 5 ha sido sustituido por un átomo de flúor. Lo mismo que el uracilo, se convierte en desoxirribótido dentro de la célula. El desoxirribótido falso compite con el natural por la enzima timidilato sintetasa, que convierte el sustrato normal en ácido desoxitimidílico transfiriendo un grupo metilo del metilene tetrahidrofólico a la posición 5 del núcleo uracilo. La inhibición de la síntesis del ácido desoxitimidílico impide que se sintetice ADN y esto produce la muerte de las células en división. El 5-FU también se incorpora a largo plazo en el ARN, provocando efectos importantes en su procesamiento y funciones, inhibiendo la maduración del ARN ribosómico y convirtiéndose pues, en un gran tóxico celular (Isselbacher *et al.*, 1994).

El 5-FU, es un agente quimioterápico ampliamente usado en el tratamiento de diversos tumores sólidos malignos como el cáncer gastrointestinal y cáncer de mama. Fue desarrollado por Heidelberger *et al.* (1957), y desde entonces se ha establecido que el método de administración óptimo para el paciente es el de administración oral y no el de administración intravenosa, teniendo en cuenta la calidad de vida de éste, el coste efectividad

y los efectos antitumorales (Tanaka *et al.*, 2000). Los efectos antitumorales obtenidos por administración oral de un agente quimioterápico puede ser pobre comparado con otros obtenidos por administración intravenosa del agente, sin embargo 5-FU es adecuado para fórmula oral por sus características farmacológicas y mejorada eficacia y tolerabilidad (Cunningham y Coleman, 2001). En contra de estas ideas, Brito *et al.* (1999), indicaron que el uso del 5-FU administrado oralmente fue abandonado debido a la absorción errática, causada por los variados niveles de dihidropirimidina deshidrogenasa encontrados en el tracto gastrointestinal. Si se administra por vía intravenosa, puede hacerse por inyección o por infusión, aunque la duración de la óptima infusión y la intensidad de la dosis de 5-FU, continúa debatiéndose (Lokich, 1998; Cattell *et al.*, 2003).

El 5-FU es particularmente tóxico para la mucosa de la cavidad bucal y del tracto gastrointestinal, la médula ósea y los tejidos embrionarios, y también es inmunosupresor. Los mecanismos de acción antitumoral del 5-FU, dependen del anabolismo del fármaco a nucleótidos citotóxicos, que sucesivamente pueden actuar a varios niveles, incluyendo inhibición de timidilato sintetasa o incorporación dentro del ADN o ARN. La dihidropirimidina deshidrogenasa (DHPD), es la enzima inicial limitante en el catabolismo de las pirimidinas. Así pacientes con cáncer que presentan una baja actividad de DHPD tienen incrementado el riesgo de toxicidad severa, que incluye diarrea, estomatitis, mielosupresión, neurotoxicidad y en algunos casos la muerte (Johnson *et al.*, 1999). Aunque el 5-FU no muestra efectos citotóxicos en sí, los produce después de ser fosforilado y convertido en metabolitos activos como el FUTP (5-fluororidina-5'-trifosfato) que es incorporado en toda clase de ARN y por lo tanto, reconocido por la ARN polimerasa, y FdUMP (5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato) que actúa inhibiendo a la TS involucrada en la síntesis de ADN.

El 5-FU es más efectivo si se administra en combinación con fármacos de otras clases como por ejemplo, las sales de calcio del ácido folínico, también llamado Leucovorín, ya que los perfiles de toxicidad son más pronunciados, aunque la evaluación de la calidad de vida del paciente, muestra

que la combinación de terapia, no tiene impacto, en la evolución en el tiempo del estado global de la enfermedad (Carnaghi et al., 2000). Para fármacos que actúan en una fase específica del ciclo celular, la secuencia de administración, puede determinar la eficacia y toxicidad de una terapia combinada. Estudios in vitro con 5-FU y taxanos, indican que 5-FU administrado antes o simultáneamente a paclitaxel merma la citotoxicidad comparado con la monoterapia de paclitaxel, mientras que la secuencia inversa resulta en citotoxicidad sinérgica o aditiva (Smorenburg et al., 2001).

5.3.1.1 Timidilato sintetasa

La *timidilato sintetasa* (TS), es una de las enzimas de mamíferos mejor caracterizadas y que ofrece varias características mecánicas, incluyendo cambios conformacionales inducidos por ligandos en catálisis. Es la responsable de la síntesis de novo de 2'-deoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP), para la que el 5,10-metilen-tetrahidrofolato (CH_2THF), es el donante del grupo metilo. dTMP es requerido para la síntesis de ADN, y será subsecuentemente fosforilada dos veces, antes de su incorporación al ADN en forma de deoxitimidina trifosfato (dTTP). La TS es inhibida por los análogos de nucleótidos y por los folatos. Las células proliferantes, son rápidamente vulnerables a la modulación bioquímica de 5-FU por los tetrahidrofolatos (CH_2THF). El 5-FU activado (FdUMP) crea un complejo ternario estable con la timidilato sintetasa y CH_2THF , anulando la actividad enzimática y paralizando la síntesis del ADN. Por lo tanto, la TS es una diana importante para la quimioterapia (Peters et al., 2002).

Varios estudios sugieren que los niveles intratumorales de TS, se correlacionan con la supervivencia, pudiéndose considerar un factor pronóstico independiente para la recurrencia locoregional, metástasis distantes, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (Cascinu et al., 1999; Edler et al., 2000). Diversos estudios demuestran que pacientes con cáncer colorectal, con bajos niveles de expresión de TS en sus metástasis, han mostrado tasas de respuesta de tres a diez veces mayor comparados a pacientes con altos niveles de TS (Aschele et al., 2002; Edler et al., 2002). La

expresión inmunohistoquímica de p53 y TS puede ayudar al clínico para predecir la respuesta de los pacientes a 5-FU en cáncer colorectal (Paradiso *et al.*, 2000), y la expresión inmunohistoquímica de TS y de timidina fosforilasa predice la respuesta en carcinoma mamario (Ogura *et al.*, 2003). Igualmente en cáncer pancreático la expresión inmunohistoquímica de TS, es capaz de predecir la respuesta a la terapia adyuvante basada en 5-FU (Hu *et al.*, 2003). El polimorfismo génico de TS puede servir en pacientes con avanzado cáncer colorectal, como predictor de respuesta a capecitabina (profármaco de 5-FU)

La expresión de TS está controlada a varios niveles, que pueden afectar al final la actividad catalítica en la célula, y la capacidad de las drogas de inhibir la actividad funcional de la enzima. TS es la diana para 5-FU y para varios inhibidores basados en folatos, y su expresión se puede relacionar con la sensibilidad a estos fármacos. Así la inducción de TS después de la exposición a 5-FU, es un fenómeno generalmente observado en células malignas y no malignas (Parr, 1998). Según Peters *et al.* (2002), el papel de la expresión de la enzima TS no está del todo claro, ya que encuentran en su estudio, que la baja tasa de proliferación celular previene de la inducción de daño de ADN y de la toxicidad de 5-FU, aunque las células con menos TS, teóricamente deban ser más sensibles a 5-FU. Estos datos indican que pacientes con sensibilidad tumoral a 5-FU pueden ser identificados antes de iniciar la terapia con tratamientos basados en dicho fármaco, mientras que pacientes con resistencia tumoral a fluoropirimidinas podrían recibir fármacos alternativos con diferentes mecanismos de acción como por ejemplo el oxaliplatín.

La capacidad de la TS de funcionar como un regulador translacional, puede tener importantes consecuencias con respecto al desarrollo de resistencia celular a varios fármacos antineoplásicos. La autorregulación translacional involucra la unión de la proteína TS a su propio ARNm en dos áreas distintas, reprimiendo la eficiencia translacional (Voeller *et al.*, 2002). La presencia de inhibidores de TS conlleva la derepresión de la unión de la proteína al ARNm, resultando en una incrementada eficiencia translacional y en último lugar en niveles incrementados de la proteína TS. La resistencia adquirida a 5-FU o antifolatos, ha sido ciertamente asociada con una

incrementada expresión de TS a nivel proteico o de ARNm (Welsh *et al.*, 2000). La eficacia mejorada de 5-FU se puede lograr, por incremento y prolongación en la inhibición de la TS, por una prevención en la disociación de los complejos ternarios, y por la prevención de la inducción de TS (Mader *et al.*, 1998).

Recientemente Kastanos *et al* (2001), desarrollaron un sistema celular donde la expresión de TS podía ser modulada por un promotor inducible de Zn^{2+} en la línea celular MCF7, y encontraron que la sobreexpresión de TS, provocaba baja regulación de proteína p21 y de los niveles de ARNm, a través de un mecanismo independiente de p53. Las células con bajos niveles de p53 son más sensibles a 5-FU, que células con altos niveles de p53 mutada.

La TS puede jugar un papel crítico en la regulación del ciclo celular y los procesos de apoptosis, a través de sus efectos regulatorios, en la expresión de p53 y quizás, en otras proteínas relacionadas con el ciclo celular (Liu *et al.*, 2002). En células de la línea celular M7TS90, desarrollada a partir de MCF-7, donde se ha desarrollado p53 normal con expresión inducible de TS, la detención del ciclo celular y la apoptosis, debida a la inactivación de p53 por la inducción con 5-FU, no se vio afectada por los niveles de expresión de TS. Sin embargo la detención del ciclo celular y la apoptosis inducida por antifolatos, sí fue anulada por la inducción de TS, que activó la proteína p53. Estos resultados indican que en células M7TS90, la expresión de TS no modula p53 en respuesta a 5-FU (Longley *et al.*, 2002; Longley *et al.*, 2003).

5.4. NUEVOS FÁRMACOS DERIVADOS DEL 5-FU

Los análogos de nucleósidos y bases pirimidínicas son muy utilizados en el tratamiento del cáncer, pero presentan una serie de desventajas como, que el espectro antitumoral no es suficientemente amplio, que se ven afectadas células normales provocando efectos tóxicos sobre el organismo, o incluso que son poco efectivos frente a metástasis. Estos inconvenientes han hecho necesaria la síntesis de agentes derivados del 5-FU.

Los profármacos pueden ser definidos como agentes que son transformados después de su administración, bien por metabolismo o bien por ruptura química, para formar una especie activa farmacológicamente (Denny, 2001). Los profármacos de 5-FU se caracterizan por un anillo de pirimidina con un átomo de flúor en posición 5.

Una posibilidad de obtener profármacos derivados de nucleósidos que no tengan tantos efectos indeseables, es añadir sustancias de afinidad lipídica que puedan penetrar en la célula por difusión pasiva y ser hidrolizados en el interior para liberar ya dentro el correspondiente principio activo. La conversión en derivados fosfolipídicos permite además, que estos compuestos sean resistentes a enzimas que inactivan dichos nucleósidos, que presenten mejores características farmacocinéticas y que tengan la posibilidad de una gradual liberación intracelular.

El aumento de la concentración de 5-FU en la célula se puede conseguir con compuestos que sean activados en el interior de la célula tumoral. Existe una enzima denominada uridina fosforilasa que actúa sobre el sustrato, dando lugar al principio activo que posee la actividad citotóxica. Así, el compuesto posee menos efectos secundarios sobre el individuo, es bien tolerado por vía oral y no tiene toxicidad gástrica o sobre médula ósea en comparación con 5-FU, disminuyendo, además, los efectos inmunosupresores. La acción antitumoral selectiva parece estar relacionada con el hecho de que la uridino fosforilasa está presente en mayores cantidades en células tumorales que en células normales (Isselbacher *et al.*, 1994; Denny, 2001).

Por otro lado, las células con fenotipo maligno poseen una gran actividad metabólica que hace que el medio intracelular sea más ácido. Esto hace que enzimas como la uridino fosforilasa, presentes en mayor proporción en células tumorales, actúen sobre el sustrato y se libere más rápidamente el 5-FU siendo su acción mucho más selectiva. Así, estos análogos de nucleósidos de 5-FU son hidrolizados en ácidos diluidos, pero son estables en soluciones neutras, de forma que la liberación in vivo debe ser enzimática.

En los últimos años, se han desarrollado nuevas fluoropirimidinas orales que han sido estudiadas en cáncer colorectal y en otros tumores como el de mama, en respuesta a la necesidad de agentes químicos más convenientes, con mejorada eficacia, actividad y seguridad comparados con el 5-FU intravenoso. Estos nuevos compuestos pueden emular los efectos de una continua infusión de 5-FU y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Entre estos fármacos se encuentra el Ftorafur, la doxifluoridina, UFT, 5-etinil-uracil, S-1, BOF-A2 y la capecitabina.

5.4.1. Ftorafur

Fue sintetizado por Hiller *et al.* (1967), y su utilización *in vitro* no ha demostrado por sí mismo efectos citotóxicos. Cuando es administrado *in vivo*, gradualmente se convierte en 5-FU por la enzima citocromo p-450, presente principalmente en el hígado, y de esta manera sí produce efectos citotóxicos. También puede ser convertida en 5-FU espontáneamente *in vivo* o, por la timidina fosforilasa también presente en el hígado (Takiuchi y Ajani, 1998).

Ftorafur va a producir efectos antitumorales, ya sea administrado por vía oral o intravenosa. Administrado por vía intravenosa va a causar neurotoxicidad central, diarreas severas y mucositis (Friedman y Ignoffo, 1980). Si es administrado oralmente, raramente va a producirse toxicidad gastrointestinal, ya que produce efectos citotóxicos, después de ser metabolizado y ser convertido en 5-FU en el hígado, y además puede mantenerse una concentración estable de 5-FU en sangre (Taguchi, 1997). La persistencia de concentraciones estables de 5-FU, llevada a cabo por la administración de Ftorafur, que lo libera de manera continuada, ha permitido la utilización de este profármaco de 5-FU, de forma habitual. Sin embargo, cuando se administra por vía oral en bajas dosis, el 5-FU liberado de Ftorafur, es rápidamente degradado por DHPD, lo que ha llevado al desarrollo de un nuevo fármaco, combinación de Ftorafur y de Uracil, que es el UFT (Tanaka, 2000).

5.4.2. Capecitabina

La capecitabina es un profármaco del 5-FU, aprobado para el tratamiento de cáncer de mama y colorectal, y desarrollado como un profármaco administrado oralmente y como agente citotóxico selectivo tumoral. Fue desarrollado por Arazaki *et al.* (1992), como una fórmula oral que pudiera evitar la toxicidad del 5-FU, y a su vez no pudiera ser metabolizada por la enzima timidina fosforilasa en el intestino. La Capecitabina administrada oralmente por lo tanto va a atravesar la barrera gastrointestinal, siendo rápidamente absorbida y sin producir diarreas (Reigner *et al.*, 2001).

La capecitabina es convertida en 5-FU, a través de una ruta enzimática triple y secuencial. Se vuelve efectiva después de la conversión selectiva por la enzima hepática carboxilesterasa, en su mayor metabolito 5'-deoxi-5-fluocitidina (5'-DFCR), y ésta a su vez es convertida por la enzima citidina desaminasa, en 5'-deoxi-5-fluoridina (5'-DFUR), presente en hígado y en tejido tumoral. Por último su transformación en 5-FU en células de cáncer de mama, se debe a la timidina fosforilasa, que se encuentra sobrerregulada en tumores sólidos, y se asocia con angiogénesis tumoral, mostrando propiedades antiapoptóticas (Caudry *et al.*, 1995; Zufía *et al.*, 2004). Se ha demostrado que una alta expresión de timidina fosforilasa se asocia con resistencia a tratamientos con 5-FU convencionales en cáncer de colon, y en consecuencia, la capecitabina ofrece un medio para superar este tipo de resistencia (Leichman *et al.*, 1995).

La capecitabina puede tener dos ventajas principales: la primera, es que puede incrementar la concentración del principio activo en el lugar del tumor, y así tener mayor actividad; y la segunda, es que puede disminuir la concentración de droga en tejidos sanos, con una reducción consecuente de la toxicidad sistémica (Malet-Martino y Martino, 2002).

5.4.3. Aciclonucleósidos pirimidínicos

Otra serie de compuestos que han sido desarrollados y estudiados experimentalmente (Marchal, 1999; Marchal, 2000; Saniger, 2003; Saniger, 2003; Marchal, 2004; Campos, 2005), son los aciclonucleósidos pirimidínicos (Gallo-Mezo *et al.*, 1995) derivados del 5-FU, los cuales poseen una serie de propiedades:

- Actúan como profármacos y pueden ser fosforilados por medio de las quinasas correspondientes y subsiguientemente ser incorporados al ARN para ejercer su acción citotóxica.
- Pueden actuar liberando 5-FU en el interior de la célula junto a otros productos, como la acroleína, que también poseen actividad antitumoral.
- Debido a la similitud conformacional de estos compuestos y el nucleósido natural desoxi-uridina, las moléculas acíclicas pueden hipotéticamente mimetizar a la desoxiuridina en estructura y actividad antineoplásica.

Se ha comprobado que estos derivados tienen actividad doble de la presentada por el 5-FU frente a células HEP-2 (carcinoma laríngeo humano), presentando incluso sobre ratones pocas muestras de toxicidad aguda en comparación con 5-FU. Por otro lado estos compuestos poseen una actividad selectiva sobre las células tumorales, que poseen un medio más ácido que las sanas.

La inducción con estos agentes en la línea de rhabdomiosarcoma humano RD, conlleva modificaciones morfológicas y ultraestructurales, con cambios en la expresión y distribución en proteínas de filamentos intermedios y microtúbulos, provocando procesos de diferenciación miogénica, similares a los ocurridos durante el proceso normal de miogénesis (Marchal, 1996).

6. NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS SELECTIVAS FRENTE A DIANAS MOLECULARES

6.1. ANTICUERPOS MONOCLONALES DIRIGIDOS

Los anticuerpos monoclonales son de gran importancia debido a su excepcional método de obtención, que posibilita la producción de cantidades ilimitadas de un solo anticuerpo frente a un antígeno, que puede ser especialmente seleccionado. Desde el punto de vista clínico, presentan un enorme interés a nivel diagnóstico y terapéutico por ser susceptibles de ser administrados por vía subcutánea o endovenosa. Normalmente, la vía endovenosa se utiliza para el diagnóstico y terapia de tumores sistémicos, y la subcutánea, para enfermedades metastásicas de los nódulos linfáticos. Los anticuerpos monoclonales pasan por los conductos linfáticos hasta los nódulos linfáticos, y aquí los anticuerpos pueden unirse a las células diana. Su principal aplicación en la terapia está dirigida al campo de la oncología, usándose como agente terapéutico en sí mismo o bien como transportador del agente terapéutico (San Miguel, 1991).

Uno de los blancos ideales de los anticuerpos en este tipo de tratamiento es HER-2/neu, como única modalidad o combinado con otras modalidades coadyuvantes. El anticuerpo humanizado *trastuzumab* tiene actividad antitumoral contra células tumorales de mama humanas sobreexpresando HER-2, y es ampliamente usado para el tratamiento de mujeres con sobreexpresión de HER-2 en cáncer de mama (Yarden y Sliwkowski, 2001; Parton *et al.*, 2004). Trastuzumab induce una baja modulación de HER-2, y bloquea la progresión del ciclo celular por la formación de complejos p27/cdk2. *In vivo* Trastuzumab, inhibe la angiogénesis e induce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Otro anticuerpo monoclonal humanizado llamado 2C4, une a epítopos diferentes de HER-2 que trastuzumab y se ha visto en ensayos clínicos en fase I, que puede tener potencial contra una amplia variedad de tumores sólidos (Albanell *et al.*, 2003). Además estos anticuerpos contra HER-2 son usados en combinación con quimioterapia en el tratamiento del cáncer de mama metastásico (Harari y Yarden, 2000). El tratamiento con

trastuzumab incrementó la sensibilidad a drogas como las antraciclinas, cisplatín y taxanos, pero no a 5-FU en células de cáncer de mama (Ryungsa *et al.*, 2002). También se han producido anticuerpos biespecíficos que no sólo reconocen los antígenos asociados con el tumor, sino que se fijan a las células inmunes y las estimulan. Sin embargo, este tipo de terapia presenta dos problemas: el primero es la creación de anticuerpos que no induzcan que la paciente forme otros contra ellos, y segundo, la gran especificidad del anticuerpo monoclonal, ya que a menudo los tumores presentan antígenos múltiples (Eberlein y Goedegebuure, 2000).

6.2. TERAPIA GÉNICA

A pesar del desarrollo de un importante número de agentes quimioterápicos y del aumento de la supervivencia global de los pacientes con cáncer de mama, la esperanza de vida de los pacientes que desarrollan metástasis son limitadas. El desarrollo de la terapia génica, como un tipo de terapia antitumoral dirigida contra objetivos selectivos, para la destrucción de las células neoplásicas, el cese o disminución de su capacidad proliferativa o la corrección del defecto celular, se presenta como uno de los mayores logros en la investigación actual.

Se necesitan al menos tres condiciones para desarrollar nuevas terapias génicas (Watson, 1991):

- La existencia de estudios clínicos relacionando la sobreexpresión de un gen, para determinar que pacientes se pueden beneficiar de esta terapia, y adaptarla a cada subtipo de cáncer de mama.
- Un conocimiento del modo de acción de la molécula objetivo involucrada en la carcinogénesis o progresión.
- Una forma de alcanzar específicamente al tumor y no a las células normales para minimizar la toxicidad y aumentar la selectividad al tratamiento.

En los últimos años, se han desarrollado tres estrategias terapéuticas fundamentales para tratar el cáncer de mama utilizando la terapia génica:

- La inmunoterapia genética, que consiste en la introducción de nuevos genes en las células tumorales, para intensificar las respuestas inmunes antitumorales.
- La transducción de tumores con profármacos o enzimas convertidoras, en los que se aumenta la susceptibilidad de las células tumorales a la quimioterapia mediante manipulaciones que induzcan la expresión de enzimas convertidoras de profármacos.
- La terapéutica de reemplazo genético, en la que se altera el fenotipo de las células tumorales malignas, al corregir patrones anormales de expresión genética subyacentes a la carcinogénesis.

La terapia génica con genes suicidas podría ser una adición atractiva al tratamiento del cáncer para obviar el problema de la quimioresistencia adquirida. Esta quimioresistencia frecuentemente es la responsable del fallo en el tratamiento (Ziller *et al.*, 2004). La terapia génica suicida de tipo prodroga/droga, está basada en la transferencia de genes, de no mamíferos, que codifican enzimas capaces de convertir selectivamente una prodroga en un metabolito altamente tóxico.

La terapia génica empleada en cáncer de mama, inicialmente podría ser local por medio de inyección directa en las lesiones, vía intrapleurales o sistémica (Patterson y Harris, 1999). El concepto sencillo de reemplazar la pérdida de genes con funciones críticas, se ha usado en laboratorio, para estudiar las funciones de genes supresores de tumores y puede ser usada también para desactivar oncogenes a través de secuencias de ADN antisentido (complementarias). Igualmente se puede utilizar para introducir genes que, de lo contrario, interfieren con la expresión de un oncogen.

Se ha sugerido que la terapia génica con p53 es un potencial tratamiento antitumoral, ya que restaurar la función de p53, puede inducir de forma importante apoptosis en líneas celulares tumorales. Así, la terapia génica retroviral y adenoviral se ha comprobado que induce apoptosis en líneas celulares que acarrean mutaciones en p53. La terapia génica adenoviral de p53 ha sido corrientemente evaluada en combinación con docetaxel en cáncer de mama avanzado (Obermiller, 2000).

La proteína mitocondrial bcl-2 es un importante mediador de resistencia a tratamiento con quimioterapia citotóxica tradicional, radioterapia y terapia con anticuerpos monoclonales. La combinación de terapia citotóxica con oblimersen (un oligonucleótido bcl-2 antisentido), ha mostrado tener una eficacia antineoplásica importante (Bücheler, 2003). Esta terapia basada en Bcl-2 antisentido, puede ser válida para inducir apoptosis y aumentar la quimiosensibilidad en cáncer de mama (Zhang, 2002; Nahta y Esteva, 2003).

Otras experiencias en curso de terapia génica no basadas en oncogenes supresores de tumores, incluyen la transfección de moduladores inmunes, tales como antígenos y citoquinas; la protección de células madre con el gen de resistencia a multidrogas, o purgar las células madre con el gen proapoptótico bcl-x o con el gen HSV-TK y ganciclovir (Osborne, 2004).

Actualmente se están ensayando en modelos preclínicos, terapias antioncogénicas usando secuencias antisentido con c-fos y c-myc, junto con otros muchos genes relevantes relacionados con el cáncer de mama (Head, 2002). También se han utilizado selectivamente oligonucleótidos antisentido para bajar regular la expresión de HER-2/neu en células de cáncer de mama humanas (Roh *et al.*, 2000).

Por otro lado, Hung *et al.* (1996), llegaron a la conclusión de que la ciclina D1 sometida a terapia antisentido con oligodesoxinucleótidos, funcionaba como un agente antiproliferativo, y que diferentes oligodesoxinucleótidos antisentido contra ciclinas D1, ejercían diferente eficacia en la inhibición del crecimiento celular y de la expresión génica.

6.3. NUEVOS FÁRMACOS SELECTIVOS FRENTE A CICLO CELULAR Y APOPTOSIS

La identificación de genes y de los productos de genes que son responsables de la apoptosis, junto con información que emerge acerca de los mecanismos de acción y de las estructuras de los reguladores apoptóticos y sus proteínas efectoras, ha llevado al descubrimiento de fármacos que actúan modulando estas dianas. Algunos de estos fármacos están sometidos a evaluación en ensayos clínicos (Reed, 2002).

Los receptores de MCP son dianas atractivas para la intervención terapéutica en cáncer, debido a su capacidad para inducir apoptosis en muchos tipos celulares. Así el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), es considerado como un prototipo de inductor de apoptosis en MCF-7 (Simstein *et al.*, 2003). De hecho se ha demostrado (Burow *et al.*, 1999), que la apoptosis inducida por TNF- α , puede ser suprimida en células RE+ como las MCF-7, debido a la acción de los estrógenos ambientales. Sin embargo, la infusión de TNF- α , en ratones causó apoptosis hepática letal (Ashkenazi *et al.*, 1999).

Existen investigadores como Baell y Huang (2002), con un gran interés en desarrollar péptidos y no péptidos imitadores de BH3, familia de proteínas que actúa como antagonista directo de bcl-2, como nuevos agentes anticancerosos.

Como el problema que surge del uso de los inhibidores de TS es la toxicidad, Li *et al.* (2001), diseñaron una nueva estrategia basada en la activación terapéutica catalizada por enzimas, para evitar dicha toxicidad. Así desarrollan un nuevo agente antitumoral (NB1011), cuya actividad aumenta en células tumorales que expresan elevada TS endógena.

Todos estos ensayos realizados en los últimos años, abogan por la búsqueda de nuevos agentes antitumorales, que tengan actividad selectiva sobre moléculas específicas del ciclo celular y la apoptosis. Dichos ensayos,

permitirán obtener tratamientos antineoplásicos, menos tóxicos y más selectivos sobre las pacientes afectadas de cáncer.

II. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo de investigación han sido:

- Evaluar la actividad citotóxica de los nuevos fármacos derivados del 5-FU, en la línea tumoral humana de cáncer de mama (MCF-7).
- Analizar el efecto de los compuestos sobre los puntos de control del ciclo celular, comparándolos con los del 5-FU y Ftorafur para intentar dilucidar su mecanismo de acción.
- Estudiar la capacidad de estos fármacos de inducir apoptosis a su concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7.
- Realizar un análisis comparativo de las modificaciones que los nuevos compuestos provocan en los marcadores tumorales moleculares utilizados en el diagnóstico clínico del cáncer de mama.
- Diferenciar aquellos compuestos que actúen como profármacos del 5-FU de los que poseen actividad antitumoral *per se*.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. LÍNEA CELULAR

La línea celular humana derivada de cáncer de mama MCF-7, fue amablemente proporcionada por el Dr. N. Olea, del instituto de biología tumoral Sánchez Mora del hospital universitario de Granada.

1.2. CONDICIONES DE CULTIVO

Los cultivos de células se realizaron en cabina de flujo laminar (Micro-V, Telstar, España) bajo condiciones de esterilidad. Los frascos de cultivo estériles (Falcon de 25 u 80 cm² de superficie útil) se mantuvieron en estufa a 37°C, atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad. Durante el cultivo celular las células tuvieron que ser sembradas en nuevos Falcon conforme se alcanzaba la saturación, despegándolas de la superficie de los frascos de cultivo mediante una solución de PBS-EDTA (0,02%) o de Tripsina (10x). Después fueron centrifugadas a 600 x g durante 5 minutos y lavadas 2 veces con PBS resuspendiéndolas en medio de cultivo.

Para el cultivo fue utilizado el medio Dubelcco`s Eagle modificado (DMEM) (Gibco, USA) (13,37 gr de medio base), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Flow, United Kingdom) en calor húmedo a 60°C durante 30 minutos. El medio fue tamponado con 27 ml de NaHCO₃ al 7,5%, y 10 ml buffer Hepes (Flow) 1M pH 7,2 y suplementado con 40 mg/l de gentamicina (Antibióticos S.A), 500 mg/l de ampicilina (Antibióticos S.A), 20 ml de L-glutamina (Flow) 200 mM y agua bidestilada, c.s.p. hasta 1000 ml. Una vez preparado el medio de cultivo fue filtrado con filtros Millex estériles de 0,22 µm (Millipore, France) y añadido a los frascos.

1.3. MÉTODO DE CONGELACIÓN CELULAR

Para la congelación celular, las células fueron despegadas de la superficie de los Falcons mediante una solución de PBS-EDTA (0,02%) o de

Tripsina (10x), centrifugadas a 600 x g durante 5 minutos y lavadas 2 veces con PBS. El pellet celular fue resuspendido en medio de congelación a razón de 0.5×10^6 células por ml siendo introducidas inmediatamente en criotubos y estos en el congelador a -80°C durante 24 h, siendo almacenadas definitivamente en nitrógeno líquido tras este período o de Tripsina (10x).

Medio de congelación: suero fetal bovino (Sigma, SL), inactivado en calor húmedo a 56°C durante 30 min, y dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%.

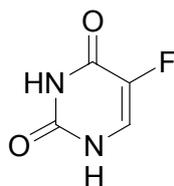
1.4. MÉTODO DE DESCONGELACIÓN CELULAR

La línea celular MCF-7 crioconservada en Nitrógeno líquido fue descongelada en calor húmedo a 37°C , inmediatamente, las células se resuspendieron en PBS estéril, siendo centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos repitiendo el proceso 2 veces para eliminar los restos de DMSO. El pellet fue resuspendido en medio de cultivo previamente filtrado y las células depositadas en frascos de cultivo.

2. AGENTES FARMACOLÓGICOS

2.1. 5-FLUOROURACILO (5-FU)

El 5-FU: *5-Fluoro-2,4(1H,3H) pirimidindiona* de peso molecular 130.08 g/mol fue suministrado por el Dr. Antonio Espinosa del Dpto de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de Granada. Este compuesto se usó como control para comparar los efectos de los nuevos fármacos. Se preparó un stock mediante la disolución de 10 mg del fármaco en 10 ml de agua bidestilada estéril, a una concentración final de $7,68 \times 10^{-3}\text{M}$. Su estructura se muestra en la Fig 1:

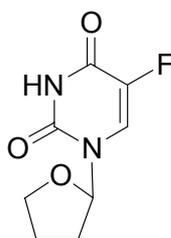


5-Fluorouracilo, 5-FU

FIG.1

2.2. FTORAFUR

El Ftorafur (Fig.2): *5-Fluoro-1-(tetrahidro-2-furil) uracil*) de peso molecular 200.17 g/mol, es un profármaco del 5 Fu que no provoca efectos citotóxicos *in vitro*. También ha sido suministrado por el Dr. Antonio Espinosa del Dpto de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de Granada, y usado como control para comparar el efecto con los nuevos fármacos. Se preparó un stock mediante la disolución de 10 mg del fármaco en 10 ml de agua bidestilada estéril, a una concentración final de $9,9 \times 10^{-3} \text{M}$.



Ftorafur

FIG.2

2.3. PROFÁRMACOS DEL 5- FU

La síntesis y diseño de los 21 fármacos derivados del 5-FU mediante modificaciones en su estructura (Tabla I), se llevó a cabo en colaboración con el grupo de investigación dirigido por el profesor Dr. Antonio Espinosa del departamento de química farmacéutica de la Universidad de Granada. Estos

fueron disueltos en DMSO (10 mg de fármaco en 10 ml de DMSO) a la concentración deseada para cada experimento. Se obtuvo una solución stock de cada compuesto que fue almacenada a -20°C en alícuotas de 100 μl , a partir de las cuales, y tras su descongelación, se cogieron las cantidades necesarias para la inducción.

Debido a la solubilidad de los derivados del 5-FU en DMSO, también utilizamos controles de dicho compuesto de forma independiente y a las mismas concentraciones que los fármacos a los que diluye. Los efectos fueron eliminados de los resultados globales obtenidos con las técnicas realizadas en nuestro estudio, de tal modo que dichos resultados corresponden exclusivamente a la acción de los agentes.

Los compuestos utilizados en esta investigación, se han clasificado en tres grupos:

- *Grupo I* (*O,N*-Acetales cíclicos): compuestos cíclicos en los que el “resto glicomimético” es una estructura benzoxepínica o benzodioxepínica, como se muestra en la tabla I.
- *Grupo II* (fenoxi-*O,N*-Acetales acíclicos): seconucleósidos en los que el 5-FU se une por el OH del grupo fenólico como se muestra en la tabla II.
- *Grupo III* (Benzoxi-*O,N*-Acetales acíclicos e isósteros): compuestos abiertos en los que el 5-FU se une por el OH del grupo alcohólico, como se muestra en la tabla III.

^a El valor de $c \log^p$ fue calculado según el sistema fragmentario, basado en el método de Rekker *et al.* (1979)] y utilizando la opción CDR del programa PALLAS 2.0 (MÓDULO PALLAS es una herramienta que permite predecir parámetros fisicoquímicos, y lo suministra la compañía CompuDrug Chemistry Ltd, PO Box 23196, Rochester, NY 14696, EE. UU.). ^bEl valor experimental del $\log P$ es de -0.83 (Buur *et al.*, 1985). ^cEl valor experimental, medido mediante

la técnica de reparto octanol-buffer a pH 7.4 es de -0.36 ± 0.5 (Gulyaeva *et al.*, 2003).

TABLA 1. ESTRUCTURAS Y CONSTANTES FÍSICAS DE LOS COMPUESTOS DEL GRUPO I.

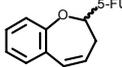
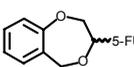
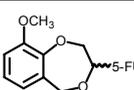
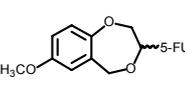
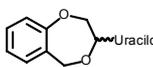
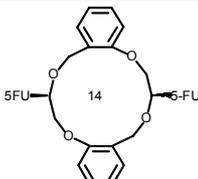
CÓDIGO	ESTRUCTURA	Peso Molecular (g/mol)	Aspecto y punto de fusión (°C)	c log P^a
5-FU		130.08	Sólido blanco 282-286	-0.89 ^b
Ftorafur		200.17	Sólido blanco 171-173	-0.18 ^c
196-A		228.22	sirupo	0.86
786-B		274.25	Sólido blanco 215-217	2.54
596-D		278.24	Sólido blanco 138-141	0.70
252-A		278.24	Sólido blanco 196-200	1.09
454-B		308.26	Sólido blanco 130-135	1.16
928-A		308.26	Sólido blanco 220-222	1.16
930-A		260.25	Sólido blanco 153-154	0.87
798-B		572.51	Sólido amarillento 80-83	2.18

TABLA 2. ESTRUCTURAS Y CONSTANTES FÍSICAS DE LOS COMPUESTOS DEL GRUPO II.

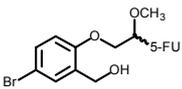
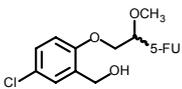
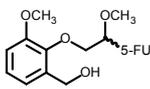
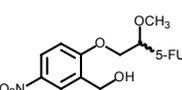
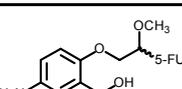
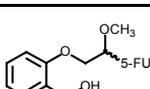
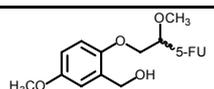
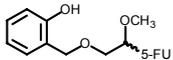
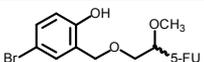
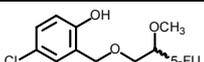
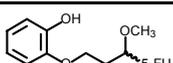
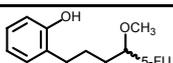
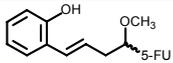
CÓDIGO	ESTRUCTURA	Peso Molecular (g/mol)	Aspecto y punto de fusión (°C)	c log P ^a
5-FU		130.08	Sólido blanco 282-286	-0.89 ^b
Ftorafur		200.17	Sólido blanco 171-173	-0.18 ^c
394-B		389.17	Sólido blanco 74-75	1.25
524-FS		344.72	Sólido blanco 110-115	1.04
600-F		340.30	Sólido blanco 130-133	0.37
548-FS		355.28	Sólido amarillento 230-233	0.04
704-D		325.29	Sólido marrón 100-101	-0.74
856-C		310.28	Sólido blanco 100-105	0.30
912-C		340.30	Sólido blanco 85-87	0.37

TABLA 3. ESTRUCTURAS Y CONSTANTES FÍSICAS DE LOS COMPUESTOS DEL GRUPO III.

CÓDIGO	ESTRUCTURA	Peso Molecular (g/mol)	Aspecto y punto de fusión (°C)	c log P ^a
5-FU		130.08	Sólido blanco 282-286	-0.89 ^b
Ftorafur		200.17	Sólido blanco 171-173	-0.18 ^c
442-C		310.28	Sólido blanco 154-157	0.32
484-E1		389.17	Sólido blanco 145-150	1.26
560-F		344.72	Sólido blanco 105-110	1.06
596-C		310.28	Sólido salmón 125-128	0.87
826-A		308.30	sirupo	1.84
778-G		306.29	sirupo	1.76

3. TRATAMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR MCF-7 CON LOS FÁRMACOS

Se siguió el siguiente protocolo: las células fueron despegadas de la superficie de los frascos de cultivo con PBS-EDTA (0,02%) o PBS-tripsina (10x) durante 10 minutos a 37°C y se lavaron dos veces con PBS a 4°C mediante centrifugación a 600x g durante 5 minutos. A continuación se diluyeron en medio Dubelcco's Eagle suplementado con el 10% de suero fetal bovino hasta obtener cultivos de 5×10^6 células. A partir de este momento realizamos la inducción con fármacos añadiendo las concentraciones deseadas de cada uno de ellos, permaneciendo en contacto con las células durante uno, dos, tres o seis días dependiendo del tipo de experimento. Se utilizaron como control en cada experimento cultivos paralelos de células MCF-7 sin drogas. El medio de ambos cultivos, control y tratados con drogas, fue remplazado cada 48h.

4. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

4.1 CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (CI₅₀)

Tras la inducción durante 6 días con los fármacos, a las concentraciones de 10, 20, 30 50, 75 y 100 μ M, de la línea celular en cultivo, y después de llevar a cabo un ensayo colorimétrico con Sulforrodamina-B (SRB) que se especifica más adelante, se procedió a la medida de la absorbancia para una densidad óptica de 492 nm. Se hicieron las gráficas de Densidad óptica (D.O) (eje de las Y) y concentración (eje de las X), de cada uno de los fármacos, y sobre las gráficas, se calculó interpolando el valor de la (CI₅₀) trazando la vertical en la curva del valor obtenido como media entre los dos valores extremos de la D.O.

4.2 CURVAS DE CRECIMIENTO

En todos los fármacos se utilizaron dosis correspondientes a las concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀). Igualmente se emplearon dosis mitad y doble de la CI₅₀ para el cálculo de las curvas de crecimiento. Iguales cantidades de DMSO fueron usadas para ver el efecto que producía este compuesto por sí mismo.

Se determinaron las curvas de crecimiento por dos métodos distintos:

4.2.1 Primer método:

Tras períodos de 6 días en cultivo, las células fueron despegadas mediante una solución de PBS-EDTA (0,02%) y centrifugadas a 1500 rpm. Se desechó el sobrenadante por decantación. Estas células fueron resuspendidas en 2ml de medio de cultivo y contadas repetitivamente mediante cámara Newbauer.

4.2.2 Segundo método:

Tras períodos de 6 días en cultivo, las células fueron coloreadas con Sulforrodamina-B (SRB) mediante el siguiente protocolo:

1. El tapiz celular se lavó con PBS al 1% y se incubó con glutaraldehído al 1% durante 15-30 minutos a 4°C, lavándose a continuación con PBS y dejándolo secar.
2. Las células así fijadas se tiñeron, durante 15 min con SRB al 0,4% en ácido acético al 1%.
3. Posteriormente, se lavó el tapiz con ácido acético al 1% y se dejaron secar de nuevo las placas.
4. El colorante fijado sobre las células se solubilizó con una solución 10mM Tris-base (pH 10.5) con agitación suave.
5. Alícuotas de 100 µl se transfirieron a placas de 96 pocillos y se leyeron en un colorímetro Titertek multiscan a 492 nm.

4.3 PROLIFERACIÓN CELULAR

Con el objeto de evaluar el comportamiento de la línea celular durante los 6 días en que las células estuvieron en contacto con los fármacos, se hizo la determinación de la proliferación celular.

Se utilizaron para el estudio placas Falcon de 24 pocillos, sembrando, con 30.000 células de la línea parental MCF-7, cada pocillo. Fueron expuestas al medio de crecimiento suplementado con cada una de las concentraciones de los diferentes fármacos ($\frac{1}{2} CI_{50}$, CI_{50} , $2 CI_{50}$). Como control los pocillos de las placas fueron sembrados con células que crecieron en medio de crecimiento estándar. Los experimentos se realizaron por duplicado. En cada experimento, las células de 3 pocillos con cada una de las 3 diferentes concentraciones de fármaco, y las células de 3 pocillos que crecieron en medio sin drogas, fueron recogidos separadamente cada 24 horas y contadas en cámara Newbauer durante los 6 días procediéndose a la realización de las curvas de crecimiento.

5. ANÁLISIS DE DISTRIBUCIÓN DEL CICLO CELULAR

Se sembraron Falcon de 80 cm² aproximadamente con 1×10^6 de células. Se indujeron con los distintos fármacos a la dosis de CI_{50} permaneciendo en cultivo durante 48 horas. También se sembraron Falcon control con medio de cultivo estándar.

5.1 FIJACIÓN DE LAS CÉLULAS

Una vez transcurrido este período de tiempo las células fueron lavadas dos veces con una solución tampón, contadas en cámara Newbauer y fijadas después en etanol al 70% frío (-20°C) en tubos Facs durante toda la noche a 4°C.

Solución tampón: 1 gr de glucosa en 1 l de solución salina de fosfato (PBS) (sin los iones Ca^{++} ni Mg^{++}).

5.2 TINCIÓN DE LAS CÉLULAS

Las células fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min, lavadas 2 veces con muestras tamponadas, resuspendidas y teñidas con solución de yoduro de Propidio durante media hora en la oscuridad. Las células fueron analizadas mediante FACScan usando el citómetro de flujo "VANTAGE" (Becton Dickinson, San José, CA,USA) por el software de análisis de ciclo celular CellFIT. Todos los experimentos fueron llevados a cabo por duplicado obteniéndose resultados similares.

Solución de yoduro de propidio: 50 µg/ml de PI, 0.5 mg/ml de RNAsa en solución tampón, pH 7.4.

6. ENSAYOS DE APOPTOSIS.

Los efectos de los fármacos, en cuanto a la pérdida de asimetría de la membrana plasmática, que resulta en la exposición de fosfatidilserina en la superficie externa de la membrana plasmática como un evento temprano en apoptosis, fue llevado a cabo mediante la unión de isocianato de fluoresceína (FITC)-etiquetada annexina V, a células, en respuesta a los compuestos. El estudio se realizó mediante el Kit TACS™ Annexin V-FITC (Pharmingen)

6.1 ESTUDIO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

300.000 células de la línea parental MCF-7 sembradas en placas Falcon de 6 pocillos fueron inducidas con los diferentes fármacos a distintos períodos de tiempo cambiando el medio de cultivo celular por medio nuevo. A las 3, 6, 12, 24 y 48 horas fueron despegadas de los frascos de cultivo con una solución de PBS-EDTA (0.02%), lavadas dos veces con PBS frío en tubos de FACS y centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min. A continuación fueron resuspendidas en 100 µl de la solución de binding buffer (10 mM hepes, pH 7.1; 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂), teñidas con 10 µl de la solución de anexina V (1 ml de anexina V-FITC (25 µg/ml), 10 µl de binding buffer, 10 µl PI (50 µg/ml), 79 µl H₂O e incubadas en oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo, se les añadió 250 µl de la solución de binding buffer y se procedió a su análisis por medio del FACScan.

Este análisis fue llevado a cabo por el Dr. Jaime Lazuén Alcón del servicio de citometría de flujo, del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

6.2 ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

10 µl de las muestras inducidas con los distintos fármacos durante 3, 6, 12, 24 y 48 horas, y procesadas con el Kit de apoptosis, de igual manera que para el estudio con citómetro de flujo, se depositaron en un porta y se analizaron inmediatamente con microscopía confocal.

7. OBTENCIÓN DE ADN

7.1. EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se hizo mediante Kit “Genomic ADN Purification” (Promega, Madison, WI). Tras el cultivo de la línea MCF-7 (en Falcon de 80 cm²) durante 3 días, con los diferentes fármacos, y siempre, con un Falcon control con las células parentales en medio estándar, estos fueron despegados y centrifugados para obtener un pellet de aproximadamente 10⁷–10⁸ células. A este pellet se le añadieron 600 µl de una solución de lisis nuclear y se mezcló cuidadosamente durante 3 minutos hasta obtener una perfecta homogenización. Se añadieron 3 µl de solución de RNasa a una concentración 100 mg/ml, mezclando e incubando a 37°C durante 30 minutos. Después, se dejó enfriar 5 minutos. Tras la incubación, y para eliminar la contaminación proteica, se añadieron 200 µl de solución de precipitación de proteína, mezclando suavemente durante 20 segundos y dejando la mezcla 5 minutos en hielo. Las dos fases se separaron por dos centrifugaciones a 14000 rpm durante 4 minutos a 4°C. Al sobrenadante se le añadieron 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente, mezclando suavemente hasta la formación de hebras. Centrifugamos 1 minuto a 14000 rpm aislando el precipitado. Se añadieron 600 µl de etanol al 70% con el cual se mezcló varias veces antes de ser centrifugado un minuto a 14000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se volcaron los eppendorf boca abajo sobre papel absorbente de 10 a 15 minutos. Una vez lavado, el pellet se resuspendió en 100 µl de solución de rehidratación y se incubó una hora a 65°C. Después se guardaron en el congelador a -20°C alícuotas de 90 µl para electroforesis y los 10 µl restantes se guardaron a 4°C para su cuantificación y para la determinación de su integridad.

Solución de lisis: 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 8 y 1% de Sarcosil.

7.2. CUANTIFICACIÓN DE ADN

Se llevó a cabo a una longitud de onda entre 260 nm y 280 nm, mediante el espectrofotómetro Ultrospec 2000 de Pharmacia Biotech. La lectura en este intervalo permitió calcular la concentración de ácidos nucleicos en la muestra mediante la relación entre la lectura (D.O. 260 nm/ D.O. 280 nm), teniendo en cuenta que 1 unidad de D.O. a 260 nm es igual a 50 mg/ml de ADN.

7.3. DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN

Dos µg de ADN fueron analizados realizando electroforesis a 80 V durante 1h en un gel de agarosa al 1,5%. La visualización del ADN por transiluminador de ultravioletas nos permitió comprobar que se encontraba degradado.

7.4. ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA

7.4.1. Preparación del gel de agarosa

Se disolvieron 0,75 gr de agarosa calentándola hasta ebullición en 49 ml de agua y 1 ml de 50 x TAE (concentración final de agarosa 1,5 %). Se dejó enfriar hasta una temperatura de 60°C y se le añadió 2,5 µl de bromuro de etídeo. Se mezcló suavemente para evitar la formación de burbujas y se depositó sobre un portageles con peine donde se dejó solidificar. Por último se colocó el gel de agarosa en el interior del aparato de electroforesis que contenía ya la cantidad suficiente de buffer de electroforesis (1 x TAE) para cubrir el gel.

Tampón concentrado de electroforesis (50 x TAE): Tris-acetato 2 M y EDTA 0.05 M, pH 8. Para su utilización en la electroforesis se diluye 50 veces.

7.4.2. Electroforesis

A las diferentes muestras de ADN se les añadió un volumen 1/10 de tampón de carga LB y se cargaron en los pocillos del gel. Los fragmentos obtenidos de la digestión de las muestras fueron separados mediante electroforesis, en el gel de agarosa (1,5%) a bajo voltage (40 V) durante toda la noche. También se introdujo el marcador de peso molecular VIII marcado con digoxigenina (Boehringer mannheim, Indianapolis, IN) que nos permitió identificar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

Buffer de carga LB: azul de bromofenol al 0.25%, xileno cianol al 0.25% y ficol 400 al 15%.

8. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LAS CÉLULAS

8.1. MICROSCOPIA ÓPTICA

Las células inducidas y no inducidas de la línea celular MCF-7 fueron observadas mediante microscopio invertido de contraste de fase Nikon TM Phase Contrast-2, ELWD 0.3.

8.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las células, fueron lavadas dos veces con PBS, y fueron sembradas en portas con pocillos estériles (Chamber slide System, Lab-Tek). Después de 6 días de tratamiento con los distintos fármacos fueron fijadas en una mezcla de glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 2% en tampón de cacodilato sódico (0.1 M, pH 7.4) ajustada con sacarosa al 0.05 M durante 2 h a 4°C. Posteriormente se lavaron con el tampón (3 cambios de 30 min cada). La postfijación se realizó con tetróxido de osmio al 2% (un 0.18% de ferrocianuro potásico) en solución acuosa a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con agua (3 cambios de 30 min). La deshidratación de las células se realizó utilizando etanol como agente deshidratante con los siguientes pasos:

- Etanol 50%-----20 min.
- Etanol 70%-----20 min.
- Etanol 90%-----20 min.
- Etanol 100%-----2 cambios de 20 min.
- Óxido de propileno-----2 cambios de 5 min.

Se desecaron por el método de Anderson (1951) o CPD (Critical point Dry) mediante DUPONT-Machine y se montaron en los portamuestras específicos o “stubs” con coloidal. Posteriormente, las células se metalizaron con oro durante 4 min en un metalizador Polaron E5000. Por último, las células fueron observadas en un Microscopio Electrónico de Barrido (DSM 950 de Zeiss).

8.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

8.3.1. Fijación de las células

A partir de cultivos de la línea celular a analizar inducida y sin inducir con los fármacos durante un período de tres días, se obtuvieron botones celulares de 5×10^6 células. La monocapa y los pellet celulares fueron fijados con un tampón de cacodilato sódico 0.1 M (pH 7.2-7.5) con glutaraldehído al 4% durante un periodo de 14 a 19 h a 4°C. Las muestras fueron lavadas en el mismo tampón, suplementándolo con sacarosa hasta alcanzar una concentración final de 0.25 M durante 20-22 h a 4°C.

Se realizó la postfijación con tetróxido de osmio (Merck) al 1% en tampón de millonig, durante 2.30 h con un lavado posterior en el mismo tampón durante 1 h. Las muestras fueron posteriormente deshidratadas en una batería de alcoholes creciente: un paso de 15 min en alcoholes de 30° y 50°; 1.30 h en alcohol de 70° al que se le añadió acetato de uranilo a saturación y, por último, dos cambios de 30 min en alcoholes de 90° y 100°.

8.3.2. Inclusión de la muestra

La resina de inclusión se obtuvo de la siguiente forma: la solución base se realizó a partir de la mezcla a partes iguales de una solución A y una solución B. Se añadieron por cada 10 ml de esta solución, 0.15 ml de p-dimetilfenol (DMP 30) (Serva). Las muestras fueron introducidas dos veces en óxido de propileno durante 15 min y una vez en una mezcla 1:1 (v/v) de óxido de propileno y "Epon" (Serva) durante dos horas, siendo transferidas a cápsulas de gelatina en las que previamente se habían vertido unas gotas de "Epon". Las cápsulas se rellenaron con resina y se colocaron en estufa durante 3 días a 37°C, 45°C y 60°C (24 h en cada temperatura) para la polimerización de la resina. Por último, Las muestras fueron sometidas a cortes ultrafinos en un Ultracut E (Reichert-Jun), de 60-70 nm utilizando cuchillas de vidrio.

Solución A: Epon 812 (62 ml) y anhídridododecenil-succínico (DDSA) (Serva) (100 ml).

Solución B: Epon 812 (100 ml) y anhídrido metilnádico (MNA) (Serva) (89 ml).

8.3.3. Método de tinción

La tinción de las rejillas se realizó con citrato de plomo y acetato de uranilo. Se cubrió una placa de Petri con cera de dentista. Las rejillas se dejaron durante 30 min con unas gotas de una solución de acetato de uranilo al 5% y después fueron lavadas durante 1 min en agua destilada. Sobre esta superficie hidrófoba se añadieron unas gotas de la solución de citrato de plomo, colocando las rejillas sobre ellas durante 20 min. Para evitar la aparición de precipitados provocados por la presencia de anhídrido carbónico, se colocaron en la placa lentejas de hidróxido sódico, tapando posteriormente la placa. Antes de proceder a la lectura, las rejillas se lavaron cuidadosamente en agua destilada.

Solución citrato de plomo: 1.33 gr nitrato de plomo y 1.76 gr de citrato sódico (deshidratado) en 30 ml de agua destilada. Posteriormente adicionamos: 6.5 ml

de hidróxido sódico 1 N completando con agua destilada hasta 50 ml y ajustando el pH a 12. Filtrar la solución final con un filtro de 45 mm de diámetro (Millipore, Francia), inmediatamente antes de usar.

9. DETERMINACIÓN DE LOS MARCADORES CELULARES MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Las células de la línea parental MCF-7, así como las inducidas con los distintos fármacos durante 2 días, fueron despegadas de los frascos de cultivo con una solución de PBS-EDTA (0.02%), lavadas con PBS, centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min en centrifuga refrigerada a 4°C y resuspendidas en 1 ml de PBS. Las células se contaron en cámara de Neubauer y se ajustaron a una concentración de 6×10^5 células para cada fluorescencia. Una vez ajustada la cantidad de células, se centrifugaron. Se decantó el sobrenadante y se permeabilizó con metanol frío a temperatura ambiente durante 10 minutos para facilitar la apertura de los poros, excepto en las células a las que se le iba a añadir algún anticuerpo de membrana (HER-2). Se lavó una vez con PBS frío, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y se le añadió al botón celular 20 μ l del anticuerpo monoclonal correspondiente según la población a determinar. Se agitó y se incubó 30 min en oscuridad a 4°C. Pasado este tiempo, se lavó una vez con PBS frío, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y se le añadió al botón celular 100 μ l de albúmina fetal bovina (Sigma Aldrich-3803) al 3% y se dejó incubar de 30 a 45 minutos para evitar uniones inespecíficas. Se volvió a lavar tras este tiempo con PBS frío, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y se le añadió al botón celular 20 μ l de antiinmunoglobulina conjugada con fluoresceína y diluida al 1/50. Se incubó durante 30 min a 4°C y posteriormente, después de dos lavados con PBS frío se decantó el sobrenadante y se fijaron las células con etanol al 70%. A continuación se procedió a su análisis por medio del FACScan.

Los anticuerpos utilizados fueron: p21, p27, p34, p53, ciclina D1, Ki-67, HER-2, Bcl-2, Receptor de Progesterona, Receptor de Estrógenos y Timidilato Sintetasa.

10. ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO

10.1. PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS

Las células de la línea parental MCF-7 y las células MCF-7 inducidas con los distintos fármacos durante 2 días, fueron despegadas de los frascos de cultivo con una solución de PBS-tripsina (10x), lavadas con PBS, centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min a 4°C y resuspendidas en 0.5 ml de PBS. Estas células fueron pegadas en portas por centrifugación a alta velocidad mediante el citospin del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Posteriormente, los portas fueron secados al aire libre y fijados durante 30 seg con metanol al 70% y congelados a -20°C.

10.2. DETECCIÓN INMUNOCITOQUÍMICA

El estudio inmunohistoquímico se realizó mediante el Kit ChemMate (Dako).

Los portas fueron descongelados, lavados con PBS e incubados en la solución de inhibición de la peroxidasa durante 5 min, se lavaron en PBS tres veces (3 min) y posteriormente se incubaron con un primer anticuerpo (ver más adelante) durante una hora en cámara húmeda y en oscuridad. Después, fueron lavados tres veces (3 min) con PBS, incubados con el anticuerpo secundario (AB2) en cámara húmeda y en oscuridad durante 30 min, y luego lavados tres veces con PBS durante 3 min. Los portas fueron incubados con el anticuerpo conjugado durante 25 min, lavados dos veces, con PBS en el primer lavado y agua en el segundo, y revelados con diaminobencidina (DAB) hasta que apareció, bajo control microscópico, la tinción deseada.

Parte de los anticuerpos estudiados fueron analizados también de manera automática mediante un analizador automático que existe en este Servicio.

Una vez teñidos, los portas fueron lavados tres veces con agua destilada y después en una serie de soluciones seriadas con distintos porcentajes de alcohol, empezando con agua y terminando con alcohol al 96%. La lectura fue realizada con microscopio óptico y fue interpretada por el mismo observador.

11. OBTENCIÓN DE ARN

11.1. EXTRACCIÓN DE ARN

Se obtuvo ARN total de las células MCF-7 tras la inducción con fármacos durante 3 días. La extracción del ARN se realizó mediante RNeasy Mini Kit (QIAGEN), a partir de cultivos de 5×10^6 células.

Las células fueron lavadas con PBS frío dos veces, tras el lavado se despegaron con PBS-tripsina (10x) y posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min para recoger el pellet celular. Los pellet celulares se resuspendieron en 600 μ l de RLT buffer (buffer de lisis), habiendo añadido previamente 10 μ l/ml de β -mercaptoetanol y se homogeneizaron durante 30 segundos con un rotor. Se añadieron 600 μ l de etanol al 70% mezclando bien con pipeta estéril. Del total de la muestra cogimos 700 μ l y los añadimos a las minicolumnas Rneasy centrifugando 15 segundos a 14000 rpm a una temperatura de 20-25°C. Se decantó el líquido y añadimos a la minicolumna 700 μ l de RW₁ buffer (buffer de lavado), centrifugando 15 segundos a 14000 rpm. Se decantó el sobrenadante y añadimos 500 μ l de RPE buffer (buffer de lavado al que se añadió previamente etanol), se centrifugó durante 2 minutos a 14000 rpm, separando cuidadosamente la minicolumna del tubo recolector que contiene etanol, y que podría, interferir en la reacción. Las minicolumnas fueron transferidas a otro tubo recolector añadiendo 40 μ l de Rnase-free water directamente sobre la membrana y fueron centrifugadas durante 1 minuto a 14000 rpm. El ARN se guardó a -20°C.

11.2. CUANTIFICACIÓN DE ARN

Se llevó a cabo a una longitud de onda entre 260 nm y 280 nm, mediante el espectrofotómetro Ultrospec 2000 de Pharmacia Biotech. La

lectura en este intervalo permitió calcular la concentración de ácidos nucleicos en la muestra mediante la relación entre la lectura (D.O. 260 nm/ D.O. 280 nm), teniendo en cuenta que 1 unidad de D.O. a 260 nm es igual a 40 mg/ml de ARN.

11.3. DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ARN

Un µg de ARN fue chequeado mediante electroforesis a 80 V durante 2 h en un gel de agarosa al 1%. La visualización del ARN por transiluminador de ultravioletas nos permitió comprobar que no se encontraba degradado. Su concentración fue estimada mediante espectrofotómetro.

12. TRANSCRIPTASA REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

12.1. TRANSCRIPTASA REVERSA

Utilizando el ARN obtenido previamente, se realizó la transcriptasa reversa mediante kit Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI). Cada tubo de reacción contenía un volumen total de 20 µl compuestos de:

- ARN total (2 µg).
- Tampón de transcriptasa reversa 10x (2 µl).
- Proteína inhibidora de RNAsa (0,5 µl).
- Transcriptasa reversa (1 µl).
- d NTP (2 µl).
- MgCl₂ (4 µl).
- Oligos (1 µl)
- Agua hasta 20 µl.

La transcriptasa reversa se realizó en el autociclador LINUS Autocycler 32 (Linus). Los tubos fueron calentados a 94°C durante 2 min para desnaturalizar el ARN y rápidamente fueron enfriados en hielo. La reacción de

la transcriptasa reversa tuvo lugar a 42°C durante 15 min. Tras este periodo los tubos fueron enfriados 5 min en hielo.

12.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

El resultado de la transcriptasa reversa fue diluido al 1/10 en agua destilada. Se utilizaron 5 µl para la reacción en cadena de la polimerasa. Cada tubo de reacción contenía:

- Resultado de la transcriptasa reversa (5 µl).
- Buffer de Taq polimerasa 10x (5 µl).
- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), (concentración final 250 µM).
- Primers (100 ng de cada).
- Taq polimerasa (2,5 U).
- Agua hasta 50 µl.

Los primers utilizados fueron preparados por el Dr. Javier Cifuentes Melchor del servicio de secuenciación y síntesis de ácidos nucleicos, del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Los correspondientes al ADNc de Ciclina D1 fueron:

- a.** Primer senso: 5' GAACAAACAGATCATCCGCAA 3'
- b.** Primer antisenso: 5' TGCTCCTGGCAGGCACGGA 3'

Cada ciclo consistió en 0,5 min de desnaturalización a 94°C, seguido de 0,5 min a 55°C para el acoplamiento de los primers y 1 min de extensión a 72°C. La amplificación fue realizada con 30 ciclos y con una extensión final de 7 min a 72°C.

Los primers correspondientes al cDNA de β-actina fueron:

- a.** Primer senso: 5' ATCATGTTTGAGACCTTCAA 3' que se corresponde con el ADNc de β-actina (1854-1873).

b. Primer antisense: 5' CATCTCTTGCTCGAAGTCCA 3' que se corresponde con ADNc de β -actina (2151-2170).

Cada ciclo consistió en 1 min de desnaturalización a 94°C, seguido de 2 min a 58°C para el acoplamiento de los primers y 3 min de extensión a 72°C. La amplificación fue realizada con 35 ciclos y con una extensión final de 7 min a 72°C.

IV. RESULTADOS

1. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

1.1. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR EN LA LÍNEA MCF-7 INDUCIDA CON AGENTES FARMACOLÓGICOS

En los ensayos de citotoxicidad llevados a cabo con los distintos fármacos de los grupos I, II Y III, sobre la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, calculamos la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}), como se describe en el apartado de material y métodos. El ensayo se hizo a partir de concentraciones crecientes de fármacos de 10 μM , 20 μM , 30 μM , 50 μM , 75 μM y 100 μM . Los valores para cada uno de los compuestos fueron los siguientes:

a. Grupo I

En los compuestos del grupo I, se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA 1. CI_{50} DE LOS COMPUESTOS DEL GRUPO I.

CÓDIGO	ESTRUCTURA	CI_{50} (μM)	c log P^a
5-FU		$2.75 \pm 0,28$	-0.89 ^b
Ftorafur		$3 \pm 0,21$	-0.18 ^c
196-A		$23 \pm 2,15$	0.86
786-B		$14 \pm 1,25$	2.54
596-D		$69 \pm 6,58$	0.70
252-A		$22 \pm 0,95$	1.09
454-B		$22 \pm 3,2$	1.16
928-A		$4.5 \pm 1,33$	1.16
930-A		$5 \pm 2,05$	0.87
798-B		$5.5 \pm 2,21$	2.18

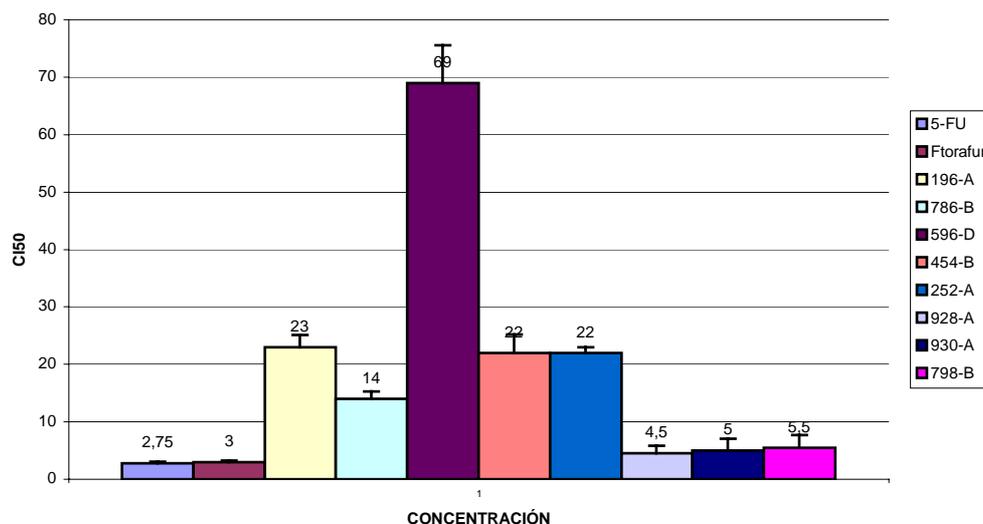


FIGURA 1. ESQUEMA COMPARATIVO DE CI₅₀, DE LOS COMPUESTOS DEL GRUPO I.

Los efectos citotóxicos de los compuestos del grupo I, también fueron expresados en % de viabilidad celular o supervivencia. La figura 2 muestra algunos de los compuestos más representativos.

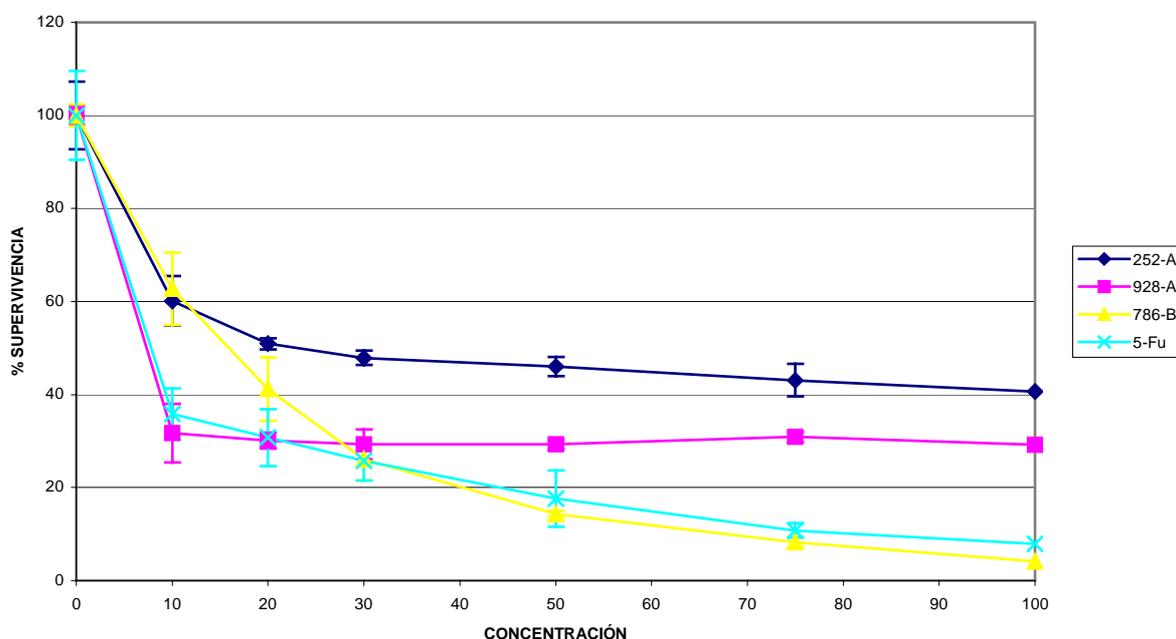
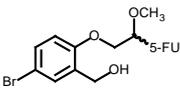
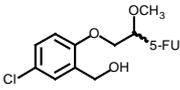
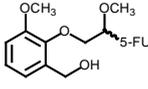
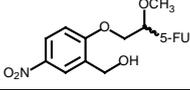
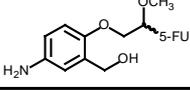
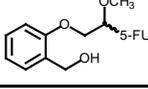
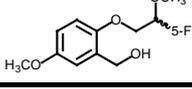


FIGURA 2. GRÁFICAS DE SUPERVIVENCIA DE ALGUNOS COMPUESTOS DEL GRUPO I.

b. Grupo II

En los ensayos de citotoxicidad llevados a cabo en los compuestos del grupo II, se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA 2. CI_{50} DE LOS COMPUESTOS DEL GRUPO II.

CÓDIGO	ESTRUCTURA	CI_{50} (μ M)	c log P^{β}
5-FU		$2.75 \pm 0,28$	-0.89 ^b
Ftorafur		$3 \pm 0,21$	-0.18 ^c
394-B		$16 \pm 2,14$	1.25
524-FS		$18 \pm 1,75$	1.04
600-F		$29 \pm 5,15$	0.37
548-FS		$5.4 \pm 1,35$	0.04
704-D		$21 \pm 2,05$	-0.74
856-C		$18.5 \pm 4,33$	0.30
912-C		$5 \pm 1,23$	0.37

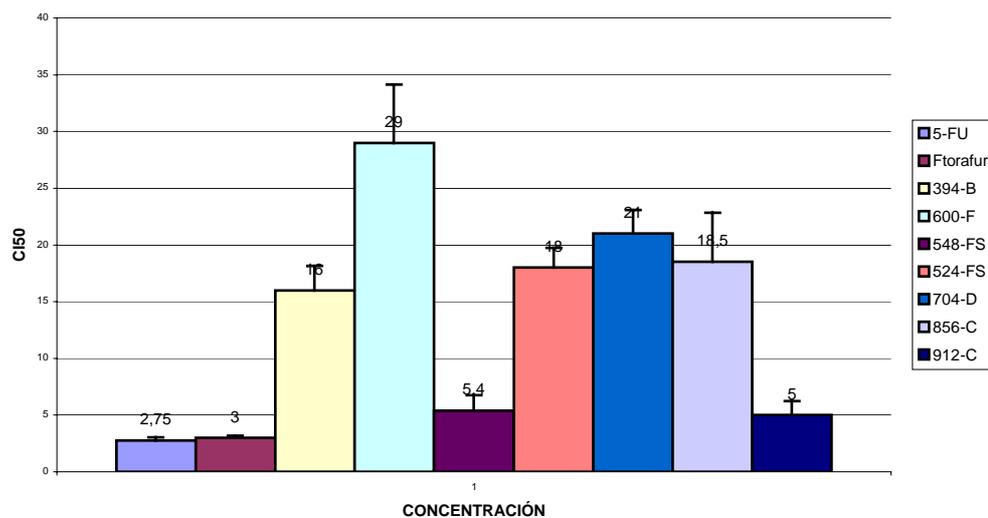


FIGURA 3. ESQUEMA COMPARATIVO DE CI_{50} , DE LOS COMPUESTOS DEL GRUPO II.

Al igual que en los compuestos del grupo I, también se calculó el % de viabilidad celular de todos los compuestos del grupo II. La figura 4 muestra los dos compuestos más representativos

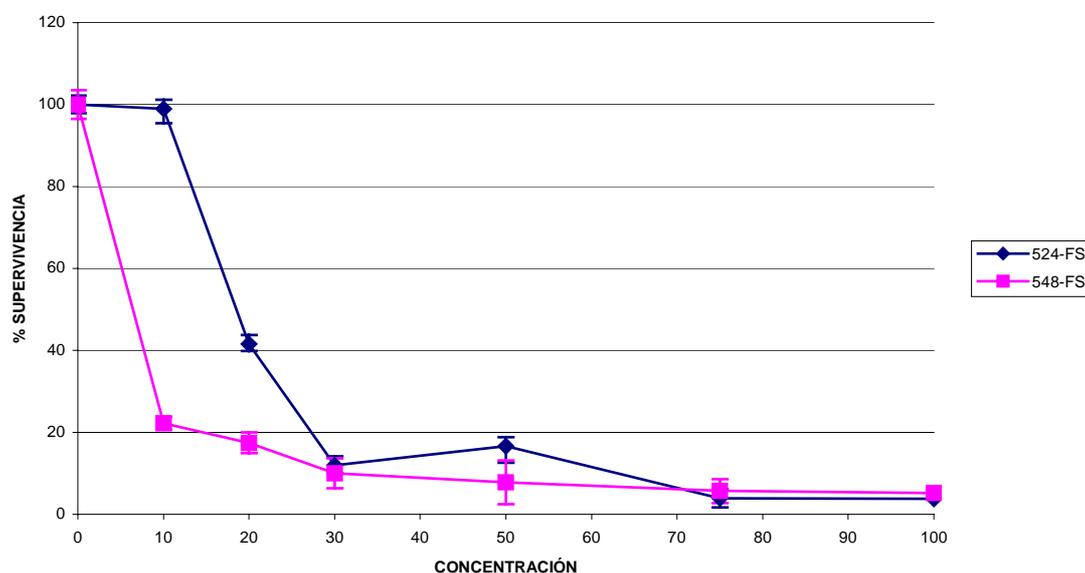
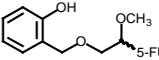
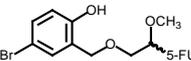
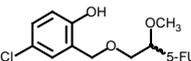
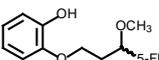
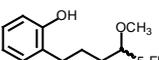
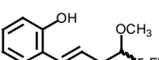


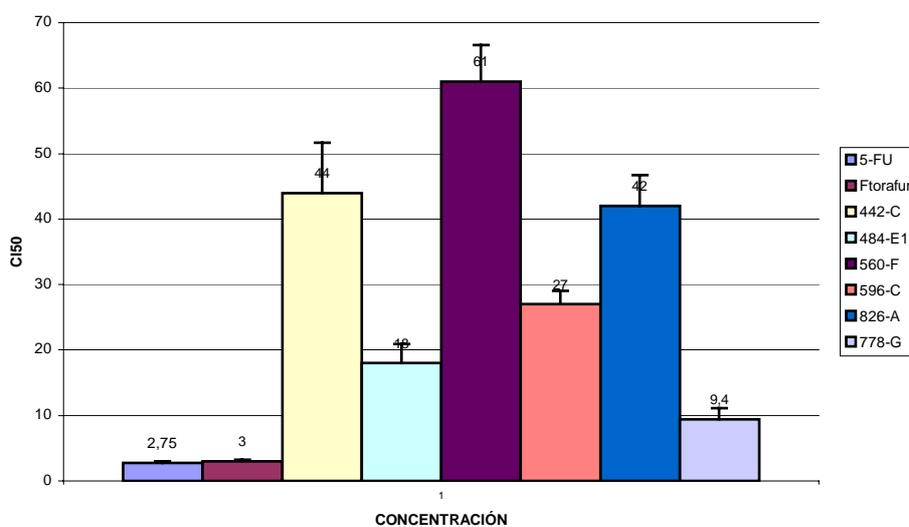
FIGURA 4. GRÁFICAS DE SUPERVIVENCIA DE ALGUNOS COMPUESTOS DEL GRUPO II.

c. Grupo III

Los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad llevados a cabo con los compuestos del grupo III, fueron los siguientes:

TABLA 3. CI_{50} DE LOS COMPUESTOS DEL GRUPO III.

CÓDIGO	ESTRUCTURA	CI_{50} (μM)	c log P^a
5-FU		2.75±0,28	-0.89 ^b
Ftorafur		3±0,21	-0.18 ^c
442-C		44±7,64	0.32
484-E1		18±2,91	1.26
560-F		61±5,57	1.06
596-C		27±2,05	0.87
826-A		42±4,73	1.84
778-G		9.4±1,75	1.76

FIGURA 5. ESQUEMA COMPARATIVO DE CI_{50} , DE LOS COMPUESTOS DEL GRUPO III.

Las gráficas de supervivencia de los compuestos del grupo III, se representaron a partir de los resultados de los ensayos citotóxicos, al igual que se hizo en los compuestos del grupo I y II, mostrándose dos compuestos representativos de este grupo en la figura 6:

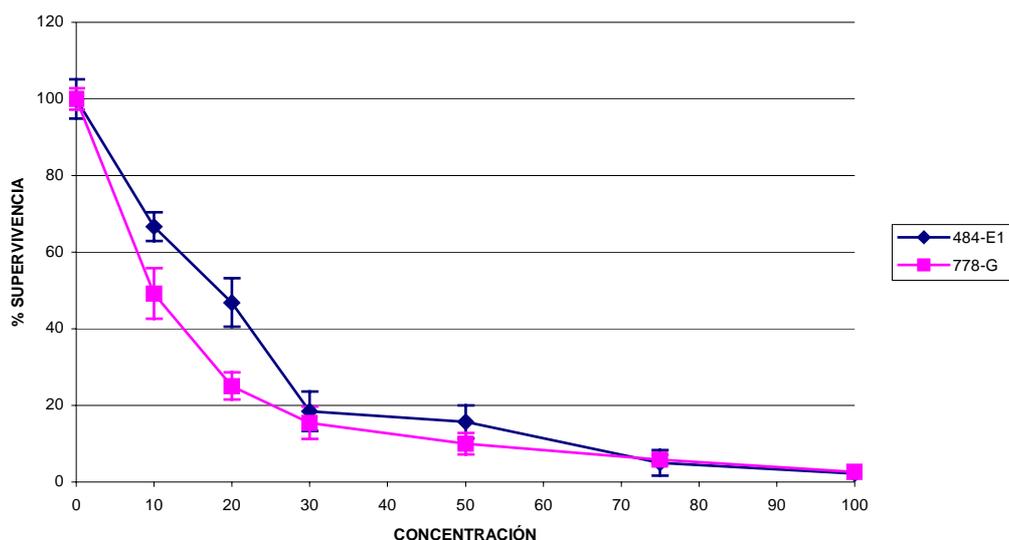


FIGURA 6. GRÁFICAS DE SUPERVIVENCIA DE ALGUNOS COMPUESTOS DEL GRUPO III.

2. ANÁLISIS DE DISTRIBUCIÓN DEL CICLO CELULAR

El análisis se llevó a cabo en la línea MCF-7, inducida con los distintos compuestos durante 48 horas a la dosis de CI_{50} , teniendo como control la línea parental sin inducir. Los resultados obtenidos con los compuestos de los grupos I, II y III fueron los mostrados en las tablas 4, 5 y 6 respectivamente. Como referencia se utilizaron los resultados de las células inducidas con 5-FU y Ftorafur.

TABLA 4. PORCENTAJES DE CÉLULAS ACUMULADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR, EN LOS COMPUESTOS DEL GRUPO I.

	CICLO CELULAR		
	G0/G1(%)	SINT.	G2/M
Control	62,92	29,90	7,18
5-FU	58,07	39,83	2,10
Ftorafur	45,62	54,38	0
196A	50,99	30,49	18,51
786B	86,14	1,60	12,26
798B	82,48	12,40	5,13
596D	68,61	21,79	9,60
454B	71,76	18,16	10,08
252A	74,41	9,82	15,77
928A	73,41	13,44	13,15
930A	69,01	19,61	11,38

TABLA 5. PORCENTAJES DE CÉLULAS ACUMULADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR, EN LOS COMPUESTOS DEL GRUPO II.

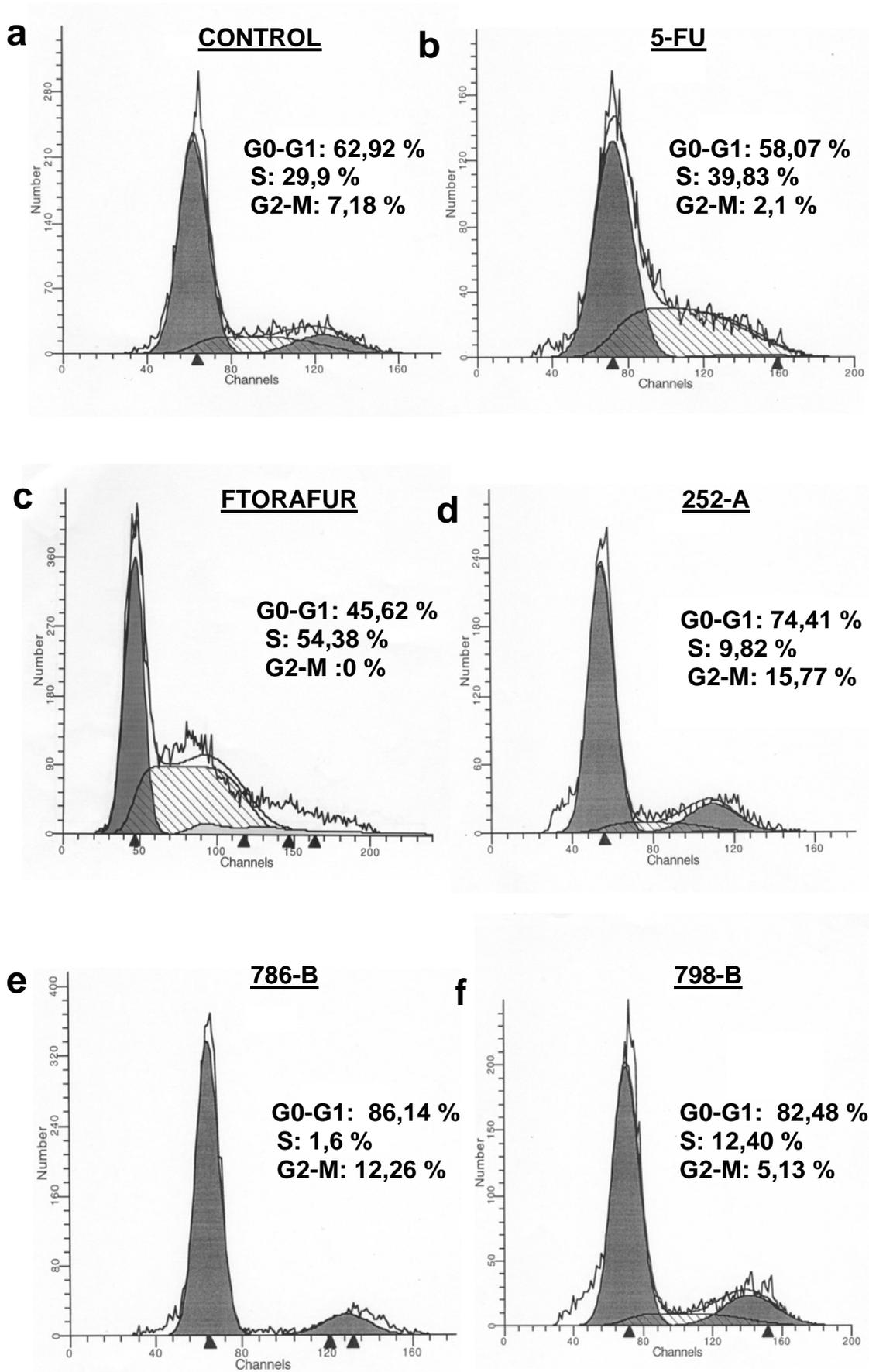
	CICLO CELULAR		
	G0/G1(%)	SINT.	G2/M
Control	62,92	29,90	7,18
5-FU	58,07	39,83	2,10
Ftorafur	45,62	54,38	0
394B	51,45	27,88	20,66
600F	62,72	35,69	1,59
524FS	71,01	0	28,99
548FS	46,92	50,24	2,84
704D	67,32	23,28	9,40
856C	67,18	28,16	4,67
798C	71,39	15,91	12,70

TABLA 6. PORCENTAJES DE CÉLULAS ACUMULADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR, EN LOS COMPUESTOS DEL GRUPO III.

	CICLO CELULAR		
	G0/G1(%)	SINT.	G2/M
Control	62,92	29,90	7,18
5-FU	58,07	39,83	2,10
Ftorafur	45,62	54,38	0
442-C	64,51	25,39	10,10
484-E1	72,45	18,17	9,38
560-F	72,15	20,52	7,33
596-C	63,71	29,67	6,62
826-A	66,29	33,71	0
778-C	55,76	42,33	1,91

2.1. EFECTOS DE LOS COMPUESTOS DEL GRUPO I SOBRE EL CICLO CELULAR

El análisis citométrico mostró la existencia de importantes diferencias en la progresión del ciclo celular de las células inducidas con los fármacos del grupo I comparadas con las células control. En éstas (Fig.16 a) se observó un 62,92 % de células en la fase G₀-G₁, un 29,9 % en la fase S y un 7,18 % en la fase G₂-M. En el caso de las células tratadas con 5-Fu (Fig.16 b), después de 48 horas de inducción, los porcentajes de células en las distintas fases del ciclo fueron: un 58,07% en la fase G₀-G₁, un 39,83% en la fase S y un 2,1% en la fase G₂-M. Los compuestos 252-A, 786-B, 798-B, 928-A, 930-A acumularon las células sobre todo en la fase G₀-G₁ como se muestra en la figura 16 (d, e, f, g, h), al igual que el 5-Fu (Fig.16 b). De estos 5 compuestos, 252-A (Fig.16 d), 786-B (Fig.16 e), 798-B (Fig.16 f) y 928-A (Fig.16 g) causaron fuertes efectos sobre el ciclo celular en comparación con 5-FU, mostrando valores en la fase G₀-G₁ de hasta 86,14 % (786-B) a expensas de la fase S, con valores de hasta 1,6 %. También se observó un notable incremento de la fase G₂-M.



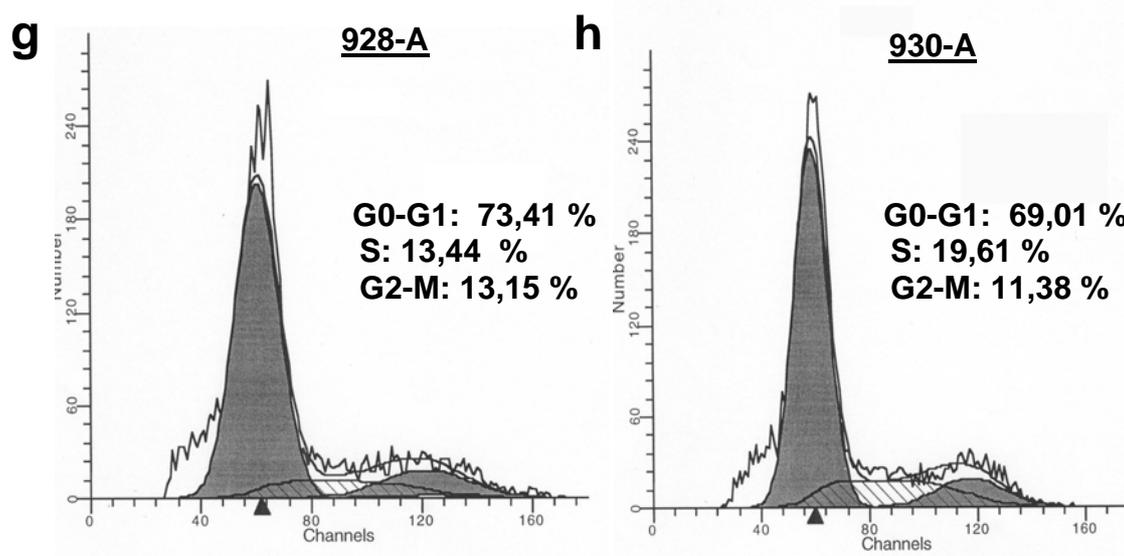


FIGURA 7. ANÁLISIS DE LA MODULACIÓN DEL CICLO CELULAR MEDIANTE FACSCAN. PORCENTAJE DE CÉLULAS ACUMULADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR TRAS TRES DÍAS DE INDUCCIÓN CON FÁRMACOS. A) CÉLULAS MCF-7 CONTROL NO INDUCIDAS CON FÁRMACOS, B) CÉLULAS INDUCIDAS CON 5-FU, C) CÉLULAS INDUCIDAS CON FTORAFUR, D) CÉLULAS INDUCIDAS CON 252-A, E) CÉLULAS INDUCIDAS CON 786-B, F) CÉLULAS INDUCIDAS CON 798-B, G) CÉLULAS INDUCIDAS CON 928-A, H) CÉLULAS INDUCIDAS CON 930-A.

2.2. EFECTOS DE LOS COMPUESTOS DEL GRUPO II SOBRE EL CICLO CELULAR

De este grupo, el compuesto 524-FS (Fig.17 c), acumuló las células en la fase G₀-G₁ (71,01 %), a expensas de la fase S donde casi no hubo acumulación celular. En contraste el compuesto 548-FS (Fig.17 d) acumuló más las células en la fase S con un 50,24 %, al igual que Ftorafur (Fig.16 c y 17 c) con un 54,38 %, mostrando un descenso celular en la fase G₀-G₁. La fase G₂-M casi desaparecieron por completo en las poblaciones de células tratadas con estos dos compuestos, alcanzando valores de 2,84 % en el caso del compuesto 548-FS y llegando al 0 % en el caso del Ftorafur.

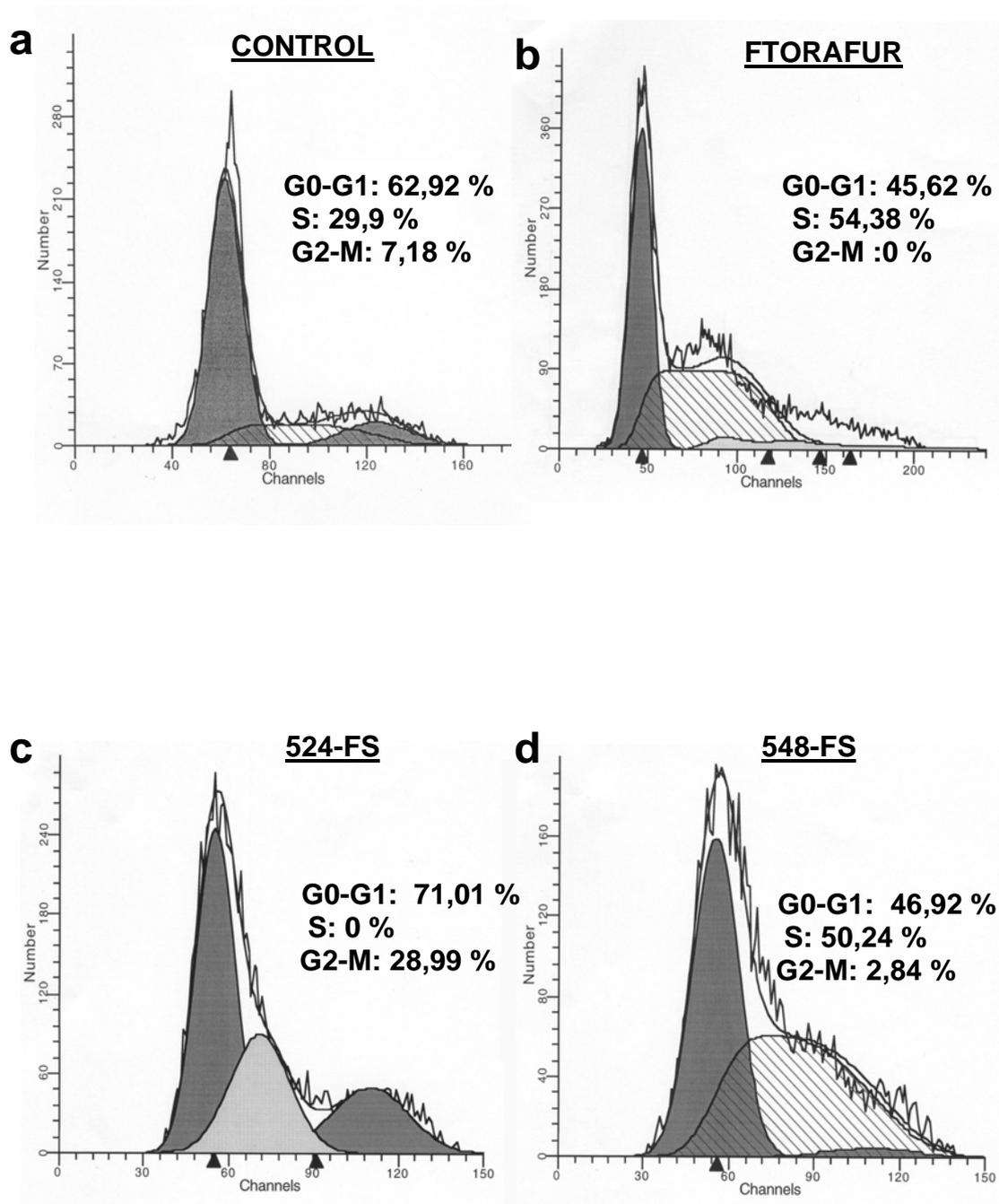


FIGURA 8. ANÁLISIS DE LA MODULACIÓN DEL CICLO CELULAR MEDIANTE FACSCAN. PORCENTAJE DE CÉLULAS ACUMULADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR TRAS TRES DÍAS DE INDUCCIÓN CON FÁRMACOS. A) CÉLULAS MCF-7 CONTROL NO INDUCIDAS CON FÁRMACOS, B) CÉLULAS INDUCIDAS CON FTORAFUR, C) CÉLULAS INDUCIDAS CON 524-FS, D) CÉLULAS INDUCIDAS CON 548-FS.

De los 23 fármacos con los que se llevaron a cabo los ensayos anteriores y basándonos sobre los resultados significativos del ciclo celular y la relación estructura-actividad, escogimos analizar en profundidad los 7 fármacos siguientes: 252-A, 786-B, 798-B, 524-FS, 548-FS, 928-A, 930-A. Los fármacos comerciales 5-Fu y Ftorafur se utilizaron como referencia de fármacos utilizados en la clínica, además de formar parte de la estructura química de algunos de los compuestos utilizados en esta tesis.

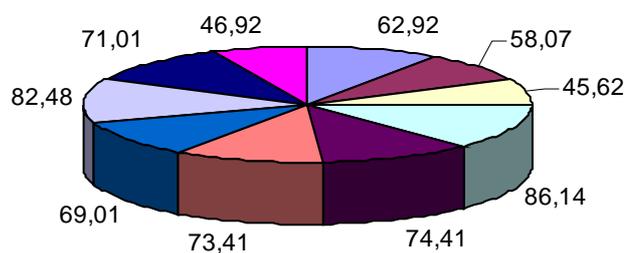
La figura 9 muestra la variación de la distribución del ciclo celular, tanto en células inducidas con los 9 fármacos con más actividad, como en células no inducidas o células control.

Como se puede observar en la fase G_0-G_1 , los compuestos que más células acumulan respecto al control, son el 786-B y el 798-B con porcentajes de 86,14 % y de 82,48 % respectivamente, mientras que los compuestos que menos células acumulan en esta fase son el Ftorafur con un 45,62 %, y el 548-FS con un 46,92 %. El 5-FU también presenta valores inferiores al control de 58,07 %.

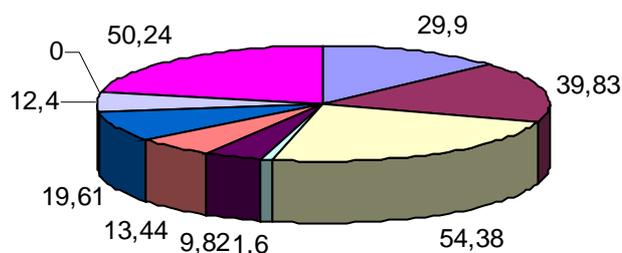
En la fase S es de destacar cómo los compuestos Ftorafur y 548-FS acumulan mayores porcentajes celulares, con valores de 54,38 % y de 50,24 % respectivamente, seguidos por el 5-FU con 39,83 %. Sin embargo, Los compuestos 786-B y 524-FS acumulan menores porcentajes celulares en esta fase con valores de 1,6 % y de 0 % respectivamente. El 786-B acumuló las células en la fase G_0-G_1 en detrimento de la fase S como se ha especificado anteriormente.

En cuanto a la fase G_2-M , el compuesto que mayor proporción de células acumuló, en detrimento de la fase S, fue el 524-FS con 28,99 % frente a un 7,18 % en el control. Los compuestos que menos células acumularon fueron Ftorafur, 5-FU y 548-FS con valores de 0 %, 2,1 % y 2,84 % respectivamente.

% DE CÉLULAS ACUMULADAS EN G0-G1



% DE CÉLULAS ACUMULADAS EN S



% DE CÉLULAS ACUMULADAS EN G2-M

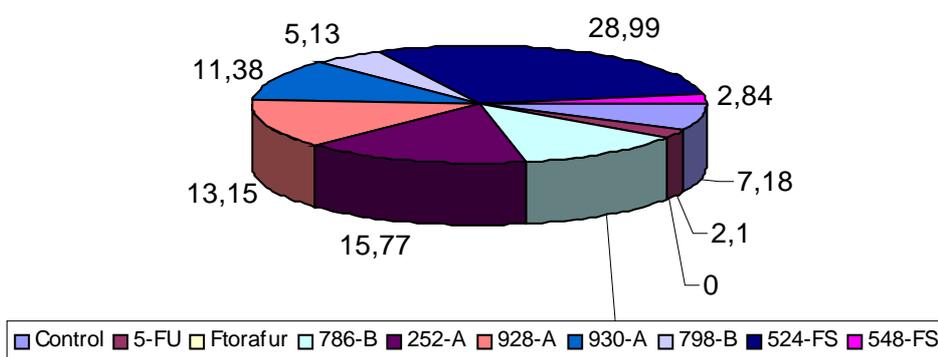


FIGURA 9. GRÁFICA DE LOS % DE CÉLULAS ACUMULADOS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR, TANTO EN CÉLULAS INDUCIDAS CON LOS DISTINTOS FÁRMACOS COMO EN CÉLULAS CONTROL.

3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LA LÍNEA MCF-7 DE CÁNCER DE MAMA

Para analizar el efecto citotóxico que los diferentes fármacos pueden ejercer sobre el grado de proliferación de la línea celular MCF-7, se ha llevado a cabo un estudio comparativo entre las células MCF-7 inducidas con los diferentes fármacos durante 6 días y las células control. Las curvas de proliferación se realizaron mediante la utilización de dosis correspondientes a la $\frac{1}{2} CI_{50}$, CI_{50} y $2 CI_{50}$.

Nuestros resultados demuestran que en un mismo período de tiempo, las células control presentan una mayor tasa de proliferación que las células tratadas con los diferentes compuestos.

TABLA 7. DOSIS DE FÁRMACOS CON LOS QUE SE LLEVÓ A CABO LA INDUCCIÓN DE LA LÍNEA CELULAR MCF-7

	$\frac{1}{2} CI_{50}$	CI_{50}	$2 CI_{50}$
5-FU	1,37 μ M	2,75 μ M	5,50 μ M
Ftorafur	1,50 μ M	3,00 μ M	6,00 μ M
252-A	3,50 μ M	7,00 μ M	14,00 μ M
786-B	7,00 μ M	14,00 μ M	28,00 μ M
798-B	2,75 μ M	5,50 μ M	11,00 μ M
928-A	2,25 μ M	4,50 μ M	9,00 μ M
930-A	2,50 μ M	5,00 μ M	10,00 μ M
524-FS	9,00 μ M	18,00 μ M	36,00 μ M
548-FS	2,70 μ M	5,40 μ M	10,80 μ M

3.1. 5-Fluorouracilo

En general, nuestros resultados demuestran que en un mismo período de tiempo, las células tratadas con las dosis $\frac{1}{2} CI_{50}$, CI_{50} y $2 CI_{50}$ de 5-FU presentan una fuerte inhibición de la proliferación en comparación con las células control.

Así, a partir del primer día, se observó una pronunciada inhibición del crecimiento en comparación con las células control. Sin embargo, en el tercer día se observaron diferencias en el comportamiento de las células inducidas con las dosis mitad ($1,37 \mu\text{M}$) y doble de la CI_{50} ($5,5 \mu\text{M}$), en comparación con la dosis de CI_{50} ($2,75 \mu\text{M}$). A esta concentración todavía siguió disminuyendo la proliferación celular ($8,25 \times 10^3$), mientras que a las concentraciones doble y mitad, se produjo un aumento en el crecimiento celular, especialmente brusco en el caso de la dosis de $5,5 \mu\text{M}$ ($1,065 \times 10^5$), aunque no significativo respecto al patrón de células control. Sin embargo en el cuarto día esta concentración produjo una disminución del crecimiento celular hasta alcanzar de nuevo los valores del segundo día, y la tendencia fue a seguir disminuyendo hasta el sexto día. En el caso de la inducción celular con la dosis de $1,37 \mu\text{M}$, la tendencia de la proliferación celular continuó hasta el cuarto día ($1,087 \times 10^5$), y a partir de aquí se observó una importante inhibición del crecimiento ($2,025 \times 10^4$). En cuanto a la dosis de $2,75 \mu\text{M}$ se observó un ligero aumento de la proliferación celular en el cuarto día aunque no significativo ($2,62 \times 10^4$), ocurriendo de nuevo la inhibición del crecimiento en el quinto día y alcanzando una fase meseta hasta el sexto día.

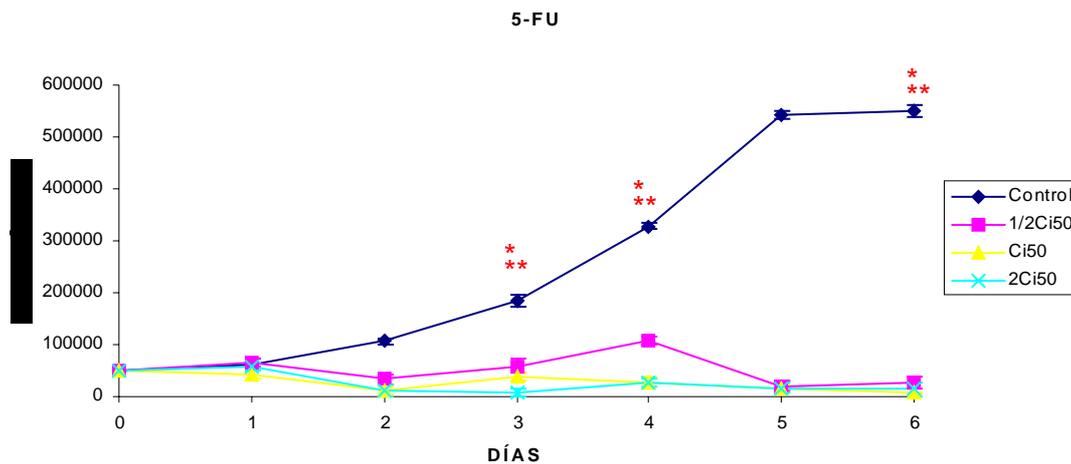


FIGURA 10. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 5-FU SOBRE LAS TASAS DE CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS MCF-7

* Diferencia significativa con $p < 0,05$ entre el grupo control y las distintas concentraciones de 5-FU.

** Diferencia significativa con $p < 0,05$ entre las distintas concentraciones de 5-FU.

3.2. Ftorafur

Las diferencias en el crecimiento entre las células inducidas con ftorafur y las células control son estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Nuestros resultados demuestran que en un mismo periodo de tiempo las células control presentan una mayor tasa de proliferación que las células tratadas con las dosis $\frac{1}{2} CI_{50}$ ($1,5 \mu M$), CI_{50} ($3 \mu M$) y $2 CI_{50}$ ($6 \mu M$) de ftorafur.

La tendencia de las células inducidas con este fármaco, fue la de disminuir hasta el cuarto día en el caso de la dosis de $\frac{1}{2} CI_{50}$ ($1,5 \mu M$), y en el quinto día ocurrió una importante inhibición y muerte celular alcanzando $1,5 \times 10^5$ de células, a partir de aquí la tendencia fue a aumentar el crecimiento celular. En el caso de la CI_{50} ($3 \mu M$), hubo una inhibición progresiva de la proliferación celular hasta el segundo día de inducción, y a partir del cual la tendencia fue de nuevo la de la proliferación celular. Con la dosis doble de CI_{50} ($6 \mu M$) se produjo una muerte celular más acentuada en el día tercero, a partir del cual al igual que con las otras concentraciones de fármaco la tendencia fue

hacia el crecimiento celular, pero con una inhibición del crecimiento significativa en comparación con el control.

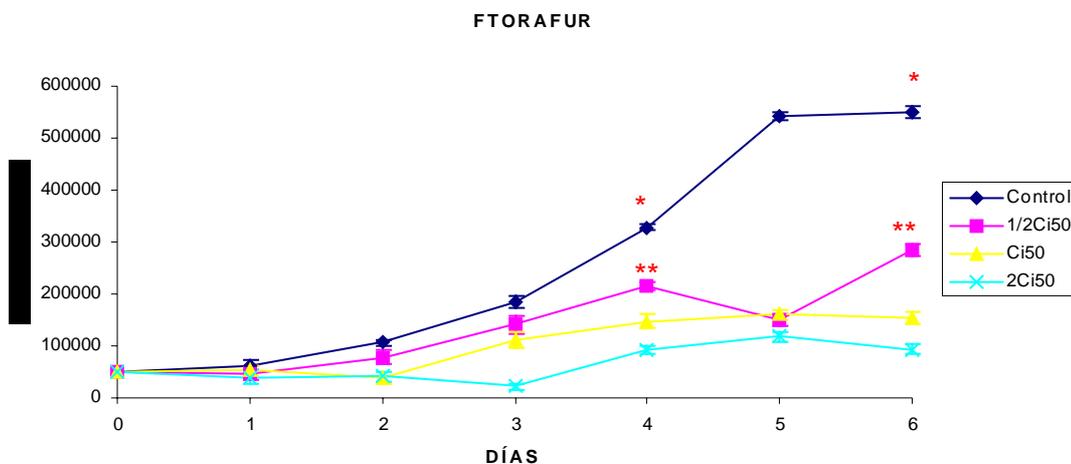


FIGURA 11. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FTORAFUR SOBRE LAS TASAS DE CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS MCF-7

* diferencia significativa con $p < 0,05$ entre el grupo control y las distintas concentraciones de Ftorafur.

** diferencia significativa con $p < 0,05$ entre las distintas concentraciones de Ftorafur.

3.3. Compuestos del grupo I

La tendencia general de los 5 compuestos seleccionados de este grupo, fue la de inhibir la proliferación celular, encontrándose en todos ellos diferencias estadísticamente significativas respecto a las células control (Fig.12, 13, 14, 15 y 16). El comportamiento de cada uno de los fármacos difirió en cuanto a las dosis utilizadas.

Así con la dosis de CI_{50} todos los compuestos lograron inhibir el crecimiento en el primer día de inducción, excepto el compuesto 786-B (Fig.12) que lo incrementó. A esta dosis el compuesto 786-B ($14 \mu M$), produjo un incremento continuo del crecimiento celular alcanzando en el sexto día un crecimiento de $4,2 \times 10^5$ células, mientras que la proliferación alcanzada por el resto de los compuestos a esta misma dosis de CI_{50} en el día sexto fue menor. Hay que hacer notar que con el compuesto 928-A (Fig.14) a esta misma dosis

(4,5 μ M), se produjo en el segundo día un incremento de la proliferación celular alcanzando $1,98 \times 10^5$ células, y esta proliferación se vio inhibida bruscamente en el tercer día de inducción alcanzando $7,9 \times 10^4$ células. A partir de este día hasta el día sexto el crecimiento celular alcanzó una fase meseta de $2,3 \times 10^5$ células. Este comportamiento de crecimiento progresivo a partir del primer día de inducción, fue general también para los compuestos 252-A (Fig. 13), 930-A (Fig.15) 798-B (Fig.16), alcanzando fases meseta en la proliferación celular.

Con la dosis $\frac{1}{2}$ de CI_{50} los compuestos 252-A (Fig.13), 930-A (Fig.15) y 798-B (Fig.16), tuvieron un comportamiento similar en cuanto al aumento progresivo en la proliferación celular hasta el tercer día de inducción, aunque con el 252-A se observó una inhibición del crecimiento en el primer día de inducción llegando a las $2,7 \times 10^4$ células. El 930-A en el tercer día dio lugar a un aumento más pronunciado en el crecimiento celular superando incluso al crecimiento de las células control, con aproximadamente $2,6 \times 10^5$ células. Sin embargo estos tres compuestos inhibieron el crecimiento celular en el cuarto día, y a partir de éste, la tendencia fue de nuevo a ir aumentando la proliferación celular hasta el sexto día, en el caso de los compuestos 252-A y 798-B, alcanzando respectivamente valores de $3,1 \times 10^5$ células y de $2,6 \times 10^5$ células. En el caso del compuesto 786-B (Fig.12), se observó un crecimiento celular lento hasta el cuarto día, y en el quinto día ocurrió una inhibición de éste hasta alcanzar aproximadamente los valores del segundo día de $5,4 \times 10^4$ células. Desde este día hasta el sexto se produjo un fuerte incremento en la proliferación celular alcanzándose valores de $3,6 \times 10^5$ células. Con el compuesto 928-A (Fig.14), las células experimentaron un ligero incremento hasta el segundo día y ya en el tercer día esta proliferación celular se vio algo disminuida alcanzando $7,3 \times 10^4$ células. Los valores máximos de crecimiento celular se alcanzaron en el día quinto con $3,1 \times 10^5$ células, disminuyendo de nuevo en el día sexto.

Con la dosis doble de CI_{50} , el crecimiento celular se vio inhibido en el primer día de inducción con todos los compuestos. En el caso del compuesto 798-B (Fig.16) se produjo un aumento paulatino en el crecimiento celular con

diferencias estadísticamente significativas entre las distintas dosis. Los compuestos 786-B (Fig.12) y 252-A (Fig.13), tuvieron en el segundo día un incremento de la proliferación celular que se vio de nuevo inhibida en el tercer día de inducción, continuando esta inhibición hasta el cuarto día en el caso del compuesto 786-B llegando a alcanzar las cifras de $7,8 \times 10^4$ células. Con este compuesto en el quinto y sexto día la tendencia fue hacia el incremento celular. En el caso de la inducción con 252-A, durante los días cuarto y quinto se observó un aumento de la proliferación celular que se mantuvo en fase meseta hasta el día sexto con $1,8 \times 10^5$ células. En el caso de la inducción con 930-A (Fig.15), ocurrió un aumento paulatino en la proliferación celular hasta el día cuarto de inducción, disminuyendo ligeramente durante los días quinto y sexto, alcanzando $1,9 \times 10^5$ células. Con el compuesto 928-A (Fig.14), se alcanzó un pico celular de $1,8 \times 10^5$ células en el segundo día, este crecimiento fue inhibido en el día tercero hasta alcanzar $1,3 \times 10^5$ células, y a partir de este día la proliferación aumentó lentamente en el cuarto y quinto día manteniéndose en fase meseta en el sexto día con $2,2 \times 10^5$ células.

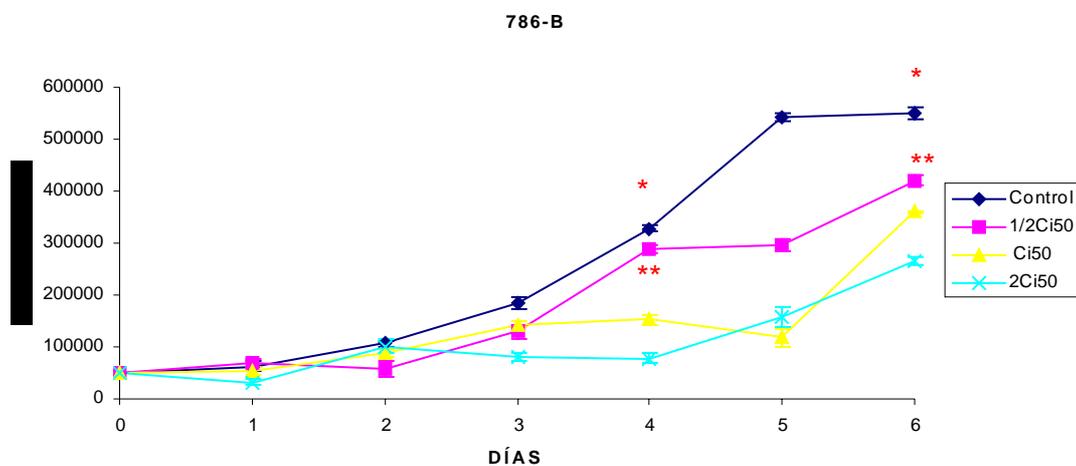


FIGURA 12. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 786-B SOBRE LAS TASAS DE CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS MCF-7

* diferencia significativa con $p < 0,05$ entre el grupo control y las distintas concentraciones de 786-B.

** diferencia significativa con $p < 0,05$ entre las distintas concentraciones de 786-B.

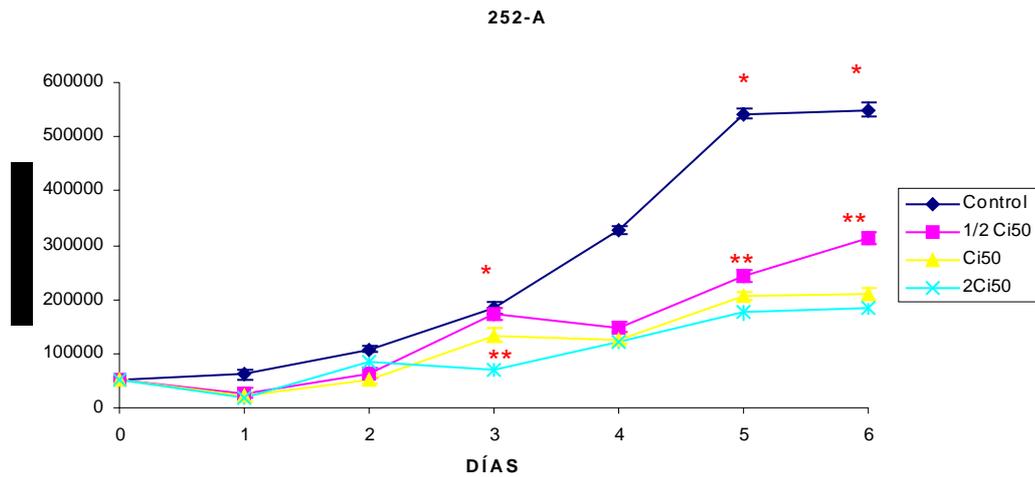


FIGURA 13. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 252-A SOBRE LAS TASAS DE CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS MCF-7

* diferencia significativa con $p < 0,05$ entre el grupo control y las distintas concentraciones de 252-A.

** diferencia significativa con $p < 0,05$ entre las distintas concentraciones de 252-A.

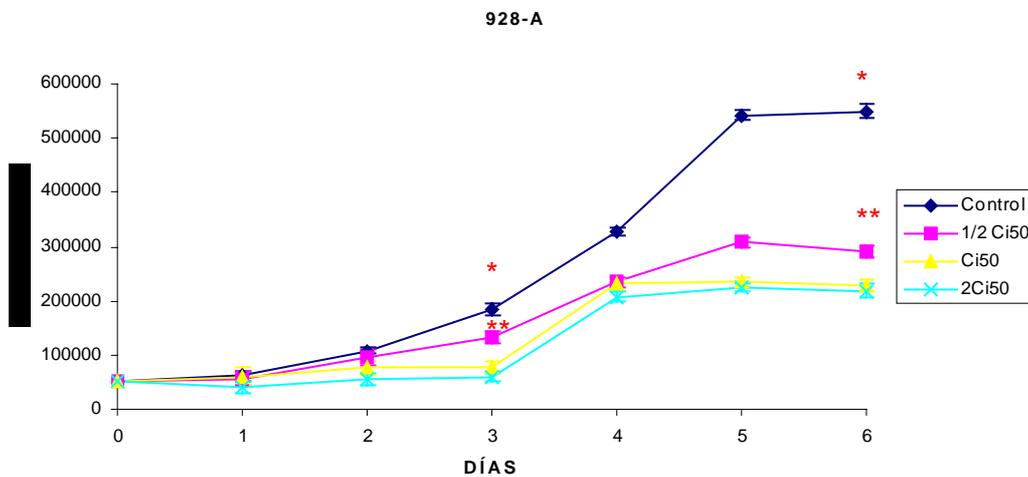


FIGURA 14. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 928-A SOBRE LAS TASAS DE CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS MCF-7

* diferencia significativa con $p < 0,05$ entre el grupo control y las distintas concentraciones de 928-A.

** diferencia significativa con $p < 0,05$ entre las distintas concentraciones de 928-A.

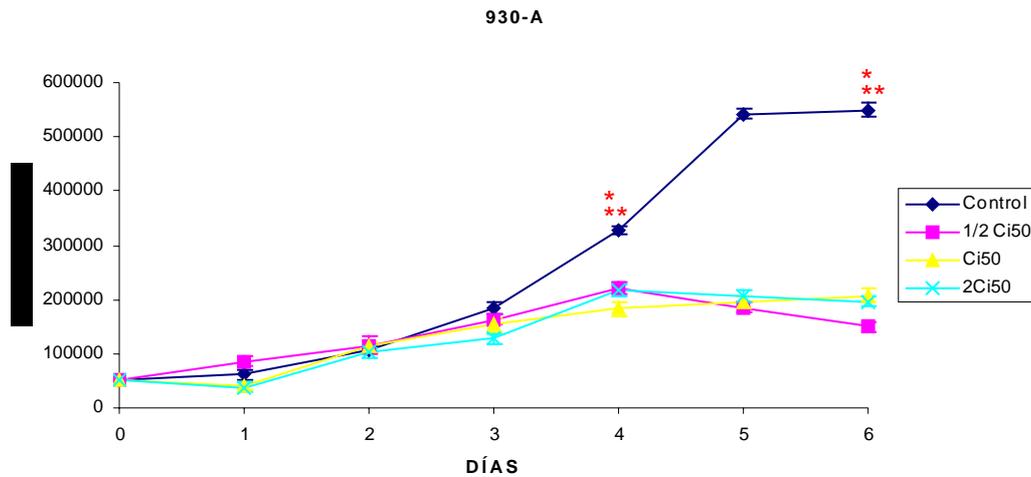


FIGURA 15. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 930-A SOBRE LAS TASAS DE CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS MCF-7

* diferencia significativa con $p < 0,05$ entre el grupo control y las distintas concentraciones de 930-A.

** diferencia significativa con $p < 0,05$ entre las distintas concentraciones de 930-A.

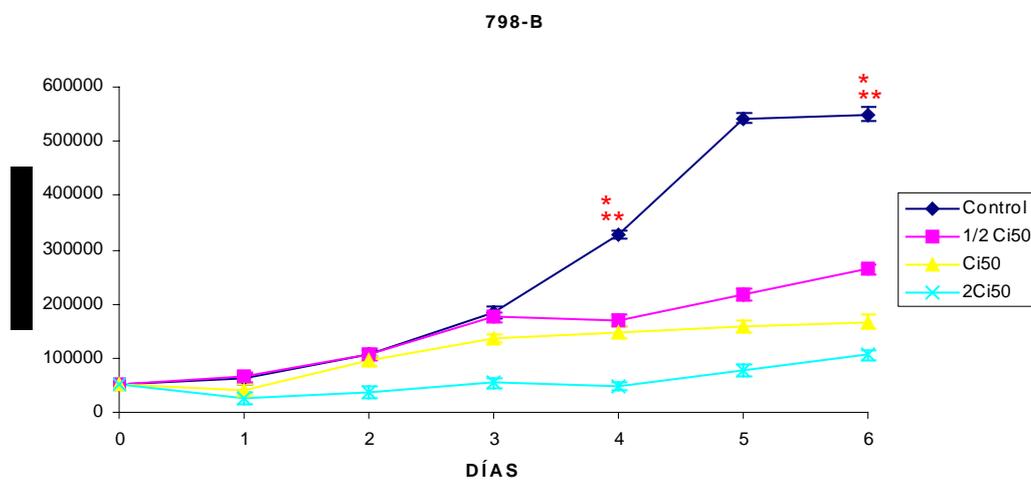


FIGURA 16. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 798-B SOBRE LAS TASAS DE CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS MCF-7

* diferencia significativa con $p < 0,05$ entre el grupo control y las distintas concentraciones de 798-B.

** diferencia significativa con $p < 0,05$ entre las distintas concentraciones de 798-B.

3.4. Compuestos del grupo II

En el caso de las células inducidas por los compuestos *524-FS* (Fig.17) y *548-FS* (Fig.18), observamos una disminución de su crecimiento en comparación con las células control.

La tendencia de las células inducidas con estos dos compuestos a las dosis de $\frac{1}{2}$ de CI_{50} , para *524-FS* y *548-FS* ($9 \mu\text{M}$ y $2,7 \mu\text{M}$ respectivamente), fue la de ir aumentando la proliferación. En el caso del compuesto *548-FS* (Fig.18), este aumento fue gradual hasta el quinto día en que se alcanzó una fase meseta con 3×10^5 células. Con el compuesto *524-FS* (Fig.17), el primer día hubo una ligera inhibición del crecimiento, y a partir de este día se produjo un aumento en el crecimiento celular, siendo este crecimiento más notorio en el cuarto día donde se alcanzaron $2,9 \times 10^5$ células, manteniéndose así más o menos hasta el sexto día.

En el caso de la inducción con el compuesto *524-FS* a la dosis de CI_{50} de $18 \mu\text{M}$ (Fig.17), se observó un crecimiento continuo de las células, aunque en el cuarto día se vio incrementado este crecimiento de una manera más acentuada, y continuó este crecimiento aunque de manera más suave hasta el sexto día, en el que se alcanzaron 3×10^5 células. En las células inducidas a la concentración de $5,4 \mu\text{M}$ con el compuesto *548-FS* (Fig.18), se observó un rápido incremento de la proliferación en el primer día que se vio disminuido en el tercer día alcanzando $2,1 \times 10^4$ células, y a partir de aquí las células fueron proliferando hasta alcanzar una fase meseta en los días quinto y sexto de $2,2 \times 10^5$ células.

Cuando las células se indujeron con el fármaco *524-FS* a la dosis doble CI_{50} de $36 \mu\text{M}$ (Fig.17), se observó un ligero aumento en la proliferación celular en el primer día, que se vio disminuida en el día segundo de inducción llegando a alcanzar valores de $8,1 \times 10^4$ células. Durante el tercer y cuarto día el incremento celular llegó al valor de 9×10^4 células. A partir de este día el crecimiento celular se vio inhibido alcanzando valores de $1,2 \times 10^5$ células. En

el caso del compuesto 548-FS a la dosis de 10,8 μ M, se observó un rápido aumento del crecimiento celular en el segundo día de inducción con valores de $1,4 \times 10^5$ células, volviendo a disminuir el crecimiento en el tercer día de inducción, y a partir de éste hubo un incremento progresivo de células hasta alcanzar en el sexto día valores parecidos a los del segundo día.

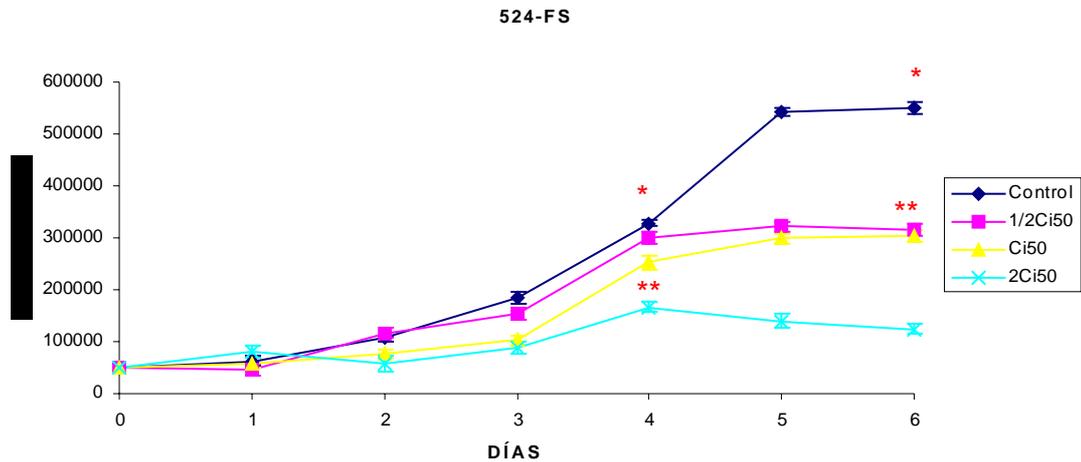


FIGURA 17. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 524-FS SOBRE LAS TASAS DE CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS MCF-7

* diferencia significativa con $p < 0,05$ entre el grupo control y las distintas concentraciones de 524-FS.

** diferencia significativa con $p < 0,05$ entre las distintas concentraciones de 524-FS.

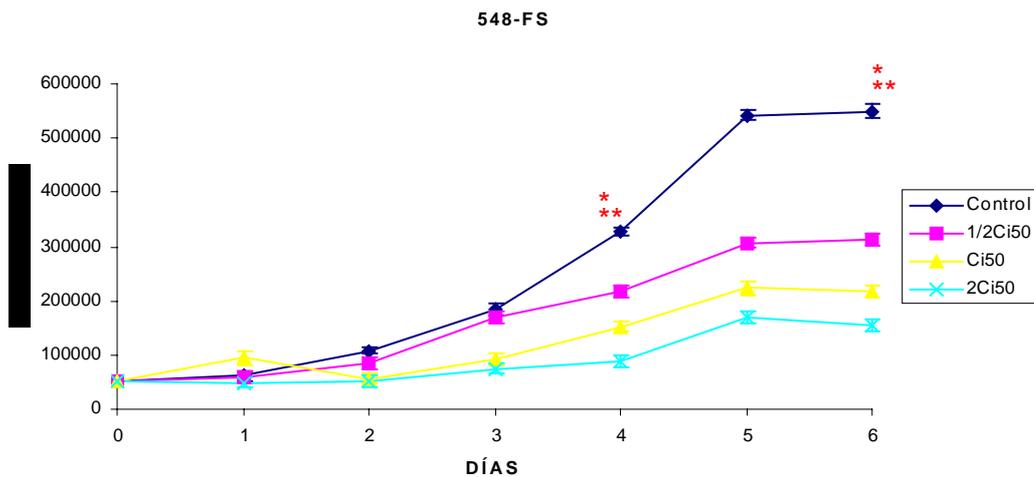


FIGURA 18. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 548-FS SOBRE LAS TASAS DE CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS MCF-7

* diferencia significativa con $p < 0,05$ entre el grupo control y las distintas concentraciones de 548-FS.

** diferencia significativa con $p < 0,05$ entre las distintas concentraciones de 548-FS.

4. ENSAYOS DE LA INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA O APOPTOSIS

Mediante la anexina V conjugada con fluoresceína (FITC) y utilizando microscopía confocal o citómetro de flujo es posible distinguir entre células viables (no teñidas), células en los primeros estadios de apoptosis (teñidas solamente con anexina V-FITC), células que están en la última fase de apoptosis (teñidas con la anexina V-FITC e yoduro de propidio) y células necróticas (teñidas solamente con yoduro de propidio).

En la última fase de la apoptosis, puede ocurrir fragmentación del ADN y por ello también incluimos los resultados obtenidos con los distintos compuestos.

4.1. ESTUDIO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Se determinó mediante citómetro de flujo el porcentaje de las células viables, necróticas, apoptóticas tardías y apoptóticas, tanto en las células control como en las células inducidas con los 23 fármacos. El estudio se hizo a distintos intervalos de tiempo de 3, 6, 12, 24 y 48 horas. Los resultados obtenidos para las células control y los compuestos escogidos de los grupos I y II, junto con 5-Fu y Ftorafur fueron los mostrados en la tabla 8.

4.1.1. Compuestos del grupo I

En células control tras 48 horas de cultivo, el 1,24 % de las células fueron apoptóticas tempranas y el 1,57 % fueron apoptóticas tardías (Fig.19 a). En contraste las células tratadas con los valores de CI_{50} de 5-FU y los nuevos compuestos mostraron un significativo incremento de apoptosis. Así por

ejemplo, la apoptosis inducida con 5-FU a las 24 horas fue de 56,75 % apoptosis temprana y de 35,55 apoptosis tardía (Fig.19 b). Valores muy similares se alcanzaron en las células inducidas con Ftorafur durante 24 horas (Fig.19 c). En el caso de las células inducidas con el compuesto 252-A, se observó una apoptosis temprana de 41,15 % a las 6 horas (tabla 8), mientras que a las 12 horas la apoptosis temprana descendió a un 21,70 % e incrementó la apoptosis tardía hasta un 62,90 % (Fig.19 d). En el caso de inducción con 786-B, la apoptosis fue mayor a las 12 horas alcanzando valores de 60,66 % de apoptosis temprana y de 27,19 % de apoptosis tardía (Fig.19 e). Es de destacar que en la inducción con 798-B, la apoptosis temprana a las 6 horas (Fig.21 a), fue de 59,73 % disminuyendo hasta las 48 horas, y también se observó un incremento de la apoptosis tardía, desde valores de 5,70 % a las 6 horas hasta valores de 35,23 % a las 48 horas. En el caso de las células inducidas con 928-A, a las 6 horas se alcanzaron valores de apoptosis temprana de 58,01 % y de 27,62 % de apoptosis tardía (Fig.20 c), disminuyendo a las 12 horas la apoptosis temprana y aumentando la apoptosis tardía (Fig. 20 f). Las células inducidas durante 6 horas con el compuesto 930-A (Fig.21 b), tuvieron un grado de apoptosis temprana similar a 928-A, y al igual que ocurrió con este compuesto, a las 12 horas de inducción la apoptosis temprana disminuyó aumentando la apoptosis tardía desde un 31,12 % hasta un 51,24 %.

4.1.2. Compuestos del grupo II

Las células inducidas con 524-FS tuvieron un comportamiento particular ya que indujeron apoptosis temprana a las 3 horas (Fig. 20 a), con valores de 50,81 % y 32,66 % de apoptosis tardía, valores muy similares a los obtenidos a las 48 horas de inducción (Fig.19 e). Las células inducidas con 548-FS alcanzaron los valores de mayor apoptosis a las 24 horas (Fig.19 d), aunque a las 3 horas alcanzaron ya valores de apoptosis tardía de 50,19 % (Fig.20 b).

Apoptosis

TABLA 8. % DE CÉLULAS VIABLES Y APOPTÓTICAS EN LOS COMPUESTOS DEL GRUPO I Y II

		COMP. GRUP. I								COMP. GRUP. II	
		Control	5FU	Ftorafur	252A	786B	798B	928A	930A	524FS	548FS
3 horas	Viables	72,49	52,65	36,12	53,93	35,81	40,21	52,03	44,26	13,05	12,77
	A.Temp.	1,07	21,50	38,88	22,48	31,10	45,31	27,28	32,54	50,81	29,74
6 horas	A.Tardía	1,13	15,53	16,12	11,10	25,13	10,04	15,14	15,23	32,66	50,19
	Viables	77,56	28,84	58,87	30,99	40,98	32,73	11,30	10,76	24,75	20,58
12 horas	A.Temp.	1,15	38,35	29,05	41,15	48,70	59,73	58,01	54,33	43,26	28,57
	A.Tardía	1,20	27,89	10,42	17,99	5,53	5,70	27,62	31,12	28,47	43,03
24 horas	Viables	72,90	27,08	42,50	10,91	11,35	30,27	9,20	13,25	31,74	15,63
	A.Temp.	1,16	23,79	37,06	21,70	60,66	37,86	38,55	30,47	30,63	27,63
48 horas	A.Tardía	1,24	42,54	13,65	64,90	27,19	26,13	49,16	51,24	27,42	45,59
	Viables	65,25	6,64	4,72	13,45	18,27	46,24	21,67	19,08	12,06	6,96
3 horas	A.Temp.	1,27	56,75	52,20	8,45	57,33	14,37	1,50	5,30	44,36	40,73
	A.Tardía	1,41	35,55	40,77	36,85	22,84	23,68	10,80	30,72	42,65	50,50
6 horas	Viables	53,52	6,59	8,90	9,50	4,88	22,00	14,57	13,00	13,93	10,60
	A.Temp.	1,24	52,81	58,06	12,17	51,37	19,05	3,50	5,22	50,64	48,22
12 horas	A.Tardía	1,57	39,75	31,01	53,77	42,64	35,23	29,50	26,68	34,26	39,65

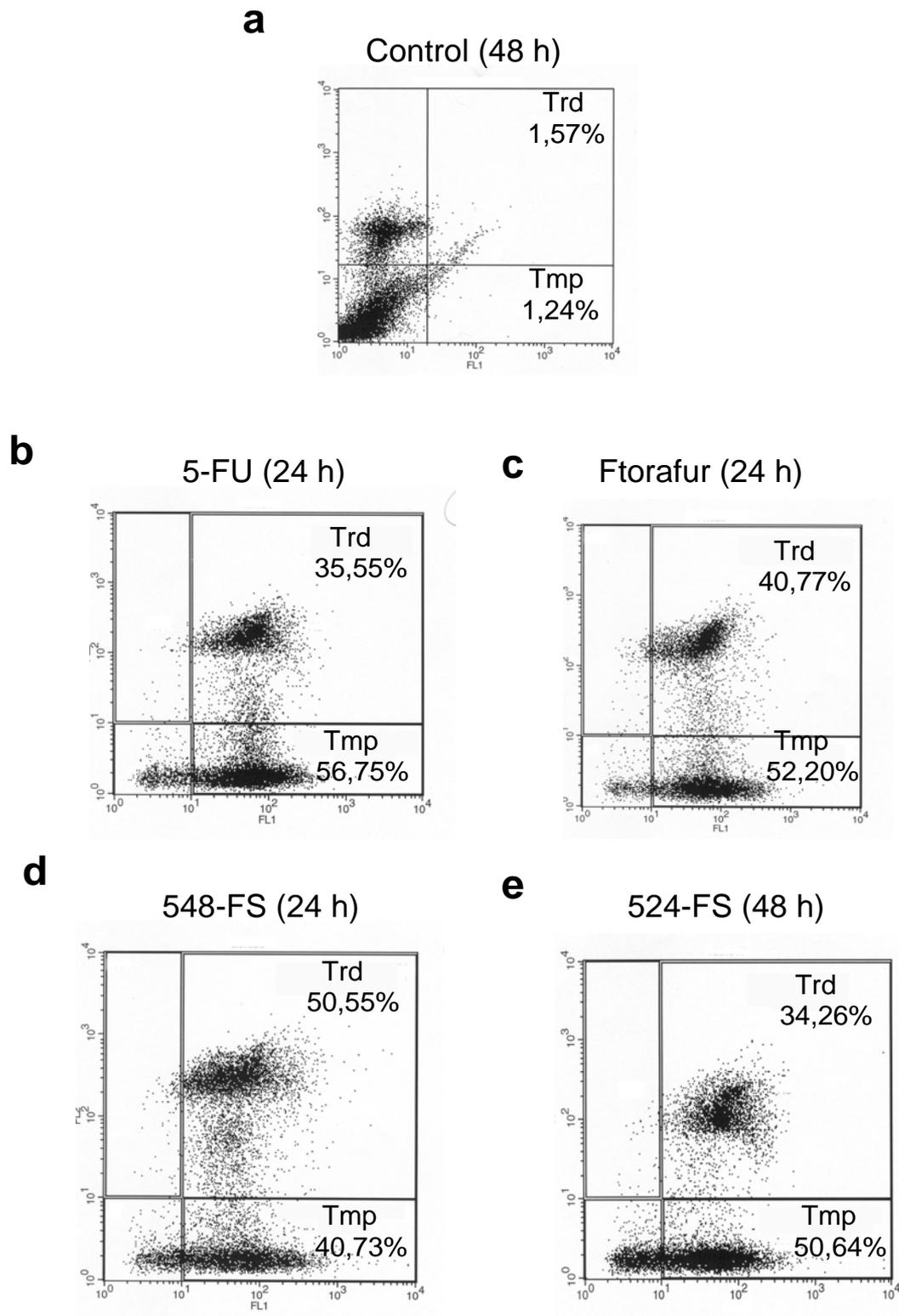


FIGURA 19. APOPTOSIS EN CÉLULAS MCF-7 A LAS 24 Y 48 HORAS DE INDUCCIÓN CON LOS FÁRMACOS. A) APOPTOSIS EN CÉLULAS CONTROL A LAS 48 H, B) APOPTOSIS INDUCIDA CON 5-FU A LAS 24 H, C) APOPTOSIS INDUCIDA CON FTORAFUR A LAS 24 H, D) APOPTOSIS INDUCIDA CON 548-FS A LAS 24 H, E) APOPTOSIS INDUCIDA CON 524-FS A LAS 48 H.

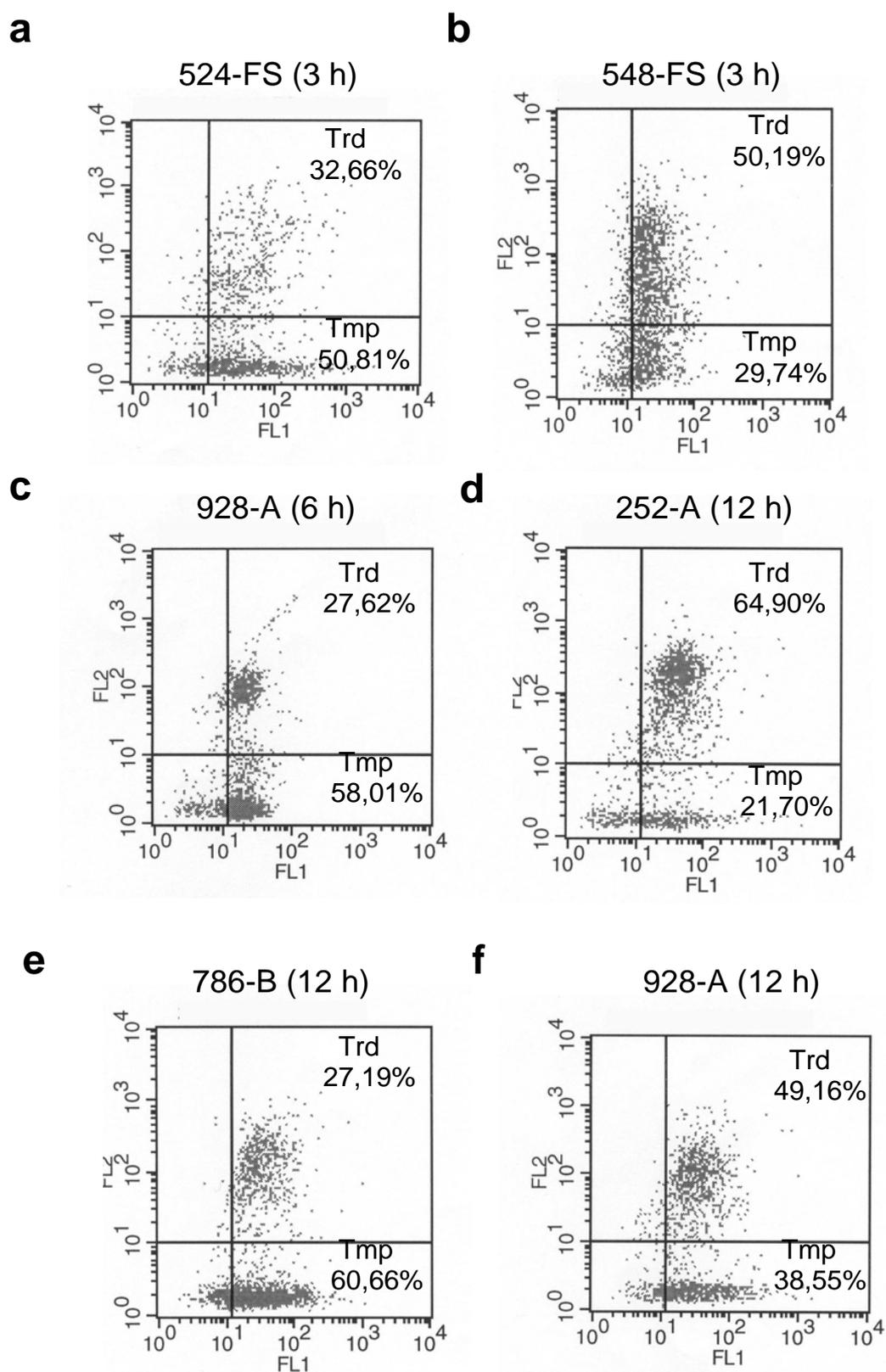


FIGURA 20. APOPTOSIS EN CÉLULAS MCF-7 A LAS 3, 6 Y 12 HORAS DE INDUCCIÓN CON LOS FÁRMACOS. A) APOPTOSIS INDUCIDA CON 524-FS A LAS 3 H, B) APOPTOSIS INDUCIDA CON 548 A LAS 3 H, C) APOPTOSIS INDUCIDA CON 928-A A LAS 6 H, D) APOPTOSIS INDUCIDA CON 252-A A LAS 12 H, E) APOPTOSIS INDUCIDA CON 786-B A LAS 12 H, F) APOPTOSIS INDUCIDA CON 928-A A LAS 12 H.

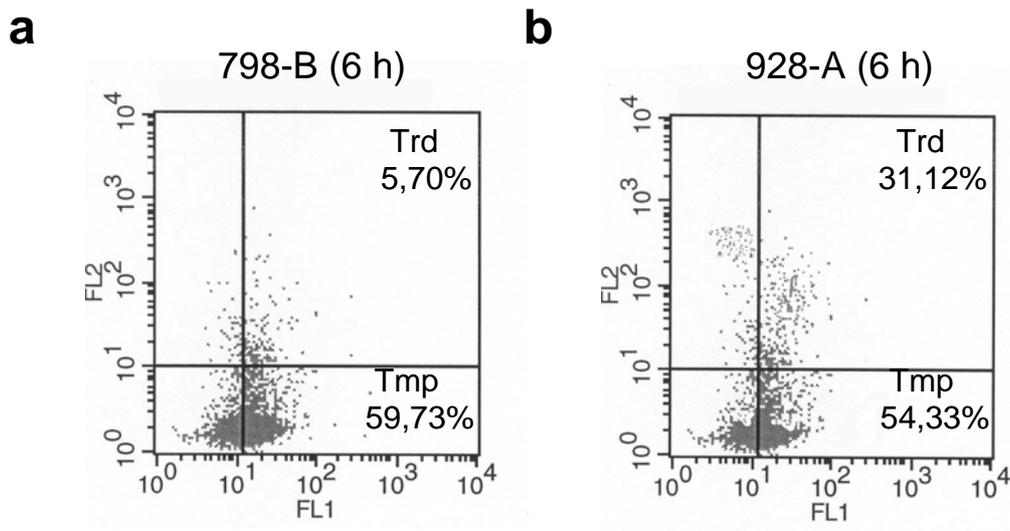


FIGURA 21. APOPTOSIS EN CÉLULAS MCF-7 A LAS 6 HORAS DE INDUCCIÓN CON LOS FÁRMACOS. A) APOPTOSIS INDUCIDA CON 798-B A LAS 6 H, B) APOPTOSIS INDUCIDA CON 928-A A LAS 6.

4.2. ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

El análisis mediante la microscopía confocal nos permitió avalar los resultados obtenidos mediante citometría de flujo. Así tras el tratamiento con los nueve compuestos se pudo observar en las células la existencia de apoptosis tanto temprana como tardía, y también se observó necrosis celular (fig, 22, 23 y 24).

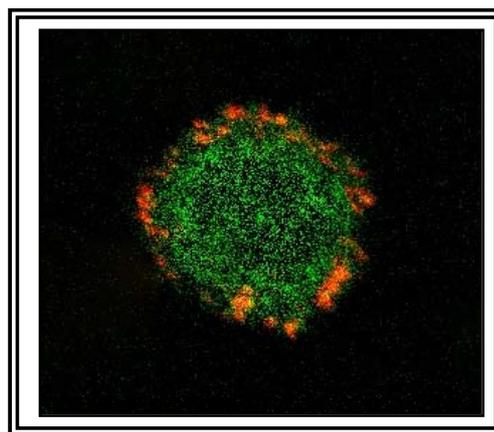


FIGURA 22. CÉLULA CARACTERÍSTICA DE APOPTOSIS TARDÍA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON 786-B, A LAS 24 HORAS. EN ELLA SE PUEDE APRECIAR EN FORMA DE MANCHAS SOLARES LA EXTRUSIÓN DE LOS CUERPOS APOPTÓTICOS (FRAGMENTOS DE CROMATINA Y ORGÁNULOS CELULARES, RECUBIERTOS DE MEMBRANA).

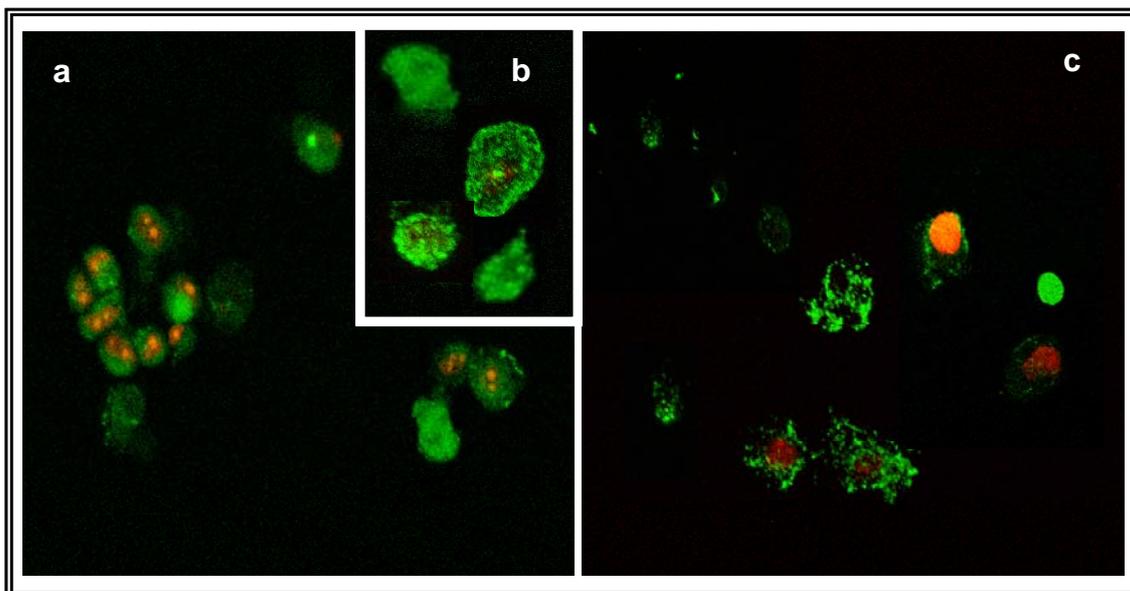


FIGURA 23. CÉLULAS APOPTÓTICAS, DESPUÉS DE TRATAMIENTOS CON DISTINTOS FÁRMACOS A LAS 24 HORAS, A) IMAGEN DE CÉLULAS TRATADAS CON EL COMPUESTO 930-A, DONDE SE PUEDE APRECIAR LA EXISTENCIA TANTO DE CÉLULAS EN APOPTOSIS TEMPRANA (TEÑIDAS SÓLO CON ANEXINA V), COMO DE CÉLULAS EN APOPTOSIS TARDÍA (TEÑIDAS CON IODURO DE PROPIDIO Y ANEXINA V) Y NECRÓTICAS (SÓLO TEÑIDAS CON IODURO DE PROPIDIO), B) DETALLE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS TRAS EL TRATAMIENTO CON 524-FS, C) CÉLULAS INDUCIDAS CON EL COMPUESTO 252-A

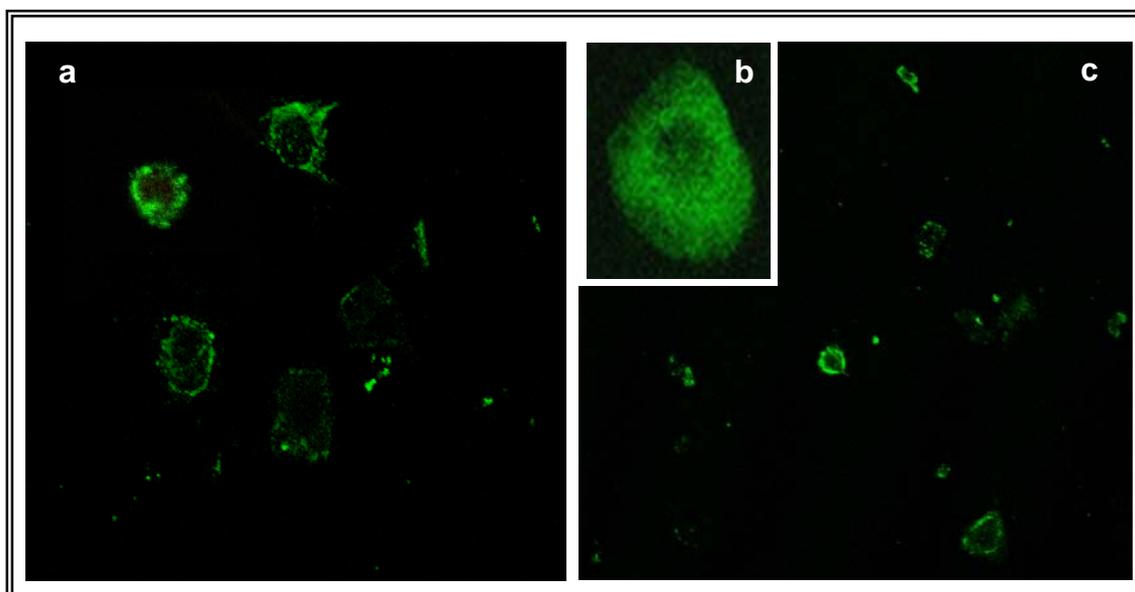


FIGURA 24. CÉLULAS APOPTÓTICAS, DESPUÉS DE TRATAMIENTOS CON DISTINTOS FÁRMACOS A LAS 48 HORAS, A) IMAGEN DE CÉLULAS TRATADAS CON EL COMPUESTO FTORAFUR, B) DETALLE DE CÉLULA APOPTÓTICA TEMPRANA, C) VISIÓN GENERAL DE CÉLULAS TRATADAS CON 548-FS.

En las figuras 23 y 24, se pueden apreciar células en apoptosis tras la inducción con distintos fármacos, en las que se puede observar cómo la membrana citoplasmática se mantiene intacta, y cómo el núcleo se desestructura llevándose a cabo la desintegración nucleolar. Al contrario en las células necróticas el núcleo está expandido y es voluminoso, observándose una ruptura de la membrana plasmática.

Al no teñirse las células viables no van a ser visualizadas por lo que en las células control sólo se pudieron observar las células necróticas teñidas con ioduro de propidio (Fig. 25).

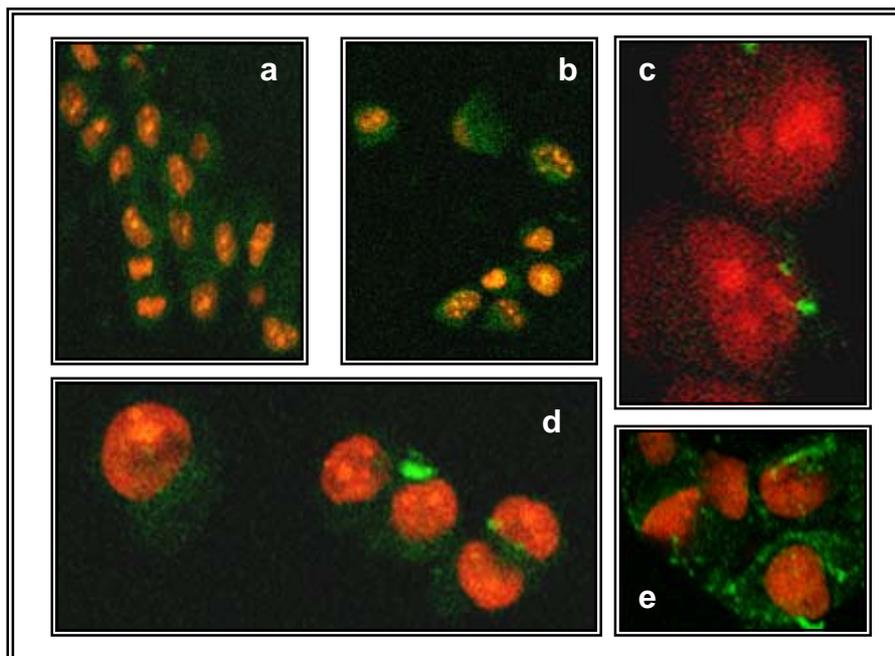


FIGURA 25. CÉLULAS SIN TRATAR CON FÁRMACOS O CÉLULAS CONTROL DONDE SE PUEDE OBSERVAR UNA NECROSIS CELULAR (A, B, C, D, E), YA QUE LOS NÚCLEOS ESTÁN EXPANDIDOS (D), CON LOS NUCLEOLOS BIEN INSINUADOS (C), Y DONDE SE INTUYE UNA DESESTRUCTURACIÓN DEL CITOPLASMA OBSERVÁNDOSE UNA DESINTEGRACIÓN DE LA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA (E).

4.3. ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN

Se decidió realizar este estudio en horas escogidas al azar descartando los valores extremos, y así se llevó a cabo a las 6 y a las 24 horas. Los compuestos seleccionados de los grupos I y II al igual que el 5-FU son capaces de inducir fragmentación del ADN en la línea celular MCF-7. La fragmentación del ADN no fue evidente en las células control a las 6 y 24 horas. Sin embargo, las células tratadas con los distintos fármacos con la dosis de CI_{50} , causaron fragmentación del ADN cuya porcentaje dependía del tiempo de tratamiento.

Los compuestos 548-FS y Ftorafur, produjeron una modesta generación de hebras rotas de ADN en células MCF-7 después de 6 horas de tratamiento (Fig.26, c), mientras que los compuestos 798-B, 928-A, 930-A y 786-B (Fig.26 a y b) indujeron una fuerte fragmentación del ADN. Los compuestos 5-FU, 252-A y 524-FS (Fig.26, c) indujeron una fragmentación algo menor de la que indujeron los 4 compuestos citados anteriormente y mayor a la inducida por el Ftorafur y el compuesto 548-FS. La cantidad de fragmentos de ADN aumentó considerablemente a las 24 horas de tratamiento con los compuestos 548-FS y Ftorafur (Fig.27). También incrementó el grado de fragmentación del ADN a las 24 horas de tratamiento con el 5-FU, y los compuestos 524-FS y 786-B. La cantidad de fragmentos de ADN disminuyó algo después de 24 horas de tratamiento con los compuestos 252-A, 798-B, 930-A y decreció mucho para 928-A (Fig.27).

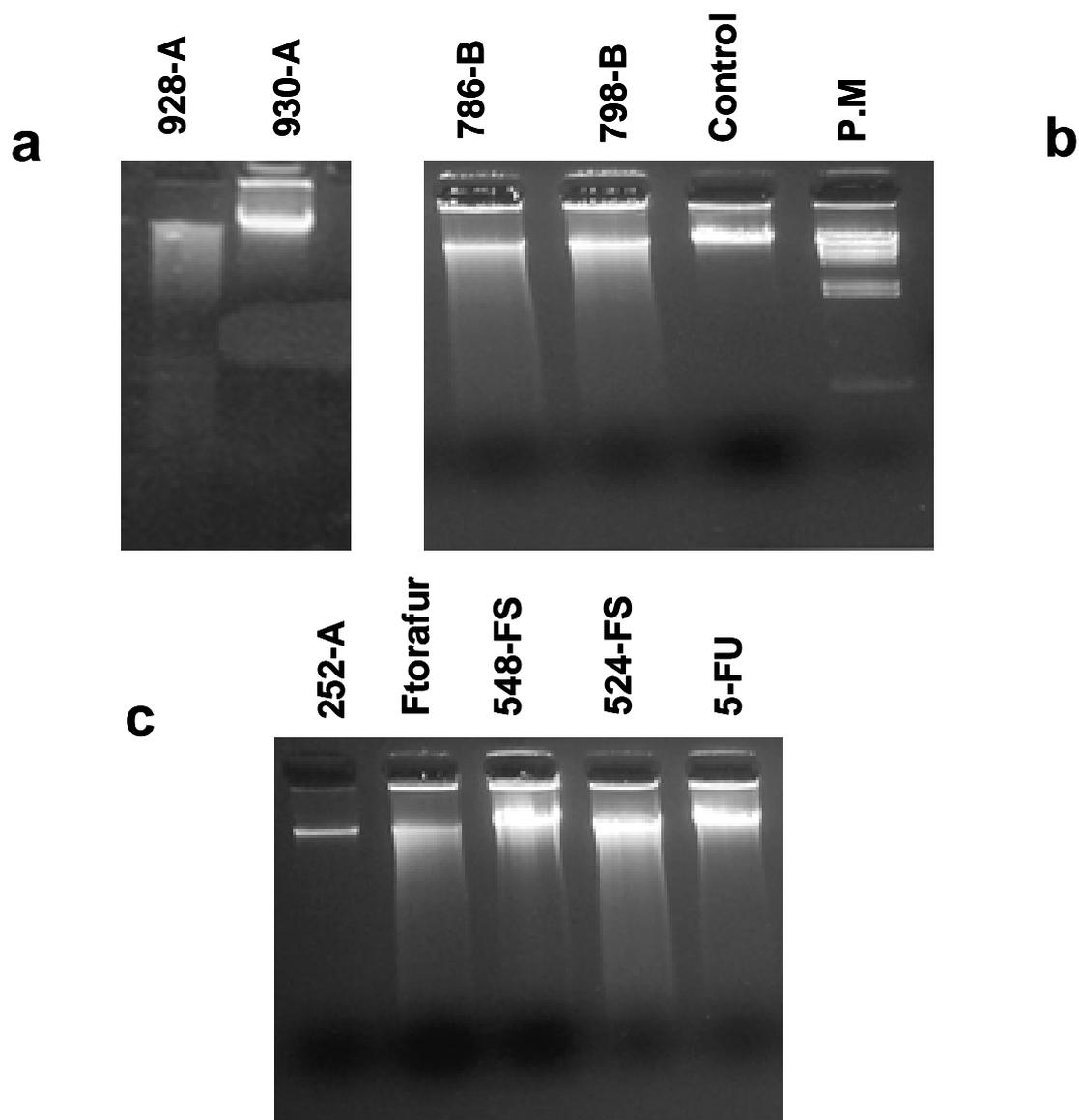


FIGURA 26. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE ADN FRAGMENTADO, EN CÉLULAS MCF-7 INDUCIDAS A LA CONCENTRACIÓN CI_{50} CON LOS NUEVE FÁRMACOS, Y EN CÉLULAS CONTROL SIN INDUCIR. EL ANÁLISIS SE LLEVÓ A CABO A LAS SEIS HORAS DE INDUCCIÓN . A, B Y C SON EL RESULTADO DE LA ELECTROFORESIS LLEVADA A CABO EN TRES GELES DIFERENTES CON LOS DISTINTOS COMPUESTOS.

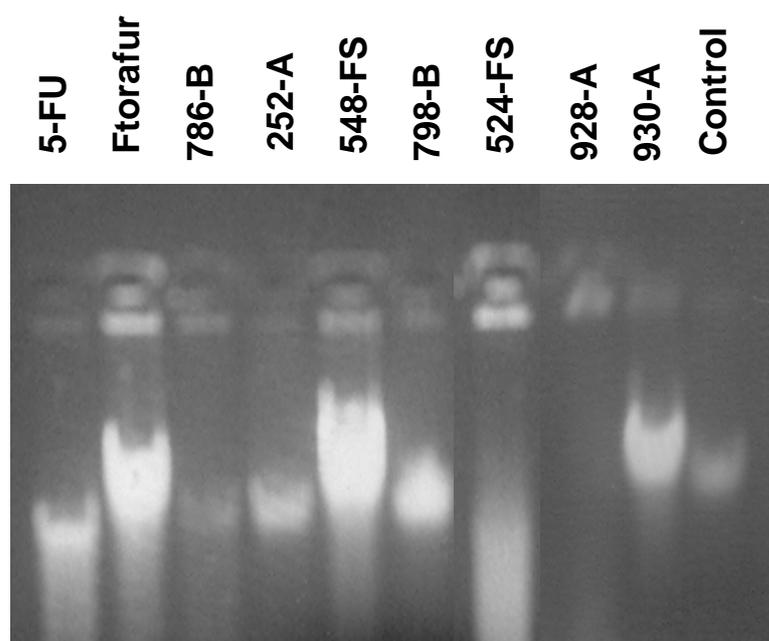


FIGURA 27. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE ADN FRAGMENTADO EN LAS CÉLULAS SIN INDUCIR Y EN CÉLULAS MCF-7 INDUCIDAS CON LOS NUEVE COMPUESTOS , TRAS 24 HORAS.

5. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE LA LÍNEA MCF-7 SIN INDUCIR E INDUCIDA CON FÁRMACOS

5.1. ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA

Para determinar los cambios morfológicos producidos en las células de la línea MCF-7 tras la inducción con los distintos fármacos, se llevó a cabo su observación mediante microscopio óptico de contraste de fases.

La línea parental MCF-7, se caracterizó por presentar una morfología celular epitelial, redondeada y poligonal con células mono y multinucleadas. El crecimiento de las células fue en monocapa, como agregados irregulares y confluyentes (Fig.28).

En las células tratadas con valores de CI_{50} de 5-FU a las 24 horas, se observó una clara morfología poligonal con prolongaciones citoplasmáticas que le conferían un aspecto totalmente irregular con tendencia al agrupamiento

celular, y una alta cantidad de células despegadas o muertas (Fig. 29, a). En el caso de las células inducidas con Ftorafur, el aspecto celular fue como el desarrollado por las células inducidas con 5-FU, y también se observó la pérdida de adherencia de las células a la superficie de la placa Falcon. A las 48 horas se pudo apreciar un crecimiento celular formando agrupamientos esféricos (Fig. 29, b). Las colonias se desarrollaron concéntricamente a las células que iniciaron su formación. Este tipo de crecimiento fue condicionado en parte, por el hecho de que las células en división rara vez se separaron de la monocapa.

En las células tratadas con la dosis de CI_{50} de los compuestos del grupo I y II, las células adquirieron forma poligonal en todos ellos agrupándose y dando lugar a figuras esféricas en mayor o menor grado (Fig. 30). También se observó una reducción del tamaño celular conforme se agrupaban y numerosas células muertas.

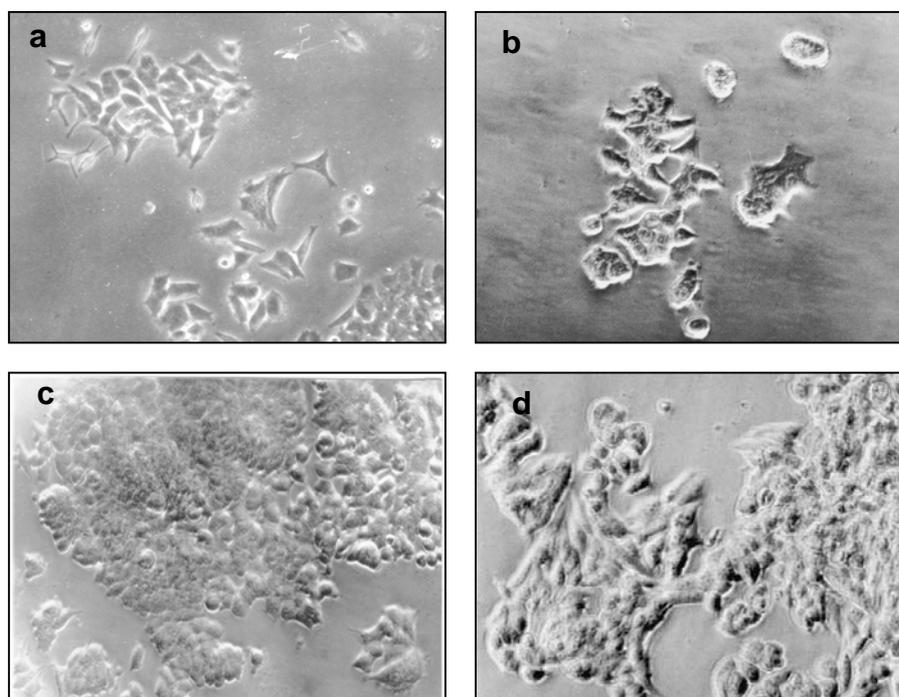


FIGURA 28. ASPECTO MORFOLÓGICO DE LAS CÉLULAS PARENTALES MCF-7. A) A LAS 24 HORAS DE CULTIVO CELULAR (X 20), B) A LAS 24 HORAS DE CULTIVO CELULAR (X 40), C) A LAS 48 HORAS DE CULTIVO CELULAR (X 20), D) A LAS 48 HORAS DE CULTIVO CELULAR (X 40).

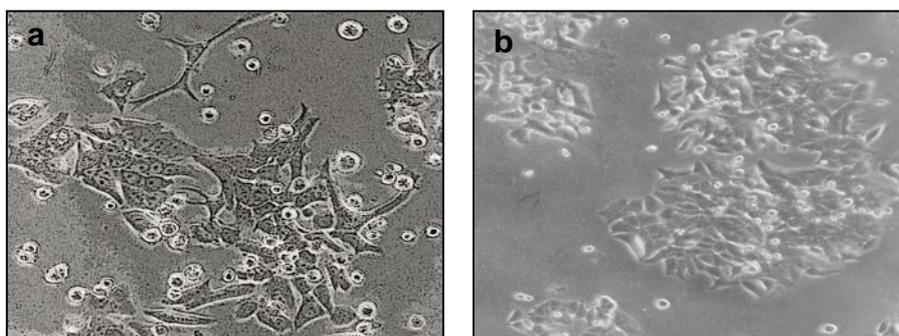


FIGURA 29. ASPECTO MORFOLÓGICO DE LAS CÉLULAS INDUCIDAS CON 5-FU Y FTORAFUR. A) CÉLULAS INDUCIDAS CON 5-FU A LAS 24 HORAS (x40), SE OBSERVAN GRANDES PROLONGACIONES CITOPASMÁTICAS, B) CÉLULAS INDUCIDAS CON FTORAFUR A LAS 48 HORAS.(x20).

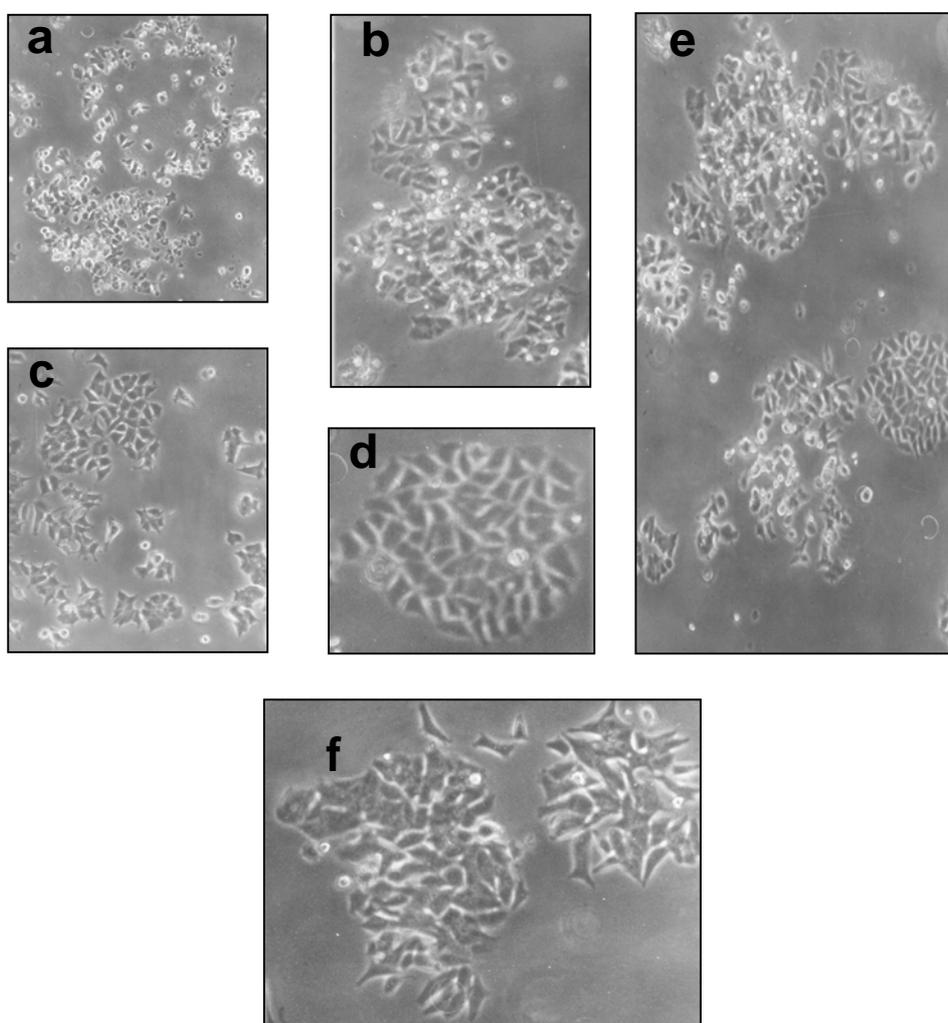


FIGURA 30. EJEMPLOS DE MORFOLOGÍA DE LOS COMPUESTOS DEL GRUPO I Y II TRAS 48 HORAS DE INDUCCIÓN (x20). A) CÉLULAS INDUCIDAS CON 786-B B) CÉLULAS INDUCIDAS CON 928-A, C) CÉLULAS INDUCIDAS CON 252-A, D) DETALLE DE AGRUPAMIENTO CELULAR FORMANDO UN CUERPO ESFÉRICO ,E) VISTA COMPLETA DE UN CAMPO CELULAR INDUCIDO CON 928-A, F) AGRUPAMIENTOS CELULARES INDUCIDOS CON 548-FS.

5.2. ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Para comprobar la existencia de cambios a nivel subcelular en la línea MCF-7 tratada durante 48 horas con los distintos fármacos, se llevó a cabo un estudio mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

En el estudio de la línea celular MCF-7, observamos la presencia de células mononucleares e incluso algunas multinucleadas con núcleos grandes y de distinto tamaño (anisocitosis) que presentan nucleolos prominentes (Fig.31, a). Las células permanecen unidas por medio de numerosas conexiones intermembrana como las interdigitaciones, y se observa numeroso microvilli. Las organelas se encuentran dispersas por todo el citoplasma celular confiriéndole un aspecto laxo y relajado (Fig.31, b).

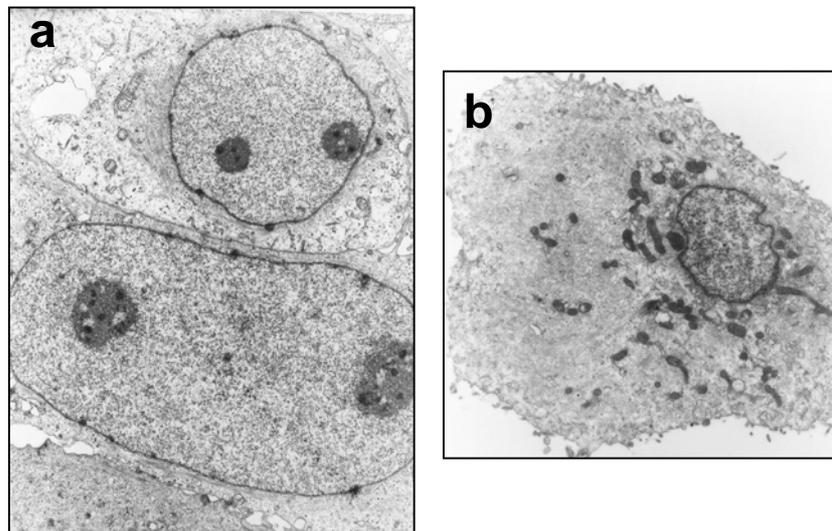
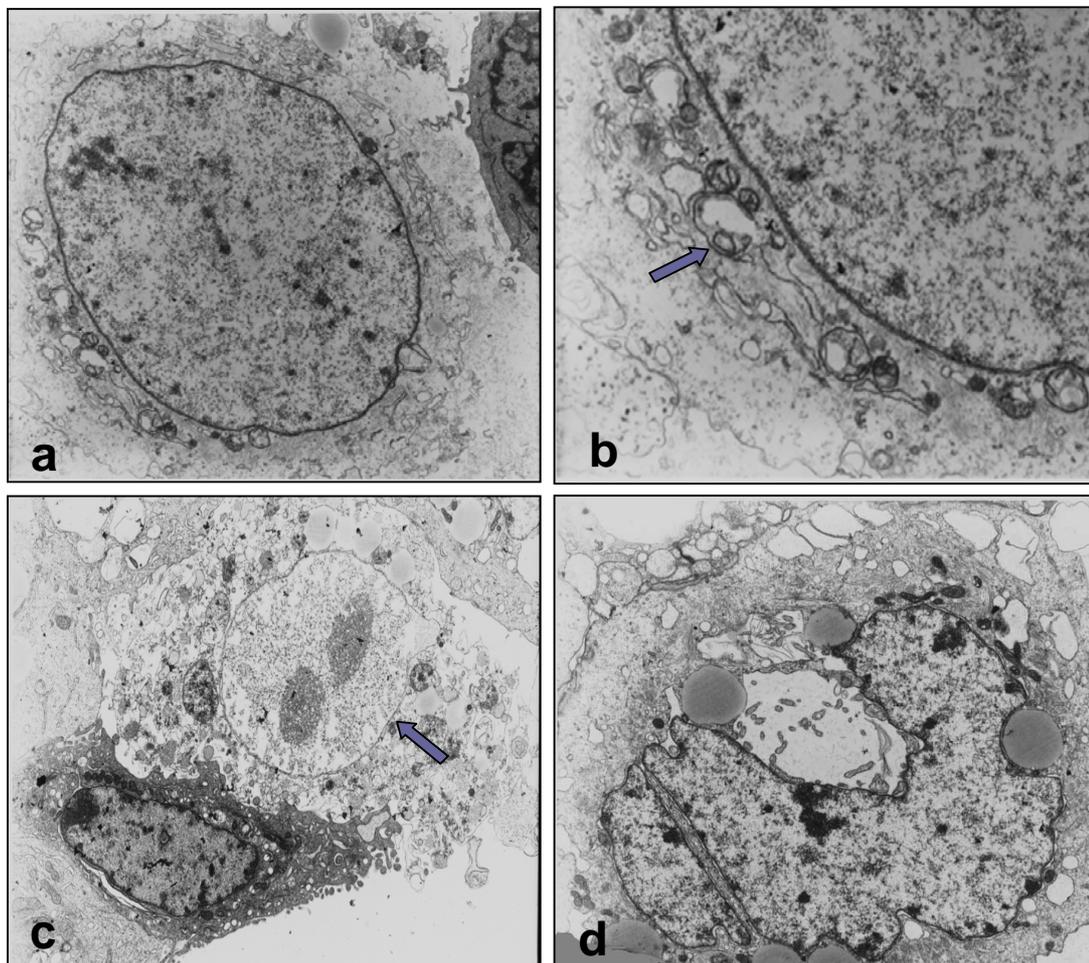


FIGURA 31. EJEMPLOS DE CÉLULAS CONTROL (x 5000). A) CÉLULAS EN LAS QUE LA CROMATINA SE ENCUENTRA RELAJADA Y DISPERSA POR EL NÚCLEO Y DONDE SE PUEDEN APRECIAR LOS NUCLEOLOS BIEN ESTRUCTURADOS Y PROMINENTES. B) CÉLULA EN INTERFASE DONDE RESALTAN EN COLOR MÁS OSCURO LAS MITOCONDRIAS.

En las células inducidas con los distintos fármacos, se observaron síntomas característicos tanto de necrosis como de apoptosis. En las células necróticas, se pudo observar inicialmente un aumento del volumen celular que continuó con una desestructuración del citoplasma, y rotura de la membrana plasmática con liberación del contenido celular al microambiente (Fig. 32). El núcleo celular se caracterizó por un aumento de tamaño, con desaparición de los nucleolos y una condensación irregular de la cromatina, degradándose ésta en sitios al azar.



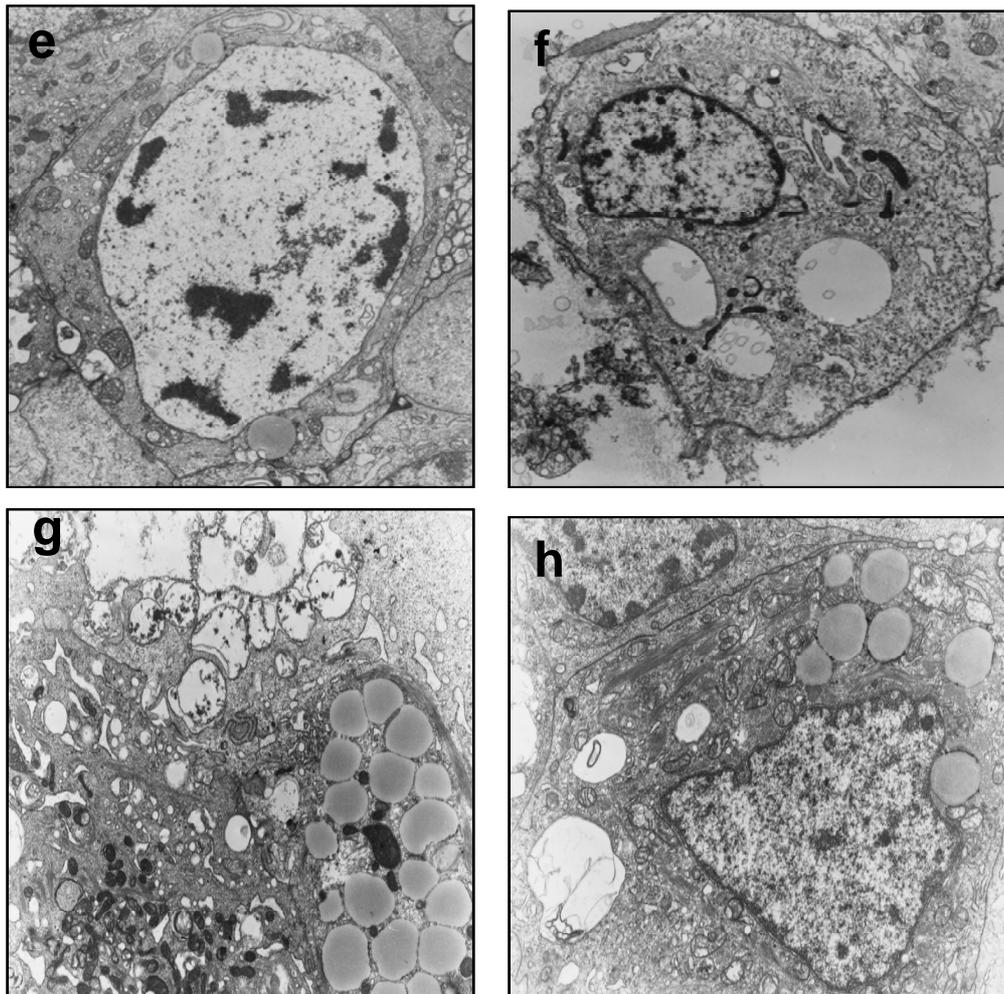


FIGURA 32. CÉLULAS NECRÓTICAS. A) CÉLULA CON CITOPLASMA YA DESESTRUCTURADO Y ROTURA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA, EN LA QUE SE APRECIA UN NÚCLEO MUY VOLUMINOSO CON LA CROMATINA REPARTIDA AL AZAR (X 6300-CONTROL). B) DETALLE DE LOS ORGÁNULOS DESESTRUCTURADOS COMO LAS MITOCONDRIAS (FLECHA). C) CÉLULA EN LA QUE SE APRECIA UN NÚCLEO HINCHADO CON DOS NUCLEOLOS PROMINENTES (FLECHA) Y FRAGMENTACIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA, Y ABAJO A SU IZQUIERDA UNA CÉLULA APOPTÓTICA (X 5000-FTORAFUR). D) CÉLULA NECRÓTICA BINUCLEADA EN LA QUE COMIENZA A DESESTRUCTURARSE EL CITOPLASMA Y DONDE SE OBSERVAN NUMEROSAS VACUOLAS, ALGUNAS DE GRAN TAMAÑO Y GRANDES GOTAS DE GRASA PRODUCTO DEL METABOLISMO CELULAR (X 8000-FTORAFUR). E) NECROSIS EN FASE TEMPRANA DONDE SE OBSERVA EL NÚCLEO CLARAMENTE HINCHADO Y CON LA CROMATINA DISPERSA, EN EL CITOPLASMA SE PUEDE OBSERVAR CÓMO LOS ORGÁNULOS COMIENZAN A DESORGANIZARSE Y LA MEMBRANA A FRAGMENTARSE (X 5000-786-B). F) NECROSIS EN FASE TEMPRANA DONDE SE PUEDE APRECIAR GRANDES VACUOLAS Y DESESTRUCTURACIÓN DEL CITOPLASMA (X 6300-798-B). G) DETALLE DEL CITOPLASMA YA DESORGANIZADO COMPLETAMENTE CON PRESENCIA DE NUMEROSAS GOTAS DE GRASA (X 8000-548-FS). H) CÉLULA CON NÚCLEO GRANDE Y CITOPLASMA EN EL QUE ABUNDAN LOS TONOFILAMENTOS Y GOTAS LÍPIDICAS ADEMÁS DE NUMEROSAS VACUOLAS, LA MEMBRANA PLASMÁTICA YA SE ESTÁ FRAGMENTANDO (X 8000-786-B).

Por otra parte en las células que sufrieron apoptosis se observó pérdida de uniones celulares y de estructuras especializadas de membrana como los microvilli (Fig.36, b y d). Las células apoptóticas estaban encogidas y separadas de sus células vecinas por una especie de halo o espacio claro (Fig.34 y 36). El proceso apoptótico normalmente involucró a células únicas y ocasionalmente a pequeños grupos de células. La cromatina se encontraba fuertemente condensada bajo la membrana nuclear (Fig.35) y el citoplasma celular se presentó más denso y con las organelas intactas. No se observó ruptura de la membrana plasmática y ya en la fase de apoptosis tardía se observaron los cuerpos apoptóticos (fragmentos de cromatina y organelas rodeados de membrana plasmática íntegra (Fig.36, d y e).

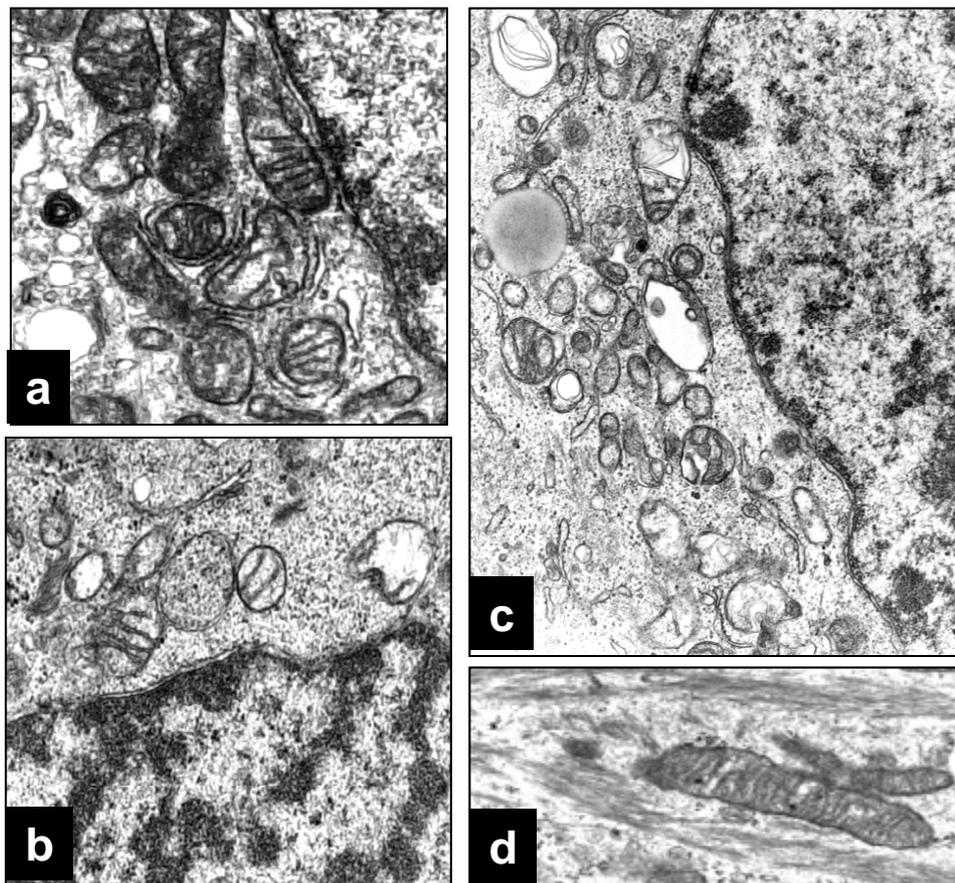


FIGURA 33. DETALLE DE MITOCONDRIAS EN CÉLULAS APOPTÓTICAS Y NECRÓTICAS. A Y B) CORTE TRANSVERSAL CÉLULAS EN LAS QUE LAS MITOCONDRIAS PERMANECEN INTACTAS (x 16.000-928-A). C) MITOCONDRIAS EN UN CORTE TRANSVERSAL DE CÉLULA NECRÓTICA DONDE YA SE OBSERVAN LAS CRESTAS DESESTRUCTURADAS (x 10.000-930-A). D) CORTE LONGITUDINAL DE UNA CÉLULA APOPTÓTICA DONDE SE OBSERVAN NUMEROSOS TONOFILAMENTOS Y MITOCONDRIAS ÍNTEGRAS (x 12.500-252-A).

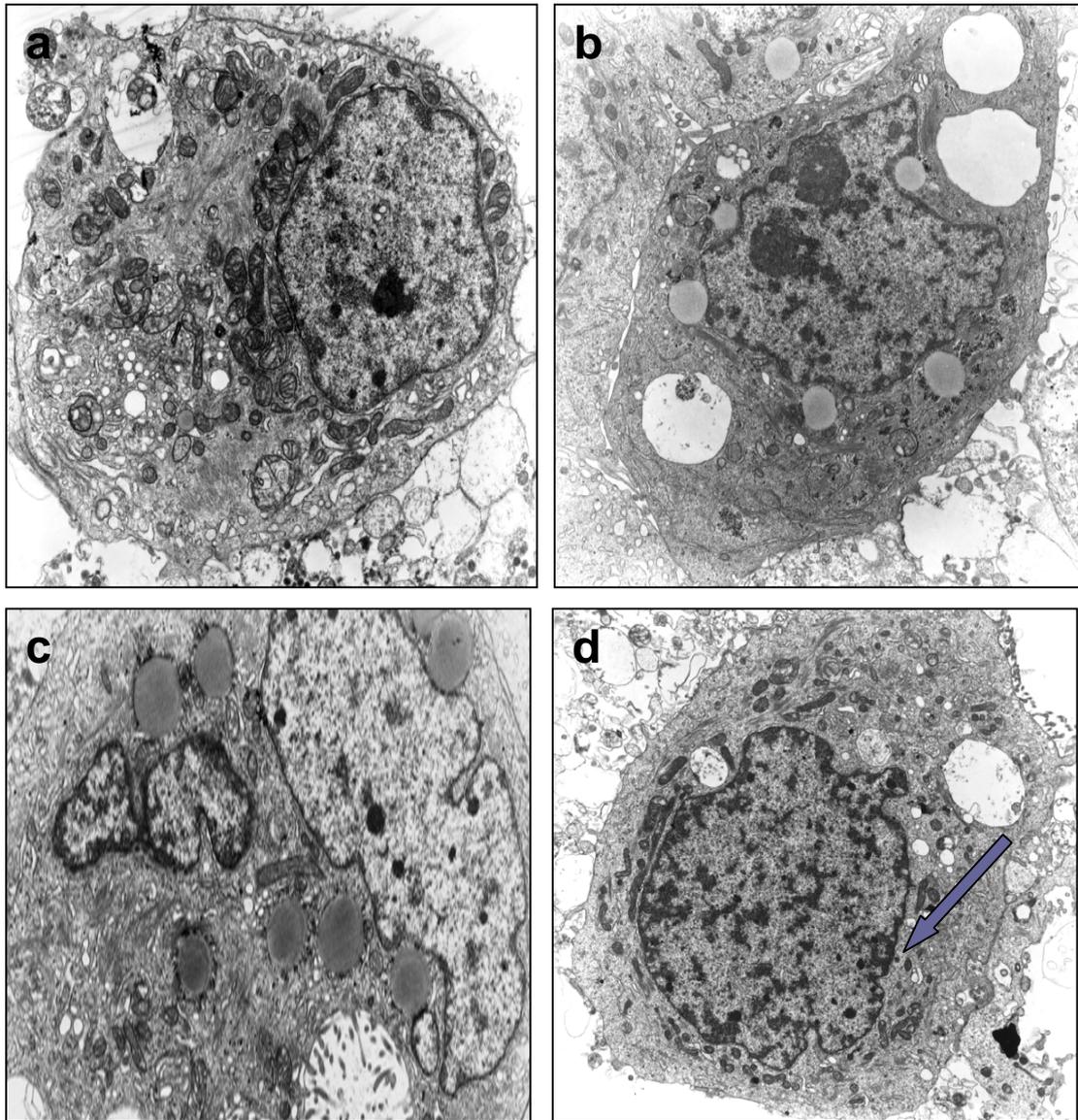


FIGURA 34. CÉLULAS APOPTÓTICAS TRAS LA INDUCCIÓN CON FÁRMACOS. A) APOPTOSIS TEMPRANA EN LA QUE SE OBSERVA EL CITOPLASMA BIEN ESTRUCTURADO Y LOS ORGÁNULOS INTACTOS, Y DONDE COMIENZA A REDUCIRSE EL NÚCLEO EN EL QUE TODAVÍA SE APRECIA UN NUCLEOLO QUE EMPIEZA A DEGENERAR (X 8000-252-A). B) EN ESTA CÉLULA SE APRECIA LA REDUCCIÓN DEL VOLUMEN NUCLEAR Y LA CONDENSACIÓN DE LA CROMATINA. LOS DOS NUCLEOLOS SON AÚN VISIBLES Y PROMINENTES (X 6300-524-FS). C) CÉLULA APOPTÓTICA EN LA QUE SE APRECIAN TRES NÚCLEOS APOPTÓTICOS CON CONDENSACIÓN DE LA CROMATINA EN DISTINTAS ETAPAS. LA CROMATINA SE VA DISTRIBUYENDO ALREDEDOR DE LA MEMBRANA NUCLEAR, Y LOS ORGÁNULOS CITOPASMÁTICOS TODAVÍA PERMANECEN INTACTOS APRECIÁNDOSE ENTRE ELLOS GOTAS DE GRASA TÍPICAS DE LAS CÉLULAS GLANDULARES (X 6300-FTORAFUR). D) CÉLULA APOPTÓTICA DONDE SE OBSERVA YA EL NÚCLEO DESESTRUCTURADO SIN ROMPER LA MEMBRANA NUCLEAR NI LA PLASMÁTICA, Y EN LAS PROXIMIDADES AL NÚCLEO SE PUEDE OBSERVAR LA EXTRUSIÓN DE PEQUEÑOS FRAGMENTOS DE CROMATINA HACIA EL CITOPLASMA CELULAR (FLECHA) (X 5000-798-B).

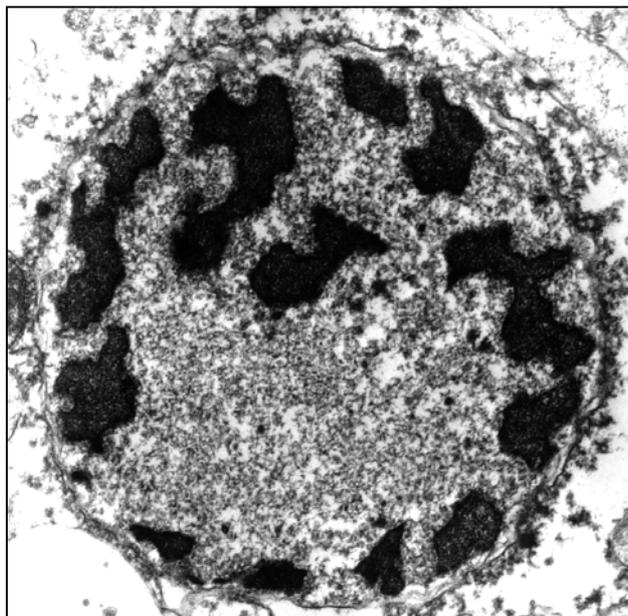
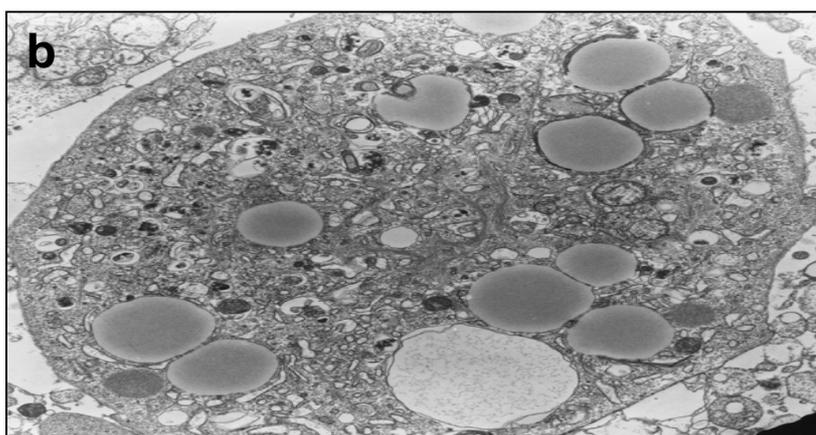
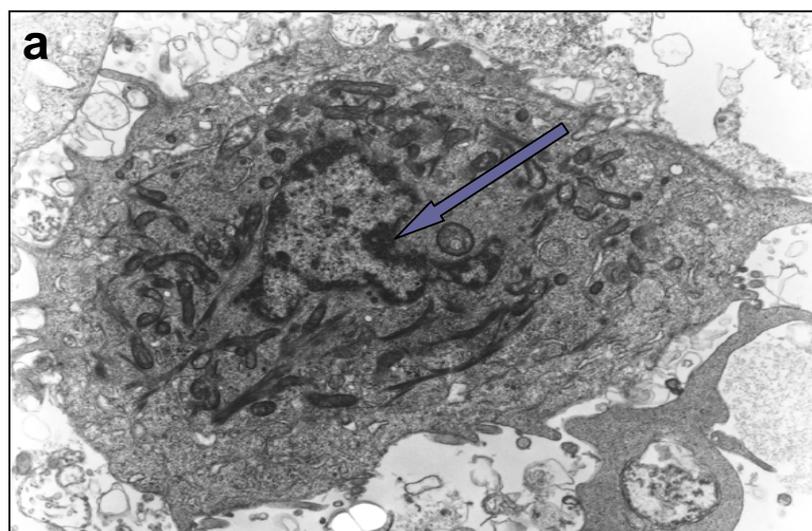


FIGURA 35. DETALLE DE UN NÚCLEO APOPTÓTICO TARDÍO, CON LA CROMATINA MUY CONDENSADA Y DISTRIBUIDA ALREDEDOR DE LA MEMBRANA NUCLEAR EN FORMA DE MANCHAS SOLARES (X 12.500-548-FS).



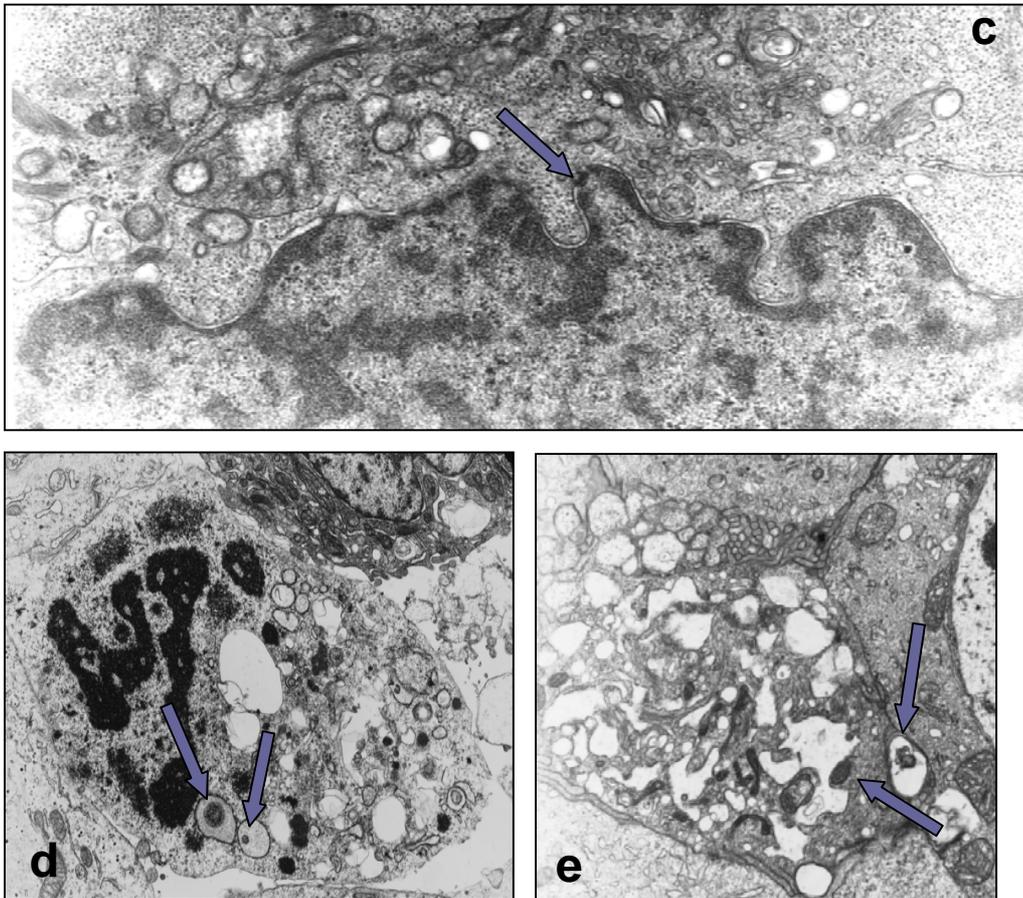


FIGURA 36. CÉLULAS APOPTÓTICAS. A). SE PUEDE APRECIAR LA EXTRUSIÓN DE NUMEROSOS FRAGMENTOS DE CROMATINA (FLECHA), HACIA EL CITOPLASMA, QUE SE ENCUENTRA MUY CONDENSADO Y CON NUMEROSOS TONOFILAMENTOS, NO SE OBSERVA ROTURA NI DE LA MEMBRANA NUCLEAR NI DE LA PLASMÁTICA (X 6300-798-B) .B) LA MEMBRANA NUCLEAR YA HA DESAPARECIDO ENCONTRÁNDOSE LA CROMATINA REPARTIDA POR TODO EL CITOPLASMA, PARA SER EVAGINADA EN FORMA DE CUERPOS APOPTÓTICOS (X 6300-548-FS). C) DETALLE DE UN NÚCLEO APOPTÓTICO EVAGINANDO UN FRAGMENTO DE CROMATINA (FLECHA) (X 16.000-5-FU). D) CÉLULA APOPTÓTICA TARDÍA EN LA QUE LA CROMATINA TODAVÍA SE ENCUENTRA ALGO CONDENSADA , CON DESAPARICIÓN COMPLETA DE LA MEMBRANA NUCLEAR, Y DONDE YA SON EVIDENTES LOS CUERPOS APOPTÓTICOS (FLECHAS) (X 8000-FTORAFUR). E) APOPTOSIS TARDÍA DE UNA CÉLULA YA CON EL CITOPLASMA TOTALMENTE DESESTRUCTURADO Y DONDE SE APRECIA LA FORMACIÓN DE CUERPOS APOPTÓTICOS (FLECHA DE ABAJO) Y CUERPO APOPTÓTICO QUE SE ESTÁ LIBERANDO AL ESPACIO INTERCELULAR (X 5000-786-B).

Por último las células apoptóticas y los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos, o por células tumorales vecinas (Fig. 37).

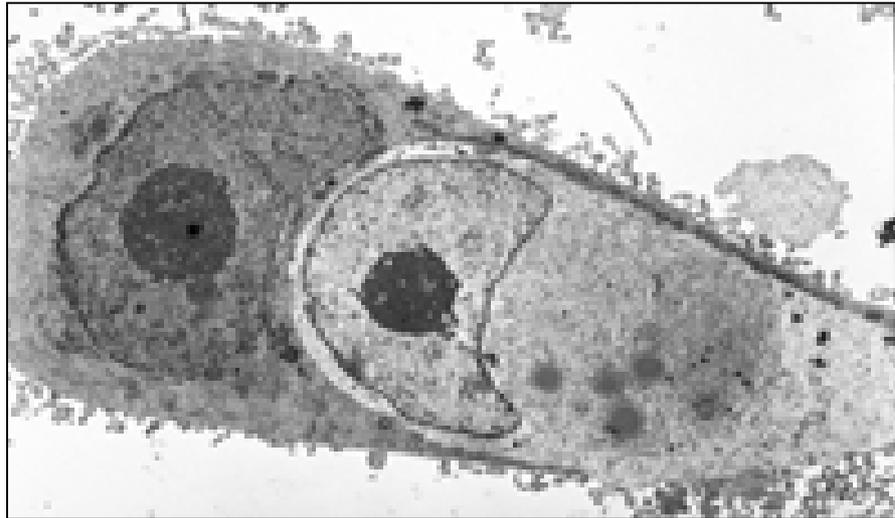


FIGURA 37. CÉLULA TUMORAL EN LA QUE SE APRECIAN PROLONGACIONES CITOPASMÁTICAS, QUE RODEAN Y VA A FAGOCITAR A UNA CÉLULA QUE SE ENCUENTRA EN APOPTOSIS TEMPRANA. EN LA CÉLULA FAGOCITARIA SE OBSERVAN NUMEROSOS LAMELIPODIOS (X 2500-FTORAFUR).

5.3. ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El estudio de la morfología de las células control adheridas al sustrato mediante microscopía electrónica de barrido, nos mostró al igual que habíamos observado con la microscopía óptica, una variedad de formas más o menos poligonales, con numerosas prolongaciones citoplasmáticas para contactar con otras células y confluir (Fig.37), dichas prolongaciones citoplasmáticas se vuelven más evidentes tras la inducción con fármacos durante 48 horas, apreciándose rasgos de diferenciación (Fig.41). En la superficie de las células se observaron numerosos microvilli y extensiones de lamelipodios.

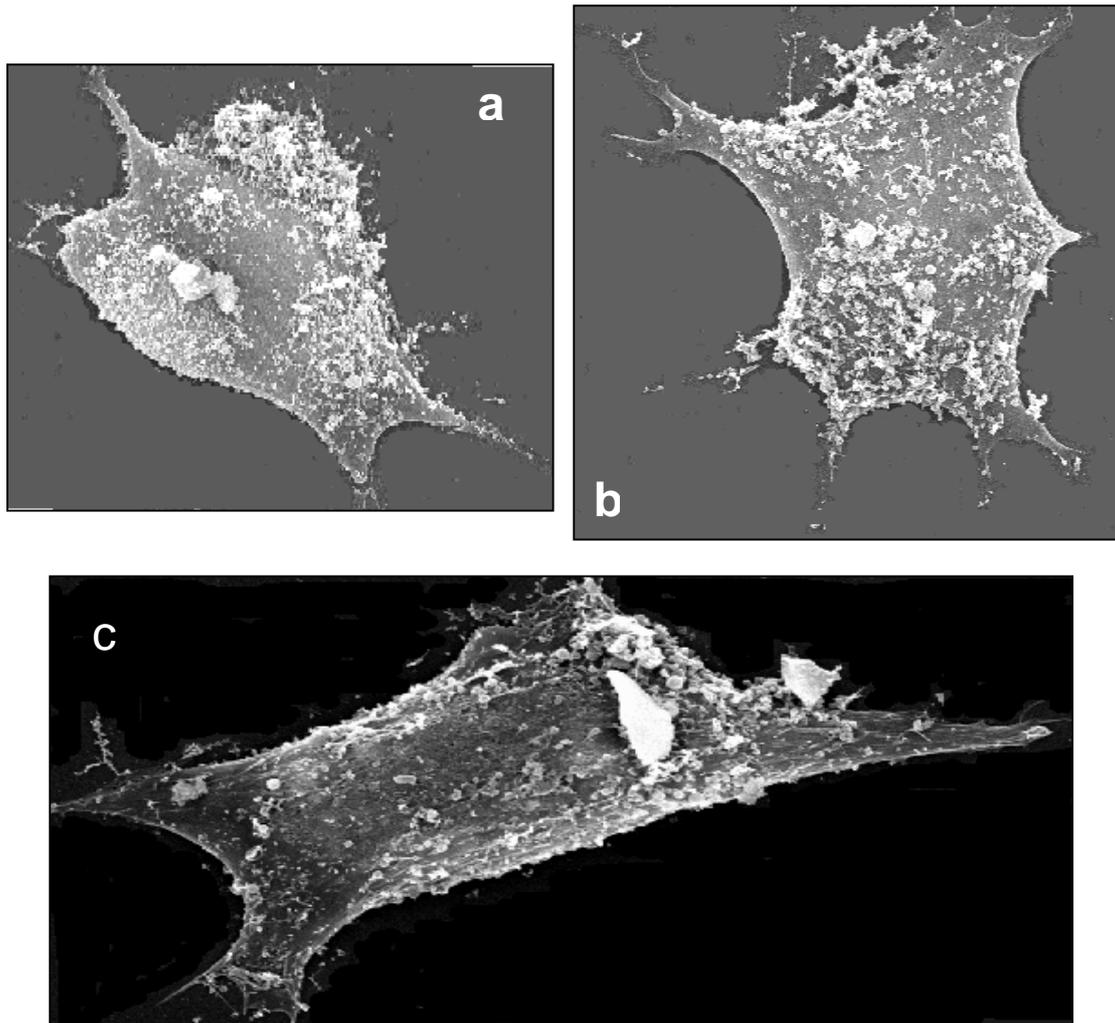


FIGURA 38. CÉLULAS CONTROL RESALTADAS SOBRE FONDO GRIS (A Y B) Y SOBRE FONDO NEGRO (C). EN LAS IMÁGENES (X 1700) SE PUEDEN APRECIAR CÉLULAS CON MORFOLOGÍA CLARAMENTE POLIGONAL, EN LAS QUE EN SU SUPERFICIE SE OBSERVAN MICROVELLOSIDADES Y LAMELIPODIOS, TAMBIÉN SE OBSERVAN PROLONGACIONES CITOPASMÁTICAS ALARGADAS Y ESTRECHAS POR LAS QUE VAN A CONTACTAR CON OTRAS CÉLULAS CERCANAS.

Entre las células inducidas con los distintos fármacos se pudieron observar algunas con evaginaciones superficiales y otras con cráteres en la membrana plasmática, debido a la extrusión nuclear característica de la apoptosis. Dichas células aparecen con aspecto redondeado y arrugado mostrando numerosas deformaciones de la membrana plasmática aunque sin perder su integridad (Fig. 39).

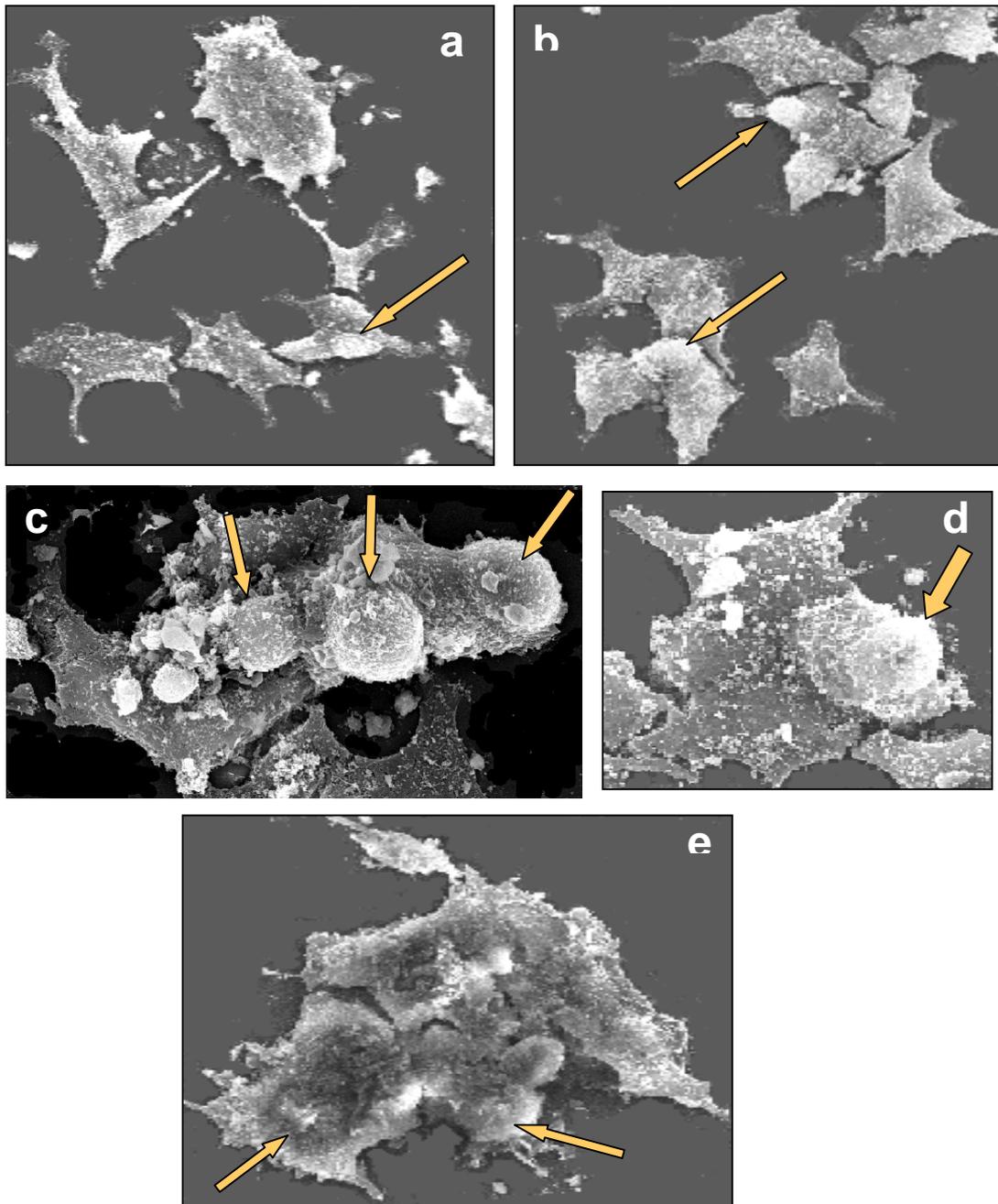


FIGURA 39. DETALLES DE LA EXTRUSIÓN NUCLEAR EN LAS CÉLULAS APOPTÓTICAS INDUCIDAS CON DISTINTOS FÁRMACOS. LAS IMÁGENES A Y B (X 300) CORRESPONDEN A CÉLULAS INDUCIDAS CON 928-A Y 252-A RESPECTIVAMENTE DONDE SE OBSERVA EL INICIO DE LA EVAGINACIÓN SUPERFICIAL DEL NÚCLEO (FLECHAS). C) CÉLULA INDUCIDA CON 786-B EN LA QUE SE APRECIAN TRES NÚCLEOS EXTRUYENDO (FLECHAS) (X 650). D) EXTRUSIÓN DE UN NÚCLEO EN CÉLULAS INDUCIDAS CON 524-FS (FLECHA) (X 650). E) LA FLECHA IZQUIERDA SEÑALA UN CRÁTER PROVOCADO POR LA EVAGINACIÓN NUCLEAR EN CÉLULAS INDUCIDAS CON 548-FS Y LA DE LA DERECHA LA EXTRUSIÓN DE OTRO NÚCLEO EN LA CÉLULA ADYACENTE (X 650).

Es importante notar cómo en las imágenes con microscopía electrónica de barrido se observa que las células que sufren una apoptosis temprana pierden las conexiones de la membrana plasmática con las células vecinas y también la adhesión celular al sustrato provocando por ello que las células aparezcan flotando en el medio de cultivo.

En las células necróticas se pudo apreciar una rotura y desestructuración de la membrana plasmática con salida al exterior del contenido citoplasmático como se puede apreciar en la figura 40.

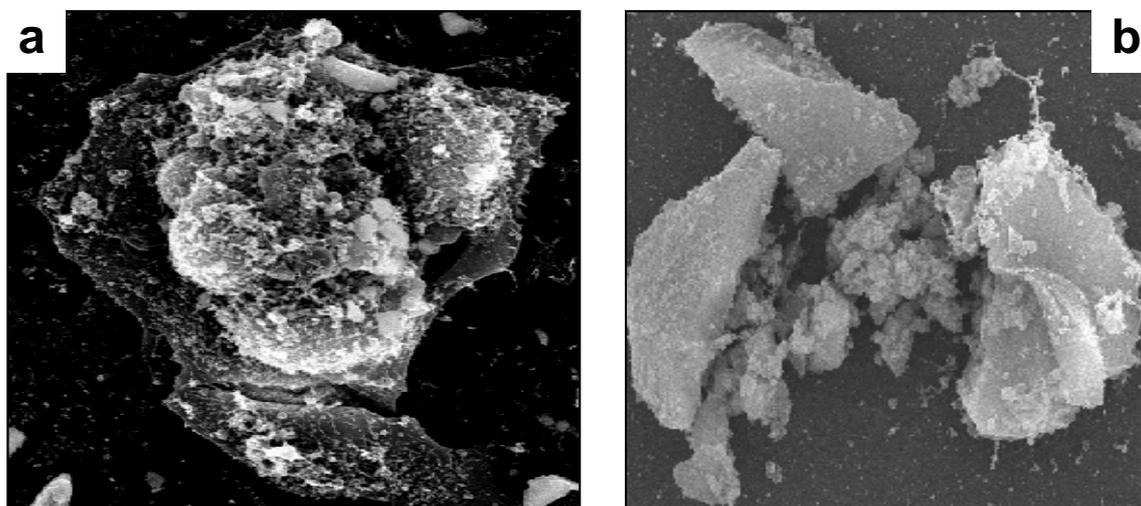


FIGURA 40. A) CÉLULA CONTROL NECRÓTICA EN LA QUE SE APRECIAN NUMEROSAS EVAGINACIONES SUPERFICIALES Y POROS EN LA MEMBRANA (X 850). B) GRUPO DE CÉLULAS INDUCIDAS CON 930-A, CON ASPECTO MÁS O MENOS HINCHADO DONDE SE OBSERVA SALIDA AL EXTERIOR CELULAR DEL CONTENIDO CITOPASMÁTICO (X 950).

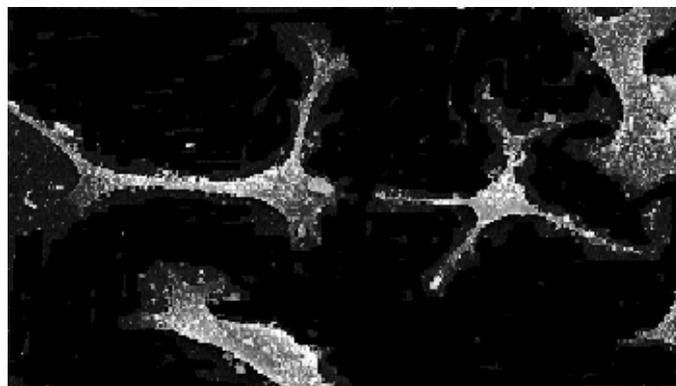


FIGURA 41. CÉLULAS TRAS LA INDUCCIÓN DURANTE 48 HORAS CON 5-FU (X 600). SE OBSERVAN CARACTERÍSTICAS DE DIFERENCIACIÓN.

6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES CELULARES EN LA LÍNEA MCF-7 SIN INDUCIR E INDUCIDA CON FÁRMACOS

6.1. ESTUDIO MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

El estudio se llevó a cabo con distintos marcadores específicos utilizados en la clínica como factores pronóstico. Así, mediante FACScan, obtuvimos los porcentajes de expresión de los distintos marcadores en las células MCF-7 inducidas y sin inducir con los distintos compuestos, durante 2 días.

Receptores estrogénicos (RE) y de progesterona (RP): El análisis citométrico (Tabla 9 y Fig. 42), demostró una gran disminución de los receptores de estrógenos y de progesterona en las células MCF-7 tratadas con los compuestos 252-A y 548-FS. En las células tratadas con 5-FU sin embargo, los valores se mantuvieron en el mismo rango que en las células control. Los valores para el receptor de progesterona se mantuvieron aproximadamente iguales a los obtenidos por las células control con los compuestos 786-B, 798-B y 928-A, viéndose incrementados en Ftorafur y en mayor medida en los compuestos 524-FS y 930-A. En cuanto a los valores de los receptores de estrógenos se vieron algo disminuidos en las células tratadas con los compuestos 524-FS y 928-A, y en mayor grado con Ftorafur y 930-A. En las células tratadas con 798-B el valor aumentó respecto a las células control y el aumento mayor lo experimentaron las células tratadas con 786-B.

TABLA 9. % DE RP Y DE RE EN CÉLULAS MCF-7 CONTROL Y INDUCIDAS CON LOS DISTINTOS COMPUESTOS

	Cont.	5-FU	Ftoraf.	252-A	786-B	798-B	928-A	930-A	524-FS	548-FS
RP	19,71	19,60	33,66	1,76	19,36	21,06	23,06	50,29	45,02	4,75
RE	18,69	20,22	10,06	1,74	50,80	29,95	12,06	8,83	13,45	4,60

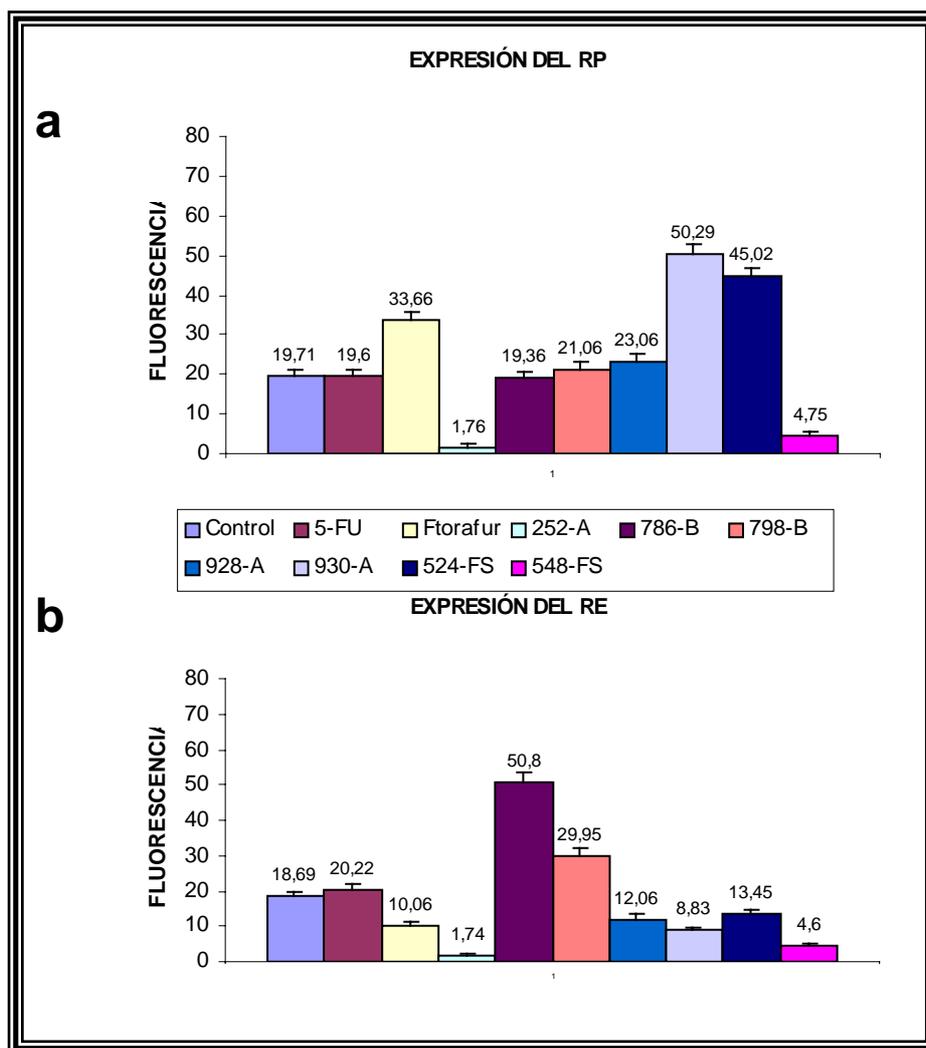


FIGURA 42. ANÁLISIS MEDIANTE FACSCAN DE LAS MODIFICACIONES EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LAS CÉLULAS MCF-7 INDUCIDAS CON LOS DISTINTOS COMPUESTOS DURANTE 2 DÍAS. A) RECEPTOR DE PROGESTERONA. B) RECEPTOR DE ESTRÓGENOS.

Antígeno Ki-67 y Oncogen HER-2: El análisis citométrico (Tabla 10 y Fig.43), mostró una gran disminución en la expresión del marcador de proliferación Ki-67 en las células tratadas con todos los compuestos especialmente con 548-FS, 798-B y 252-A, manteniendo los niveles de expresión de este marcador respecto a las células control, las células tratadas con 928-A. En cuanto a la expresión de HER-2 (Tabla 10 y Fig.43), se observó una disminución en su expresión en las células tratadas con los distintos compuestos excepto en las tratadas con 786-B y sobre todo con 524-FS en las que la expresión aumentó notablemente.

TABLA 10. % DE KI-67 Y DE HER-2 EN CÉLULAS MCF-7 CONTROL Y INDUCIDAS CON LOS DISTINTOS COMPUESTOS

	Cont.	5-FU	Ftoraf.	252-A	786-B	798-B	928-A	930-A	524-FS	548-FS
Ki-67	30,51	22,28	17,64	8,82	17,67	3,24	29,04	13,69	27,76	0,27
HER-2	27,22	13,14	0,88	0,14	35,98	0,28	1,48	1,20	67,74	6,01

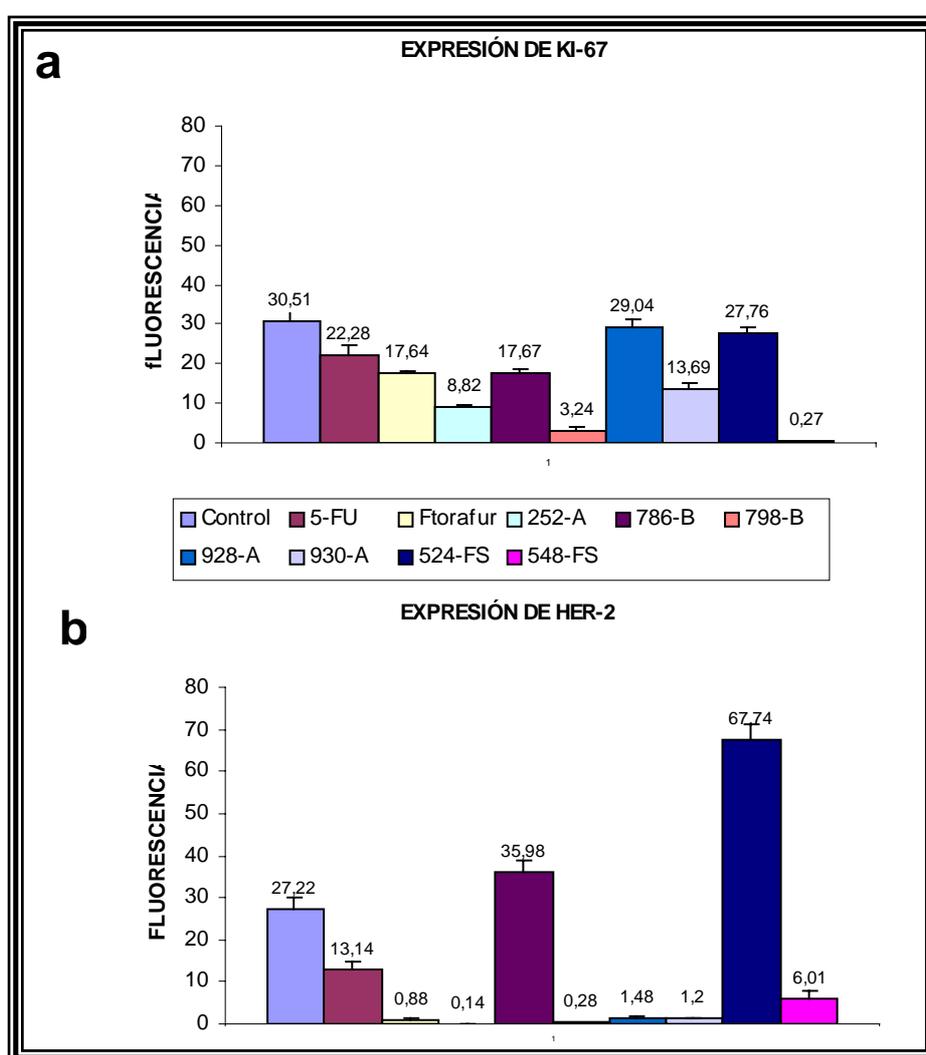
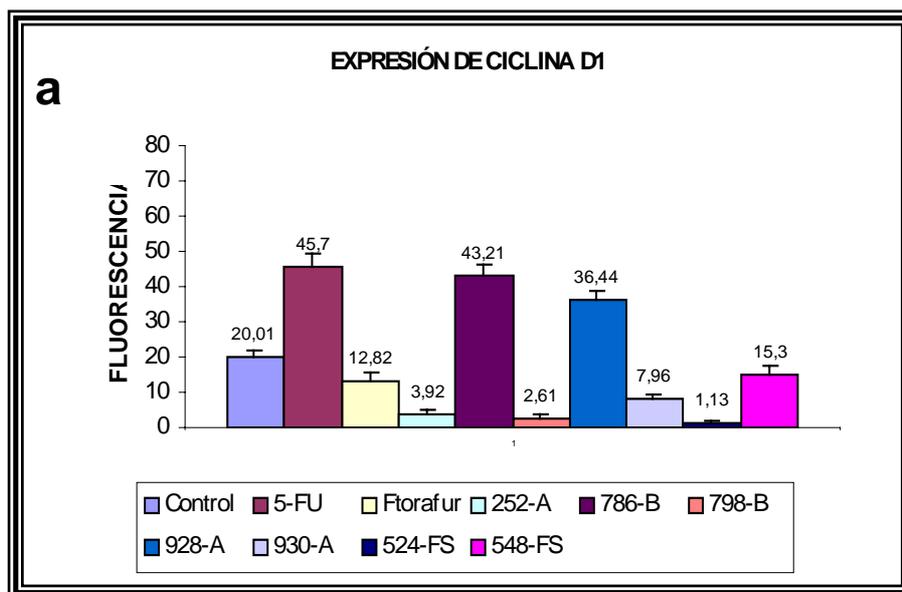


FIGURA 43. ANÁLISIS MEDIANTE FACSCAN DE LAS MODIFICACIONES EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LAS CÉLULAS MCF-7 INDUCIDAS CON LOS DISTINTOS COMPUESTOS DURANTE 2 DÍAS. A) ANTÍGENO KI-67. B) ONCOGEN HER-2.

Ciclina D1 (C.D1) y p34: El análisis citométrico de la expresión de ciclina D1 (Tabla 11 y Fig. 44), mostró una tasa de disminución alta en las células tratadas con los compuestos 524-FS, 798-B y 252-A y también en las células tratadas con los compuestos 930-A, Ftorafur y 548-FS. Sin embargo la inducción con los compuestos 928-A, 786-B y 5-FU en las células MCF-7, incrementó notablemente la expresión de la ciclina D1. El análisis de la expresión de p34 (Tabla 11 y Fig.44), mostró un ligero incremento en su expresión en las células tratadas con Ftorafur, y éste incremento fue mayor en las células inducidas con 5-FU, 786-B y 548-FS. Mientras que en las células tratadas con los demás compuestos la expresión de p34 disminuyó y lo hizo de manera muy notable en las células inducidas con 252-A.

TABLA 11. % DE CICLINA D1 Y DE P34 EN CÉLULAS MCF-7 CONTROL Y INDUCIDAS CON LOS DISTINTOS COMPUESTOS

	Cont.	5-FU	Ftoraf.	252-A	786-B	798-B	928-A	930-A	524-FS	548-FS
C.D1	20,01	45,70	12,82	3,92	43,21	2,61	36,44	7,96	1,13	15,30
P34	31,52	45,32	32,54	2,96	45,44	25,52	13,60	18,07	7,64	49,82



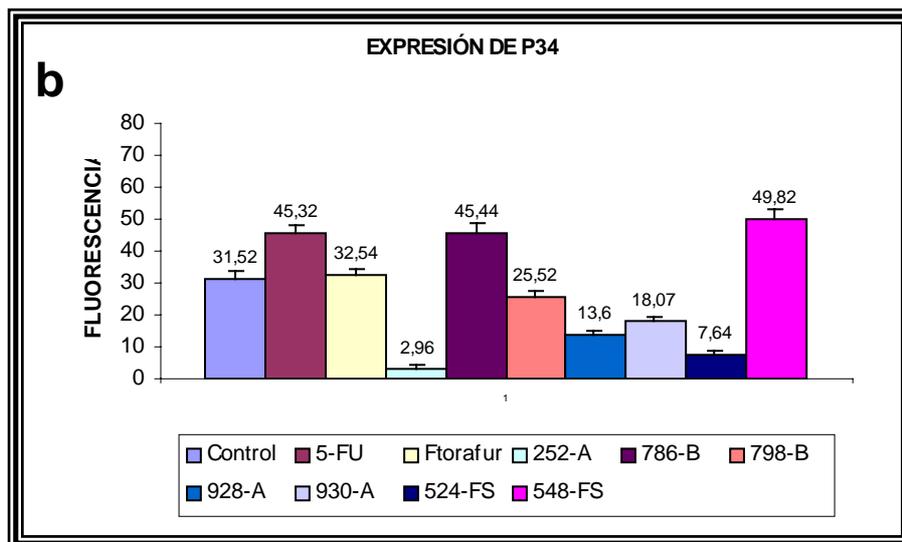


FIGURA 44. ANÁLISIS MEDIANTE FACSCAN DE LAS MODIFICACIONES EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LAS CÉLULAS MCF-7 INDUCIDAS CON LOS DISTINTOS COMPUESTOS DURANTE 2 DÍAS. A) CICLINA D1. B) P34.

P21 y p27: El análisis citométrico de la expresión de estas proteínas (Tabla 12 y Fig.45), mostró una disminución en la expresión de p21 en las células MCF-7 inducidas con los compuestos 798-B, 928-A, Ftorafur, 252-A y 786-B, mientras que la expresión de p21 se vio incrementada en las células inducidas con 524-FS, 930-A, 548-FS y Ftorafur. En cuanto a la expresión de p27 (Tabla 12 y Fig.45), ésta, disminuyó en las células inducidas con los distintos compuestos excepto en las células inducidas con 5-FU, 798-B y 930-A, donde la expresión aumentó.

TABLA 12. % DE P21 Y DE P27 EN CÉLULAS MCF-7 CONTROL Y INDUCIDAS CON LOS DISTINTOS COMPUESTOS

	Cont.	5-FU	Ftoraf.	252-A	786-B	798-B	928-A	930-A	524-FS	548-FS
P21	26,96	70,34	2,64	4,60	13,05	2,02	2,62	56,63	46,03	69,14
P27	28,63	49,44	3,16	0,64	7,73	51,34	25,34	62,14	5,65	6,38

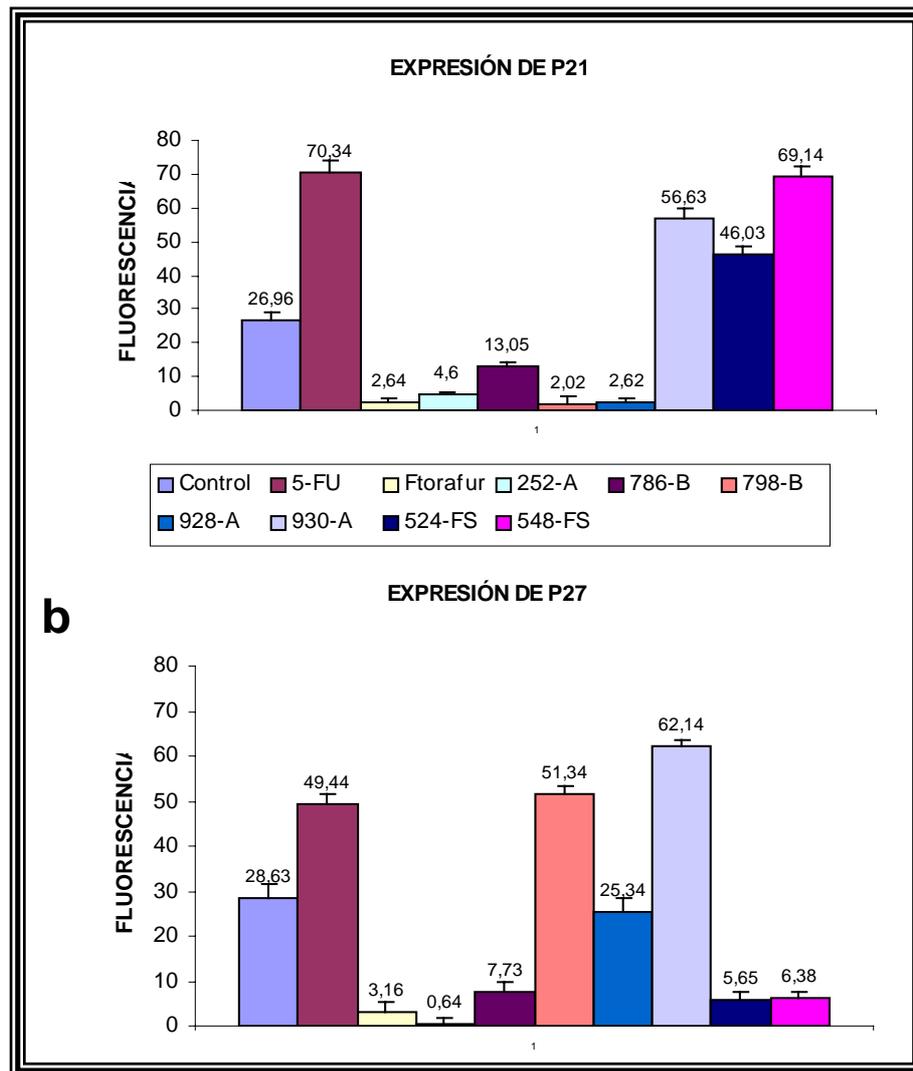


FIGURA 45. ANÁLISIS MEDIANTE FACSCAN DE LAS MODIFICACIONES EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LAS CÉLULAS MCF-7 INDUCIDAS CON LOS DISTINTOS COMPUESTOS DURANTE 2 DÍAS. A) P21. B) P27.

Bcl-2 y p53: El análisis citométrico de Bcl-2 mostró (Tabla 13 y Fig.46), una disminución en la expresión de Bcl-2 en las células MCF-7 inducidas con los distintos fármacos, excepto con 5-FU y 930-A donde se observó un aumento en la expresión de este marcador. En cuanto a la expresión de p53 (Tabla 13 y Fig.46), también se vio disminuida en las células inducidas con los distintos compuestos excepto en las inducidas con 5-FU, 786-B, 930-A y 548-FS, donde la expresión de este marcador aumentó.

TABLA 13. % DE BCL-2 Y DE P53 EN CÉLULAS MCF-7 CONTROL Y INDUCIDAS CON LOS DISTINTOS COMPUESTOS

	Cont.	5-FU	Ftoraf.	252-A	786-B	798-B	928-A	930-A	524-FS	548-FS
Bcl-2	28,15	41,04	9,18	4,02	22,05	3,45	1,28	88,74	5,54	26,73
P53	23,67	46,44	7,78	17,32	41,74	15,57	2,36	27,51	11,16	41,26

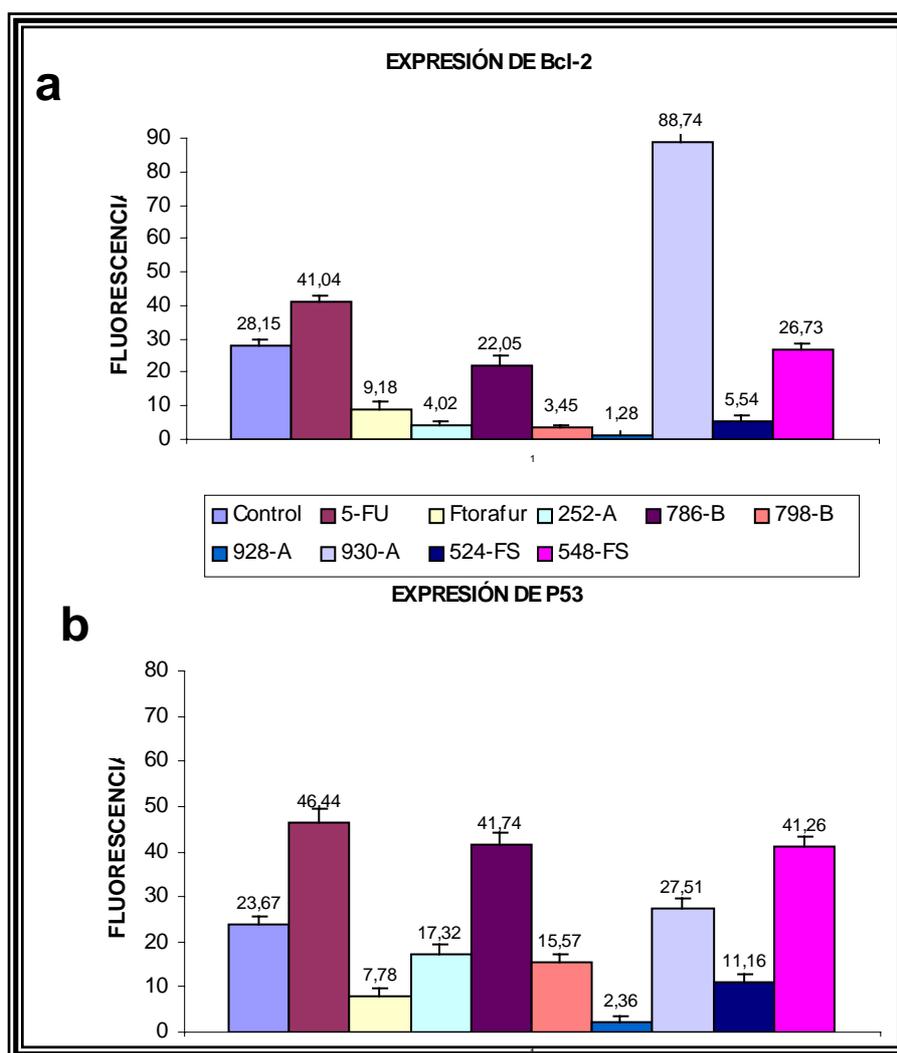


FIGURA 46. ANÁLISIS MEDIANTE FACSCAN DE LAS MODIFICACIONES EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LAS CÉLULAS MCF-7 INDUCIDAS CON LOS DISTINTOS COMPUESTOS DURANTE 2 DÍAS. A) BCL-2. B) P53.

Timidilato Sintetasa (TS): El análisis citométrico de la expresión de Timidilato sintetasa en las células MCF-7 inducidas con los distintos compuestos mostró (Tabla 14 y Fig. 47), una disminución en esta expresión con los distintos compuestos frente al control aunque esta disminución fue menor en las células inducidas con 928-A, 930-A y 548-FS.

TABLA 14. % DE TIMIDILATO SINTETASA EN CÉLULAS MCF-7 CONTROL Y INDUCIDAS CON LOS DISTINTOS COMPUESTOS

	Cont.	5-FU	Ftoraf.	252-A	786-B	798-B	928-A	930-A	524-FS	548-FS
T.S	77,78	35,17	30,44	55,02	26,16	50,73	73,98	72,06	59,65	74,81

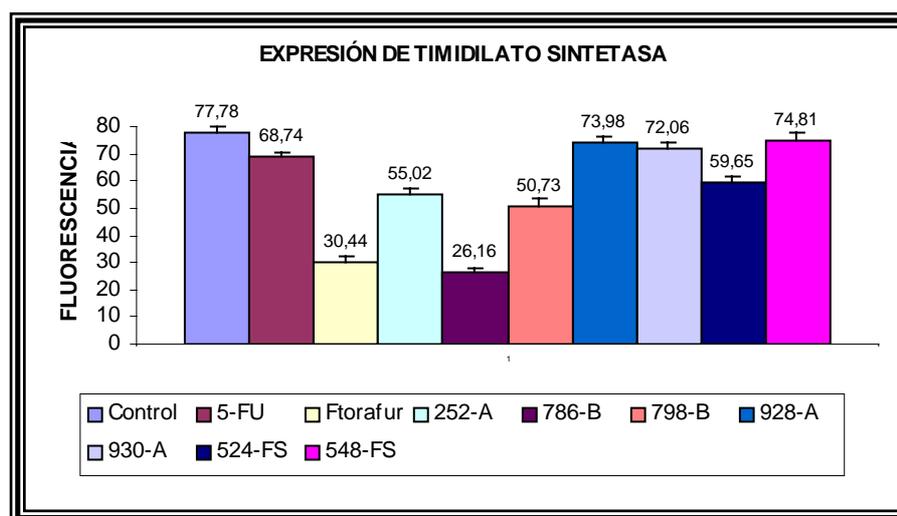


FIGURA 47. ANÁLISIS MEDIANTE FACSCAN DE LAS MODIFICACIONES EN LA EXPRESIÓN DE TIMIDILATO SINTETASA DE LAS CÉLULAS MCF-7 INDUCIDAS CON LOS DISTINTOS COMPUESTOS DURANTE 2 DÍAS.

6.2. ESTUDIO MEDIANTE INMUNOCITOQUÍMICA

El estudio inmunocitoquímico, corroboró los resultados obtenidos por medio de citometría de flujo, encontrándose modificaciones en el patrón de expresión antigénico de las células inducidas con los distintos compuestos en relación a las células control (Tabla 15).

TABLA 15. % DE EXPRESIÓN DE LOS DISTINTOS MARCADORES POR INMUNOCITOQUÍMICA

	Control	5FU	Ftorafur	252A	786B	798B	928A	930A	524FS	548FS
RP	+ 10%	+++ 50%	+ 20%	-	++ 10%	+ 25%	+ 20%	+ 40%	+++ 40%	+ <5%
RE	+++ 25%	++ 40%	+ 5%	-	++ 50%	+ 30%	+ 10%	+ 5%	+ 5%	+ 5%
Ki-67	++ 25%	++ 15%	+ 10%	+++ 15%	Tinción N. 15%	-	++ 25%	++10%	++ 25%	-
HER-2	+ 20%	++ 20%	- *	-	-	-	-	-	+ 50%	+ 10%
C.D1	++ 20%	+ 30%	+ 10%	+ 10%	+ 50% **	-	+ 30%	+ 5%	-	+ 10%
P34	+ 40%	++ 30%	+++ 50%	+++ 5%	+++ 50%	+ 30%	+ <5%	++ 25%	+ 10%	+++ 60%
P21	++ 15%	+ 40%	-	++ 10%	+ 10%	-	+ <10%	++ 50%	+ 30%	++ 50%
P27	+ 25%	+ 20%	-	-	+ <10%	+ 20%	+ 20%	++ 70%	-	+ <5%
Bcl-2	*	++ 30%	+ 5%	++ 5%	+ 30%	-	-	++ 60%	+ 10%	+ 15%
P53	+ 15%	++ 40%	++ 15%	++ 20%	+ <50%	+ 10%	-	+ 30%	+ 5%	+ 30%
T.S	+ 80%	+ 30%	+ 20%	++ 70%	+ 30%	++ 60%	+ 80%	++ 80%	++ 70%	+++ ***80%

-: negativo

+: tinción débil

++: tinción moderada

+++ : tinción intensa

* tinción citoplasmática no valorable

** tinción citoplasmática poco valorable

*** tinción nuclear y citoplasmática

La observación a microscopio de las muestras celulares tanto control como las inducidas con los nueve compuestos, mostraron el grado de expresión de los once marcadores utilizados (contabilizado en %), observándose distintos grados de tinción. En la figura 48 se representa la expresión de distintos marcadores con un grado de tinción intensa (+++), en la figura 49 se representa la expresión de distintos marcadores con un grado de tinción moderada (++), y en la figura 50 se representa la expresión de distintos marcadores con un grado de tinción débil (+).

Los marcadores utilizados con esta técnica fueron los mismos que para citometría de flujo, utilizándose RE, RP, Ki-67, HER-2, Ciclina D1, p34, p21, p27, Bcl-2, p53 y TS.

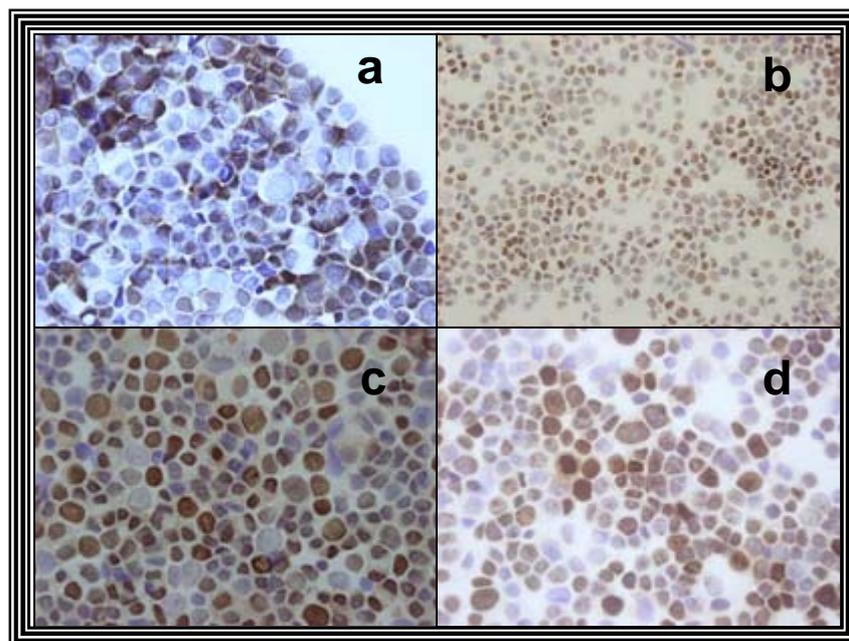


FIGURA 48. ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO MEDIANTE MARCAJE CON PEROXIDASA DE CÉLULAS CONTROL Y DE CÉLULAS INDUCIDAS DURANTE DOS DÍAS CON DISTINTOS COMPUESTOS. A) EXPRESIÓN DEL RE EN CÉLULAS CONTROL (+++25%). B) EXPRESIÓN DE P34 EN CÉLULAS INDUCIDAS CON 786-B (+++50%). C) EXPRESIÓN DE P34 EN CÉLULAS INDUCIDAS CON FTORAFUR (+++50%). D) EXPRESIÓN DE TS EN CÉLULAS INDUCIDAS CON 548-FS (+++75%).

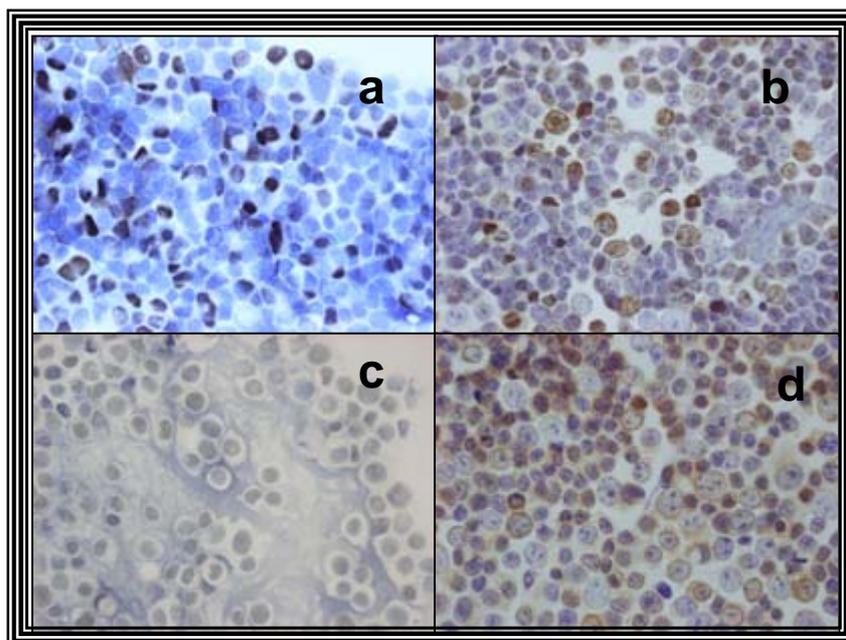


FIGURA 49. ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO MEDIANTE MARCAJE CON PEROXIDASA DE CÉLULAS INDUCIDAS DURANTE DOS DÍAS CON DISTINTOS COMPUESTOS. A) EXPRESIÓN DE P21 EN CÉLULAS INDUCIDAS CON 252-A (++)10%). B) EXPRESIÓN DE KI-67 EN CÉLULAS INDUCIDAS CON 928-A (++)25%). C) EXPRESIÓN DE P27 EN CÉLULAS INDUCIDAS CON 930-A (++)70%). D) EXPRESIÓN DE BCL-2 EN CÉLULAS INDUCIDAS CON 5-FU (++)30%).

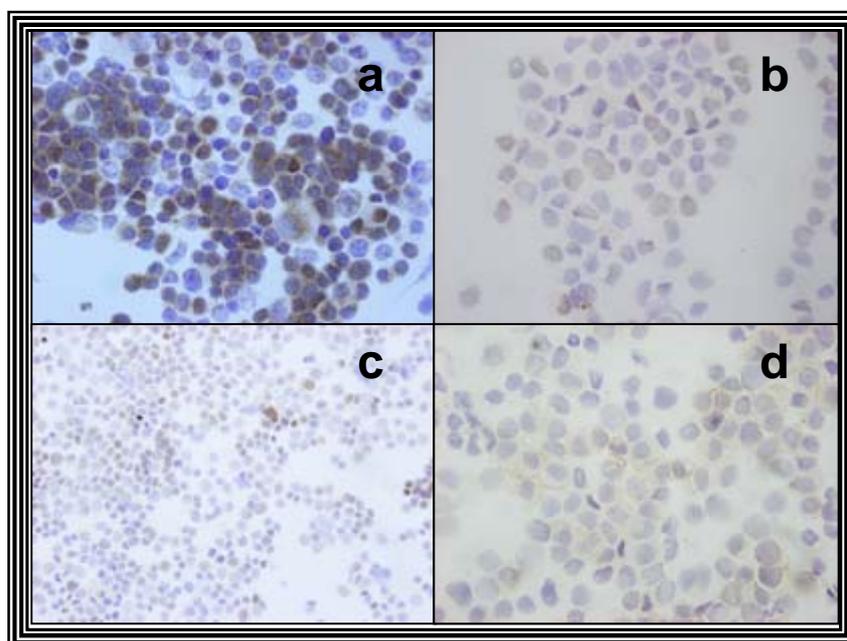


FIGURA 50. ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO MEDIANTE MARCAJE CON PEROXIDASA DE CÉLULAS INDUCIDAS DURANTE DOS DÍAS CON DISTINTOS COMPUESTOS. A) EXPRESIÓN DE C.D1 EN CÉLULAS INDUCIDAS CON 252-A (+)10%). B) EXPRESIÓN DE RP EN CÉLULAS INDUCIDAS CON 798-B (+)25%). C) EXPRESIÓN DE P53 EN CÉLULAS INDUCIDAS CON 524-FS (+)5%). D) EXPRESIÓN DE HER-2 EN CÉLULAS INDUCIDAS CON 524-FS (+)50%).

5.3. ESTUDIO MEDIANTE TRANSCRIPTASA REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

El estudio de la ciclina D1 mediante RT-PCR se realizó con células MCF-7 control y inducidas con los distintos fármacos durante 2 días. Se utilizó como control negativo una PCR sin taq polimerasa. El chequeo en gel de agarosa al 1% de los productos de la PCR permitió observar la amplificación de un fragmento de 169 pb correspondiente a la ciclina D1 (Fig. 51). La intensidad del producto amplificado varió según el fármaco utilizado. Así, la intensidad fue mayor con los compuestos 5-FU, 524-FS y 930-A, mientras que disminuyó con el resto de los compuestos.

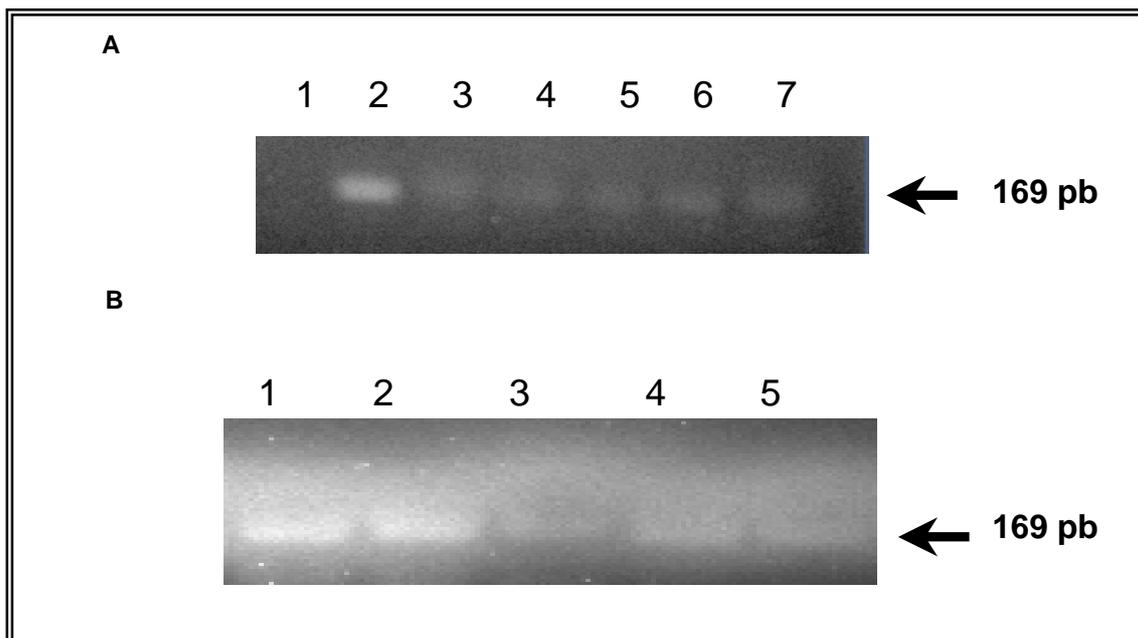


FIGURA 51. ANÁLISIS MEDIANTE RT-PCR DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA CICLINA D1

- A. LÍNEA 1: CONTROL NEGATIVO, LÍNEA 2: CONTROL, LÍNEA 3: 252-A, LÍNEA 4: 928-A, LÍNEA 5: 798-B, LÍNEA 6: 548-FS, LÍNEA 7: FTORAFUR.
- B. LÍNEA 1: CONTROL, LÍNEA 2: 5-FU, LÍNEA 3: 786-B, LÍNEA 4: 524-FS, LÍNEA 5: 930-A

Para demostrar la integridad de las preparaciones de ARN, se realizó PCR utilizando primers específicos de β -actina. En todos los casos el producto de esta amplificación fue detectado (Fig. 52) y fue de la misma intensidad, lo que indicó la no-degradación del ARN y que la PCR fue realizada a partir de las mismas cantidades de ARN.

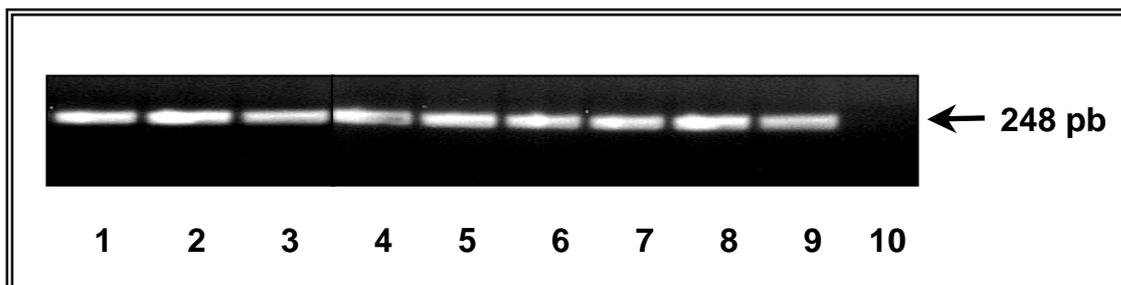


FIGURA 52. GEL DE AGAROSA TEÑIDO CON BROMURO DE ETIDIO CON EL RESULTADO DE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE B-ACTINA. LÍNEA 1: 5-FU. LÍNEA 2: FTORAFUR. LÍNEA 3: 252-A. LÍNEA 4: 786-B. LÍNEA 5: 798-B. LÍNEA 6: 928-A. LÍNEA 7: 930-A. LÍNEA 8: 524-FS. LÍNEA 9: 548-FS. LÍNEA 10: CONTROL NEGATIVO.

V. DISCUSIÓN

En líneas generales se asume que la progresión tumoral del cáncer de mama es debida a una combinación de alteraciones genéticas y epigenéticas, siendo la deregulada proliferación celular y la supresión de la muerte celular fenómenos que juntos van a proporcionar la base para esta evolución neoplásica. Por todo esto, se ha hecho preciso el diseño de agentes antineoplásicos, que puedan actuar sobre el aparato del ciclo celular, y que al mismo tiempo activen la apoptosis como parte de su acción en células neoplásicas.

En los últimos años la estrategia en la terapia del cáncer ha sido el uso de altas dosis de agentes tóxicos no específicos y la investigación con nuevos agentes que directamente actúan sobre moléculas relacionadas con el tumor en distintas rutas biológicas (Evan y Vousden 2001).

El 5-FU es el análogo mejor conocido de las pirimidinas, un agente quimioterápico ampliamente usado en el tratamiento de diversos tumores sólidos malignos como el cáncer gastrointestinal y cáncer de mama, aunque la toxicidad de éste fármaco ha sido mayor de la esperada (Yoshikawa *et al.*, 2001), y menos de una tercera parte de pacientes lograron respuestas objetivas (Malet-Martino y Martino, 2002). Recientes avances en el conocimiento de los mecanismos que regulan la proliferación celular, diferenciación y apoptosis apoyan el desarrollo de nuevas estrategias basadas en el diseño de nuevos agentes antitumorales (Garret y workman, 1999). Así han sido diseñados nuevos derivados de 5-FU que poseen un amplio espectro de actividad antitumoral y con menos efectos colaterales que él (Marchal *et al.*, 1999; Marchal *et al.*, 2000).

Por otra parte el hecho de que la línea celular MCF-7 derivada de cáncer de mama humano, haya sido usada como un excelente modelo experimental, ha supuesto una mejora a la hora de la investigación, ya que prueba la eficacia de diferentes terapias antes de su uso en pacientes.

Por todo esto llevamos a cabo el estudio de la actividad antitumoral con los nuevos derivados de 5-FU en esta línea celular.

INDUCCIÓN DE MODIFICACIONES EN EL PATRÓN DE CRECIMIENTO CELULAR CON AGENTES FARMACOLÓGICOS ANTINEOPLÁSICOS

La mayoría de fármacos antineoplásicos usados clínicamente, son sistemáticamente agentes antiproliferativos que preferentemente van a matar células dividiéndose, principalmente por actuar a nivel de síntesis, replicación o procesamiento del ADN. Sin embargo estos fármacos no son verdaderamente selectivos para la células cancerígenas, y su eficacia terapéutica está limitada por el daño que puedan causar a células normales proliferando. Por ello una estrategia sería proporcionar un incremento sustancial en la eficacia clínica de tales compuestos, y desarrollar profármacos relativamente menos tóxicos (Denny, 2001).

Un profármaco se define como un compuesto farmacológicamente inactivo que es convertido en un agente activo por una biotransformación metabólica. El objetivo es una modificación química del agente antitumoral para dejarlo temporalmente inactivo. *In vivo* los profármacos se descomponen, liberando el principio activo. Así, los profármacos de 5-FU se caracterizan por un anillo de pirimidina con un átomo de flúor en posición 5, difiriendo de éste en una variedad de alteraciones químicas (Brito *et al.*, 1999).

En la presente investigación hemos evaluado los efectos antiproliferativos de los distintos fármacos demostrando las propiedades antitumorales *in vitro* de los nuevos análogos lipofílicos de 5-FU, por inducción de apoptosis y detención del ciclo celular en las células MCF-7 de cáncer de mama. La baja lipofilia de los compuestos antineoplásicos hace que por parte de las células, no haya una óptima biodisponibilidad de estos fármacos, al no atravesar fácilmente la membrana celular. Los nuevos derivados de 5-FU pertenecientes a los grupos I, II, y III, fueron más lipofílicos que éste, por lo tanto mejoraron la biodisponibilidad celular respecto al 5-FU. Recientes investigaciones se han centrado en el desarrollo de modificaciones químicas de 5-FU que muestran una incrementada lipofilia. La N-aciloxialquilación de compuestos NH-ácidos tales como carboxamidas, carbamatos, ureas, imidas y otras estructuras tipo amida, ha sido considerada generalmente como un

planteamiento útil para obtener derivados que combinen alta estabilidad *in vitro* con labilidad enzimática (Bundgaard y Nielsen, 1987).

Nuestros resultados en los ensayos de citotoxicidad han demostrado que los compuestos de los grupos I, II y III, causaron una inhibición dosis dependiente del crecimiento de las células cancerígenas. Por lo tanto la proliferación celular se encuentra inhibida por el tratamiento de las células MCF-7 con los nuevos compuestos, a concentraciones similares a 5-FU y Ftorafur en el rango micromolar.

Es de destacar que en el grupo I existe un compuesto (930-A), que posee actividad antitumoral pese a estar unido a uracilo y no a 5-FU como el resto de los compuestos de los grupos I; II y III. El hecho de no poseer flúor, indica que este compuesto posee una actividad antitumoral propia, y sugiere, que estructuras similares puedan actuar como moléculas activas frente a cáncer de mama.

El patrón de crecimiento de las células inducidas con las dosis de CI_{50} , mitad y doble de los distintos fármacos se asemejó más al patrón de crecimiento del Ftorafur que al del 5-FU, encontrándose diferencias significativas en el patrón de crecimiento celular entre las distintas dosis en los nueve compuestos analizados.

Observamos que la inhibición de la proliferación de una manera más manifiesta comenzaba entre el tercer y cuarto día con todas las dosis en general y en los distintos compuestos incluido el Ftorafur, frente al 5-FU en el que la inhibición fue ya manifiesta a partir del segundo día. Estas observaciones nos hicieron pensar, que este período de latencia es un período necesario para que los fármacos produzcan su efecto a nivel celular. Así esto podría ser corroborado por los estudios *in vivo* de Denny (2001), en los que los profármacos en tumores, tienen que someterse a un metabolismo celular selectivo para generar especies citotóxicas capaces de difundir a distancias limitadas, y matar a las células tumorales que carecen de la capacidad de activar estos profármacos. Los mecanismos de su activación selectiva se

deben a unidades desencadenantes que van a someter al profármaco a un metabolismo celular eficiente, unidades que desactivan el profármaco hasta que se desencadena el metabolismo, y unidades efectoras que son las que van a matar a las células según las condiciones de pH y el status del ciclo celular.

Por otra parte la lipofilia mayor en los compuestos sintetizados no influyó en que la inhibición del crecimiento se llevara a cabo antes del tercer día como ocurrió con el 5-FU. Además el hecho de que el Ftorafur siendo menos lipofílico que los nuevos compuestos sintetizados al igual que 5-FU, también manifestara sus efectos inhibidores de una manera más marcada a partir del cuarto día, nos corroboró esta independencia entre lipofilia e inicio manifiesto de la inhibición del crecimiento, sugiriendo que esta mayor o menor biodisponibilidad del fármaco por parte de la célula es independiente de la acción de éste a nivel celular (Saniger *et al.*, 2003). Por todo ello consideramos que el aumento de la lipofilia no aumenta la citotoxicidad en células normales de estos compuestos, al igual que ocurre con el Ftorafur, siendo más selectivos para las células tumorales. Ftorafur es un profármaco del 5-FU que administrado vía oral, posee menos efectos citotóxicos que éste, estando más biodisponible en las células y manifestando menos toxicidad gastrointestinal (Tanaka *et al.*, 2000).

Por lo tanto consideramos de gran interés el hecho de que la actividad antiproliferativa de los nuevos compuestos no vaya acompañada de una toxicidad sistemática como sucede con el 5-FU. A dosis mayores de 30 mg/kg de peso corporal, 5-FU es muy tóxico en ratones (Gabel *et al.*, 1998). Estos efectos prometen, ya que permiten futuras mejoras en la actividad antiproliferativa de las moléculas, sin un incremento necesario en sus efectos adversos. Nosotros hemos comprobado, que a dosis de 50 mg/kg de peso corporal, los nuevos compuestos derivados de 5-FU, no tienen efectos citotóxicos in vivo a las tres semanas de su administración, al contrario de lo que sucedió con éste, permitiendo la administración de estos nuevos derivados durante seis semanas (Marchal *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2005).

Una vez que comprobamos la actividad antitumoral de estos compuestos, nuestro interés se centró en estudiar su posible mecanismo de acción. Para ello llevamos a cabo en las células MCF-7 estudios de distribución del ciclo celular, estudios de apoptosis y también estudios con distintos marcadores utilizados en la clínica

INDUCCIÓN DE MODIFICACIONES EN LA DISTRIBUCIÓN DE LAS FASES DEL CICLO CELULAR CON AGENTES FARMACOLÓGICOS ANTINEOPLÁSICOS

La regulación del ciclo celular ha sido objeto de gran interés en la investigación y tratamiento del cáncer (Sympath y Plunkett, 2001; Gali-Muhtasib y Bakkar, 2002). El uso de tratamientos específicos en la terapia contra el cáncer cuyo objetivo principal es el ciclo celular, ha aportado grandes beneficios, debido a los avances que recientemente se han logrado en la investigación de moléculas reguladoras del ciclo celular y a la mayor comprensión de las conexiones entre ciclo celular y apoptosis. Además cada vez en mayor cuantía, se están descubriendo fármacos del ciclo celular que están siendo investigados extensamente (Gali-Muhtasib y Bakkar, 2002).

Para estudiar los mecanismos de esta actividad antitumoral y antiproliferativa de los compuestos, se analizaron por citometría de flujo los efectos en la distribución del ciclo celular.

El análisis del ciclo celular en los compuestos del grupo I y en el compuesto del grupo II, 524-FS, mostró que a la dosis de CI_{50} las células MCF-7, fueron detenidas en las fases G_1 y G_2/M a expensas de la población de células de la fase S, sobre todo los compuestos 786-B del grupo I y 524-FS del grupo II. Por lo tanto los nuevos análogos derivados de 5-FU analizados del grupo I, y el compuesto 524-FS del grupo II, disminuyeron lentamente la progresión del ciclo celular, como se indica por la disminución en el porcentaje en la fase S y el incremento en el porcentaje de la fase G_0/G_1 . Por lo tanto se reduce el índice mitótico ($MI = S+G_2/M/G_1$) en las células MCF-7 por bloquear las células en la fase G_1 (Ligueros *et al.*, 1997).

Un bloqueo en la fase G₁ del ciclo celular previene de la replicación del ADN dañado por acción de los distintos fármacos. Este bloqueo en G₁ puede deberse a varios factores como por ejemplo, la inactivación o descenso en los niveles de la ciclina D₁ en la fase G₁ temprana, que impide la fosforilación de pRb, permaneciendo esta proteína activa en un estado hipofosforilado, e impidiendo el paso a la fase S por la no liberación del factor de transcripción E2F (Lundberg and Weinberg, 1999; Viallard *et al.*, 2001). El bloqueo también puede deberse a la inactivación o descenso en los niveles de la ciclina E, responsable de mantener hiperfosforilada a pRb en la fase G₁ tardía, para que la liberación de E2F no se detenga (Lundberg and Weinberg, 1999; Viallard *et al.*, 2001).

Pero la alteración del funcionamiento de la proteína Rb no es el único responsable de la detención de las células en G₁, así el control genómico en G₁, lo efectúa también la proteína p53, a través de la inducción de la proteína inhibidora de las cdk p21. Ésta formará complejos con las ciclinas/cdk de la fase G₁, impidiendo la progresión del ciclo celular y dando así más tiempo para la reparación del ADN dañado (Lane *et al.*, 1992). Sin embargo, cuando el control del ciclo por la proteína Rb está alterada, la proteína p53 desvía el ciclo celular hacia la apoptosis disminuyendo la expresión de genes como Bcl-2 (Lane *et al.*, 1994; Rodríguez y Rodríguez, 2000). Otros mecanismos de detención del ciclo celular en la fase G₁, pueden ser la baja regulación de cdk4 y cdk2 y sobrerregulación de p21 y p27 (Chen *et al.*, 2003).

Sin embargo, el análisis del ciclo celular mostró que a la dosis de CI₅₀ las células MCF-7, fueron detenidas en la fase S del ciclo después de ser tratadas con 5-FU, e igual ocurrió con los compuestos Ftorafur y 548-FS del grupo II, que retuvieron mayor porcentaje de células que éste. Por lo tanto el compuesto 548-FS del grupo II, detuvo el ciclo en la fase S por disminución en el porcentaje de células en la fase G₂/M.

Una vez que la célula pasa el punto de control de G₁, el daño genómico no impide el paso a la fase S, pero lo cierto es que la mitosis no se inicia, ya que no se va a completar la replicación del ADN. El control de la replicación en

la fase S no está tan bien caracterizado, como el de la fase G₁, quizá porque no se ha podido identificar ninguna línea celular defectiva exclusivamente en este punto de control (Rodríguez y Rodríguez, 2000).

Previamente en células MCF-7, ha sido demostrado que 5-FU a bajas dosis prolonga la fase S (Grem *et al.*, 1999), que se traduce en la incapacidad de las células para sintetizar ADN. Igual le sucede al resveratrol después de su inducción en células MCF-7, que a bajas dosis acumula las células en fase S del ciclo celular, asociándose este acúmulo con una marcada inhibición de los niveles de ciclina D y de cdk₄, y también se asocia con inducción de p53 y de p21 (Young-Ae, 20024).

En el estudio llevado a cabo por Saunders *et al.*, (1997) se observó detención del crecimiento en la fase G₂/M de las células MCF-7, tras inducción con paclitaxel. 5-FU que normalmente detiene las células tumorales en las fases G₁/S del ciclo celular, puede reprimir la actividad citotóxica de paclitaxel en células de tumores sólidos, incluso cuando se añade simultáneamente a éste, sugiriendo que 5-FU puede interferir con la citotoxicidad de paclitaxel en un estado temprano, probablemente para prevenir la entrada de las células tumorales en fase G₂-M (Johnson *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1999). El flavopiridol induce detención del ciclo celular por inhibición de cdks, en las células MCF-7, indujo detención del crecimiento en la G₁-S, demostrándose que el descenso de ciclina D₁ precede a la pérdida de actividad de su pareja catalítica cdk₄, y por lo tanto sugiriendo que la pérdida de actividad de cdk₄ puede resultar de la baja regulación de ciclina D1, mientras que al contrario, la pérdida de actividad de cdk₄ no implica un descenso en la actividad de la ciclina D1 (Carlson *et al.*, 1999). El gossipol actúa deteniendo las células de la línea celular MCF-7 en las fases G₁-S del ciclo celular por inhibición de la ciclina D₁ y no de cdk₄, e inhibiendo la concentración de pRb fosforilada (Ligueros *et al.*, 1997).

Tras el estudio de las modificaciones que los nuevos compuestos provocan a nivel del ciclo celular, nuestro interés se ha centrado en intentar explicar por qué dichos compuestos detienen o enlentecen la progresión de

las células tumorales a través de dicho ciclo. Con esto pretendemos comprender cuáles son los mecanismos moleculares responsables de su actividad antitumoral y así poder encontrar las similitudes y diferencias con el modo de actuación del 5-FU.

Existe una relación de gran interés entre ciclo celular y apoptosis. En principio ambos procesos son antagónicos y su existencia necesaria. Del equilibrio entre división celular y apoptosis surge la homeostasis necesaria para un desarrollo normal de los tejidos. Según Swanton (2004), el mecanismo de acción de estos nuevos agentes antitumorales podría tener un gran potencial manipulador del ciclo celular, promoviendo la detención del crecimiento, la diferenciación o incluso la apoptosis.

INDUCCIÓN DE APOPTOSIS TRAS EL CULTIVO DE LAS CÉLULAS MCF-7 CON LOS NUEVE COMPUESTOS QUÍMICOS

La apoptosis ha sido estudiada en términos de desarrollo del cáncer y sus tratamientos, intentando identificar su papel en la citotoxicidad inducida por agentes quimioterápicos. Los agentes citotóxicos frecuentemente inducen apoptosis sólo en una fracción celular. Para considerar la apoptosis como un mecanismo de respuesta a agentes antineoplásicos, se necesitaría que la proporción de células apoptóticas fuera mayor.

Se conocen ciertas formas de apoptosis independientes de caspasas (Parone *et al.*, 2002), aunque existen evidencias de la importancia que juega la mitocondria en las formas de apoptosis dependientes o independientes de caspasas. Así en un estudio muy reciente de Ostrakhovitch y Cherian (2005), demuestran que la liberación del factor inductor de la apoptosis (AIF) mediante la despolarización de la membrana mitocondrial y su traslado al núcleo celular, parece ser el único candidato apropiado y responsable para la ejecución de la apoptosis en las células MCF-7 (carentes de actividad caspasa).

La demostración de apoptosis en las células MCF-7 de cáncer de mama por conocidos agentes inductores de apoptosis ha sido por lo tanto, difícil y

únicamente unos pocos agentes citotóxicos actúan preferentemente a través de mecanismos apoptóticos en células de cáncer de mama humanas (Saunders *et al.*, 1997; Chadderton *et al.*, 2000). El paclitaxel, las ciclofosfamidias y la arabinósido citosina, son los agentes citotóxicos usados comúnmente que inducen apoptosis en estas células (Meyn *et al.*, 1995; Milas *et al.*, 1995).

Sin embargo, dado que las células expuestas a agentes específicos entran en apoptosis desde una fase dada del ciclo celular (Yoshikawa *et al.*, 2001; Saunders *et al.*, 1997; Joe *et al.*, 2002), hemos estudiado si la muerte celular programada, es también el mecanismo por el que los nuevos derivados análogos de 5-FU inducen citotoxicidad.

No obstante, hay que tener en cuenta que las células de cáncer de mama son poco susceptibles a inducción apoptótica por una variedad de agentes citotóxicos (Rasbridge *et al.*, 1994). En los estudios *in vitro* se ha llegado a conocer que la inducción de apoptosis parece ser independiente del objetivo inicial de los agentes quimioterápicos (Mesner *et al.*, 1997). Así según nuestros resultados las células MCF-7 inducidas con los distintos compuestos parecen ser más susceptibles a la apoptosis que las células control sugiriendo que estos fármacos sí pueden estimular los procesos apoptóticos en cáncer de mama.

La apoptosis inducida por los nueve fármacos en la línea MCF-7 a la dosis de Cl_{50} , fue demostrada por medio de citometría de flujo, microscopía confocal, condensación irregular de la cromatina que fue confirmado tras la evaluación de las hebras rotas del ADN, y por criterios morfológicos y ultraestructurales.

De los nueve fármacos estudiados mediante ***citometría de flujo***, los nueve indujeron apoptosis en mayor o menor grado a las 3, 6, 12, 24 y 48 horas, en la línea celular MCF-7.

Los compuestos 5-FU, Ftorafur y 548-FS fueron los compuestos que indujeron mayor grado de apoptosis en las células a las 24 horas de su inducción, continuando esta apoptosis a las 48 horas de tratamiento. Estos datos junto con los datos de la acumulación de células en la fase S del ciclo celular, nos permitieron corroborar que el compuesto 548-FS tiene el mismo comportamiento químico que el 5-FU y sobre todo que el Ftorafur.

Recientemente Grem et al, (1999) demostraron que 5-FU administrado sólo durante 24 horas en células de cáncer de mama, se asoció con acúmulo de células en la fase S, inducción de las proteínas p53 y p21, y una modesta generación de hebras rotas de ADN.

El compuesto 786-B fue el más activo en inducir apoptosis a las 12 y 24 horas, y también el más activo a la hora de acumular células en la fase G₁, los compuestos 252-A, 798-B, 928-A y 930-A, indujeron mayor grado de apoptosis temprana, sobre todo a las 6 horas de tratamiento, pasando a mayor grado de apoptosis tardía a las 12 horas de tratamiento, siendo acumuladas las células en las fases G₁ y G₂/M. Estos resultados concuerdan con la demostración de que las células que expresan p53 salvaje, como ocurre con las células MCF-7, exhiben detención del crecimiento en las fases G₁ y G₂/M después de la exposición a agentes que dañan el ADN (Lundberg y Weinberg, 1999; Stewart *et al.*, 1995).

El compuesto 524-FS que acumuló las células en fase G₁ y sobre todo en fase G₂, indujo mayor grado de apoptosis a las 3 horas de inducción celular, repitiéndose este grado de inducción celular de apoptosis a las 48 horas de tratamiento, lo que nos llevó a pensar que las células que quedaban inducidas con este compuesto reiniciaron un nuevo ciclo de apoptosis.

Existen una serie de estudios contradictorios sobre la implicación o no de p53 y su papel o no en la apoptosis. Así, los efectos citotóxicos de 5-FU son atribuidos a apoptosis, mediante una vía p53 dependiente (Jhonson *et al.*, 1997). Sin embargo las células MCF-7, son relativamente resistentes a la apoptosis mediada por p53 (Saunders *et al.*, 1997), aunque la activación de

p53 funcional a su vez puede regular y promover discretas etapas de la cascada de apoptosis tales como la sobrerregulación de p21 (Ostrakhovitch y cherian, 2005). La administración de 5-FU induce apoptosis en células de cáncer de mama y significativamente inhibe su actividad reproductiva, sin que se demuestre que p53 esté involucrado en los mecanismos que deciden o no la apoptosis (Asaga et al., 2001).

En los nuevos análogos derivados de 5-FU, los mecanismos de inhibición del crecimiento fueron por apoptosis y no por otro mecanismo como sugiere Takahashi *et al*, (2001) en su estudio, tras observar que la inducción de la apoptosis se llevó a cabo a una concentración mayor que la concentración que causó detención del crecimiento en células de mieloma humanas.

Actualmente existen una serie de estudios, para comprender los eventos moleculares específicos involucrados en la actividad de los nuevos derivados en cuanto a, las rutas que regulan los puntos de restricción del ciclo celular y de la apoptosis.

La confirmación de la apoptosis inducida por estos compuestos también se llevó a cabo por **microscopía confocal**. La liberación de las caspasas va a dar lugar a la mayoría de los distintivos morfológicos de la muerte celular, como fragmentación nuclear, rotura del citoesqueleto celular y exposición de fosfatidilserina en la superficie extracelular de la membrana plasmática (Parone *et al.*, 2002). No obstante, en células carentes de caspasas como las células MCF-7, tras un detallado análisis se observó la presencia de condensación de la cromatina y de fragmentación nuclear por microscopía de fluorescencia. En ausencia de inducción por los 9 compuestos químicos en las células MCF-7 control, se observó la presencia de núcleos con distribución homogénea de la cromatina y algunas células necróticas, como también se observó en las células MCF-7 en ausencia de resveratrol en el estudio llevado a cabo por Pozo-Guisado *et al*, (1999). Sin embargo tras la inducción a la dosis de CI_{50} , con los distintos fármacos, sí se observaron núcleos apoptóticos con cromatina condensada y fragmentación nuclear, además de células necróticas tras períodos de 6 y 24 horas de inducción.

Relacionar la apoptosis con la **fragmentación del ADN** puede ser complejo. Así esta fragmentación implica la degradación del ADN en unidades de unos 200 pares de bases entre nucleosomas, que en la electroforesis del ADN en gel de agarosa se visualiza como una estructura en escalera (Chakrabarty *et al.*, 2002). Este suceso ocurre tardíamente después de que el proceso apoptótico esté en marcha, y no siempre ocurre (Walker *et al.*, 1994), sugiriéndose que esta forma de rotura del ADN no es necesaria para la apoptosis en células MCF-7 (Saunders *et al.*, 1997), ni se relaciona con la cantidad de apoptosis inducida (Gooch y Yee, 1999). También hay que tener en cuenta que en células de mamíferos la fragmentación es activada por la caspasa 3 de la cual carecen las células MCF-7, por lo que podría suponer una discapacidad en estas células para activar la fragmentación nucleosomal del ADN (Semenov *et al.*, 2003). Sin embargo, nuestros análisis de la fragmentación del ADN, mostraron diferentes cantidades de fragmentos en células MCF-7 inducidas con los distintos compuestos, por lo tanto produciendo fragmentos en una línea celular donde la inducción de éstos es muy difícil (Stewart *et al.*, 1995). Nuestros agentes antineoplásicos pueden interferir con la replicación del ADN y esto conllevar la ruptura de las hebras de ADN y la detención del ciclo celular. En nuestro estudio el incremento en la ruptura de las hebras de ADN temporalmente precedió al incremento en figuras apoptóticas.

El compuesto 252-A no indujo fragmentación apoptótica a las seis horas de la inducción celular, en contra de los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, y sí indujo una modesta generación de hebras a las 24 horas que podrían corresponder con los resultados obtenidos en la apoptosis tardía. El resto de compuestos indujo fragmentación del ADN en distinta medida, a las seis horas de tratamiento con los fármacos y a las 24 horas. Sin embargo alguno de los compuestos como el 786-B que también indujo fragmentación del ADN, lo hizo en menor medida que la medida de apoptosis en los ensayos de citometría de flujo, sugiriéndonos que los efectos de los compuestos en algunas de las etapas de los procesos apoptóticos, no incluyen total degradación del ADN. Más allá, la degradación del ADN es un proceso multietapa que continúa con la división en fragmentos largos seguidos por la

división en fragmentos internucleosomales en algunas células(Gooch y Yee, 1999).

En concordancia con los ensayos de anexina V-FITC, se encontró que a las 24 horas la mayor inducción de fragmentos de ADN fue la de los compuestos 5-FU, Ftorafur, 548-FS y 524-FS.

Según el estudio de Jonson *et al*, (1999), el tratamiento con 5-FU durante 72 horas en la línea celular KB, fue incapaz de inducir fragmentación del ADN. Sin embargo nosotros demostramos que en la línea celular MCF-7, 5-FU sí indujo fragmentación del ADN a las 6 y a las 24 horas en que se llevó a cabo el estudio.

Los efectos antiproliferativos de los nuevos análogos derivados de 5-FU exhibidos en el rango micromolar de éste, se manifestaron con **cambios en la morfología celular** a lo largo del tiempo. Las dosis de CI_{50} de los compuestos indujeron fenotipos en las células MCF-7 que han sido descritos como indicativos de apoptosis (Saunders *et al.*, 1997; Staunton y Gaffney, 1998; Chadderton *et al.*, 2000). La identificación de apoptosis por microscopía óptica es algo subjetiva y tediosa si tenemos en cuenta que el proceso es muy rápido y que las células apoptóticas son rápidamente eliminadas. Así el análisis de las células control de cáncer de mama MCF-7, mostró células pequeñas de forma redondeada o poligonal mono o multinucleadas, creciendo en monocapa como agregados irregulares y confluyentes, a diferencia de las células tratadas con los distintos compuestos que exhibieron una morfología más poligonal e irregular, conferida por las prolongaciones citoplasmáticas, y con tendencia a los agrupamientos en formas esféricas reduciendo el volumen celular. El proceso apoptótico normalmente afectó a células únicas y ocasionalmente a pequeños grupos de células. Las células apoptóticas redujeron su volumen y se separaron de las vecinas.

Las células MCF-7 control visualizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM), se mostraron, al igual que describen Meschini *et al*, (2002) en su trabajo de investigación, heterogéneas en tamaño y forma, y su superficie

cubierta por abundante microvilli, mientras que en las células apoptóticas tras la inducción con los distintos fármacos se observó una disminución del tamaño celular probablemente por pérdida ocasional de fragmentos de membrana (cuerpos apoptóticos). También se pudieron observar protusiones en la membrana y cráteres por extrusión nuclear, y microvilli menos denso además de pérdida de prolongaciones citoplasmáticas responsables de la adhesión celular, como también se describe en los trabajos de Amin *et al.*, (2000) y de Meira *et al.*, (2005), tras la inducción de las células MCF-7 con cotrimazol.

Algunos agentes antineoplásicos pueden ejercer su efecto terapéutico a través de una mezcla de acciones citodestructivas e inductoras de diferenciación, provocando no sólo la muerte celular sino que también activan el programa de diferenciación que va unido a una disminución de la capacidad de proliferación en las células MCF-7 (Sartorelli., 1985, Chen *et al.*, 2002).

El **análisis ultraestructural** es un criterio usado clásicamente para observar cambios celulares que indican la aparición de un fenómeno de apoptosis.

Las células MCF-7 tratadas exhibieron prominentes vacuolas autocatalíticas perinucleares, abundante material filamentoso y microvilli irregular en la superficie celular, que podría ser consistente con la inducción de diferenciación (Chen *et al.*, 2002). Hubo pérdida de uniones celulares y de estructuras especializadas de membrana como los microvilli, con la formación de burbujas o protuberancias superficiales. También se observó condensación irregular de la cromatina bajo la membrana, y ya en la apoptosis tardía se observaron cuerpos apoptóticos. Todos estos eventos son descritos también por Staunton y Gaffney, (1998). Las organelas citoplasmáticas permanecieron bien preservadas observándose condensación citoplasmática.

En la membrana citoplasmática de las células apoptóticas al volverse asimétrica, se exponen fosfatidilserina y glicanos inmaduros, que pueden facilitar un reconocimiento fagocítico eficiente por macrófagos, células parenquimáticas vecinas o por células tumorales (Staunton y Gaffney, 1998).

Esto supone un mecanismo de reconocimiento específico que supone una ventaja por prevenir respuestas inflamatorias sobre todo en condiciones fisiológicas (Kerr et al., 1994). La exposición de la fosfatidilserina por parte de la membrana plasmática, se considera un evento temprano en la apoptosis y secundario a alteraciones morfológicas, que va a preceder a la condensación nuclear, independientemente del agente inductor de la apoptosis (Cornelissen et al., 2002).

El hecho de que la pérdida de capacidad proliferativa de las células por fragmentación del ADN, fuera anterior a la pérdida de la viabilidad de la membrana celular durante la inducción con los distintos compuestos, fue un distintivo de la apoptosis (Armstrong et al., 1992). Por lo tanto podemos decir que las fluoropirimidinas inhiben la proliferación celular e inducen apoptosis. Esta respuesta citotóxica es el resultado de la inducción de un estado con menos timina debido a la inhibición de la timidilato sintetasa por estos fármacos.

Pero para comprender los mecanismos de estos compuestos tanto en las modificaciones llevadas a cabo en el ciclo celular como en la apoptosis, hemos llevado a cabo estudios de marcadores específicos, que se utilizan en la clínica, para definir el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama y la efectividad del tratamiento. Estos estudios se han llevado a cabo utilizando las técnicas de citometría de flujo e inmunocitoquímica con anticuerpos específicos para estos marcadores.

MODIFICACIONES EN EL PATRÓN DE EXPRESIÓN PROTÉICA Y A NIVEL DE ARN, TRAS LA INDUCCIÓN CON LOS NUEVOS COMPUESTOS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7

La caracterización antigénica de las células tumorales es importante para un mejor conocimiento de la biología de una neoplasia. A través de la detección de las modificaciones antigénicas durante el proceso de transformación maligna, se puede llegar a su detección precoz y a establecer una valoración pronóstica de la enfermedad. El estudio realizado mediante una batería de

anticuerpos monoclonales usando técnicas de inmunocitoquímica y fluorescencia indirecta medida por citometría de flujo, han tenido por objeto identificar la posible alteración en el patrón de expresión proteica de la línea MCF-7 inducida con los nuevos derivados de 5-FU, con respecto a sus respectiva línea parental MCF-7.

Por otra parte, nuestro estudio sobre la línea de carcinoma de mama, se ha centrado en marcadores ampliamente testados en esta patología como son los receptores hormonales de estrógenos y de progesterona así como en el oncogen *c-erbB-2* y el antígeno Ki-67.

La determinación de receptores estrogénicos (RE) y de progesterona (RP) en las biopsias de carcinomas infiltrantes antes del comienzo de las medidas terapéuticas, se ha hecho una práctica habitual en el tratamiento de pacientes con carcinoma de mama por su utilidad clínica (Osborne *et al.*, 1980; Reiner *et al.*, 1990). La detección de estos receptores es de tal importancia que han sido realizadas rigurosas investigaciones centradas en su identificación, aislamiento y caracterización. En términos generales, el valor predictivo de la presencia de estos receptores hormonales en el carcinoma de mama está asociado con un periodo de supervivencia libre de enfermedad y con una supervivencia global más favorable en un 8-10% de los casos en relación a los tumores en los que se encuentran (Mansour *et al.*, 1994). La presencia de RE y RP en el mismo tumor aumenta la probabilidad de respuesta a los tratamientos hormonales desde un 55% a un 75-80% en pacientes con tumores RE⁺ (Wittliff, 1984, Stanford *et al.*, 1986). La pérdida de RP por las células tumorales está asociada con un peor pronóstico (McGuire y Clark, 1985). En nuestro estudio experimental en la línea de cáncer de mama MCF-7, la inducción con los distintos compuestos provoca un aumento en general de la expresión de RP excepto en los compuestos 252-A y 548-FS donde la expresión disminuye. El RE sin embargo sólo aumenta en los compuestos 5-FU, 786-B y 798-B, Las drogas citotóxicas pueden causar una depleción reversible, dosis dependiente de los RE en cáncer de mama humano (Yang y Samaan, 1983) así el 60% de los RE⁺, responden a la terapia endocrina, mientras que sólo un 10% de los RE negativos y RP negativos responden a la terapia (Calero, 2003). El hecho

del aumento de los RE y RP hace que estas células respondan mejor al tratamiento hormonal ya que en los casos con receptores negativos hay alto grado de recurrencia con supervivencia más corta (Miller et al., 1993).

El estudio del oncogen c-erbB-2 en el carcinoma mamario predice el tiempo de recurrencia, y su presencia, indica una resistencia relativa a la quimioterapia. Nuestros resultados demuestran una disminución en la expresión del oncogen c-erbB-2 en las células MCF-7 inducidas con los distintos fármacos excepto con 786-B y 524-FS donde esta expresión aumenta. Así Cooke *et al.*, (2001) sugieren que la sobreexpresión de HER-2 no tiene por qué asociarse con pobre resultado clínico. La sobreexpresión de HER-2 puede relacionarse con una sobreexpresión de p21 y una disminución de p34 (Yu *et al.*, 1998) como ocurre en el caso de 524-FS, pudiéndose explicar de esta manera la detención de las células tumorales tras inducción con este fármaco en la fase G₀/G₁. Esta sobreexpresión de p21 además se relaciona con inducción de diferenciación (Ménard *et al.*, 2000) como también ocurre con 5-FU y 930-A. Por lo tanto existen estudios contradictorios ya que el hecho de disminuir, según Toikkanen *et al.*, (1992), indicaría un mejor pronóstico, puesto que la sobreexpresión de este oncogén está asociada a un pronóstico desfavorable (Kim *et al.*, 2002). Además, la inhibición de su expresión en las células MCF-7 inducidas con los distintos compuestos, estuvo asociada a una disminución en la expresión del antígeno Ki-67 al igual que demuestran Ringberg *et al.* (2001) tras observar que su amplificación se correlaciona con la sobreexpresión de Ki-67.

El antígeno Ki-67, es un marcador de proliferación que tiene significado pronóstico y diagnóstico en estos tipos de tumores. Cuando se expresa en el carcinoma de mama es un signo de proliferación tumoral y por tanto de mal pronóstico. La expresión del antígeno nuclear Ki67, es un indicativo de alto riesgo de recurrencia de la enfermedad (Grases, 2003). Como sugiere Korabiowska (2000) debemos considerarlo, en general, como un marcador de mal pronóstico independiente de otras variables, como ha sido demostrado en cáncer de mama (Sasaki *et al.*, 1992). En nuestro estudio, las células MCF-7 inducidas con los compuestos, presentaron una significativa disminución de la

expresión de Ki-67 que puede estar relacionado con la disminución de la proliferación mencionada anteriormente.

También llevamos a cabo el estudio de los marcadores del ciclo celular, ciclina D1, p34 o cdc2, p21 y p27. Debido a que la gran mayoría de los compuestos acumulan las células en G₁, es por lo que estudiamos el patrón de expresión de ciclina D1, la cual es una de las subunidades activadoras de cdks, concretamente de cdk₄, siendo la responsable de la progresión de la célula a lo largo de la fase G₁. Dicho estudio dio como resultado una inhibición de la ciclina D1, hasta prácticamente la desaparición de la misma, para los compuestos Ftorafur, 252-A, 798-B, 930-A, 524-FS y 548-FS que no ocurrió con 5-FU, 786-B y 928-A, en donde los niveles se incrementaron con respecto a las células tumorales no tratadas. Esto explicaría, por un lado, el porqué estos compuestos acumulan las células en G₁ (al inhibir la ciclina D1 la célula no puede progresar a la fase S), y por otro cómo tienen un mecanismo de acción distinto a 5-FU (no profármacos) excepto los compuestos 786-B y 928-A. El 5-Fu sin embargo incrementa la producción de ciclina D1 de forma que las células pasan en su mayoría hacia la fase S donde son retenidas. De hecho un estudio reciente (Stacey, 2003) demuestra que la ciclina D1 actúa como “interruptor” activo en la progresión del ciclo celular y que altos niveles de ciclina D1 promueven la entrada de la célula en la fase S.

A nivel de ARN también se observó variación en la expresión de la ciclina D1 observándose una disminución en las células tratadas con los compuestos 786-B y 928-A, pudiendo ser esta la causa de la detención del ciclo celular con estos compuestos en la fase G₀/G₁.

En tejidos tumorales la sobreexpresión de ciclina D1, correlaciona directamente con la síntesis de RE (Foster *et al.*, 2001), como le ocurre a las células tratadas con 5-FU y 786-B.

Estos compuestos también afectan a la actividad de cdc2, cdk₁ o p34, que regulada por sus correspondientes ciclinas A o B, es esencial para la entrada en mitosis durante el ciclo celular (Sherr, 1993). Todos los compuestos (252-A,

798-B, 928-A, 930-A y 524-FS), a excepción de 786-B, Ftorafur, 5-FU y 548-FS, disminuyen de forma significativa la actividad de p34. Esto impedirá por tanto la unión a sus correspondientes ciclinas tanto en la fase final de G₁, en el punto de control denominado “comienzo” para entrar irreversiblemente en el ciclo mitótico, como al final de G₂ al principio de la mitosis (Lees, 1993), y la fosforilación de pRb, dando como resultado la no progresión de las células hacia la división (Nigg, 2001). El hecho de que 5-FU incremente la expresión de p34 se debe a que esta mayor actividad es necesaria para que las células pasen rápidamente a la fase S donde las células son detenidas por esta fluoropirimidina. Finalmente el compuesto Ftorafur en baja proporción y los compuestos 786-B y 548-FS en mayor medida, incrementaron los niveles de p34, lo cual pudo deberse a que una activación prematura del mismo es uno de los requisitos para la apoptosis (Shi *et al.*, 1994); de hecho estos fármacos inducen una alta proporción de muerte celular programada en las células MCF-7 tratadas.

Además algunos compuestos incrementan la expresión de las proteínas p21 o p27 como ocurre con 5-FU, 930-A, 798-B, 524-FS y 548-FS. Estas pertenecen a la familia INK2 de las proteínas inhibidoras de cdk que actúan inhibiendo la asociación y activación de las ciclinas con sus complejos (Sherr, 2000) y por tanto detienen las células en la fase G₁ y G₂/M. con un incremento de actividad del supresor de tumores p21 que implica por un lado la parada de las células en G₁ con el consiguiente bloqueo de la actividad de los complejos ciclina D/cdk₄ (Obaya y Sedivy, 2002) y por otro, una acción específica de estos compuestos dirigida a la inhibición de la formación o a la destrucción de la ciclina D1 existente. Por otra parte los compuestos Ftorafur, 252-A, 786-B y 928-A disminuyen la expresión de estas proteínas. Korey *et al.*, (1999) encontraron que agentes que detuvieron el ciclo en G₁/S alteraron la capacidad para inducir incremento en los niveles de p21. Por otra parte, la regulación de p21 puede ser p53 dependiente o p53 independiente (El Deiry, 1994).

Debido a que los compuestos sintetizados inducen de forma llamativa apoptosis, hemos llevado a cabo estudios de la expresión de algunos de los genes que intervienen en este fenómeno, entre los que destacan p53 y Bcl-2.

El gen p53 interviene en el ciclo celular, regulando, de forma negativa, el crecimiento del tumor. El gen supresor de tumores p53 vela por la integridad del genoma de tal forma que si el ADN de la célula es dañado por un agente se produce una sobreexpresión del mismo, induciendo la parada celular en G₁, para la reparación del daño o si no es posible, entrar en apoptosis (Agarwal *et al.*, 1995). Por otro lado, los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 actúan como reguladores de la apoptosis, de forma que Bcl-2 y Bcl-XL protegen frente a la apoptosis y Bax, Bak y Bad inducen dicho fenómeno, (Reed, 1997). Del Bufalo *et al.* (2002), subrayan la idea de que bcl-2 puede tener distintos efectos biológicos dependiendo del fármaco antineoplásico usado.

El tratamiento de las células MCF-7 (wild-type p53) con estos compuestos provocó en general incrementos en la expresión proteica de p53 principalmente para 5-FU, 786-B, 930-A y 548-FS. Estos datos indican que la actividad de p53 es restaurada con los compuestos 5-FU, 786-B, 930-A y 548-FS, permitiendo la entrada en apoptosis de las células tumorales, que permiten la eliminación de las mismas por este mecanismo dependiente de p53 (Nita *et al.*, 1998). Por otra parte el aumento en la expresión protéica del compuesto 786-B puede ser la vía de la detención de las células inducidas con este compuesto en la fase G₀/G₁ (Lundberg y Weinberg, 1999). La reintroducción de las funciones de p53, es suficiente para inducir apoptosis en muchas células tumorales (Evan y Vousden, 2001). Existen estudios que demuestran que la inducción de p53 wild-type, potencia poderosamente la citotoxicidad de 5-FU (Yang *et al.*, 1996). Sin embargo, se observó también una disminución de los niveles de p53 en las células inducidas con el resto de los compuestos, ya que en condiciones adversas como la exposición de las células a estos compuestos, la pérdida de p53 se considera un intercambio para inestabilidad genética (Blagosklonny, 2001), y por otra parte los niveles de expresión protéica de p53 son independientes de la detención de las células en la fase G₁/S. La disminución de los niveles de p53 y de bcl-2 en el resto de los compuestos, indicaría una inducción de apoptosis no dependiente de p53 como ha sido demostrada para otros agentes antitumorales (Dou *et al.*, 1995).

Los niveles de bcl-2 disminuyeron a su vez para todos los compuestos excepto para 5-FU y 930-A y esto se podría relacionar con el hecho de que, el aumento de expresión de ciertas proteínas antiapoptóticas como bcl-2, se asocia con la inducción de diferenciación (Lin *et al.*, 1996), como hemos observado con estos dos compuestos. Por otra parte la sobreexpresión de bcl-2 puede enlentecer el crecimiento celular (Borner, 1996) y altos niveles de bcl-2 pueden promover la muerte celular programada (Shinoura *et al.*, 1999). En cáncer de mama la expresión de bcl-2 correlaciona mejor con la expresión del RE y del RP (Maloof *et al.*, 1999), Igualmente la inhibición de bcl-2 facilita a las células a entrar en el fenómeno de muerte celular programada. Así, curcumín indujo apoptosis en la línea de cáncer de mama MCF-7, donde la expresión de p53 wild-type fue inducida por éste probablemente a través de una vía p53 dependiente en que el gen Bax es el efector de p53 (Choudhuri *et al.*, 2002).

Estos efectos antitumorales son independientes de la capacidad del fármaco para unir e inactivar la enzima timidilato sintetasa (TS), responsable de la síntesis de novo de timina (Tokunaga *et al.*, 2000; Parker y cheng, 1990). Sin embargo el hecho de que dosis similares en los nuevos derivados exhiban diferentes secuencias de perturbaciones del ciclo celular, indican que estos compuestos actúan por rutas diferentes. Este hecho se ve apoyado por una demostración reciente de que nuevos derivados de 5-FU con propiedades antitumorales, no inhiben la enzima timidilato sintetasa y están desprovistos de los efectos citotóxicos de 5-FU (Dominguez *et al.*, 2003), actuando de manera independiente a 5-FU. El estatus de p53 no juega un papel en la regulación de TS (Yukimoto *et al.*, 2001), aunque la pérdida de su función resulta en una respuesta apoptótica alterada y en una regulación también alterada del ciclo celular (Liu *et al.*, 2002).

Aunque a nivel del ciclo celular y apoptosis el compuesto 548-FS actúa del mismo modo que 5-FU y Ftorafur, el hecho de que el comportamiento a nivel de modulación de alguno de los marcadores moleculares sea distinto, puede significar que este compuesto libere 5-FU, y que la otra parte de la molécula actúe modulando los distintos marcadores, manifestando por lo tanto actividad antitumoral. Así se ha demostrado que otros compuestos que actúan

como profármacos de 5-FU, liberan sustancias como la acroleína y el resto de la molécula manifiesta actividad antitumoral (Marchal, 1996).

Después de daño en el ADN, las células básicamente pueden tener tres alternativas, detención del ciclo celular, apoptosis o necrosis, dependiendo de varios factores como, el grado de daño celular y la susceptibilidad de una célula dada a los fármacos. Los resultados experimentales con estas nuevas sustancias, muestran cambios en la proliferación celular de las células inducidas con los nuevos derivados de 5-FU, cambios en la distribución de las fases del ciclo celular, y fenómenos de apoptosis, junto con modificaciones en la expresión de los distintos marcadores. Debido a la gran variabilidad de resultados obtenida con estos marcadores es necesario llevar a cabo estudios en más profundidad con cada uno de los compuestos, para llegar a saber cuál es el mecanismo de acción principal de cada uno de ellos.

Todos estos resultados indican por un lado la actividad selectiva de la mayoría de los nuevos compuestos sobre las moléculas reguladoras de la fase G1 del ciclo celular, así como la acción moduladora de los mismos sobre p53 y bcl-2 para la inducción de apoptosis. Por lo tanto, estos compuestos proporcionan evidencias de actividad antitumoral específica y selectiva y por todo ello, podemos concluir diciendo que estos compuestos pueden ser considerados como fármacos con entidad propia y actividad antitumoral independiente del 5-FU, siendo necesario llevar a cabo evaluaciones en modelos *in vivo* de cáncer de mama para futuras aplicaciones clínicas.

VI. CONCLUSIONES

1. Los nuevos análogos derivados de 5-FU (*O,N*-Acetales cíclicos, Fenoxi-*O,N*-Acetales acíclicos y Benzoxi-*O,N*-Acetales acíclicos e isósteros), son más lipofílicos y por lo tanto más biodisponibles por las células. El aumento de la lipofilia no aumenta la citotoxicidad de estos compuestos en células normales, siendo más selectivos para las células tumorales.

2. Los nuevos compuestos inhiben la proliferación a una concentración similar a la del 5-FU y Ftorafur, en el rango micromolar. Dichos compuestos poseen una actividad antitumoral que es dosis-dependiente a lo largo del tiempo.

3. El compuesto 930-A, pese a estar unido a uracilo y no poseer flúor en su estructura, posee actividad antitumoral, y por tanto, este tipo de moléculas constituyen entidades farmacológicas *per se*.

4. Tanto los compuestos del grupo I (*O,N*-Acetales cíclicos) como los del grupo II (Fenoxi-*O,N*-Acetales acíclicos) analizados, enlentecen la progresión a través del ciclo celular de las células de cáncer de mama MCF-7. Los compuestos del grupo I y el compuesto 524-FS del grupo II actúan acumulando las células en la fase G_0/G_1 . El compuesto 548-FS del grupo II se comportó de modo similar al 5-FU y Ftorafur, con una parada del ciclo en la fase S, produciendo una disminución en el porcentaje de células en la fase G_2/M .

5. Los nuevos derivados de 5-FU son inductores de apoptosis a nivel morfológico, ultraestructural, y nuclear, con la fragmentación del ADN, en una línea como la MCF-7, donde la inducción de apoptosis por agentes antitumorales es muy difícil. Esto demuestra la especificidad en el mecanismo de acción de estos compuestos sobre dicho fenómeno.

6. La detención de las células MCF-7 a nivel de la fase G_0/G_1 por los compuestos del grupo I y el compuesto 524-FS del grupo II, se produce a través de la disminución en la expresión de la ciclina D1. Otras modificaciones

moleculares consisten en una sobreexpresión de p53 y una baja regulación de p34, indicando la independencia de acción con respecto al 5-FU.

7. La detención de las células MCF-7 en la fase S por 5-FU, se debe a una sobreexpresión de ciclina D1. Sin embargo, los compuestos Ftorafur y 548-FS detienen las células en esta fase por aumento en la expresión de p34.

8. La disminución de la proliferación de las células MCF-7 tratadas con los 9 compuestos, se relaciona con una disminución en la expresión de Ki-67, un marcador de mal pronóstico en cáncer de mama.

9. Todos los compuestos indujeron apoptosis en las células, debida a una disminución en la expresión de bcl-2, excepto en los compuestos 5-FU y 930-A que estuvo relacionada con el aumento de p53.

10. En todos los fármacos en mayor o menor grado se observó una disminución en la expresión de la enzima timidilato sintetasa. Los efectos antitumorales son independientes de la capacidad del fármaco para unir e inactivar dicha enzima.

11. Los resultados experimentales sobre la línea tumoral humana MCF-7 sugieren que estos compuestos poseen una actividad antitumoral específica y selectiva, pudiéndoseles considerar fármacos con entidad propia y actividad antitumoral independiente del 5-FU, con gran potencial para su futura aplicación en el tratamiento de cáncer de mama.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ◆ Agami R, Bernards R. Convergence of mitogenic and DNA damage signaling in the G1 phase of cell cycle. *Cancer Letters* 2002; 177: 111-118.
- ◆ Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995;92: 8493-8497.
- ◆ Aguilar A, Barrón EM. Epidemiología y factores de riesgo. En: Díaz-Rubio E, Escudero M, editors. *Cáncer de mama*. 1ª ed. Madrid: International Marketig & Communications, SA; 1998. P.9-22.
- ◆ Albanell J, Codony J, Rovira A, Mellado B, Gascón P. Mechanism of action of anti-HER-2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2003; 253-268.
- ◆ Alkarain A, Slingerland J. Deregulation of p27 by oncogenic signaling and its prognostic significance in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2004; 6: 13-21.
- ◆ Amin F, Bowen ID, Szegedi Z, Mihalik R, Szende B. Apoptotic and non-apoptotic modes of programmed cell death in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Cell Biology International* 2000; 24(4): 253-260.
- ◆ Anderson TF. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans. N.Y. Acad. Sci* 1951; 13: 130.
- ◆ Arazaki M, Ishitsuka H, Kuruma I Miwa M, Murasaki C, Shimma N et al.. N-oxy carbonyl substituted 5'-deoxy-5-fluorocytidines. *Eur Patent Appl* 1992; no. 92121538.0.
- ◆ Arciero C, Somiari SB, Shriver CD, Brzeski H, Jordan R, Hu H et al. Functional relationship and gene ontology classifications of breast cancer biomarkers. *The International Journal of Biological Markers* 2003; 18: 241-272.

- ◆ Armstrong DK, Isaacs JT, Ottaviano YL, Davidson NE. Programmed cell death in a estrogen-independent human breast cancer cell line, MDA-MB-468. *Cancer Research* 1992; 52: 3418-3424.
- ◆ Arun B, Kilic G, Yen C, Foster B, Yardley D, Gaynor R et al. Correlation of bcl-2 and p53 expression in primary breast tumors and corresponding metastatic lymph nodes. *Cancer* 2003; 98(12): 2554-2259.
- ◆ Asaga T, Inaba M, Nagano A, Yanoma S. Induction of apoptosis in breast cancer cells by preoperative oral administration of 5-fluorouracil. *Cancer & Chemotherapy* 2001; 28: 49-53.
- ◆ Aschele C, Lonardi S, Monfardini S. Thymidylate synthase expression as a predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Cancer Treatment Reviews* 2002; 28: 27-47.
- ◆ Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 1999; 104: 155-162.
- ◆ Baell JB, Huang DCS. Prospect for targeting the bcl-2 family of proteins to develop novel cytotoxic drugs. *Biochemical Pharmacology* 2002; 64: 851-863.
- ◆ Baffy G, Miyashita T, Williamson JR, Reed JC. Apoptosis induced by withdrawal of IL-3 from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem* 1993; 268: 6511-6519.
- ◆ Bagui TK, Mohapatra S, Haura E, Pledger WJ. P27Kip1 and p21Cip1 are not required for the formation of active D cyclin-cdk4 complexes. *Molecular and Cellular Biology* 2003; 23: 7285-7290.
- ◆ Bai C, Richman R, Elledge SJ. Human cyclin F. *The EMBO Journal* 1994; 15: 6087-6098.
- ◆ Baliga BC, Kumar S. Role of bcl-2 family of proteins in malignancy. *Hematological Oncology* 2002; 20: 63-74.

- ◆ Barbareschi M. P27 Expression, a cyclin dependent kinase inhibitor in breast carcinoma. *Advances in Clinical Pathology: The Official Journal of Adriatic Society of Pathology* 1999; 3: 119-127.
- ◆ Barette C, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M, Piette J. Human cyclin C protein is stabilized by its associated kinase cdk₈, independently of its catalytic activity. *Oncogene* 2001; 20: 551-562.
- ◆ Barnes DM, Gillet CE. Cyclin D1 in breast cancer. *Breast Cancer Research* 1998; 52: 1-15.
- ◆ Barrenetxea G. Farmacología clínica de la quimioterapia. En: Herruzo AJ, Menjón S, Rodríguez-Escudero FJ. *Avances y controversias en Ginecología oncológica en 1998*. 1ª ed. Granada. Proyecto Sur de Ediciones SL; 2000. P. 69-127.
- ◆ Belka C, Budach W. Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. *International Journal of Radiation Biology* 2002; 78(8): 643-658.
- ◆ Ben-Hur H, Mordechay E, Halperin R, Gurevich P, Zandbank J, Herper M et al. Apoptosis-related proteins (Fas, Fas ligand, bcl-2 and p53) in different types of human breast tumors. *Oncology Reports* 2002; 9(5): 977-980.
- ◆ Berardo MD, Elledge RM, De Moor C, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Bcl-2 and apoptosis in lymph node positive breast carcinoma. *Cancer* 1998; 82(7): 1296-1302.
- ◆ Blagosklonny MV. Paradox of Bcl-2 (and p53): why may apoptosis-regulating proteins be irrelevant to cell death?. *BioEssays* 2001; 23: 947-953.
- ◆ Bland KI, Chang HR, Copeland III. Mastectomía radical modificada y mastectomía total (simple). En: Bland KI, Copeland III EM editors. *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P.895-927.

- ◆ Bland KI, Copeland III EM. Mastectomía radical de Halsted. En: Bland KI, Copeland III EM editors. La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P.872-886.
- ◆ Bloom J, Pagano M. Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Seminars in Cancer Biology* 2003; 13: 41-47.
- ◆ Boehm M, Yoshimoto T, Crook MF, Nallamshetty S, True A, Nabel GJ, Nabel EG. A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27^{kip1} and regulates cell cycle progression. *The EMBO Journal* 2002; 21(13): 3390-3401.
- ◆ Boise LH, González-García M, Postema CE. Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74: 597-608.
- ◆ Bonnefoy-Berard N, Aouacheria A, Verschelde C, Quemeneur L, Marçais A, Marvel J. Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1644: 159-168.
- ◆ Borner C. Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2. *J Biol Chem* 1996; 271: 12695-12698.
- ◆ Brito RA, Medgyesy D, Zukowski TH, Royce ME, Ravandi-Kashani F, Hoff P et al. Fluoropyrimidines: a critical evaluation. *Oncology* 1999; 57(Suppl 1): 2-8.
- ◆ Büchele T. Proapoptotic therapy with oblimersen (bcl-2 antisense oligonucleotide) review of preclinical and clinical results. *Onkologie* 2003; 26(7): 60-69.
- ◆ Buchholz TA, Davis DW, McConkey DJ, Symmans WF, Valero V, Jhingran A et al. Chemotherapy-induced apoptosis and Bcl-2 levels correlate with breast cancer response to chemotherapy. *Cancer Journal* 2003; 9(1): 33-41.
- ◆ Bundgaard H, Nielsen NM. Prodrugs and drug delivery systems. 74. Facile hydrolysis of *N*-(acyloxymethyl)amide derivatives and implications for

the design of prodrugs of NH-acidic compounds and of carboxylic acids. *Acta Pharm Suec* 1987; 24: 233-246.

- ◆ Burow ME, Tang Y, Collins-Burow BM, Krajewski S, Reed JC, McLachlan A et al. Effects of environmental estrogens on tumor necrosis factor α -mediated apoptosis in MCF-7 cells. *Carcinogenesis* 1999; 20(11): 2057-2061.
- ◆ Buur A, bundgaard H, Falch E. Prodrugs of 5-fluorouracil. IV. Hydrolysis kinetics, bioactivation and physicochemical properties of various N-acyloxymethyl derivatives of 5-fluorouracil *Int. J. Pharm* 1985; 24: 43-60.
- ◆ Caelles C, Helmberg A, Karin M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 1994; 370: 220-223.
- ◆ Calero F. Cáncer de mama IV. Tratamiento locorregional. Factores de pronóstico. Ganglio centinela. Tratamiento coadyuvante. En: Cabero L, editors. *Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción*. 1ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana SA; 2003. P. 1716-1729.
- ◆ Campos J, Saniger E, Marchal JA, Aiello S, Suárez I, Boulaiz H et al. New médium oxacyclic O,N-Acetals and related open analogs: biological activities. *Current Medicinal Chemistry* 2005; 887-916.
- ◆ Canman CE, Kastan MB. Role of p53 in apoptosis. En: Kaufmann SH editors. 1ª ed. San Diego. Academic Press. *Apoptosis: pharmacological implications and therapeutic opportunities*. *Advances in Pharmacology* 1997; 41: 1-34.
- ◆ Cariou S, Catzavelos C, Slingerland JM. Prognostic implications of expression of the cell cycle inhibitor protein p27Kip1. *Breast Cancer Research and Treatment* 1998; 52: 29-41.
- ◆ Cariou S, Donovan JCH, Flanagan WM, Milic A, Bhattacharya N, Slingerland JM. Down-regulation of p21^{waf1/cip1} or p27^{kip1} abrogates

- antiestrogen-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells. PNAS 2000; 97(16): 9042-9046.
- ◆ Carlson B, Lahusen T, Singh S, Loaiza-Pérez A, Worland PJ, Pestell R et al. Down-regulation of cyclin D₁ by transcriptional repression in MCF-7 human breast carcinoma cells induced by flavopiridol. Cancer Research 1999; 59: 4634-4641.
 - ◆ Carnaghi C, Zucali P, Garassino I. Combination of 5-fluorouracil and folinic acid: is it still the standard therapy for advanced colorectal carcinoma?. Tumori 2000; 86 (Suppl 2): 19-25.
 - ◆ Cascinu S, Aschele C, Barni S, Debernardis D, Baldo C, Tunesi G et al. Thymidilate synthase protein expression in advanced colon cancer: correlation with the site of metastasis and the clinical response to leucovorin-modulated bolus 5-fluorouracil. Clinical Cancer Research 1999; 5: 1996-1999.
 - ◆ Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Kroemer G. Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. Cell Death and Differentiation 2002; 9:1287-1293.
 - ◆ Cattel L, La Grotta G, Infante L, Passera R, Arpicco S, Brusa P et al. Pharmacokinetic study of oxaliplatin iv chronomodulated infusión combinaded with 5-fluorouracil iv continuous infusión in the treatment of advanced colorectal cancer. Il Farmaco 2003; 58: 1333-1338.
 - ◆ Caudry M, Bonnel C, Floquet A, Marsault C, Quetin P, Pujol J et al. A randomized study of bolus fluorouracil plus folinic acid versus 21-day fluorouracil infusion alone or in association with cyclophosphamide and mitomycin C in advanced colorectal carcinoma. Am. J. Clin. Oncol. 1995; 18: 118-125.
 - ◆ Chacón JI, Álvarez A. Tratamiento neoadyuvante. En: Lombardía J, Rodríguez I, Carreira MC, editors. La mama paso a paso. 1ª ed. Madrid. Ediciones Ergon SA; 2002. P.343-348.
 - ◆ Chadderton A, Villeneuve DJ, Gluck S, Kirwan-Rhude AF, Gannon BR, Blais DE et al. Role of specific apoptotic pathways in the restoration of

paclitaxel-induced apoptosis by valspodar in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 59: 231-244.

- ◆ Chakrabarty S, Madhumita R, Hazra B, Bhattacharya RK. Induction of apoptosis in human cancer cell lines by diosporin, a plant-derived bisnaphthoquinoid, and its synthetic derivatives. *Cancer Letters* 2002; 188: 85-93.
- ◆ Chang BD, Watanabe K, Broude EV, Fang J, Poole JC, Kalinichenko TV et al. Effects of p21^{waf1/Cip1/Sdi1} on cellular gene expression: Implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *PNAS* 2000; 97(8): 4291-4296.
- ◆ Chang J, Ormerod M, Powles TJ, Allred DC, Ashley SE, Dowsett M. Apoptosis and proliferation as predictors of chemotherapy response in patients with breast carcinoma. *Cancer* 2000; 89(11): 2145-2152.
- ◆ Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Elledge R et al. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet* 2003; 362: 362-369.
- ◆ Chen ST, Pan TL, Tsai YC, Huang CM. Proteomics reveals protein profile changes in doxorubicin-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Letters* 2002; 181: 95-107.
- ◆ Chen WJ, Chang CY, Lin JK. Induction of G₁ phase arrest in MCF-7 human breast cancer cells by pentagalloylglucose through the down-regulation of CDK4 and CDK2 activities and up-regulation of the CDK inhibitors p27^{Kip} and p21^{Cip}. *Biochemical Pharmacology* 2003; 65: 1777-1785.
- ◆ Chiarle R, Pagano M, Inghirami G. The cyclin dependent kinase inhibitor p27 and its prognostic role in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2001; 3: 91-94.

- ◆ Chittenden T, Harrington E A, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI et al. Induction of apoptosis by the bcl-2 homologue bak. *Nature* 1995; 374: 733-736.
- ◆ Choudhuri T, Pal S, Agwarwal ML, Das T, Sa G. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. *FEBS Letters* 2002; 512: 334-340.
- ◆ Chu E, Mota AC, Fogarasi MC. Pharmacology of cancer chemotherapy. En: De vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 6^a ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
- ◆ Ciocca DR, Gago FR. Factores pronósticos en el cáncer de mama y lesiones relacionadas. En: Pérez López FR, editors. *Cáncer de mama: biología, diagnóstico y tratamiento*. 1^a ed. Zaragoza. SEISGE, 2000. P. 155-174.
- ◆ Clavero A, Suárez I, Expósito A, Gonzalvo MC, Expósito AI, Fontes J et al. Apoptosis en el folículo ovárico humano. En: Mendoza N editors. *Avances en endocrinología ginecológica*. 1^a ed. Granada, 2001. P. 31-46.
- ◆ Clurman BE, Porter P. New insights into the tumor suppression function of p27^{kip1}. *Proc. National Academy of Sciences* 1998; 95: 15158-15160.
- ◆ Cooke T, Reeves J, Lanigan A, Stanton P. HER-2 as a prognostic and predictive marker for breast cancer. *Ann Oncol* 2001; 12(Suppl 1): 23-28.
- ◆ Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?. *Trends in Cell Biology* 2003; 13(2): 65-70.
- ◆ Coradini D, Daidone MG. Biomolecular prognostic factors in breast cancer. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology* 2004; 16(1): 49-55.
- ◆ Cornelissen M, Philippé J, De Sitter S, DE Ridder L. Annexin V expression in apoptotic peripheral blood lymphocytes: an electron microscopic evaluation. *Apoptosis* 2002; 7: 41-47.

- ◆ Cory S, Adams JM. The bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 647-656.
- ◆ Cristóbal I, Quevedo P. Diagnóstico de certeza. En: Díaz-Rubio E, Escudero M, editors. *Cáncer de mama*. 1ª ed. Madrid: International Marketig & Communications, SA; 1998. P. 95-130.
- ◆ Cunningham D, Coleman R. New options for outpatient chemotherapy: the role of oral fluoropyrimidines. *Cancer Treatment Reviews* 2001; 27: 211-220.
- ◆ Cyr MG, Moulton AW. Terapia de reposición hormonal y riesgo de cáncer de mama. En: Bland KI, Copeland III EM editors. *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P. 1495-1508.
- ◆ Dahiya R, Deng G. Molecular prognostic markers in breast cancer. *Breast cancer Research and Treatment* 1998; 52: 185-200.
- ◆ Dai Y, Grant S. Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology* 2003; 3: 362-370.
- ◆ Daidone MG, Luisi A, Veneroni S, Benini E, Silvestrini R. Clinical studies of bcl-2 and treatment benefit in breast cancer patients. *Endocrine-Related Cancer* 1999; 6: 61-68.
- ◆ De la Cruz MA, Adell A, Tripero J. Tratamiento coadyuvante. En: Lombardía J, Rodríguez I, Carreira MC, editors. *La mama paso a paso*. 1ª ed. Madrid. Ediciones Ergon SA; 2002. P.349-357.
- ◆ De McGuire WL. Breast cancer prognostic factors: Evaluation guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 154-155.
- ◆ Del Bufalo D, Biroccio A, Trisciuoglio D, Bruno T, Floridi A, Aquino A et al. Bcl-2 has differing effects on the sensitivity of breast cancer cells depending on the antineoplastic drug used. *European Journal of Cancer* 2002; 38: 2455-2462.

- ◆ Denmeade SR, McCloskey DE, Hahm HA, Isaacs JT, Davidson NE. Apoptosis in hormone-responsive malignancies. En: Kaufmann SH editors. 1ª ed. San Diego. Academic Press. Apoptosis: pharmacological implications and therapeutic opportunities. *Advances in Pharmacology* 1997; 41: 553-614.
- ◆ Denmeade SR, McCloskey DE, Joseph IB, Hahm HA, Isaacs JT, Davidson NE. Apoptosis in Hormone-responsive malignancies. En: Kaufmann SH editors. 1ª ed. San Diego. Academic Press. Apoptosis: pharmacological implications and therapeutic opportunities. *Advances in Pharmacology* 1997; 41: 553-583.
- ◆ Denny WA. Prodrug strategies in cancer therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2001; 36: 577-595.
- ◆ Di Paolo A, Danesi R, Del Tacca M. Pharmacogenetics of neoplastic diseases: new trends. *Pharmacological Research* 2004; 49: 331-342.
- ◆ Dickson RB, Lippman ME. Growth factors in breast cancer. *Endocrine Reviews* 1995; 6(5): 559-589.
- ◆ Dickson RB, Lippman ME. Regulación del crecimiento normal y maligno. En: Bland KI, Copeland III EM editors. *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P. 529-575.
- ◆ Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL. Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocrine-Related Cancer* 2003; 10: 179-186.
- ◆ Dominguez JF, Marchal JA, Correa A, Carrillo E, Boulaiz H, Aranega A, Gallo M, Espinosa A. Synthesis and evaluation of new 5-FU antitumour cell differentiating derivatives. *Bioorg Med Chem* 2003;11: 315-323.
- ◆ Donegan WL. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *CA-A Cancer Journal for Clinicians* 1997; 47: 28-51.

- ◆ Dou QP, An B, Will PL. Induction of a retinoblastoma phosphatase activity by anticancer drugs accompanies p53-independent G1 arrest and apoptosis Proc. Natl Acad Sci USA 1995; 92: 9019-9023.
- ◆ Early breast cancer trialists`collaborative group. Polichemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Lancet 1998; 352: 930-942
- ◆ Eberlein TJ, Goedegebuure P. Inmunología y papel de la inmunoterapia en el cáncer de mama. En: Bland KI, Copeland III EM editors. La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P. 617-625.
- ◆ Eccles SA. The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 2001; 6(4): 393-406.
- ◆ Edler D, Hallström M, Johnson PG, Magnusson I, Ragnhammar P, Blomgrem H. Thymidylate synthase expression: an independent prognostic factor for local recurrence, distant metastasis, disease-free and overall survival in rectal cancer. Clinical Cancer Research 2000; 6: 1378-1384.
- ◆ Edler D, Kressner U, Ragnhammar P, Johnston PG, Magnusson I, Glimelius B. Immunohistochemically detected thymidylate synthase in colorectal cancer: an independent prognostic factor of survival. Clinical Cancer Research 2000; 6: 488-492.
- ◆ Eissa S, Labib R, Khalifa A, Swelam N, Khalil F, El-Shenawy AM. Regulators of apoptosis in human breast cancer. Clinical Biochemistry 1999; 32(5): 321-326.
- ◆ El Deiry WS. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. Cancer Res 1994; 54: 1169-74.
- ◆ Elledge RM, Allred DC. Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment 1998; 52: 79-98.

- ◆ Ellis LM, Nicolson GL, Fidler IJ. Conceptos y mecanismos relacionados con las metástasis del cáncer de mama. En: Bland KI, Copeland III EM editors. La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P.576-593. Bland KI, Copeland III EM editors.
- ◆ Esteva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Research* 2004; 6: 109-118.
- ◆ Evan IG, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411: 342-347.
- ◆ Falcón O, Falcón O. Cáncer de mama. Generalidades. En: Lombardía J, Rodríguez I, Carreira MC, editors. La mama paso a paso. 1ª ed. Madrid. Ediciones Ergon SA; 2002. P.253-258.
- ◆ Faust M, Kartarius S, Schwindling SL, Montenarh M. Cyclin H is a new binding partner for protein kinase CK2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 296: 13-19.
- ◆ Fernández A, Salas F, Feu J, Grases PJ, López L. Anatomía de la mama normal. En: Fernández A y cols, editors. Mastología. 2ª ed. Barcelona: Masson SA; 2000. P. 31-52.
- ◆ Fernández MJ, Bischoff JR. Bcl-2 associates with the ras-related protein R-ras p23. *Nature* 1993; 366: 274-275.
- ◆ Fernández ML, Lombardía J. Influencia de la anticoncepción hormonal en la mama. En: Lombardía J, Rodríguez I, Carreira MC, editors. La mama paso a paso. 1ª ed. Madrid. Ediciones Ergon SA; 2002. P. 213-219.
- ◆ Fernández PL, Jares P, Rey MJ, Campo E, Cardesa A. Cell cycle regulators and their abnormalities in breast cancer. *Molecular Pathology* 1998; 51: 305-309.
- ◆ Fernández Y, Gu B, Martínez A, Torregrosa A, Sierra A. Inhibition of apoptosis in human breast cancer cells: role in tumor progression to the metastatic state. *International Journal of Cancer* 2002; 101: 317-326.

- ◆ Foster JS, Henley DC, Ahamed S, Wimalasena J. Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism* 2001; 12(7): 320-327.
- ◆ Fowble B, Roser C, Hanlon A. Cirugía conservadora y radioterapia para el cáncer de mama estadio I y II. En: Bland KI, Copeland III EM editors. *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P. 1190-1197.
- ◆ Friedman MA, Ignoffo RJ. A review of the United States clinical experience of the fluoropyrimidine, ftorafur (NSC-148958). *Cancer Treat. Rev.* 1980; 7(4): 205-213.
- ◆ Fujise K, Zhang D, Liu J-L, Yeh ETH. Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(50): 39458-39465.
- ◆ Fung TK, Siu WY, Yam CH, Lau A, Poon RYC. Cyclin F is degraded during G₂-M by mechanism fundamentally different from other cyclins. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(38): 35140-35149.
- ◆ Gabel M, Kim JH, Kolozsvary A, Khil M, Freytag S. Selective *in vivo* radiosensitization by 5-fluorocytosine of human colorectal carcinoma cells transduced with the *E. coli* cytosine deaminase (CD) gene. *Int J Radiation Oncol Biol Phys* 1998; 41(4): 883-887.
- ◆ Galimberti V, Farante G, Gennari R, Monti S, Capurso M. Biopsia del ganglio centinela. En: Pérez López FR, editors. *Cáncer de mama: biología, diagnóstico y tratamiento*. 1ª ed. Zaragoza. SEISGE, 2000. P.187-194.
- ◆ Gali-Muhtasib H, Bakkar N. *Curr Cancer Drugs Targets* 2002; 2: 309.
- ◆ Gallo-Mezo MA, Espinosa A, Campos J, Entrena A, Pineda MJ, Gómez JA. Anticancer pyrimidine acyclonucleosides. *II Fármaco* 1995; 50: 395-400.

- ◆ Galton DAG. Aspectos médicos de las neoplasias. En: Weatherall DJ, Ledingham JGG, Warrel DA. Oxford: Tratado de medicina interna. Editorial Médica Panamericana; 1993. P. 182-205.
- ◆ García E. Embriología y Anatomía. En: Lombardía J, Rodríguez I, Carreira MC, editors. La mama paso a paso. 1ª ed. Madrid. Ediciones Ergon SA; 2002. P. 3-9.
- ◆ Garret MD, Workman P. Millennium review. Discovering novel chemotherapeutic drugs for the third millennium. Eur J Cancer 1999; 35: 2010-2030.
- ◆ Garrido F, López MA. Inmunología e inmunoterapia para ginecólogos oncólogos. 1ªed. Madrid: SEGO; 2000. P. 59-132
- ◆ Gasparini G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. Critical Reviews in Oncology / Hematology 2001; 37: 97-114.
- ◆ Golsteyn RM. Cdk1 and Cdk2 complexes (cyclin dependent kinases) in apoptosis: a role beyond the cell cycle. Cancer Letters 2005: 217: 129-138.
- ◆ Gompel A, Somai S, Chaouat M, Kazem A, Kloosterboer HJ, Beusman I et al. Hormonal regulation of apoptosis in breast cells and tissues. Steroids 2000; 65: 593-598.
- ◆ González J. Bases del tratamiento hormonal. En: Herruzo AJ, Menjón S, Rodríguez-Escudero FJ, editors. Avances y controversias en Ginecología oncológica en 1998. 1ª ed. Granada. Proyecto Sur de Ediciones SL; 2000. P. 215-241.
- ◆ Gooch JL, Yee D. Strain-specific differences in formation of apoptotic DNA ladders in MCF-7 breast cancer cells. Cancer Letters 1999; 144: 31-37.
- ◆ Grases PJ. Patología Ginecológica: bases para el diagnóstico morfológico. 1ª ed. Barcelona: MASSON SA; 2003.

- ◆ Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research* 1994; 54: 4855-4878.
- ◆ Grem JL, Nguyen D, Monahan BP, Kao V, Geoffroy FJ. Sequence-dependent antagonism between fluorouracil and paclitaxel in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 477-486,
- ◆ Guinee VF. epidemiología del cáncer de mama. En: La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P.345-357.
- ◆ Gulyaeva N, Zaslavsky A, Lechner P, Chlenov M, McConnell O, Chait A et al. *Eur. J. Med. Chem* 2003; 38-391.
- ◆ Guy M. Targeting apoptosis in cancer chemotherapy. *Expert Opin Ther Targets* 2002; 6(1): 73-84.
- ◆ Hagan MP, Mendenhall NP. Manejo de la recidiva local/regional: papel de la radioterapia oncológica. En: Bland KI, Copeland III EM editors. La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P. 1265-1280.
- ◆ Hagan MP, Mendenhall NP. Radioterapia adyuvante después de la mastectomía radical modificada. En: Bland KI, Copeland III EM editors. La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P. 1177-1189.
- ◆ Hamilton A, Piccart M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: A review of the literature on HER-2, p53 and Bcl-2. *Annals of Oncology* 2000; 11: 647-663.
- ◆ Han EK, Ng SC, Arber N, Begemann M, Weinstein IB. Roles of cyclin D1 and related genes in growth inhibition, senescence and apoptosis. *Apoptosis* 1999; 213-219.
- ◆ Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.

- ◆ Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 2000; 19: 6102-6114.
- ◆ Harris H. Características generales de las neoplasias. En: Weatherall DJ, Ledingham JGG, Warrel DA editors. Oxford. Tratado de medicina interna. 1ª ed. Editorial Médica Panamericana SA; 1993. P.142-205.
- ◆ Head JF, Elliott RL, Yang DC. Gene targets of antisense therapies in breast cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2002; 6: 375-385.
- ◆ Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg PB et al. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor-inhibitory compounds. *Nature* 1957; 179: 663-666.
- ◆ Hemachandran M, Nijhawan R, Joshi K. Cytological grading, apoptosis, and bcl-2 protein expression in breast cancer. *Diagnostic Cytopathology* 2002; 26(6):356-359.
- ◆ Hershko A. Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin B. *Phil Trans R Soc Lond* 1999; 354: 1571-1576.
- ◆ Hickman JA. Apoptosis and tumorigenesis. *Current Opinión in Genetics & Development* 2002; 12: 67-72.
- ◆ Hidalgo M, Colomer R. Docetaxel en el cáncer de mama: farmacología clínica y actividad. En: Pérez López FR, editors. Cáncer de mama: biología, diagnóstico y tratamiento. 1ª ed. Zaragoza. SEISGE, 2000. P.319-331.
- ◆ Hiller SA, Zhuk RA, Lidak MY. Analogs of pyrimidine nucleosides. *Dokl. Adad. Nauk. S.S.S.R.* 1967; 176: 332-335.
- ◆ Hiromura K, Pippin JW, Blonski MJ, Roberts JM, Shankland SJ. The subcellular localizaton of cyclin dependent kinase 2 determines the fate of mesangial cells: role in apoptosis and proliferation. *Oncogene* 2002; 21(11): 1750-1758.
- ◆ Hockenberry DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75: 241-251.

- ◆ Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Experimental Cell Research* 2003; 284: 99-110.
- ◆ Hong C, Firestone GL, Bjeldanes LF. Bcl-2 family-mediated apoptotic effects of 3,3'-diindolylmethane (DIM) in human breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 2002; 63: 1085-1097.
- ◆ Hosokawa Y, Arnold A. Mechanism of cyclin D1 (CCND1, PRAD1) overexpression in human cancer cells: Analysis of allele-specific expression. *Genes, Chromosomes & Cancer* 1998; 22: 66-71.
- ◆ Hu Y, Graewin SI, Komorowski RA, Pitt HA, Ahrendt SA. Thymidylate synthase (TS) expression predicts the response to 5-FU based adjuvant therapy in pancreatic cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2003; 7:294.
- ◆ Hult J, Lee RJ, Russell RG, Pestell RG. ErbB-2-induced mammary tumor growth: the role of cyclin D1 and p27kip1. *Biochemical Pharmacology* 2002; 64: 827-836.
- ◆ Hulka BS, Liv ET, Lininger RA. Steroid hormones and risk of breast cancer. *Cancer* 1994; 74: 111-124.
- ◆ Hung WC, Huang JS, Chuang LY. Antisense oligodeoxynucleotides targeted against different regions of cyclin D1 may exert different inhibitory effects on cell growth and gene expression. *Biochemical and biophysical research communications* 1996; 220: 719-723.
- ◆ Hunt KK, Bland KI, Ellis LM. Consideraciones generales del seguimiento. En: *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P.1481-1494.
- ◆ Iglesias J, Veiras C. Alteraciones bioquímicas de las neoplasias. 1ª ed. A coruña: Diputación de A coruña; 2000. P.11-18.
- ◆ Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev cancer* 2002; 2(4): 277-288.

- ◆ Ikeda K, Pant B, Mishiro A, Ozawa K, Masujima T, Sugiyama M. A convenient method for the evaluation of anti-tumor agents affecting the cell cycle. *Journal Of Bioscience and Bioengineering* 2000; 90(5): 574-576.
- ◆ Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martín JB, Fauci As, Kasper DL. Harrison: Principios de Medicina Interna. 13ª ed. Madrid: McGRAW-Hill-Interamericana de España; 1994. P. 2089-2104.
- ◆ Jager JJ, Jansen RLH, Arends JW. Clinical relevance of apoptotic markers in breast cancer not yet clear. *Apoptosis* 2002; 7: 361-365.
- ◆ Jardines L, Berger D. Integración de la biología molecular en los parámetros pronósticos para el cáncer de mama. En: Bland KI, Copeland III EM editors. *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P.442-465.
- ◆ Jeffrey R, Gerald L., James S., Edwin C., Mark A., Nick L et al. Breast cancer biomarkers and molecular medicine. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2003; 3(5): 573-585.
- ◆ Jiang H, Coleman J, Miskimins R, Miskimins WK. Expression of constitutively active 4EBP-I enhances p27^{Kip 1} expression and inhibits proliferation of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Cell International* 2003; 3: 2.
- ◆ Joe AK, Liu H, Suzui M, Vural ME, Xiao D, Weinstein IB. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 893-903.
- ◆ Johnson DG, Wlaker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *An Rev Pharmacol* 1999; 39: 295-312.
- ◆ Johnson KR, Wang L, Miller MC, Willingham MC, Fan W. 5-Fluorouracil interferes with paclitaxel cytotoxicity against human solid tumour cells. *Clin Cancer Res* 1997; 10: 1739-1745.

- ◆ Johnson KR, Young KK, Fan W. Antagonistic interplay between antimetabolic and G₁-S arresting agents observed in experimental combination therapy. *Clinical Cancer Research* 1999; 5: 2559-2565.
- ◆ Johnson MR, Hageboutros A, Wang K, High L, Smith JB, Diasio RB. Life-threatening toxicity in a dihydropyrimidine dehydrogenase-deficient patient after treatment with topical 5-fluorouracil. *Clinical Cancer Research* 1999; 5: 2006-2011.
- ◆ Jonson KA, Kramer BS, Anderson MJ. Tratamiento sistémico adyuvante del cáncer de mama. En: Bland KI, Copeland III EM editors. *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2^a ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P. 1215-1254.
- ◆ Kastanos EK, Zajac-Kaye M, Dennis PA, Allegra CJ. Downregulation of p21/WAF1 expression by thymidylate synthase. *Biochemical and Biophysical Research communications* 2001; 285: 195-200
- ◆ Kenny FS, Hui R, Musgrove EA, Gee JM, Blamey RL, Nicholson RI, et al. Overexpression of cyclin D1 Messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clinical Cancer Research* 1999; 5: 2069-2076.
- ◆ Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis its significance in cancer and cancer Therapy. *Cancer* 1994; 73(8): 2013-2026.
- ◆ Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 1972; 26: 239-257.
- ◆ Keyomarsi K, O'leary N, Molnar G, Lees E, Fingert HJ, Pardee AB. Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Research* 1994; 54:380-385.
- ◆ Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Osaki A, Toge T. The role of HER-2 oncoprotein in drug-sensitivity in breast cancer. *Oncology Reports* 2002; 9: 3-9.

- ◆ Knockaert M, Greengard P, Meijer L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 2002; 23(9): 417-425.
- ◆ Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-823.
- ◆ Kong M, Barnes EA, Ollendorff V, Donoghue DJ. Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. *The EMBO Journal* 2000; 19(6): 1378-1388.
- ◆ Konstantinidou A-E, Korkolopoulou P, Patsouris E. Apoptotic markers for tumor recurrence: a minireview. *Apoptosis* 2002; 7: 461-470.
- ◆ Korabiowska M, Brinck U, Middel P, Brinkmann U, Berger H. Proliferative activity in the progression of pigmented skin lesions, diagnostic and prognostic significance. *Anticancer Res* 2000; 20: 1781-1785.
- ◆ Korey RJ, Kristy KY, Weimin F. Antagonistic interplay between antimetabolic and G₁-S arresting agents observed in experimental combination therapy. *Clinical Cancer Research* 1999; 5: 2559-2565.
- ◆ Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends Genet* 1995; 11:101-105.
- ◆ Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW. MCL-1, a gene expressed in programmed myeloid differentiation, has sequence similarity to bcl-2. *Proc Natl Acad USA* 1993; 90:3516-3520.
- ◆ Krajewski S, Krajewska M, Turner BC, Pratt C, Howard B, Zapata JM et al. Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 1999; 6: 29-40.
- ◆ Kruger S, Stahlhut M, Muller H. Cell cycle-dependent AgNOR analysis in invasive breast cancer. *Anal Quant Cytol Histol* 2000; 22: 358-363.
- ◆ Kugu K, Ratts VS, Piquette GN, Tilly KI, Tao XJ, Martimbeau S et al. Analysis of apoptosis and expression of bcl-2 gene family members in the human and baboon ovary. *Cell death differ* 1998; 5(1): 67-76.
- ◆ Kumar R, Vadlamudi RK, Adam L. Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2000; 7(1): 257-269.

- ◆ Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- ◆ Lane DP, Lu X, Hupp T, Hall PA. The role of the p53 protein in the apoptotic response. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994; 345: 277-280.
- ◆ Lane DP. The p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 359: 15-16.
- ◆ Lanzós E. Papel de la radioterapia. En: Díaz-Rubio E, Escudero M, editors. *Cáncer de mama*. 1ª ed. Madrid: International Marketig & Communications, SA; 1998. P. 131-140.
- ◆ Larrad A, Louredo AM. Marcadores tumorales e inmunohistoquímicos. En: Lombardía J, Rodríguez I, Carreira MC, editors. *La mama paso a paso*. 1ª ed. Madrid. Ediciones Ergon SA; 2002. P. 129-134.
- ◆ Larrad A. Fisiología y evolución madurativa de la mama. En: Lombardía J, Rodríguez I, Carreira MC, editors. *La mama paso a paso*. 1ª ed. Madrid. Ediciones Ergon SA; 2002. P.11-18.
- ◆ Laux MT, Aregullin M, Berry JP, Flanders JA, Rodriguez E. Identification of a p53-dependent pathway in the induction of apoptosis of human breast cancer cells by the natural product, Resveratrol. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 2004; 10: 235-239.
- ◆ Leclerc V, Léopold P. The cyclin C/cdk₈ Kinase. *Progress in Cell Cycle Research* 1996; 2: 197-204.
- ◆ Lees EM, Harlow E. Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase *Mol Cell Biol* 1993; 13: 1194-1201.
- ◆ Leichman CG, Fleming TR, Muggia FM, Tangen CM, Ardan B, Doroshow JH et al. Phase II study of 5-FU and its modulation in advanced colorectal cancer: A Southwest Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* 1995; 13: 1311.
- ◆ Leiva J, Mendoza J, Navarro JM, Plata JC, De la Rosa M. Patrón de anticuerpos en brucelosis humana aguda definido por western blot. *Enf. Infecc. Microbiol. Clin* 1989; 8: 15-18.

- ◆ Lenner P, Wiklund F, Emdin SO, Arnerlöv C, Eklund C, Hallmans G et al. Serum antibodies against p53 in relation to cancer risk and prognosis in breast cancer: a population-based epidemiological study. *British Journal of Cancer* 1999; 79: 927-932.
- ◆ Lester S, Ramzy S, Cotran R. La mama femenina. En: Robbins D, editors. *Patología estructural y funcional*. 6ª ed. México: Editorial Interamericana SA; 1999. P. 1137-1139.
- ◆ Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: the firsts hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research* 1997; 57: 3071-3078.
- ◆ Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323-331.
- ◆ Li Q, Boyer C, Lee JY, Shepard HM. A novel approach to thymidylate synthase as a target for cancer chemotherapy. *Molecular Pharmacology* 2001; 59: 446-452.
- ◆ Ligueros M, Jeung D, Tang B, Hochhauser D, Reidenberg MM, Sonenberg M. Gossypol inhibition of mitosis, cyclin D1 and Rb protein in human mammary cancer cells and cyclin-D1 transfected human fibrosarcoma cells. *British Journal of cancer* 1997; 76(1): 21-28.
- ◆ Lima RT, Martins LM, Guimaraes JE, Sambade C, Vasconcelos MH. Specific downregulation of bcl-2 and xIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Gene Therapy* 2004; 11: 309-316.
- ◆ Lin EY, Orlofsky A, Wang HG, Reed JC, Prystowsky MB. A1, a Bcl-2 family member, prolongs cell survival and permits myeloid differentiation. *Blood* 1996; 87: 983-992.
- ◆ Linjawi A, Kontogiannea M, Halwani F, Edwardes M, Meterissian S. Prognostic significance of p53, bcl-2, and Bax expression in early breast cancer. *J Am Coll Surg* 2004; 198(1): 83-90.
- ◆ Lipponen P. Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. *Endocrine-Related Cancer* 1999; 6: 13-16.

- ◆ Liu J, Schmitz JC, Lin X, Tai N, Yan W, Farrell M et al. Thymidylate synthase as a translational regulator of cellular gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1587: 174-182.
- ◆ Liu S, Bishop WR, Liu M. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21 (WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resistance Updates* 2003; 6(4): 183-195.
- ◆ Liu W, Bulgaru A, Haigentz M, Stein CA, Pérez-Soler R, Mani S. The bcl-2 family of protein ligands as cancer drugs: the next generation of therapeutics. *Current Medicinal Chemistry* 2003; 3(3): 217-223.
- ◆ Lodén M, Stighall M, Nielsen NH, Roos G, Emdin SO, Ostlund H et al. The cyclin D1 high and cyclin E high subgroups of breast cancer: separate pathways in tumorigenesis based on pattern of genetic aberrations and inactivation of the pRb node. *Oncogene* 2002; 21(30): 4680-4690.
- ◆ Lohrisch C, Piccart M. HER2/neu as a predictive factor in breast cancer. *Clinical Breast Cancer* 2001; 2: 129-135.
- ◆ Lokich J. Infusional 5-FU: historical evolution, rationale, and clinical experience. *Oncology* 1998; 12(Suppl 7): 19-22.
- ◆ Lombardía J, Fernández ML. La mama durante el embarazo y la lactancia. Cuidados especiales. En: Lombardía J, Rodríguez I, Carreira MC, editors. *La mama paso a paso*. 1ª ed. Madrid. Ediciones Ergon SA; 2002. P. 177-181.
- ◆ Longley DB, Boyer J, Allen WL, Latif T, Ferguson PR, Maxwell PJ et al. The role of thymidylate synthase induction in modulating p53-regulated gene expression in response to 5-fluorouracil and antifolates. *Cancer Research* 2002; 62: 2644-2649.
- ◆ Longley DB, Latif T, Boyer J, Allen WL, Maxwell PJ, Johnston PG. The interaction of thymidylate synthase expression with p53-regulated signaling pathways in tumor cells. *Seminars in Oncology* 2003; 30(Suppl 6): 3-9.
- ◆ López F, Rodríguez J. Diagnóstico precoz del cáncer de mama. Papel del médico de atención primaria. En: Lombardía J, Rodríguez I, Carreira

- MC, editors. La mama paso a paso. 1ª ed. Madrid. Ediciones Ergon SA; 2002. P. 267-276.
- ◆ López LJ, Roldán MJ. Factores pronóstico. En: Lombardía J, Rodríguez I, Carreira MC, editors. La mama paso a paso. 1ª ed. Madrid. Ediciones Ergon SA; 2002. P.315-320.
 - ◆ Lowry ON, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 1951; 265-275.
 - ◆ Lukas J, Lukas C, Bartek J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair* 2004; 000 ([www. Elsevier. Com/ locate/ dnarepair](http://www.Elsevier.Com/locate/dnarepair)).
 - ◆ Lundberg AS, Weinberg RA. Control of cell cycle and apoptosis. *European Journal of Cancer* 1999; 35(14): 1886-1894.
 - ◆ Lymberis SC, Parhar PK, Katsoulakis E, Formenti SC. Pharmacogenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics* 2004; 5(1): 31-35.
 - ◆ Lynch HT, Lemon SJ, Marcus JN, Lerman C, Lynch J, Narod S. Genética del cáncer de mama: heterogeneidad, genética molecular, diagnóstico de síndromes y asesoramiento genético. En: Bland KI, Copeland III EM editors. La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P.377-401.
 - ◆ Mader RM, Müller M, Steger GG. Resistance to 5-Fluorouracil. *Gen Pharmac* 1998; 31(5): 661-666.
 - ◆ Malet-Martino M, Martino R. Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (Capecitabine, UFT, S-1): a review. *The Oncologist* 2002; 7: 288-323.
 - ◆ Maloof P, Wang Q, Wang H, Stein D, Denny TN, Yahalom J et al. Overexpression of basic fibroblast growth factor (FGF-2) downregulates bcl-2 and promotes apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 1999; 56: 153-167.

- ◆ Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2001; 1: 222-231.
- ◆ Mansour EG, Ravdin Y, Dressler L. Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer* 1994; 74(1): 381-400.
- ◆ Marchal JA, Boulaiz H, Suárez I, Saniger E, Campos J, Carrillo E et al. Growth inhibition, G₁-arrest, and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells by novel highly lipophilic 5-fluorouracil derivatives. *Investigational New Drugs* 2004; 22: 379-389.
- ◆ Marchal JA, Melguizo C, Prados J, Aránega AE, Gómez JA, Campos J et al. Modulation of myogenic differentiation in a human rhabdomyosarcoma cell line by a new derivative of 5-fluorouracil (QF-3602). *Jpn. J. Cancer Res* 2000; 91: 1-7.
- ◆ Marchal JA, Prados J, Melguizo C, Gómez JA, Campos J, Gallo MA et al. GR-891: a novel 5-fluorouracil acyclonucleoside prodrug for differentiation therapy in rhabdomyosarcoma cells. *British Journal of Cancer* 1999; 79(5/6): 807-813.
- ◆ Marchal JA. Terapia de diferenciación inducida con nuevos agentes antineoplásicos en células de estirpe muscular. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1996.
- ◆ Márquez A, Alba E. Cáncer de mama avanzado: tratamiento quimioterápico. En: Díaz-Rubio E, Escudero M, editors. *Cáncer de mama*. 1ª ed. Madrid: International Marketig & Communications, SA; 1998. P. 201-214.
- ◆ Márquez M, Ordi J. Histología de los órganos genitales y de la mama. En: Cabero L, editors. *Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción*. 1ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana SA; 2003. P. 39-49.
- ◆ Martínez JC. Biología molecular y cáncer. En: Herruzo AJ, Rodríguez-Escudero FJ, Comino R, editors. *Avances en Oncología Ginecológica y Mamaria*. 1ª ed. Granada. Proyecto Sur de Ediciones; 1995. P. 15-25.

- ◆ May WS, Tyler PG, Ito T, Armstrong DK, Qatsha KA, Davidson NE. Interleukin-3 and bryostatin-1 mediate hyperphosphorylation of BCL2 alpha in association with suppression of apoptosis J. Biol. Chem. 1994; 269: 26865-26870.
- ◆ McCloskey DE, Casero RA, Woster PM, Davidson NE. Induction of programmed cell death in human breast cancer cells by an unsymmetrically alkylated polyamine analogue. Cancer Research 1995; 55:3233-3236.
- ◆ McGuire WL, Clark GM. The role of progesterone receptors in breast cancer. Semin. Oncol 1985; 12 (Suppl): 12-16.
- ◆ McIntosh GG, Anderson JJ, Milton I, Steward M, Parr AH, Thomas MD et al. Determination of the prognostic value of cyclin D1 overexpression in breast cancer. Oncogene 1995; 11: 885-891.
- ◆ Meira DD, Marinho-carvalho MM, Teixeira CA, Veiga VF, Da poian AT, Holandino C et al. Cotrimazole decreases human cancer cells viability through alterations in cytoskeleton associated glycolytic enzymes. Molecular Genetics and Metabolism 2005; 84:354-362.
- ◆ Ménard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM. Role of HER-2 gene overexpression in breast carcinoma. Journal of Cellular Physiology 2000; 182: 150-162.
- ◆ Menke CH, Villanova J, Cavalheiro JA, Cericatto R, Goldberg E. Tratamiento quirúrgico del cáncer de mama y mamoplastia oncológica. En: Pérez López FR, editors. Cáncer de mama: biología, diagnóstico y tratamiento. 1ª ed. Zaragoza. SEISGE, 2000. P.195-206.
- ◆ Meschini S, Marra M, Calcabrini A, Monti E, Gariboldi M, Dolfini E, Arancia G. Role of the lung resistance-related protein (LRP) in the drug sensitivity of cultured tumor cells. Toxicology in Vitro 2002; 16: 389-398.
- ◆ Mesner PW, Budihardjo II, Kaufmann SH. Chemotherapy-induced apoptosis. En: Kaufmann SH editors. 1ª ed. San Diego. Academic

Press. Apoptosis: pharmacological implications and therapeutic opportunities. *Advances in Pharmacology* 1997; 41: 461-499.

- ◆ Meyn RE, Stephens LC, Hunter NR, Milas L. Kinetics of cisplatin-induced apoptosis in murine mammary and ovarian adenocarcinomas *Int .J. Cancer* 1995; 60: 725-729.
- ◆ Milas L, Hunter NR, Kurdoglu B, Mason KA, Meyn RE, Stephens LC et al. Kinetics of mitotic arrest and apoptosis in murine mammary and ovarian tumors treated with taxol *J. Cancer Chemoth and Pharm* 1995; 35:297-303.
- ◆ Miller RT, Hapke MR, Greene GL. Immunohistochemical assay for estrogens receptor with monoclonal antibody D753P in routinely processed formaldehyde-fixed breast tissue. *Cancer* 1993; 71(11): 3541-3546.
- ◆ Moreno J, Rodríguez-Escudero FJ. Otras terapéuticas oncológicas: citostáticos, radioterapia, otras radiaciones ionizantes. En: Cabero L, editors. *Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción*. 1ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana SA; 2003. P.1825-1834.
- ◆ Musgrove EA, Davison EA, Ormandy CJ. Role of the CDK inhibitor p27 (Kip1) in mammary development and carcinogenesis: insights from knockout mice. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2004; 9(1): 55-66.
- ◆ Nabholz JM. The role of taxanes in the management of breast cancer. *Semin Oncol* 1999; 26(suppl 8): 1-3.
- ◆ Nahta R, Esteva FJ. Bcl-2 antisense oligonucleotides: a potential novel strategy for the treatment of breast cancer. *Semin Oncol* 2003; 30(5 suppl 16): 143-149.
- ◆ Naidu R, Abdul N, Mohan M, Kannan M. Expression and amplification of cyclin D1 in primary breast carcinomas: Relationship with histopathological types and clinico-pathological parameters. *Oncology Reports* 2002; 9: 409-416.

- ◆ Navarrete S. Tratamiento radioterápico del cáncer de mama. En: Pérez López FR, editors. *Cáncer de mama: biología, diagnóstico y tratamiento*. 1ª ed. Zaragoza. SEISGE, 2000. P.227-237.
- ◆ Newman L, Xia W, Yang H-Y, Sahin A, Bondy M, Lukmanji F et al. Correlation of p27 protein expression with HER-2/neu expression in breast cancer 2001; 30: 169-175.
- ◆ Nigg EA. Mitotic Kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 9: 168-173.
- ◆ Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Fujii S, Sasaki S, et al. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *British Journal of Cancer* 1998; 78(8): 986-992.
- ◆ Noble MEM, Endicott JA, Brown NR, Jonson LN. The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control. *TIBS* 1997; 22: 482-487.
- ◆ Obaya AJ, Sedivy J. Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 126-142.
- ◆ Obermiller PS, Tait DL, Holt JT. Gene therapy for carcinoma of the breast: therapeutic genetic correction strategies. *Breast Cancer Res* 2000; 2: 28-31.
- ◆ Ogura O, Kanzaki A, Bando H, Ogura T, Toi M, Takebayashi Y. Expression of thymidylate synthase and thymidine phosphorylase in human breast carcinoma: implication for meted to detect expression of these molecules in clinic. *Cancer Letters* 2003; 190: 97-104.
- ◆ Okamoto K, Beach D. Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppresor protein. *The EMBO Journal* 1994; 13: 4816-4822.
- ◆ Okamoto K, Prives C. A role of cyclin G in the process of apoptosis. *Oncogene* 1999; 18: 4606-4615.

- ◆ Olashaw N, Pledger WJ. Paradigms of growth control: relation to cdk activation. Science's STKE [Electronic Resource]: Signal Transduction Knowledge Environment 2002; 7.
- ◆ Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapeutic applications. *The Oncologist* 2004; 9: 361-377.
- ◆ Osborne CK, Ravdin PM. Adjuvant systemic therapy of primary breast cancer. En: Harris JR, Lippman ME, Morrow M. *Diseases of the breast*. 2ª ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins; 2000. P. 599-632.
- ◆ Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WA, McGuire WL. The value of oestrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer* 1980; 46: 2884-2888.
- ◆ Osin PP, Lakhani SR. The pathology of familial breast cancer: immunohistochemistry and molecular analysis. *Breast Cancer Research* 1999; 1:36-40.
- ◆ Ostrakhovitch EA, Cherian MG. Role of p53 and reactive oxygen species in apoptotic response to copper and zinc in epithelial breast cancer cells. *Apoptosis* 2005; 10: 111-121.
- ◆ Pacheco C, Tejada A, Moreno L et al. Nuestra experiencia con el tratamiento conservador del cáncer de mama. En: Pérez López FR, editors. *Cáncer de mama: biología, diagnóstico y tratamiento*. 1ª ed. Zaragoza. SEISGE, 2000. P.175-186.
- ◆ Pagliacci ML, Smacchia M, Migliorati G, Grignani F, Riccardi C, Nicoletti I. Growth-inhibitory effects of the natural phyto-oestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur. J. Cancer* 1994; 30A: 1675-1682.
- ◆ Palacios S. *Salud y medicina de la mujer*. 1ª ed. Madrid: MMI Ediciones Harcourt SA; 2002.
- ◆ Paradiso A, Simone G, Petroni S, Leone B, Vallejo C, Lacava J et al. Thymidylate synthase and p53 primary tumour expression as

predictive factors for advanced colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer* 2000; 82:560-567.

- ◆ Parker WB, Cheng YC: Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol Ther* 1990; 48: 381-395.
- ◆ Parone PA, James D, Martinou JC. Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 2002; 84: 105-111.
- ◆ Parr AL, Drake JC, Gress RE, Schwartz G, Steinberg SM, Allegra CJ. 5-Fluorouracil-mediated thymidylate synthase induction in malignant and nonmalignant human cells. *Biochemical Pharmacology* 1998; 56: 231-235.
- ◆ Parton M, Dowsett M, Ashley S, Hills M, Lowe F, Smith IE. High incidence of HER-2 positivity in inflammatory breast cancer. *The Breast* 2004: 97-103.
- ◆ Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC. Estrogen receptor β inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G₂ cell cycle arrest. *Cancer Research* 2004; 64: 423-428.
- ◆ Patterson A, Harris AI. Molecular chemotherapy for breast cancer. *Drugs Aging* 1999; 14(2): 75-90.
- ◆ Pegram MD, Pauletti G, Slamon DJ. HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast Cancer Research and Treatment* 1998; 52: 65-77.
- ◆ Pérez EA. Paclitaxel en el cáncer de mama. En: Pérez López FR, editors. *Cáncer de mama: biología, diagnóstico y tratamiento*. 1ª ed. Zaragoza. SEISGE, 2000. P. 293-317.
- ◆ Pérez P, Martín M. Tratamiento sistémico adyuvante en cáncer de mama precoz. En: Díaz-Rubio E, Escudero M, editors. *Cáncer de mama*. 1ª ed. Madrid: International Marketig & Communications, SA; 1998. P. 141-155.

- ◆ Peters GJ, Backus HHj, Freemantle S, Van Triest B, Codacci-Pisanelli G, Van der Wilt CL et al. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1587:194-205.
- ◆ Petit T, Wilt M, Velten M, Millon R, Rodier J-F, Borel C et al. Comparative value of tumor grade, hormonal receptors, ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. *European Journal of Cancer* 2004; 40: 205-211.
- ◆ Piera J. Cáncer de mama avanzado: tratamiento hormonoterápico. En: Díaz-Rubio E, Escudero M, editors. *Cáncer de mama*. 1ª ed. Madrid: International Marketig & Communications, SA; 1998. P. 189-200.
- ◆ Pizer ES, Jakisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson NE, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Research* 1996; 56: 2745-2747.
- ◆ Polisenio L, Mariani L, Collecchi P, Piras A, Zaccaro L, Rainaldi G. Bcl-2 negative MCF-7 cells overexpress p53: implications for the cell cycle and sensitivity to cytotoxic drugs. *Cancer Chemotherapy Pharmacological* 2002; 50: 127-130.
- ◆ Ponnathpur V, Ibrado AM, Reed JC, Ray S, Huang Y, Self S et al. Effects of modulators of protein kinases on taxol-induced apoptosis of human leukemic cells possessing disparate levels of p26BCL-2 protein. *Clin. Cancer Res.* 1995; 1: 1399-1406.
- ◆ Pozo-Guisado E, Álvarez-Barrientos A, Mulero-Navarro S, Santiago-Josefat B, Fernández-Salguero PM. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. *Biochemical Pharmacology* 2002; 64: 1375-1386.
- ◆ Prall OWJ, Rogan EM, Sutherland RL. Estrogen Regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 1998; 65(1): 169-174.

- ◆ Puzstai L, Ayers M, Simmans FW, Damokosh A, Hess K, Valero V et al. Emerging science: prospective validation of gene expression profiling-based prediction of complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel/FAC chemotherapy in breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22: 1A.
- ◆ Rasbridge SA, Gillett CE, Seymour AM, Patel K, Richards MA, Rubens RD et al. The effects of chemotherapy on morphology, cellular proliferation, apoptosis and oncoprotein expression in primary breast carcinoma. *British Journal Cancer* 1994; 70: 335-341.
- ◆ Reed JC. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(2): 111-121.
- ◆ Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *Journal Cell Biology* 1994; 124:1-6.
- ◆ Reed JC. Bcl-2 family proteins: strategies for overcoming chemoresistance in cancer. En: Kaufmann SH editors. 1ª ed. San Diego. Academic Press. Apoptosis: pharmacological implications and therapeutic opportunities. *Advances in Pharmacology* 1997; 41: 501-532.
- ◆ Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family *Nature* 1997;387: 773-776.
- ◆ Reed SI. Cell cycling? Check your brakes. *Nature Cell Biology* 2002; 4: 199-201.
- ◆ Reigner B, Blesch K, Weidekamm E. Clinical pharmacokinetics of capecitabine. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40: 85-104.
- ◆ Reimer CL, Borrás AM, Kurdistani SK, Garreau JR, Chung M, Aaronson SA et al. Altered regulation of cyclin G in human breast cancer and its specific localization at replication foci in response to DNA damage in p53+/+ cells. *The Journal of biological chemistry* 1999; 274(16): 11022-11029.
- ◆ Reiner A, Neumeister B, Spona J, Reiner G, Schemper M, Jakesz R. Immunocytochemical localization of oestrogen and progesterone

receptors and prognosis in human primary breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 7057-7061.

- ◆ Rekker RF, de Kort H. M. *Eur. J. Med. Chem* 1979; 14: 479.
- ◆ Ren S, Rollins BJ. Cyclin C/cdk₃ promotes Rb-dependent G₀ exit. *Cell* 2004; 117: 239-251.
- ◆ Ringberg A, Anagnostaki L, Anderson H, Idvall I, Fernö M. Cell biological factors in ductal carcinoma in situ (DCIS) breast-relationship to ipsilateral local recurrence histopathological characteristics. *Eur. J. Cancer* 2001; 37: 1514-1522.
- ◆ Rodríguez JR, Rodríguez JR. Ciclo celular. Bases de la quimioterapia. En: Herruzo AJ, Menjón S, Rodríguez-Escudero FJ. *Avances y controversias en Ginecología oncológica en 1998*. 1ª ed. Granada. Proyecto Sur de Ediciones SL; 2000. P. 21-68.
- ◆ Roh H, Pippin JA, Green DW, Boswell CB, Hirose CT, Mokadam N et al. HER2/neu antisense targeting of human breast carcinoma. *Oncogene* 2000; 19: 6138-6143.
- ◆ Román JM, Barrón EM, Martínez P. Diagnóstico precoz y screening. En: Díaz-Rubio E, Escudero M, editors. *Cáncer de mama*. 1ª ed. Madrid: International Marketig & Communications, SA; 1998. P. 39-61.
- ◆ Román JM. La cirugía en el cáncer de mama: desde la mastectomía hasta el tratamiento conservador. En: Díaz-Rubio E, Escudero M, editors. *Cáncer de mama*. 1ª ed. Madrid: International Marketig & Communications, SA; 1998. P.121-130.
- ◆ Romrell LJ, Bland KI. Anatomía de la mama, la axila, la pared torácica y sitios metastásicos relacionados. En: *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P.19-37.
- ◆ Rosenbloom AL. Fisiología de la glándula mamaria: desarrollo y función normales y anormales. En: *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P.38-50.

- ◆ Rowan S, Ludwig RL, Haupt Y, Bates S, Lu X, Oren M et al. Specific loss of apoptotic but not cell-cycle arrest function in a human tumor derived p53 mutant. *EMBO Journal* 1996; 15: 827-838.
- ◆ Rowlands TM, Pechenkina IV, Hatsell S, Cowin P. Beta-catenin and cyclin D1: connecting development to breast cancer. *Cell Cycle* 2004; 3: 145-148.
- ◆ Ruiz E. Manual de patología mamaria. 1ª ed. Barcelona: Editorial JIMS SA; 1993.
- ◆ Russo A, Bazan V, Morello V, Tralongo V, Nagar C, Nuara R, et al. Vimentin expression, proliferating cell nuclear antigen and flow cytometric factors. Prognostic role in breast cancer. *Anal Quant Cytol Histol* 1994; 16: 365-374.
- ◆ Russo IH, Russo J. Hormonal approach to breast cancer prevention. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* 2000; 34: 1-6.
- ◆ Russo J, Russo IH. Desarrollo y aspectos patogenéticos del cáncer de mama humano. En: Pérez López FR, editors. *Cáncer de mama: biología, diagnóstico y tratamiento*. 1ª ed. Zaragoza. SEISGE, 2000. P. 7-16.
- ◆ Ryungsa K, Kazuaki T, Yoko U, Akihiko O, Tetsuya T. The role of HER2 oncoprotein in drug-sensitivity in breast cancer. *Oncology Reports* 2002; 9: 3-9.
- ◆ Salami S, Karami-tehrani F. Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines. *Clinical Biochemistry* 2003; 36: 247-253.
- ◆ Salleh MN, Caldwell J, Carmichael PL. A comparison of gene expression changes in response to diethylstilbestrol of gene expression changes in response to diethylstilbestrol treatment in wild-type and p53^{+/-} hemizygous knockout mice using focussed arrays. *Toxicology* 2003; 185: 49-57.
- ◆ San Miguel A. *Actualidades en análisis clínicos 3*. 1ª ed. Madrid: BIOLECTA, SA; 1991.

- ◆ Sandhu C, Slingerland J. Deregulation of the cell cycle in cancer. *Cancer Detection and Prevention* 2000; 24: 107-118.
- ◆ Saniger E, Campos JM, Entrena A, Marchal JA, Boulaiz H, Aránega A et al. Neighbouring-group participation as the key step in the reactivity of acyclic and cyclic salicyl-derived O,O-acetals with 5-fluorouracil. Antiproliferative activity, cell cycle dysregulation and apoptotic induction of new O,N-acetals against breast cancer cells. *Tetrahedron* 2003; (59): 8017-8026.
- ◆ Saniger E, Campos JM, Entrena A, Marchal JA, Suárez I, Aránega A et al. Medium benzene-fused oxacycles with the 5-fluorouracil moiety: synthesis, antiproliferative activities and apoptosis induction in breast cancer cells. *Tetrahedron* 2003; 59: 5457-5467.
- ◆ Santonja JJ, Sanz E. Establecimiento y mantenimiento de la lactancia. En: Cabero L, editors. *Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción*. 1ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana SA; 2003. P. 462-471.
- ◆ Sartorelli A. Malignant cell differentiation as a potential therapeutic approach. *Br J Cancer* 1985; 52: 293-302.
- ◆ Sasaki K, Matsumura K, Murakami T, Tsuji T. Measurement of bromodeoxyuridine labelling index, Ki-67 score and Ag-NOR count in breast carcinoma. *Oncology* 1992; 49: 147-153.
- ◆ Saunders DE, Lawrence WD, Christensen C, Wappler NL, Ruan H, Deppe G. Paclitaxel-induced apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Int. J. Cancer* 1997; 70: 214-220.
- ◆ Schneider J. Implicaciones pronósticas de la biología molecular en los tumores ginecológicos. En: Herruzo AJ, Rodríguez-Escudero FJ, Comino R, editors. *Avances en Oncología Ginecológica y Mamaria*. 1ª ed. Granada. Proyecto Sur de Ediciones; 1995. P. 39-56
- ◆ Schorr K, Li M, Krajewski S, Reed JC, Furth PA. Bcl-2 gene family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer.

Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 1999; 4(2): 153-164.

- ◆ Semenov DV, Aronov PA, Kuligina EV, Potapenko MO, Richter VA. Oligonucleosomal DNA fragmentation in MCF-7 cells undergoing palmitate-induced apoptosis. *Biochemistry-Biokhimiia* 2003; 68: 1335-1341.
- ◆ Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B, Weinstein B. Multiple functions of p27^{kip1} and its alterations in tumor cells: a review. *Journal of Cellular Physiology* 2000; 183: 18-27.
- ◆ Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000; 60: 3689-3695.
- ◆ Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993; 73: 1059-1065.
- ◆ Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis *Science* 1994; 263: 1143-1145.
- ◆ Shimizu A, Nishida J-I, Ueoka Y, Kato K, Hachiya T, Kuriaki Y et al. Cyclin G contributes to G₂/M arrest of cells in response to DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 242: 529-533.
- ◆ Shinoura N, Yoshida Y, Nishimura M, Muramatsu Y, Asai A, Kirino T et al. Expression level of Bcl-2 determines anti- or proapoptotic function. *Cancer Res* 1999; 59: 4119-4128.
- ◆ Siewicki TM, Boylan JF, Benfield PA, Trainor GL. Cyclin-dependent kinase inhibitors: Useful targets in cell cycle regulation. *Journal of Medicinal Chemistry* 2000; 43(1): 1-18.
- ◆ Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. *Experimental Biology and Medicine* 2003; 228(9): 995-1003.

- ◆ Sirvent JJ, Aguilar MC, Olona M, Pelegrí A, Blázquez S, Gutiérrez C. Prognostic value of apoptosis in breast cancer (pT1-pT2). A TUNEL, p53, bcl-2, bag-1 and Bax immunohistochemical study. *Histology and Histopathology* 2004; 19(3): 759-770.
- ◆ Slingerland J, Pagano M. Regulation of the Cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *Journal of Cellular Physiology* 2000; 183:10-17.
- ◆ Smits VAJ, Medema RH. Checking out the G₂/M transition. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001; 1519: 1-12.
- ◆ Smorenburg CH, Sparreboom A, Bontenbal M, Verweij J. Combination chemotherapy of the taxanes and antimetabolites: its use and limitations. *European Journal of Cancer* 2001; 37: 2310-2323.
- ◆ Sommer S, Fuqua SAW. Estrogen receptor and breast cancer. *Cancer Biology* 2001; 11: 339-352.
- ◆ Speroff L, Glass RH, Kase NG. *Endocrinología ginecológica e infertilidad*. 1^a ed. Madrid: Waverly Hispánica SA; 2000.
- ◆ Stacey DW. Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells *Curr. Opin. Cell Biol* 2003; 15: 1-6.
- ◆ Stanford JL, Szklo M, Brinton LA. Estrogen receptor and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1986; 8: 42-56.
- ◆ Staunton MJ, Gaffney EF. Basic concepts and potential significance in human cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 310-319.
- ◆ Steeg PS, Zhou Q. Cyclins and breast cancer. *Breast Cancer Research* 1998; 52: 17-28.
- ◆ Steinman HM. The bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant. *J Biol Chem* 1995; 270:3487-3490.
- ◆ Stellar H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445-1449.

- ◆ Stepanova EV, Zagrekova EI, Ermilova VD, Turbin AD, Petrovichev NN, Vysotskaia IV et al. Molecular-biological markers as prognostic factors in breast cancer of I-IIA stage. *Arkhiv Patologii* 2003; 65(3): 14-18.
- ◆ Steva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Research* 2004; 6: 109-118.
- ◆ Stewart N, Hicks GG, Paraskevas F, Mowat M. Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* 1995; 10: 109-115.
- ◆ Styblo TM, Wood WC. Factores pronósticos tradicionales para el cáncer de mama. En: *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P.425-433.
- ◆ Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *The Lancet Oncology* 2004; 5: 27-36.
- ◆ Sympath D, Plunkett W. *Curr. Opin. Oncol* 2001; 13: 484.
- ◆ Taguchi T. Clinical application of biochemical modulation in cancer chemotherapy: biochemical modulation for 5-FU. *Oncology* 1997; 54(Suppl.1): 12-18.
- ◆ Takahashi K, Loo G. Disruption of mitochondria during tocotrienol-induced apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 2004; 67: 315-324.
- ◆ Takakashi R, Shimazaki C, Inaba T, Okano A, Hatsuse M, Okamoto A et al. A newly developed bisphosphonate, YM529, is a potent apoptosis inducer of human myeloma cells. *Leukemia Research* 2001; 25: 77-83.
- ◆ Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, et al. Cloning and functional analysis of bag-1: a novel bcl-2 binding protein with anti-death activity. *Cell* 1995; 80: 279-284.
- ◆ Takiuchi H, Ajani JA. Uracil-tegafur in gastric carcinoma: a comprehensive review. *J.Clin. Oncol.* 1998; 16(8): 2877-2885.

- ◆ Tanaka F, Fukuse T, Wada H, Fukushima M. The history, mechanism and clinical use of oral 5-fluorouracil derivative chemotherapeutic agents. *Current Pharmaceutical biotechnology* 2000; 1: 137-164.
- ◆ Tang S-C, Beck J, Murphy S, Chernenko G, Robb D, Watson P et al. BAG-1 expression correlates with bcl-2, p53, differentiation, estrogen and progesterone receptors in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment* 2004; 84: 203-213.
- ◆ Thiantanawat A, Long BJ, Brodie AM. Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Research* 2003; 63(22): 8037-8050.
- ◆ Thor AD, Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC et al. ErbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 1998; 90(18): 1346-1360.
- ◆ Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of Her-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30 year follow up. *J. Clin. Oncol* 1992; 10: 1044-1048.
- ◆ Tokunaga E, Oda S, Fukushima M, Maehara Y, Sugimachi K. Differential growth inhibition by 5-fluorouracil in human colorectal carcinoma cell lines. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1998-2006.
- ◆ Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 1979; 76: 4350-4354.
- ◆ Tsihlias J, Kapusta L, Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annual Review of Medicine* 1999; 50: 401-423.
- ◆ Van Poznak C, Tan L, Panageas KS, Arroyo CD, Hudis C, Norton L et al. Assessment of molecular markers of clinical sensitivity to single-agent taxane therapy for metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20(9): 2319-2326.

- ◆ Vaux DL. Toward an understanding of the molecular mechanism of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 786-789.
- ◆ Veronesi U. Cirugía conservadora y radioterapia en la enfermedad estadios I y II: la experiencia europea. En: Bland KI, Copeland III EM editors. *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana SA; 2000. P. 1209-1214.
- ◆ Viallard JF, Lacombe F, Belloc F, Pellegrin JL, Reiffers J. Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire: aspects fondamentaux et implications en cancérologie. *Cancer/Radiother* 2001; 5:109-129.
- ◆ Voeller DM, Zajac-Kaye M, Fisher RJ, Allegra CJ. The identification of thymidylate synthase peptide domains located in the interface region that bind thymidylate synthase mRNA. *Biochemical and Biophysical Research communications* 2002; 297:24-31.
- ◆ Walker PR, Weaver VM, Lach B, LeBlanc J, Sikorska M. Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. *Exp. Cell Res* 1994; 100-106.
- ◆ Wang SC, Hung MC. HER2 overexpression and cancer targeting. *Seminars in Oncology* 2001; 28(Suppl 16): 115-124.
- ◆ Warri AM, Houvinen RL, Laine AM, Martikainen PM, Härkönen PL. Apoptosis in toremifene-induced growth inhibition of human breast cancer cells in vivo and in vitro. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1412-1418.
- ◆ Watson Ph, Pon RT, Shiu RP. Inhibition of c-myc expression by phosphorothioate antisense oligonucleotide identifies a critical role for c-myc in the growth of human breast cancer. *Cancer Research* 1991; 51: 3996-4000.
- ◆ Webb SJ, Harrison DJ, Wyllie AH. Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. En: Kaufmann SH editors. 1ª ed. San Diego. Academic Press. *Apoptosis: pharmacological implications and therapeutic opportunities*. *Advances in Pharmacology* 1997; 41: 1-34.

- ◆ Welsh J. Induction of apoptosis in breast cancer cells in response to vitamin D and antiestrogens. *Cell Biol.* 1994; 72: 537-545.
- ◆ Welsh SJ, Titley J, Brunton L, Valenti M, Monaghan P, Jackman AL et al. Comparison of thymidylate synthase (TS) protein up-regulation after exposure to TS inhibitors in normal and tumor cell lines and tissues. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 2538-2546.
- ◆ Winer EP, Morrow M, Osborne CK, Harris JR. Cancer of the Breast. En: De vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 6^a ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
- ◆ Wittliff J. Steroid hormone receptors in breast cancer. *Cancer* 1984; 53: 630-643.
- ◆ World Health Organization. Histologic typing of breast tumors, 2^a ed. International Histological classification of tumours, n^o 2. Génova: World Health Organization, 1981.
- ◆ Wu J, Shen ZZ, Lu JS, Jiang M, Han QX, Fontana JA et al. Prognostic role of p27^{kip1} and apoptosis in human breast cancer. *British Journal of Cancer* 1999; 79: 1572-1578.
- ◆ Wu X, Fan Z, Masui H, Rosen N, Mendelsohn J. Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J.Clin. Invest.* 1995; 95:1897-1905.
- ◆ Xercavins J, Salicrú S, Sabadell MD. Cáncer de mama I. Epidemiología y factores de riesgo. Prevención primaria. Diagnóstico precoz. Lesiones no palpables. Clínica y desarrollo. Clasificación TNM. Biología del carcinoma mamario (marcadores). En: Cabero L, editors. *Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción*. 1^a ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana SA; 2003. P. 1692-1702.
- ◆ Yam CH, Fung TK, Poon RYC. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cellular and Molecular Life Science* 2002; 59: 1317-1326.

- ◆ Yang B, Eshleman JR, Berger NA, Markowitz SD. Wild-type p53 protein potentiates cytotoxicity of therapeutic agents in human colon cancer cells. *Clinical Cancer Research* 1996; 2: 1649-1657.
- ◆ Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for bcl-xl and bcl-2, displaces bax and promotes cell death. *Cell* 1995; 80: 285-291.
- ◆ Yang HY, Zhou BP, Hung MC, Lee M-H. Oncogenic signals of HER-2/neu in regulating the stability of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(32): 24735-24739.
- ◆ Yang KP, Samaan NA. Reduction of estrogen receptor concentration in MCF-7 human breast carcinoma cells following exposure to chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 1983; 43(8): 3534-3538.
- ◆ Yang QF, Sakurai T, Yoshimura G, Shan L, Suzuma T, Tamaki T. Expression of bcl-2 but not bax or p53 correlates with in vitro resistance to a series of anticancer drugs in breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment* 2000; 61: 211-216.
- ◆ Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2001; 2: 127-137.
- ◆ Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; 352: 345-347.
- ◆ Yoshikawa R, Kusonoki M, Yanagui H, Noda M, Furuyama J, Yamamura T et al. Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: A novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. *Cancer Res* 2001; 61: 1029-1037.
- ◆ Young-Ae K, Byung C, Yong L, Dong P, Sook-Hee R, Kun-Young P et al. Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells. *Oncology Reports* 2004; 11(2): 441-446.

- ◆ Yu D, Jing T, Liu B, Yao J, Tan M, McDonnell TJ et al. Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21^{Cip1}, which inhibits p34^{Cdc2} kinase. *Mol Cell* 1998; 2: 581-591.
- ◆ Yukimoto K, Nakata B, Muguruma K, Yashiro M, Ohira M, Ishikawa T et al. Apoptosis and thymidylate synthase inductions by 5-fluorouracil in gastric cancer cells with or without p53 mutation. *International Journal of Oncology* 2001; 19(2): 373-378.
- ◆ Zamora P, Espinosa E, González M. Cáncer de mama. Clasificación y concepto. *Medicine* 2001; 8(57): 3041-3049.
- ◆ Zapata JM, Krajewski S, Huang R-P, Takayama S, Wang H-G, Adamson E et al. Expression of multiple apoptosis-regulatory genes in human breast cancer cell lines and primary tumors. *Breast Cancer Research and Treatment* 1998; 47: 129-140.
- ◆ Zhang JY. Apoptosis-based anticancer drugs. *Nature Reviews* 2002; 1: 101-102.
- ◆ Zhou BP, Hung M-C. Dysregulation of cellular signaling by HER-2/neu in breast cancer. *Seminars in Oncology* 2003; 30(Suppl 16): 38-48.
- ◆ Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21^{cip1/waf1} by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nature Cell Biology* 2001; 3: 245-252.
- ◆ Zhu J, Zhang S, Jiang J, Chen X. Definition of the p53 functional domains necessary for inducing apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275(51): 39927-39934.
- ◆ Ziller C, Lincet H, Muller CD, Staedel C, Behr JP, Poulain L. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{cip1/waf1} enhances the cytotoxicity of ganciclovir in HSV-tk transfected ovarian carcinoma cells. *Cancer Letters* 2004; 212: 43-52.
- ◆ Zufía L, Aldaz A, Giráldez J. Simple determination of capecitabine and its metabolites by liquid chromatography with ultraviolet detection in a single injection. *Journal of Chromatography B* 2004; 809: 51-58.

- ◆ Zunino F, Perego P, Pilotti S, Pratesi G, Supino R, Arcamone F. Role of apoptotic response in cellular resistance to cytotoxic agents. *Pharm Ther* 1997; 76: 177-185.