

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA LEGAL, TOXICOLOGÍA Y  
PSIQUIATRÍA  
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS  
ALIMENTOS JOSÉ MATAIX VERDÚ  
COMPLEJO HOSPITALARIO DE JAÉN



ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN RESPUESTA A  
LA QUIMIOTERAPIA Y SU RELACIÓN CON EL ESTRÉS  
OXIDATIVO EN EL CÁNCER DE MAMA

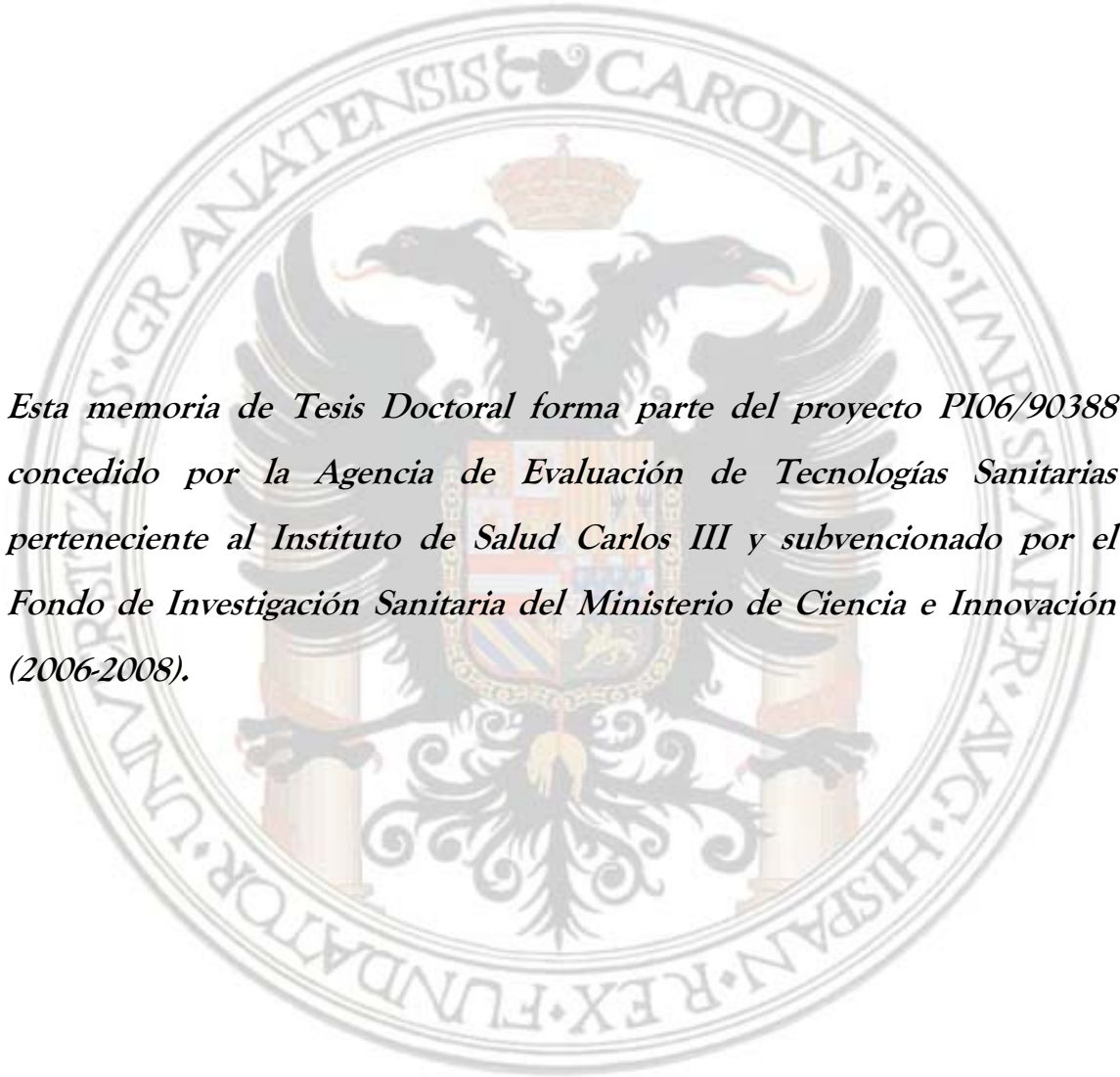
TESIS DOCTORAL

LAURA VERA RAMÍREZ

2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Laura Vera Ramírez  
D.L.: GR. 1801-2009  
ISBN: 978-84-692-1336-0



The seal of the University of Granada is a circular emblem. It features a central shield with a crown on top, flanked by two eagles with their wings spread. The shield is supported by two columns. The entire emblem is surrounded by a circular border containing the Latin text "UNIVERSITATIS GRANATENSIS CAROLVS RO IMPER AVG HISPAN R EX FVNDATOR".

*Esta memoria de Tesis Doctoral forma parte del proyecto PI06/90388  
concedido por la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias  
perteneiente al Instituto de Salud Carlos III y subvencionado por el  
Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Ciencia e Innovación  
(2006-2008).*





D. José Antonio Lorente Acosta. Profesor Titular de Universidad. Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Psiquiatría, Universidad de Granada.

D. Pedro Sánchez Rovira. Jefe de Servicio. Servicio de Oncología Médica, Complejo Hospitalario de Jaén.

D. José Luis Quiles Morales. Profesor Titular de Universidad. Departamento de Fisiología, Universidad de Granada.

#### **CERTIFICAN:**

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: **“Análisis del perfil de expresión génica en respuesta a la quimioterapia y su relación con el estrés oxidativo en el cáncer de mama”**, han sido realizados bajo nuestra dirección por la licenciada en Bioquímica y Biología D<sup>a</sup>. Laura Vera Ramírez y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada con el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada a seis de Febrero de dos mil nueve.

Dra. D José Antonio Lorente Acosta

Dr. D. Pedro Sánchez Rovira

Dr. D. José Luis Quiles Morales





MEMORIA QUE PRESENTA LA LDA. LAURA VERA RAMÍREZ PARA ASPIRAR  
AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Dr. D. José Antonio Lorente Acosta

Dr. D. Pedro Sánchez Rovira

Dr. D. José Luis Quiles Morales

Lda. D<sup>a</sup>. Laura Vera Ramírez

Granada, 2009



# ÍNDICE GENERAL

	Página
ABREVIATURAS	19
RESUMEN	23
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	27
INTRODUCCIÓN	33
I. Aspectos generales del cáncer de mama	35
I.1 Epidemiología del cáncer de mama.	35
I.1.1 Incidencia	35
I.1.2 Supervivencia	35
I.1.3 Mortalidad	37
I.2 Factores de riesgo del cáncer de mama	38
I.2.1 Edad	39
I.2.2 Raza	40
I.2.3 Historia ginecológica	40
I.2.4 Patología mamaria benigna	42
I.2.5 Historia familiar	43
I.2.6 Patrón mamográfico	44
I.2.7 Anticonceptivos orales	44
I.2.7 Terapia hormonal sustitutiva	38
I.2.8 Peso	47
I.2.9 Dieta	47
I.2.10 Ingesta de vitaminas	51
I.2.11 Ejercicio	52
I.2.12 Alcohol	53
I.2.13 Tabaco	54
I.2.14 Radiación	55
I.2.15 Xenoestrógenos y contaminantes ambientales	56
I.3 Oncogénesis molecular	57
I.3.1 Iniciación	58
I.3.2 Promoción	60
I.3.3 Progresión	68

I.4 Historia natural	71
I.5 Detección precoz	72
I.6 Clínica y diagnóstico en el cáncer de mama	73
I.7 Tipos histológicos	74
I.7.1 Carcinoma <i>in situ</i>	74
I.7.2 Carcinoma invasivo	74
I.7.2.1 Carcinoma ductal infiltrante	74
I.7.2.2 Carcinoma lobulillar infiltrante	75
I.7.2.3 Carcinoma mixto	75
I.7.2.4 Enfermedad de Paget	75
I.8 Pronóstico del cáncer de mama	76
I.9 Tratamiento del cáncer de mama	76
I.9.1 Cirugía	77
I.9.2 Radioterapia	80
I.9.3 Hormonoterapia	81
I.9.4 Quimioterapia	82
I.9.5 Terapia biológica	85
I.9.6 Inmunoterapia	86
I.9.7 Terapia génica	86
II. Estrés oxidativo y mecanismos de defensa antioxidante en el cáncer de mama.	
Implicaciones patológicas y terapéuticas	88
II.1 El balance oxidativo	88
II.2 Tipos de radicales libres y especies reactivas de oxígeno	88
II.2.1 Anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )	88
II.2.2 Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )	89
II.2.3 Radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ )	89
II.2.4 Óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ )	90
II.2.5 Peroxinitrito ( $ONOO^-$ )	90
II.2.6 Otros radicales libres	90
II.3 Daños celulares producidos por los radicales libres	92
II.3.1 Efectos sobre los lípidos. Peroxidación lipídica (PL)	92
II.3.2 Efectos sobre las proteínas	93
II.3.3 Efectos sobre los hidratos de carbono	93

II.3.4 Efectos sobre el material genético	93
II.3.4.1 Daño en el ADN mitocondrial (ADNmt)	94
II.3.4.2 Daño en el ADN nuclear	94
II.4 Sistema de defensa antioxidante	95
II.4.1 Sistema de defensa antioxidante no enzimático	96
II.4.1.1 Antioxidantes extracelulares	96
II.4.1.2 Vitamina E	96
II.4.1.3 Coenzima Q	97
II.4.1.4 Glutacion	98
II.4.1.5 Carotenoides	98
II.4.1.6 Flavonoides	98
II.4.2 Sistema de defensa antioxidante enzimático	99
II.4.2.1 Superóxido dismutasa (SOD)	99
II.4.2.2 Catalasa (CAT)	99
II.4.2.3 Glutacion peroxidasas (GPx)	100
II.4.2.4 Tiorredoxina (TRX)	101
II.5 Sistema de reparación del ADN	101
II.6 El daño oxidativo en la carcinogénesis, invasión y metástasis en el cáncer de mama	105
II.6.1 Iniciación	106
II.6.2 Promoción	107
II.6.2.1 Radicales libres y proliferación celular	107
II.6.3 Progresión	120
II.6.3.1 Radicales libres, angiogénesis y metástasis	113
II.7 Metodología para el estudio de los marcadores de estrés oxidativo y defensa antioxidante	115
II.7.1 Análisis del daño oxidativo en lípidos	116
II.7.2 Análisis del daño oxidativo en proteínas.	117
II.7.3 Análisis del daño oxidativo en el ADN	118
II.7.3 Técnicas para el análisis de antioxidantes	119
II.7.4.1 Capacidad de unión al hierro	119
II.7.4.2 Ceruloplasmina	119
II.7.4.3 Capacidad antioxidante total del plasma	119



II.7.4.4 Antioxidantes hidrosolubles	120
II.7.4.5 Antioxidantes liposolubles	120
II.7.4.6 Enzimas antioxidantes	120
II.7.4.7 Agentes soporte de los antioxidantes	120
III. Estudio del perfil de expresión génica para la identificación de nuevos factores pronósticos y predictivos aplicados al tratamiento del cáncer de mama	121
III.1 Técnicas de alto rendimiento para el estudio de la expresión génica	121
III.1.1 Tecnología de microarrays	121
III.1.2 PCR a tiempo real	124
III.1.3 Análisis de datos	126
III.2 Aplicación de la tecnología de microarrays de ADN al estudio del cáncer de mama	128
III.2.1 Clasificación molecular del cáncer de mama	129
III.2.2 Predicción del potencial metastásico del cáncer de mama primario	131
III.2.3 Predicción de la respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer de mama	138
III.3 Estandarización de los trabajos con microarrays	141
III.4 PCR a tiempo real. Una técnica de alto rendimiento alternativa para el análisis de la expresión génica aplicada al estudio del cáncer de mama	142
III.5 Metodología para la traslación de la investigación genómica a la práctica clínica en tratamiento del cáncer de mama	146
MATERIAL Y MÉTODOS	149
I. Diseño experimental	151
II. Cálculo del tamaño muestral	152
II.1 Cálculo del tamaño muestral para el análisis de la variabilidad génica mediante microarrays de oligonucleótidos	152
II.2 Cálculo del tamaño muestral para la evaluación del balance oxidativo	153
III. Población de estudio	153
III.1 Criterios de inclusión	153
III.1.1 Criterios de inclusión generales	154
III.1.2. Criterios de inclusión específicos	155
III.1.2.1 Pacientes neoadyuvantes	155
III.1.2.2 Pacientes adyuvantes	155

III.1.2.3 Pacientes metastásicas	155
III.1.3 Criterios de exclusión	156
IV. Consideraciones éticas	156
V. Análisis de variables clínicas e histopatológicas	157
V.1 Variables clínicas	157
V.2 Variables histopatológicas	158
V.2.1 Procesamiento de tejido mamario y tinción inmunohistoquímica	159
V.2.1.1 Material	159
V.2.1.2 Método	161
V.2.2 Caracterización anatomopatológica de muestras de tejido mamario ultracongeladas	165
V.2.2.1 Material	165
V.2.2.2 Método	166
VI. Análisis del balance oxidativo	169
VI.1 Extracción de plasma y linfocitos de sangre periférica	170
VI.1.1 Fundamento	170
VI.1.2 Material	170
VI.1.3 Método	171
VI.2 Análisis del daño oxidativo en el ADN de linfocitos de sangre periférica	171
VI.2.1 Fundamento	171
VI.2.2 Material	172
VI.2.3 Método	173
VI.2.4 Cálculos y expresión de los resultados	175
VI.3 Análisis de la actividad reparadora del ADN	175
VI.3.1 Extracción de la fracción proteica del compartimento nuclear de linfocitos de sangre periférica	175
VI.3.1.1 Fundamento	175
VI.3.1.2 Material	176
VI.3.1.3 Método	176
VI.3.2 Cuantificación de proteínas nucleares	176
VI.3.2.1 Fundamento	176
VI.3.2.2 Material	177
VI.3.2.3 Método	177

VI.3.2.4 Cálculos y expresión de los resultados	177
VI.3.3 Determinación de la actividad enzimática de las proteínas nucleares Ku68 y RPA	178
VI.3.3.1 Fundamento	178
VI.3.3.2 Material	178
VI.3.3.3 Método	179
VI.3.3.4 Cálculos y expresión de los resultados	180
VI.4 Determinación de la concentración de proteínas totales en plasma	180
VI.4.1 Fundamento	180
VI.4.2 Material	180
VI.4.3 Método	180
VI.4.4 Cálculos y expresión de los resultados	181
VI.5 Cuantificación del contenido de proteínas carbonilo en el plasma	181
VI.5.1 Fundamento	181
VI.5.2 Material	181
VI.5.3 Método	181
VI.5.4 Cálculos y expresión de los resultados	182
VI.6 Análisis de la concentración de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)	182
VI.6.1 Fundamento	182
VI.6.2 Material	183
VI.6.3 Método	183
VI.6.4 Cálculos y expresión de los resultados	183
VI. 7 Determinación de la capacidad antioxidante total del plasma	184
VI.7.1 Fundamento	184
VI.7.2 Material	184
VI.7.3 Método	185
VI.7.4 Cálculos y expresión de los resultados	185
VI.8 Extracción y determinación de antioxidantes liposolubles mediante HPLC	186
VI.8.1 Fundamento	186
VI.8.2 Material	186
VI.8.3 Método	187
VII. Tratamiento estadístico de los resultados	188

VIII. Análisis del perfil de expresión génica	189
VIII.1 Envío de las muestras	189
VIII.2 Extracción de ARN total	190
VIII.2.1 Procesamiento de las muestras	190
VIII.2.2 Medida de la concentración y pureza del ARN	191
VIII.2.3 Visualización de la integridad del ARN	191
VIII.3 Análisis genómico	192
VIII.3.1 Microarrays de oligonucleótidos	192
VIII.3.2 Síntesis de ARNc biotinilado	193
VIII.3.2.1 Síntesis de ADNc	193
VIII.3.2.2 Síntesis de ARNc y marcaje con biotina	194
VIII.3.2.3 Purificación del ARNc	194
VIII.3.3 Fragmentación del ARNc biotinilado	194
VIII.3.4 Hibridación con los chips	195
VIII.3.5 Lavado, tinción y escaneado	195
VIII.3.5.1 Lavado	195
VIII.3.5.2 Tinción	195
VIII.3.5.3 Escaneado	196
VIII.4 Análisis bioinformático	196
VIII.4.1 Controles de calidad	196
VIII.4.1.1 Controles <i>spike</i>	196
VIII.4.1.2 Genes domésticos o controles <i>housekeeping</i>	197
VIII.4.1.3 <i>P call %</i>	197
VIII.4.1.4 <i>Array Outlier</i>	197
VIII.4.1.5 <i>Gráficas NUSE</i>	197
VIII.4.1.6 Escalado de los datos	198
VIII.4.2 Normalización de los datos por el método RMA	198
VIII.4.2.1 Primer filtrado de los datos	199
VIII.4.2.2 Normalización	199
VIII.4.2.3 Segundo filtrado de los datos	199
VIII.4.3 Aplicación de herramientas bioinformáticas para la obtención de diferencias en la expresión génica en las muestras	199
VIII.4.3.1 Análisis estadístico	200

VIII.4.3.2 Análisis de Componentes principales y Clúster jerárquico	201
VIII.4.3.3 Análisis complementarios	202
VIII.5 Análisis funcional <i>Functional enrichment</i>	202
VIII.5.1 Análisis <i>Functional enrichment</i> con el programa PANTHER	203
VIII.5.2 Análisis <i>Functional enrichment</i> con el programa DAVID	204
RESULTADOS	207
I. Análisis de variables clínicas e histopatológicas	209
I.1 Variables clínicas	209
I.1.1 Caracterización de la población de estudio	209
I.1.2 Estudio de la influencia de la quimioterapia sobre los parámetros bioquímicos de pacientes con cáncer de mama	211
I.2 Variables histopatológicas	214
I.2.1 Caracterización del tipo histológico y análisis inmunohistoquímico de las muestras de tejido tumoral	214
I.2.2 Análisis morfológico de las biopsias de tejido mamario antes y después del tratamiento	214
II. Análisis del balance oxidativo	218
II.1 Daño oxidativo en el ADN de linfocitos de sangre periférica	218
II.2 Actividad de las enzimas reparadoras del ADN	219
II.3 Contenido de proteínas carbonilo en plasma	220
II.4 Análisis de la concentración de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)	220
II.5 Capacidad antioxidante total del plasma	
II.6 Concentración de vitaminas liposolubles en plasma sanguíneo	221
III Análisis de la expresión génica	222
III.1 Extracción de ARN total	225
III.2 Síntesis y fragmentación de ARNc biotinilado. Preparación de las mezclas de hibridación	227
III.3 Análisis de los controles de calidad	229
III.3.1 Control de calidad de los procesos de hibridación y escaneado	229
III.3.2 Control de calidad de los datos derivados de los microarrays Human Genome U133Plus2.0.	231
III.4 Normalización y filtrado de los datos de los microarrays	234

III.5 Análisis de la influencia de variables biológicas y no biológicas sobre los resultados de los microarrays	234
III.6 Análisis estadístico	235
III.7 Análisis de PCA y Clúster jerárquico no supervisado	238
III.8 Análisis de PCA y Clúster jerárquico supervisado	240
III.9 Análisis funcional <i>Functional enrichment</i>	242
III.9.1 Análisis con el programa Panther	242
III.9.2 Análisis con el programa DAVID	244
DISCUSIÓN	247
CONCLUSIONES	291
BIBLIOGRAFÍA	295
ANEXO	323



## ABREVIATURAS

8-OH-G: 8-hidroxiguanina	CMF: ciclofosfamida-metotrexato-5-fluorouracilo
A: adyuvancia	CMLs: células musculares lisas
ABS: albúmina bovina sérica	COL1: colágeno tipo 1
ABTS <sup>++</sup> : 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	COL1A1: cadena pro- $\alpha$ del COL1
ACr: aclaramiento de creatinina	COX: cicloxigenasa
ADN mt: ADN mitocondrial	CV: coeficiente de variación
ADN: ácido desoxirribonucleico	CYR61: cysteine-rich angiogenic inducer 61
ADNc: AND complementario	DAB: 3,3'-diaminobencidina tetrahydrocloruro
ADY1: grupo de adyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia	DAG: diacilglicerol
ADY2: grupo de adyuvancia después del tratamiento con quimioterapia	DAPI: 4,6- diamidino-2- fenil indol
AG: ácidos grasos	DAVID: Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
AGPI: ácidos grasos poliinsaturados	DCIS: carcinoma ductal in situ
AGS: ácidos grasos saturados	DDE: cloredifenildicloroetano
AJCC: American Joint Committee for Cancer Staging	DDT: 2,2-bis(p-clorofenil)-1,1,1 tricloroetano
ALAT: alanina amino transferasa	DMSO: dimethyl sulfoxide
AMPc: adenosín monofosfato cíclico	DNPH: 2,4-dinitrobencilhidracina
AP: anatomopatológico	DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina
AP-liasa: apúrica/apirimidínica-liasa	DOc: densidad óptica corregida
ARN: ácido ribonucleico	DTT: ditiotreitól
ARNc : ARN complementario	EBCTCG: Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group
ARNm: ARN mensajero	EEM: error estándar de la media
ASAT: aspartato amino transferasa	EGF : epidermal growth factor
ASK1: apoptosis signal-regulating kinase 1	EGR1: early growth response 1
BC: bilirrubina conjugada	EGRFR: EGF receptor
BCA: ácido bicinconínico	ELN: elastin
BMP/GDF/MIS: bone morphogenic protein /growth and differentiation factor / mullerian inhibitor substance	EMAP: echinoderm microtubule-associated protein
BPC: bifenilos policlorados	EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer
BRCA1: breast cancer 1	EPIC: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
BRCA2: breast cancer 2	ERCC1: excision repair cross-complementing 1
BSA: albúmina bovina sérica	EREs: estrogen responsive elements
BT: bilirrubina total	ERKs: extracelular-regulated kinases
C.I.D: componente intraductal	ERN: especies reactivas del nitrógeno
C.I: componente infiltrante	ERO: especies reactivas del oxígeno
CDKIs: CDK inhibitors	ESMS: ionización electrospray
CDKN2: cyclin dependent kinase inhibitor 2	EUROCARE: European Concerted Action on Survival and Care of Cancer Patients
CDKs: cyclin dependent kinases	FAK: focal adhesion kinase
c-fos: c-fos murine retroviral oncogene homolog	FBLN1. fibulin 1
CILP2: cartilage intermediate layer protein 2	



FC: fold change  
Fd: factor de dilución  
FDR: false discovery rate  
FGF: fibroblast growth factor  
FLRT2: fibronectin leucine rich transmembrane protein 2  
Fz: frizzled  
GADPH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa  
GALNT13: UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13  
GAS1: growth arrest specific 1  
GEM: GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle  
GGT: gamma glutamil transferasa  
GH: growth hormone  
GPx: glutation peroxidasas  
GSH: glutation reducido  
GSSG: glutation oxidado  
GTP: guanosín-trinucleótido fosfato  
HDL: high density lipoprotein  
HH: hedgehog  
HIF 1: hipoxic inducible factor 1  
HMNC1: hemicentin 1)  
HPLC: high performance liquid chromatography  
HPLC-EC: high performance liquid chromatography-electrochemical detection  
HRAS: harvey rat sarcomal viral oncogene  
HRP: peroxidasa de rábano  
HSP27: heat shock protein 27  
IARC: International Agency for Research on Cancer  
IGF: insulin growth factor  
IGF-BPs: IGFs binding proteins  
IHHQ= inmunohistoquímico  
IL: Interlequina  
IMC: índice de masa corporal  
INE: Instituto Nacional de Estadística  
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible  
IP3: iositol triphosphate  
IP3K: inositol phosphatidil 3-kinase  
JNK: c-jun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase  
JNK: janus tirosin kinase  
LCIS: carcinoma lobulillar in situ  
LC-MS: liquid chromatography-mass spectrometry  
LDH: lactato deshidrogenasa  
LDL: low density lipoprotein  
lob 2: lóbulos tipo 2  
lob 3: lóbulos tipo 3  
lob 4: lóbulos tipo 4)  
lob1: lóbulos tipo 1  
LOH: loss of heterocycosity  
LOX: lipoxigenasa  
LSN: límite superior normal  
M: metástasis  
MAPKKs: mitogen activated protein kinase kinases  
MAPKs: mitogen activated protein kinases  
MES: Ácido morfolinoetanosulfónico  
MET1: grupo de metástasis antes del tratamiento con quimioterapia  
MET2: grupo de metástasis después del tratamiento con quimioterapia  
MIAME: Minimum Information About a Microarray Experiment  
MINDACT: Microarray in Node Negative Disease may Avoid Chemotherapy  
MKP1: MAPK phosphatase 1  
MMPs: matrix metalloproteases  
MRCK: myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase  
mTOR: mammalian target of rapamycin  
N: neoadyuvancia  
NCI: National Cancer Institute  
NDFIP1: nedd 4 family interacting protein 1  
NEO1: grupo de neoadyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia  
NEO2: grupo de neoadyuvancia después del tratamiento con quimioterapia  
NF- $\kappa$ B: necrosis factor- $\kappa$ B  
NOS: not otherwise specified  
NOS: óxido nítrico sintasas  
NOV: nephroblastoma overexpressed  
NOX: NADPH oxidasa  
Nrf2: NF-E2-related factor 2  
NRP1: neuropilina 1  
NSABP: National Surgical Adjuvant and Bowel Project  
NUSE: normalized unscaled standard error  
OGN: osteoglycin  
PA: fosfatasa alcalina  
PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1  
PANTHER: Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships  
PCA: análisis de componentes principales

PCDH7: protocadherina 7	SPATA18: spermatogenesis associated 18 homolog
PCNA: proliferating celular nuclear antigen	SPOND1: spondin F o spondin 1
PCR: reacción en cadena de la polimerasa	SSG1: Steroids Sensitive Gene 1
PDGF: plateled derived growth factor	SSPN: sarcospan
PDGFRL: PDGF receptor like	STAT: signal transducers and transcription activators
PIP2: fosfatidil-inositol-4,5-bifosfate	STEAP: six-transmembrane epithelial antigen of the prostate
PIP3: phosphatidil-inositol 3-phosphate	T/FAC: paclitaxel-fluorouracilo-doxorrubicina-ciclofosfamida
PKB/AKT: protein kinase B/v-akt murine thymoma viral oncogene homolog	TAILORx: Assigning Individualized Options for Treatment (Rx)
PKC: protein kinase C	TBA: ácido tiobarbitúrico
PKD1: protein kinase D 1	TBARS: sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
PKG: proteína kinase G	TF: factor tisular
PL: peroxidación lipídica	TG: terapia génica
PLC $\gamma$ phospholipase C $\gamma$	TGF $\alpha$ : transforming growth factor $\alpha$
PODN: podocan	TGF- $\beta$ : transforming growth factor $\beta$
PREs: progesterone responsive elements	THS: terapia hormonal sustitutiva
PRL: prolactina	TRANSBIG : TRANSLating molecular knowledge into early breast cancer management: builging on the Breast International Group network for improved treatment tailoring
PTEN: phosphatase and tensin homolog	TRX: tiorredoxina
PUR $\alpha$ : purine-rich element binding protein $\alpha$	uPA: urokinase plasminogen activator
qPCR: PCR cuantitativa	VEGF: vascular endotelial growth factor
QT: quimioterapia	Wnt: wingless type
RAB11-FIP2: RAB11 family interacting protein 2 (Class I)	X <sub>Doc</sub> : media de la densidad óptica corregida
RAN: recuento absoluto de neutrófilos	XPA: xeroderma pigmentosum complementation group A protein
RASGRF2: Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 2	XPF-: xeroderma pigmentosum complementation group F protein
RB: gen del retinoblastoma	XPG: xeroderma pigmentosum complementation group G protein
RE: receptor de estrógenos	XRCC1: X-ray cross-complementing group 1
REB: reparación por escisión de bases nitrogenadas	ZHF4: zinc finger-homeodomain 4
REN: reparación por escisión de nucleótidos	
RMA: robust multichip average	
RP: receptor de progesterona	
RPA: replication protein A	
RPc: respuesta patológica completa	
RR: riesgo relativo	
RS: recurrence score	
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real	
SFRP4: secreted frizzled related protein 4	
SHBG: sex hormone-binding globuline	
SLR: small leucine rich	
SMOC2: SPARC related modular calcium binding 2	
SOCS5: suppressor of cytokine signaling 5	
SOD: superóxido dismutasa	
SPARC1: secreted protein acidic and rich in cystein)	



## RESUMEN

**Introducción.** El cáncer de mama es el cáncer más frecuente y la primera causa de muerte por cáncer entre las mujeres de todo el mundo. Las tasas de incidencia de esta enfermedad muestran una marcada variabilidad geográfica, siendo máxima en países industrializados, lo que sugiere que el estilo de vida es un factor de riesgo de elevada influencia. Además de los factores de riesgo ambientales, factores de riesgo endógenos, como la edad, la raza, la historia ginecológica, la historia familiar o el patrón mamográfico, determinan individualmente el riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria.

El cáncer es el resultado de la proliferación no controlada de un grupo de células que, posteriormente y como estrategia de supervivencia, adquieren cierta capacidad invasiva que les permite migrar y colonizar otros tejidos y órganos. El origen de estos eventos proliferativos es conocido como oncogénesis y se divide en tres etapas principales denominadas iniciación, promoción y progresión. A lo largo de estas tres etapas se producen una serie de aberraciones cromosómicas y alteraciones génicas, que dan lugar a una lesión en el tejido mamario que crece exponencialmente con respecto al tiempo hasta alcanzar un volumen tal, que la tasa de crecimiento es estabilizada. El mecanismo biológico que origina el enlentecimiento en el crecimiento del tumor, se basa en la incapacidad de la vascularización pre-existente para satisfacer la demanda de oxígeno y nutrientes de las células neoplásicas en intensivo crecimiento. Consecuentemente, el microambiente tumoral se caracteriza por un marcado estrés oxidativo, fruto de la hipoxia y la elevada tasa de crecimiento celular, que contribuye a la transformación y evolución de la enfermedad. Además, es necesario señalar que existen fuentes exógenas de radicales libres, entre las que destaca el tratamiento con citostáticos, que podrían influir en la progresión de la enfermedad y el resultado clínico de la paciente en tratamiento.

El estrés oxidativo define una situación fisiológica producto del desequilibrio entre la actividad de los sistemas de defensa antioxidante y producción de radicales libres, a favor de estos últimos. Por su avidez para aceptar electrones de otras moléculas, los radicales libres pueden modificar la estructura y/o la función de éstas, actuando sobre componentes estructurales como la membrana plasmática y sobre procesos críticos intracelulares, entre los que se incluyen la maquinaria genética y diversos procesos enzimáticos. De este modo, los radicales libres intervienen durante todo el proceso oncogénico e igualmente favorecen la dispersión y migración celular, pues modifican la expresión y/o actividad de genes que codifican

proteínas implicadas en el crecimiento tumoral, factores de transcripción, oncogenes y genes supresores de tumores, caspasas y proteínas implicadas en la angiogénesis y metástasis.

Tras la publicación de los resultados del Proyecto Genoma Humano, hemos asistido a una verdadera revolución tecnológica que ha permitido el desarrollo de herramientas de análisis de alto rendimiento como los microarrays de ADNc, microarrays de oligonucleótidos y la RT-PCR múltiple. Esta tecnología ha sido aplicada en los últimos años al estudio del cáncer de mama, dando lugar a trabajos que originaron una taxonomía molecular de las neoplasias mamarias con implicaciones terapéuticas y a la identificación de un grupo selecto de genes o firma genómica, con capacidad para predecir la respuesta al tratamiento sistémico del cáncer de mama o el pronóstico de la enfermedad. El empleo de esta tecnología es adecuado para la identificación de nuevas dianas terapéuticas, especialmente útiles en aquellos casos de pobre pronóstico y en los que una respuesta satisfactoria al tratamiento es improbable.

**Objetivos.** El **objetivo principal** de este trabajo fue identificar aquellos genes cuya expresión es modulada por el tratamiento con quimioterapia, para investigar los mecanismos moleculares de respuesta a fármacos antineoplásicos y las principales rutas de transducción de señales intracelulares implicadas en los mismos. Los **objetivos secundarios** de este trabajo fueron estudiar el impacto del estrés oxidativo sistémico sobre los cambios de expresión génica inducidos por la quimioterapia, analizar el nivel de daño oxidativo y respuesta antioxidante inducido por la quimioterapia y correlacionar los marcadores de daño y protección frente a la oxidación entre los distintos grupos terapéuticos.

**Material y Métodos.** El diseño experimental de este estudio comprende tres grupos experimentales definidos por la secuencia en que se administró el tratamiento: neoadyuvancia (N), adyuvancia (A) y metástasis (M). Se analizaron marcadores de daño oxidativo, defensa antioxidante y la actividad de enzimas reparadoras del ADN, datos clínicos, y marcadores bioquímicos en los tres grupos. El análisis genómico y la caracterización anatomopatológica de las muestras de tejido fue llevado a cabo en el grupo N, exclusivamente. Todos los análisis fueron llevados a cabo en muestras pareadas, es decir, de una misma paciente se extrajeron una muestra previas y otra posterior al tratamiento con quimioterapia.

Para la evaluación del daño oxidativo en ADN se empleó el ensayo comet alcalino en linfocitos de sangre periférica, para la evaluación del daño en proteínas se analizó el contenido de proteínas carbonilo en plasma y para la del daño en lípidos se llevó a cabo la cuantificación

de TBARS en muestras de plasma. Por otra parte se determinó la capacidad antioxidante total del plasma mediante el ensayo con el radical ABTS<sup>•+</sup>, la actividad de enzimas reparadoras del ADN y se extrajeron y cuantificaron una serie de antioxidantes liposolubles (retinol, tocoferol y coenzima Q). Para el tratamiento estadístico de los datos obtenidos del estudio del balance oxidativo y el análisis de la información clínica, se aplicaron tests estadísticos paramétricos y no paramétricos en función de la homogeneidad de la varianza y la normalidad de las variables.

Las muestras de tejido empleadas para el análisis genómico fueron seleccionadas en función del contenido de células tumorales. Posteriormente se extrajo el ARN del tejido, cuya concentración y pureza fueron medidas de forma previa a la síntesis de ADNc. A partir del ADNc se sintetizó el ARNc biotinilado, que fue fragmentado para preparar las mezclas de hibridación que se aplicaron sobre los chips. Por último se procedió al lavado, tinción y escaneado de los chips. El procesamiento bioinformático de los datos analizó los controles de calidad necesarios para estimar la validez de los resultados, llevó a cabo un proceso de normalización para eliminar la variabilidad de los datos y aplicó una serie de test estadísticos y herramientas bioinformáticas, como el análisis de PCA y clúster jerárquico, para la obtención de diferencias de expresión génica entre las muestras. Para finalizar, se llevo a cabo el análisis funcional de los genes seleccionados mediante el empleo de los programas PANTHER y DAVID.

**Resultados y Discusión.** En general, los resultados del análisis de marcadores de daño oxidativo mostraron que las pacientes del grupo de neoadyuvancia fueron aquellas que registraron un aumento significativo del daño oxidativo tras la quimioterapia, mientras los grupos de adyuvancia y metástasis mantuvieron niveles de daño elevados pero estables tras el tratamiento. Estos resultados sugieren que la cirugía e intervenciones clínicas previas, generan cierto estrés oxidativo al que se suma el provocado por la administración de quimioterápicos, hasta alcanzar un nivel a partir del cual, subsiguientes intervenciones clínicas no generan ningún aumento del daño oxidativo. La activación de los mecanismos de reparación del ADN y defensa antioxidante contribuyen a la estabilización del daño oxidativo.

El análisis de enriquecimiento funcional destacó las rutas moleculares moduladas por el estrés oxidativo: respuesta al estrés oxidativo, angiogénesis, señalización mediada por PDGF y metabolismo de la matriz extracelular. Los resultados de nuestro estudio mostraron que la quimioterapia reprime la expresión de genes que afectan notablemente a la supervivencia, la capacidad invasiva y la migración de células transformadas. Gran parte de estos genes se relacionan directa o indirectamente con los factores de crecimiento PDGF y VEGF, lo que

confirma la conocida interrelación entre la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis como mecanismo promotor de la metástasis. Sin embargo los radicales libres generados, crean un ambiente altamente oxidativo que contrarresta la quiescencia estromal inducida por la quimioterapia, pues estimulan la actividad de los factores de crecimiento proangiogénicos y otras moléculas, que a su vez incrementan la producción de radicales libres, creando un bucle de regulación positiva que disminuye la eficacia del tratamiento antineoplásico.

Por último, encontramos entre nuestros resultados un conjunto de genes implicados en la transducción de señales intracelulares propias de un tipo celular altamente indiferenciado y conocido como células madre del cáncer. La presencia de estas células en los tumores de las pacientes de este estudio estaría confirmada por la represión de la expresión de genes situados aguas abajo de las cascadas de señalización iniciadas por las células madre e indicaría la limitada eficacia del tratamiento con citostáticos para eliminarlas, ya que muchos de los genes descritos en este trabajo son expresados por tipos celulares característicos del estroma tumoral, posiblemente tras la inducción de las células madre tumorales.

La trascendencia clínica de estos resultados radica en que proporcionan un mejor conocimiento de la biología molecular de los tumores en respuesta a la quimioterapia, lo que haría posible el desarrollo de nuevas terapias dirigidas o la mejora de las existentes. Esta intervención junto con el desarrollo de terapias que reduzcan el estrés oxidativo, por debajo del umbral que estimula la inestabilidad genómica de las células tumorales y la activación de señales de crecimiento, mejorarían el resultado clínico y limitarían la toxicidad asociada al mismo. Por otra parte, el desarrollo de fármacos capaces de bloquear la actividad de proteínas implicadas en las cascadas de señalización selectivamente activadas en las células madre tumorales, suponen una prometedora alternativa terapéutica, sobre todo en el caso de carcinomas mamarios altamente indiferenciados y clínicamente agresivos.

**Conclusión general.** El análisis del perfil transcripcional de muestras de cáncer de mama previas y posteriores al tratamiento con antraciclinas y taxanos, mostró la represión de la expresión de un grupo de genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo, la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis, cuya actividad es modulada positivamente por el aumento del estrés oxidativo inherente al tumor o bien secundario a la quimioterapia. Por otra parte, la quimioterapia promueve la destrucción de células epiteliales, estromales y vasculares cuyo programa transcripcional se halla inducido por las células madre tumorales.



**JUSTIFICACIÓN**

**Y**

**OBJETIVOS**





## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente y la primera causa de muerte por cáncer entre las mujeres de todo el mundo. Es por tanto, un importante problema de salud pública. Se trata de una enfermedad genética, producto de la acumulación de numerosas mutaciones somáticas y cambios epigenéticos de origen epitelial y clínicamente muy heterogénea, que se caracteriza por un marcada aneuploidía, múltiples amplificaciones y deleciones génicas e inestabilidad genética en general. Probablemente esta gran complejidad a nivel molecular explica la frecuente diversidad clínica de tumores histológicamente muy similares (Modlich y cols., 2005; Abramovitz y Leiland-Jones, 2006). Por tanto, esta neoplasia constituye una enfermedad muy heterogénea que incluye varios subtipos asociados a distintas prognosis.

Históricamente, el cáncer de mama ha sido clasificado en grupos basados en características clínicas y anatomopatológicas definidas por el sistema TNM y los estudios clínicos llevados a cabo por al AJCC (*American Joint Committee for Cancer Staging*). La finalidad de esta clasificación es normalizar la comparación de las diversas modalidades terapéuticas entre distintos centros sanitarios especializados y guiar la elección del tratamiento en base a la capacidad pronóstica y predictiva de los factores definidos por este sistema (Greeny y cols., 2002). Sin embargo, aunque estos parámetros son factores predictivos útiles en manos de expertos y en general se correlacionan con la supervivencia de las pacientes, constituyen una fuente de información insuficiente para evaluar la heterogeneidad de esta enfermedad y establecer un criterio que permita la administración de un tratamiento individualizado y adecuado a cada caso (Ramaswamy y Golub, 2001; Chang y cols., 2005; Chang y cols., 2000). De hecho, actualmente pacientes con el mismo diagnóstico y pronóstico pueden responder al tratamiento y progresar clínicamente de una forma muy distinta. Estas diferencias se deben en gran medida a la limitada taxonomía actual del cáncer de mama, basada en criterios morfológicos que clasifican tumores molecularmente distintos dentro de un mismo grupo clínico (Iwao y cols., 2002).

En la actualidad, existen diferentes tipos de protocolos de tratamiento quimioterápico para pacientes con cáncer de mama recientemente diagnosticadas, sin embargo, ninguno da lugar a una remisión completa del tumor (una respuesta patológica completa –RPC-) en más del 30% del total de pacientes tratadas (Bièche y cols., 2004). En consecuencia, uno de los principales problemas actuales es el sobre-tratamiento de las pacientes, que se asocia con la toxicidad

severa y un mayor coste sin un claro beneficio en comparación con controles no tratados (Chan y cols., 2005, Chang y cols., 2002). A pesar de los esfuerzos por desarrollar protocolos de tratamiento individualizados óptimos, a excepción del análisis del marcador Her2/neu en terapias dirigidas con anticuerpos monoclonales y la expresión del receptor de estrógenos en hormonoterapia, los avances en cuanto a la predicción de la respuesta a una terapia concreta y la clasificación de las pacientes en grupos de tratamiento adecuados han sido escasos (Modlich y cols., 2005; Pawitan y cols., 2005; Chang y cols., 2005). Por ello, la identificación de marcadores moleculares capaces de predecir la respuesta al tratamiento de las pacientes está convirtiéndose en uno de los principales objetivos de la investigación clínica, pues la aplicación de criterios específicos de selección de un tratamiento optimizaría la elección del tratamiento más efectivo, más económico y menos tóxico en cada caso, dirigiría la participación en estudios clínicos con nuevas combinaciones de fármacos para pacientes en las que una respuesta patológica completa es improbable y ayudaría a acelerar el desarrollo de nuevos medicamentos orientados a pacientes que no se benefician de los tratamientos existentes (Prout, 2004).

Por otra parte, son numerosos los estudios que relacionan el estrés oxidativo con la expresión génica. Entre los genes cuya expresión puede ser modificada por efecto de los radicales libres encontramos algunos implicados en la inmortalización, la proliferación, las vías de transducción de señales, la metástasis, la angiogénesis y la resistencia a fármacos (Valko y cols., 2006). Al estrés oxidativo generado por el crecimiento incontrolado del tumor y la hipoxia intratumoral se añade el generado por el tratamiento con citostáticos, pues la producción de radicales libres a causa del metabolismo de fármacos antineoplásicos es un efecto bien documentado (Conklin, 2004). Dado que la alteración del balance oxidativo es un evento que altera la homeostasis a lo largo del todo el proceso carcinogénico y la evolución de la enfermedad neoplásica, es muy probable que ejerza una importante influencia sobre procesos celulares críticos que determinen el resultado clínico del paciente oncológico. A pesar de las evidentes implicaciones del estrés oxidativo en todas las etapas del cáncer y su tratamiento, no existe ningún estudio que evalúe su papel en la progresión de la enfermedad y la respuesta a la quimioterapia.

En consecuencia el **objetivo principal** de este trabajo fue identificar aquellos genes cuya expresión es modulada por el tratamiento con quimioterapia, para investigar los mecanismos moleculares de respuesta a fármacos antineoplásicos y las principales rutas de transducción de

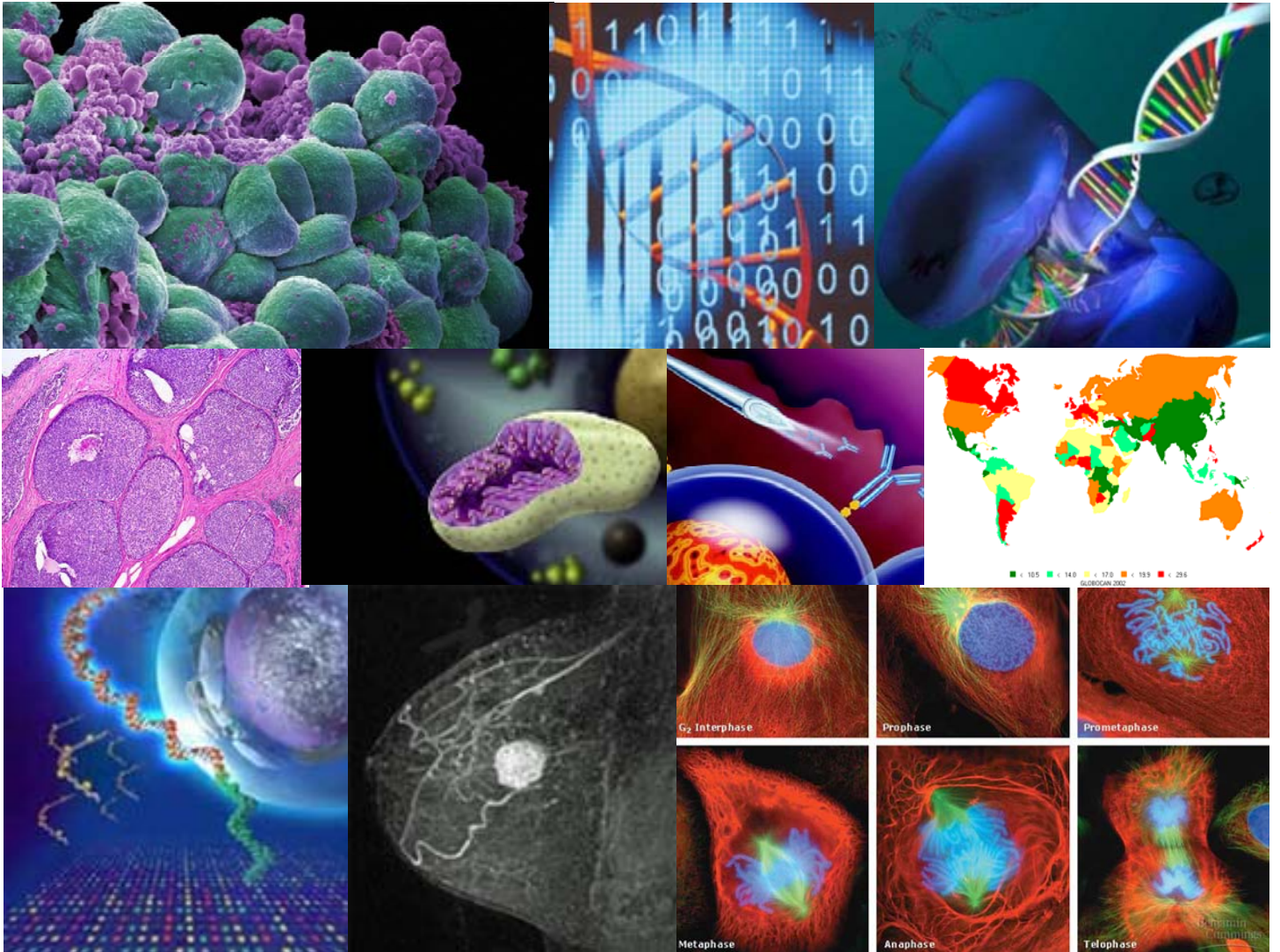
señales intracelulares implicadas en los mismos. Esta aproximación al estudio transcriptómico de la respuesta al tratamiento con quimioterapia, es adecuada para la identificación de nuevas dianas terapéuticas, especialmente útiles en aquellos casos de pobre pronóstico y en los que una respuesta satisfactoria al tratamiento es improbable.

Para ello incluimos, previo consentimiento informado, 33 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama invasivo localmente avanzado. El esquema de tratamiento de estas pacientes permitió obtener una muestra de tejido previa y otra posterior a la administración de quimioterápicos, empleadas para el análisis genómico. Paralelamente se estudiaron marcadores plasmáticos de daño y protección frente a la oxidación. Este último análisis fue llevado a cabo en dos grupos experimentales adicionales, que correspondieron a pacientes diagnosticadas de cáncer de mama invasivo tratado en secuencia adyuvante y pacientes con enfermedad metastásica. De este modo abarcamos en nuestro estudio todos los grupos terapéuticos posibles.

Tal diseño experimental fue orientado al estudio de la interrelación entre el estrés oxidativo y el tratamiento con quimioterapia. De esta forma establecimos como **objetivos secundarios** de este trabajo:

- Estudiar el impacto del estrés oxidativo sistémico sobre los cambios de expresión génica inducidos por la quimioterapia, en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado.
- Analizar el nivel de daño oxidativo y respuesta antioxidante inducido por la quimioterapia, en pacientes tratadas con quimioterapia en secuencia neoadyuvante y adyuvante y pacientes con enfermedad metastásica.
- Correlacionar los marcadores de daño y protección frente a la oxidación entre los distintos grupos terapéuticos.
- Evaluar la influencia del tratamiento con quimioterapia sobre parámetros bioquímicos relativos a la función orgánica, en pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas.





# INTRODUCCIÓN



---

## INTRODUCCIÓN

### I. Aspectos generales del cáncer de mama

#### I.1 Epidemiología del cáncer de mama

##### I.1.1 Incidencia

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente y una de las principales causas de muerte entre la población femenina a nivel mundial. De acuerdo con los datos de la IARC (*International Agency for Research on Cancer*), el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia entre las mujeres de los países industrializados (Parkin y Fernández, 2006; Ferlay y cols., 2004; Parkin y cols., 2005). La IARC estima que en el año 2006 se diagnosticaron en Europa unos 429.900 casos de cáncer de mama, donde la tasa de incidencia ajustada a la edad es máxima en Bélgica e Irlanda mostrando cifras que oscilan entre los 137,8-131,4 casos/100.000 habitantes/año y mínima en Bielorrusia y la República de Moldavia, registrando tasas de incidencia ajustadas a la edad entre 55,5-51,6 casos/100.000 habitantes/año (Ferlay y cols., 2007).

En España los datos de incidencia disponibles más recientes derivan de la base de datos GLOBOCAN (IARC, Organización Mundial de la Salud) y corresponden al año 2002. Dichos datos muestran que la incidencia del cáncer de mama en España es baja comparada con los datos de incidencia de los bloques de Europa del Norte, Europa del Sur, Europa del Este y Europa del Oeste, donde las tasas de incidencia ajustada a la edad son de 82,5; 62,4; 42,6 y 84,6 casos/100.000 habitantes/año respectivamente, mientras la española es de 50,8 habitantes/100.000 mujeres/año (Ferlay y cols., 2004). También dentro de España existe una distribución geográfica de incidencia notablemente variable según las provincias. Así en Gerona la tasa de incidencia ajustada es de 62,5 casos/100.000 habitantes/año, mientras que otras poblaciones como Granada se registran tasas menores (Parkin y cols., 2005).

##### I.1.2 Supervivencia

La información relativa a la supervivencia de las pacientes después de la diagnosis de un cáncer de mama, es un indicador clave del grado de control de la enfermedad. Es también



importante tener en cuenta este dato para planificar correctamente esquemas de atención sanitaria adecuados al número de pacientes que han sobrevivido al cáncer y precisan asistencia continuada (Coleman y cols., 2003).

Los estudios epidemiológicos muestran notables diferencias en cuanto a la distribución geográfica de las tasas de supervivencia. En el año 2003 el grupo de trabajo del proyecto europeo EUROCARE (*European Concerted Action on Survival and Care of Cancer Patients*) publicó un estudio que analizaba las diferencias en cuanto a la supervivencia en el cáncer de mama entre Europa y Estados Unidos. Dichos resultados mostraron que la tasa de supervivencia en los 5 años siguientes al diagnóstico, es mayor entre las mujeres estadounidenses comparada con la de las europeas, particularmente entre las mujeres mayores de 65 años (Sant y cols., 2004). El mismo grupo de trabajo publicó en el año 2007 una revisión de los datos epidemiológicos europeos que pone de manifiesto las diferencias en supervivencia entre los países miembros, siendo ésta máxima en los países de Europa del norte, a excepción de Dinamarca, y Europa central, media en los países de Europa del sur y baja en el Reino Unido e Irlanda. Los valores más bajos de supervivencia fueron registrados por los países de Europa del este, aunque éstos fueron los que experimentaron un mayor incremento de supervivencia desde el año 1995 hasta el 2002 (Berrino y cols., 2007; Verdecchia y cols., 2007).

Se ha comprobado que la supervivencia en el cáncer de mama se halla notablemente influida por el estadio tumoral en el momento del diagnóstico. Las tasas de supervivencia en 5 años varían entre un 94% en mujeres diagnosticadas con enfermedad en el estadio I y un 18,2% en las mujeres diagnosticadas con enfermedad metastásica de inicio (Lawson y cols., 2000).

En España la tasa de supervivencia media en el cáncer de mama es del 78%, es decir, se encuentra por encima de la media europea y es próxima a la de países muy desarrollados Holanda, Francia o Suiza (<http://www.eurocare.it>).

Las tasas de supervivencia en el cáncer de mama han experimentado un considerable aumento a lo largo de las últimas décadas en los países europeos, especialmente desde la implementación de los programas de detección precoz. A ello ha contribuido también la mejora de los tratamientos neoplásicos y nuestra progresiva mejor comprensión de diversos aspectos clínicos y moleculares de esta enfermedad. En España la tasa de supervivencia fue del 64% para los casos de neoplasia mamaria diagnosticados entre los años 1980 y 1985 y ha ido

aumentando progresivamente hasta alcanzar un valor del 78% para los casos diagnosticados entre 1990 y 1994 (Parkin y cols., 2005; Coleman y cols. 2003).

### I.1.3 Mortalidad

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres. En el año 2002 el cáncer de mama fue la causa de 410.712 muertes en todo el mundo (Ferlay y cols., 2004).

En Europa, durante el año 2004 el cáncer de mama causó 129.900 muertes y las estimaciones para el año 2006 son de 131.900 muertes, lo que representa el 17,3% de los fallecimientos a causa de cáncer y el 7.8% del total de fallecimientos en la población europea (Ferlay y cols., 2007, Boyle y Ferlay, 2005). La dinámica en las tasas de mortalidad en el cáncer de mama ha sido cambiante a lo largo de las últimas décadas en la mayoría de los países del oeste de Europa, pues si bien las tasas de mortalidad aumentaron progresivamente desde el año 1951, en el año 1989 comenzaron a disminuir experimentando una caída máxima desde 21,3 fallecimientos/100.000 habitantes en el año 1990 hasta 18,9 fallecimientos/100.000 habitantes en el año 2000. En contraste las tasas de mortalidad en el cáncer de mama de los países del bloque este de Europa han ido aumentando durante este periodo y aún en la actualidad (Parkin, 2006, Levi y cols., 2005).

Según datos del INE (Instituto Nacional de Estadística), en España fallecieron 5.726 mujeres a causa del cáncer de mama durante el año 2005, aunque el número de defunciones por esta causa descendió un 1,8% con respecto al año anterior. La tasa ajustada de mortalidad del cáncer de mama en España es de 16 fallecimientos/100.000 habitantes/año, lo que representa el 16,7% de las muertes a causa del cáncer y el 3,3% del total de muertes entre las mujeres españolas (INE, disponible en [www.ine.es](http://www.ine.es); Pollán y cols., 2007). Dicha tasa sitúa a España, junto con Portugal y Grecia, en uno de los tres países de la Unión Europea donde la mortalidad por esta causa es menor (Ferlay y cols., 2004).

Esta tendencia decreciente observada en la Europa industrializada, puede ser también apreciada en otros países desarrollados como Estados Unidos, Canadá, Australia y Nueva Zelanda (Parkin y cols., 2006). La reducción en las tasas de mortalidad coincide en el tiempo con la implementación de los programas de detección precoz del cáncer de mama en el grupo de mujeres de edad comprendida entre los 50-69 años y la mejora de los tratamientos

antineoplásicos (Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002; Humprey y cols., 2002; Tabar y cols., 2001).

En conjunto, los datos epidemiológicos muestran que el cáncer de mama es un importante problema de salud pública, no sólo en el entorno más próximo a España, a Europa u otros continentes donde se sitúan los países más desarrollados del planeta, sino que es una enfermedad que afecta al conjunto de la población femenina mundial en la que el riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria aumenta progresivamente a lo largo del tiempo. El descenso de la mortalidad a causa del cáncer de mama proporciona una medida objetiva del efecto positivo de las actuaciones clínicas llevadas a cabo con el objetivo de controlar esta enfermedad, sin embargo, la alta prevalencia de la misma, el moderado beneficio derivado del tratamiento disponible y nuestra incapacidad para prevenir su desarrollo son indicativos de la necesidad de investigar y desarrollar nuevas estrategias que permitan combatir el cáncer de mama de un modo más eficaz.

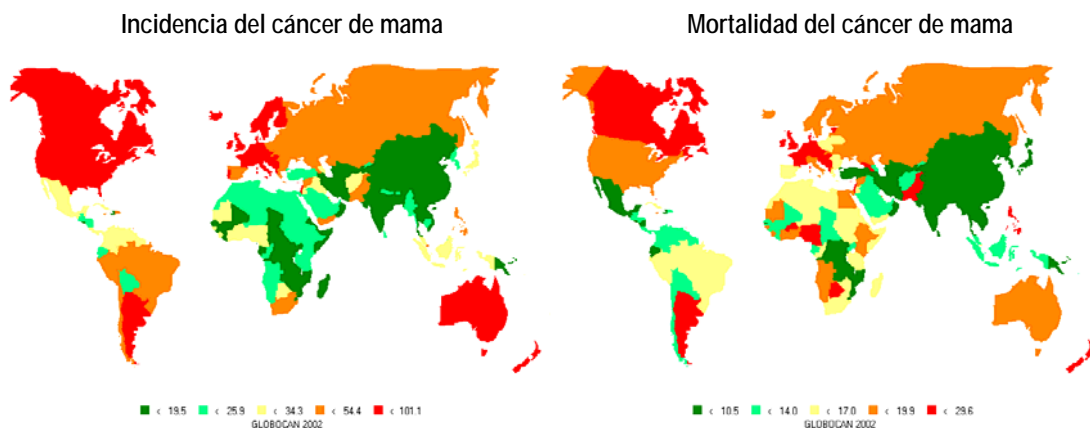


Figura 1. *Mapas de incidencia y mortalidad del cáncer de mama a nivel mundial.* Los datos corresponden a las tasas de incidencia y mortalidad anuales ajustadas a la edad y población (casos/100.000 habitantes/año)

## 1.2 Factores de riesgo del cáncer de mama

Como se deriva de los datos obtenidos en los estudios epidemiológicos, el cáncer de mama es una enfermedad cuya incidencia varía geográficamente siendo marcadamente más frecuente en los países desarrollados. Por tanto el estilo de vida de sociedades industrializadas parece ser un factor de riesgo de elevada influencia. Además, estudios en poblaciones inmigrantes muestran como la tasa de incidencia de cáncer de mama de la población inmigrante se equipara, al cabo de una o dos generaciones, con la de la población del país huésped

corroborando la gran influencia que los factores ambientales ejercen sobre el desarrollo de esta enfermedad (McPherson y cols., 2000).

Las estimaciones indican que el riesgo de padecer un cáncer de mama antes de los 85 años es del 12%, es decir, aproximadamente 1 de cada 8 mujeres desarrollará una neoplasia mamaria antes de esa edad (Feuer y cols., 1993).

El cáncer de mama es una enfermedad de etiología multifactorial. Dicha complejidad dificulta considerablemente el diseño de estrategias eficaces de prevención de esta enfermedad, particularmente porque en la actualidad los especialistas son incapaces de establecer un riesgo individual objetivo para cada paciente, ya que es desconocida la interacción entre los distintos factores de riesgo.

Tabla 1. *Principales factores de riesgo asociados al desarrollo de un carcinoma de mama*

Edad	Peso
Raza	Dieta
Historia ginecológica	Ingesta de vitaminas
Patología mamaria benigna	Ejercicio
Historia familiar	Alcohol
Patrón mamográfico	Tabaco
Anticonceptivos orales	Radiación
Terapia hormonal sustitutiva	Xenoestrógenos y contaminantes ambientales

### 1.2.1 Edad

La edad es el factor de riesgo individual conocido más importante. El riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria varía a lo largo de vida alcanzando los valores más elevados después de los 49 años de edad (Bryant, 1994), de hecho, dicho riesgo aumenta progresivamente doblando su valor cada diez años hasta la menopausia, a partir de la cual, este incremento por año de vida es menor (McPherson y cols., 2000). Por esta causa las mujeres de edad comprendida entre los 50-65 años son la población diana de los programas de detección precoz del cáncer de mama (Agencia de evaluación de Tecnologías Sanitarias. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002). Es desconocido si estas diferencias se deben a la acumulación de eventos promotores del cáncer a lo largo de la vida ó a un factor aislado que inicia el proceso oncogénico y se presenta con mayor frecuencia en mujeres de edad avanzada (Vogel y cols., 2003).

### I.2.2 Raza

La raza y la etnia modifican el riesgo de padecer cáncer de mama que confiere la edad. Las mujeres afroamericanas menores de 50 años poseen un mayor riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria que las mujeres blancas de la misma edad. Sin embargo es interesante señalar que a partir de los 50 años de vida esta tendencia se invierte, es decir, el progresivo aumento en la tasa de incidencia del cáncer de mama se restringe a las mujeres blancas mayores de 50 años, pues en el caso de las mujeres afroamericanas dicha tasa se mantiene estable en el mismo grupo de edad (Vogel y cols., 2003; Smigal y cols, 2005). En cuanto a estas diferencias, diversos estudios analizan el efecto oncogénico ejercido por la terapia hormonal sustitutiva, menos frecuentemente aplicada a mujeres afroamericanas que a mujeres blancas post-menopáusicas y la mayor prevalencia de la obesidad, más frecuente entre las mujeres afroamericanas jóvenes y relacionada con los ciclos menstruales anovulatorios y la disminución de hormonas esteroideas circulantes en mujeres premenopáusicas (Smigal y cols, 2005, Ogden y cols., 2006).

Otras etnias residentes en Estados Unidos en convivencia con las mujeres afroamericanas y blancas corresponden a las mujeres asiáticas americanas, hispanas/latinas, indias americanas y mujeres nativas de Alaska. En estos grupos de mujeres las tendencias en términos de incidencia, estadio tumoral en el diagnóstico y mortalidad son similares a las de las mujeres afroamericanas, aunque la disponibilidad de datos al respecto es reducida y los estudios recientes (Smigal y cols, 2005).

### I.2.3 Historia ginecológica

La etiología del cáncer de mama está relacionada con la historia ginecológica de la mujer y su metabolismo hormonal (DeVita y cols., 2005). Las frecuentes diferencias étnicas al respecto pueden explicar hasta un 17% de las diferencias raciales observadas en las tasas de incidencia del cáncer de mama en mujeres post-menopausicas (Gilliland y cols., 1998).

A pesar de que la incidencia es mayor en mujeres postmenopáusicas, la tasa de aumento del riesgo de cáncer de mama es seis veces mayor durante las etapas premenopáusicas de la vida. Esta dramática disminución del aumento del riesgo con respecto al tiempo tras la menopausia sugiere que la actividad ovárica juega un papel central en la oncogénesis mamaria. La edad de la menarquía y consecuentemente, el establecimiento de ciclos ováricos regulares y

la producción de estrógenos durante los ciclos menstruales, se asocian al riesgo de padecer un cáncer de mama. La menopausia tardía, después de los 55 años, es otro factor que aumenta el riesgo de cáncer de mama. El aumento del riesgo derivado de la menarquia precoz y la menopausia tardía nos indica que el número de ciclos ováricos permite una valoración del riesgo en estos términos que se traduce en la mayor o menor exposición a los estrógenos durante la vida reproductiva de una mujer (Vogel y cols., 2003; Gilliland y cols., 1998).

La edad del primer embarazo a término o con feto viable y la nuliparidad son dos importantes factores de riesgo asociados al desarrollo de una neoplasia mamaria. Las mujeres nulíparas poseen un riesgo relativo (RR) de desarrollar un cáncer de mama a lo largo de la vida 1,4 veces superior a las mujeres que han dado a luz al menos a un hijo a lo largo de su vida reproductiva (Gilliland y cols., 1998). Este efecto protector causado por la gestación puede ser observado a nivel histológico. En el tejido mamario de una mujer con ciclos menstruales normales pueden ser identificados tres tipos de lóbulos, lob 1 (lóbulos tipo 1) escasamente diferenciados, lob 2 (lóbulos tipo 2) y lob 3 (lóbulos tipo 3) que presentan un grado de diferenciación progresivamente mayor. El tejido mamario presenta su máximo grado de diferenciación tras la gestación y la lactancia, momento a partir del cual podemos observar lob 4 (lóbulos tipo 4). Durante la menopausia el tejido mamario regresa, tanto en mujeres nulíparas como en mujeres que han tenido descendencia, hasta el primer estadio de diferenciación lob1. A pesar de la similitud en la composición lobular del tejido mamario postmenopáusico entre estos dos grupos de mujeres, es un hecho contrastado que los lóbulos tipo 1 de ambos grupos presentan una composición celular diferente, pues los lóbulos de las mujeres nulíparas, que no llegaron a alcanzar su máximo grado de diferenciación, presentan una proporción significativamente mayor de células epiteliales, que son el tipo celular diana de la transformación oncogénica en el cáncer de mama. Estas células epiteliales se conocen como *Stem cells 1* (células madre 1) y son biológicamente diferentes a las encontradas en los lóbulos postmenopausicos de las mujeres que han sido gestantes en algún momento de su vida y que se conocen como *Stem cells 2* (células madre tipo 2). Las células madre 2 son refractarias con respecto a la transformación neoplásica y recientes estudios postulan que efectivamente lo son debido a que el mayor grado de diferenciación adquirido durante la gestación y la lactancia opera un cambio en la firma genómica que diferencia a las células madre 1 de las células madre 2 y hace que éstas últimas se encuentren protegidas frente a los estímulos oncogénicos (Russo y cols., 2005). El efector protector que la paridad ejerce frente al desarrollo de una neoplasia mamaria parece ser reforzado con sucesivos embarazos. (Ramon y cols., 1996).

El aborto, ya sea espontáneo o inducido, parece eliminar el efecto protector que confiere la gestación a término frente al cáncer de mama. Incluso, en algunos estudios caso-control los resultados muestran un ligero aumento del riesgo de padecer un cáncer de mama tras un aborto, especialmente si es inducido, aunque otros estudios no encuentran ninguna correlación. Posiblemente la finalización prematura del embarazo impide que las células del epitelio mamario alcancen el máximo grado de diferenciación, propiciando la transformación neoplásica inducida por la elevación de los niveles hormonales propia de la gestación (Gilliland y cols., 1998).

El posible efecto protector que ejerce la lactancia materna frente al cáncer de mama ha sido durante largo tiempo objeto de intenso debate (Gilliland y cols., 1998). Con la finalidad de esclarecer el papel de esta variable reproductiva en el desarrollo de una neoplasia mamaria, el grupo de trabajo *Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer* publicó en el año 2002 los resultados del análisis de 47 estudios epidemiológicos independientes realizados en 30 países de los cinco continentes, en cuyo diseño fue incluida información relativa a la lactancia y otros aspectos importantes del cuidado materno. El análisis reveló una reducción del riesgo relativo de desarrollar un cáncer de mama del 4,3% por año de lactancia en adición a una reducción del 7% por cada embarazo (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002). La relación de la lactancia con el cáncer de mama es de gran interés científico y sanitario pues constituye una variable modificable que podría ser considerada como una estrategia útil en la prevención primaria del cáncer de mama, particularmente en los países industrializados donde es frecuente la ausencia o acortamiento del periodo de la lactancia y la incidencia de esta enfermedad es elevada (Veronesi y cols., 2005).

#### 1.2.4 Patología mamaria benigna

El término patología mamaria benigna engloba a un amplio espectro de entidades histológicas diferentes generalmente subdivididas en lesiones no proliferativas y lesiones proliferativas con o sin atipias, según la clasificación establecida por Dupont y Page en un trabajo original publicado en el año 1985 (Dupont y cols., 1985).

El diagnóstico de patología mamaria benigna ha sido considerado como un factor capaz de influenciar el riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria, sin embargo, sólo una pequeña fracción de las pacientes que presentan lesiones mamarias benignas desarrollan un cáncer de mama a lo largo de su vida. En 1998 un grupo de trabajo avalado por el Colegio de Patólogos Americano publicó una clasificación actualizada de las lesiones mamarias benignas y su relación

con el desarrollo del cáncer de mama (Fitzgibbons y cols, 1998), en el cual, los investigadores concluyen que las lesiones no proliferativas y mínimamente proliferativas sin atipias son las más frecuentes representando el 69% de los casos y no aumentan significativamente el riesgo. Por otra parte, las lesiones proliferativas sin atipias son correlacionadas con un ligero aumento del RR de 1,5-2 (Worsham y cols., 2007). Por último, el grupo de mayor riesgo comprende a aquellas pacientes con hiperplasias atípicas tanto lobulillar como ductal. Estas lesiones tan sólo son diagnosticadas en el 3,6% de las pacientes con alguna forma de patología mamaria benigna, definidas como formas incompletas de carcinoma *in situ* de bajo grado y relacionadas con un aumento del RR de desarrollar un carcinoma mamario invasivo de 4-5 (DeVita y cols., 2005). La coexistencia de diferentes lesiones benignas así como una historia familiar positiva de cáncer de mama modifican sustancialmente el riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria (Fitzgibbons y cols., 1998, Hartmann y cols., 1985).

### I.2.5 Historia familiar

Existe una baja proporción de cánceres de mama, estimada en torno al 5-10%, en cuyo desarrollo son decisivos los factores hereditarios (Gayther y cols., 1998).

El estudio de familias con múltiples casos de cáncer de mama y ovario mediante el análisis de ligamiento permitió la localización e identificación de dos genes de susceptibilidad de alta penetrancia. El primer gen caracterizado es conocido como BRCA1 (*breast cancer 1*) y se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21) (Miki y cols., 1994). El gen BRCA2 (*breast cancer 2*), localizado en el cromosoma 13 (13q12), fue identificado en familias con cáncer de mama masculino y sin ligamiento a 17q (Wooster y cols., 1994).

Ambos genes codifican proteínas que presentan escasa homología entre sí y con otras proteínas conocidas sin embargo entre ellas se observan similitudes funcionales que sugieren que ambas participan en los mismos procesos celulares. BRCA1 y BRCA2 son proteínas nucleares que siguen un patrón de expresión regulado por el ciclo celular y que intervienen en los procesos de reparación del ADN a través de su mutua asociación con la proteína RAD51. Por otra parte BRCA1 es capaz de activar la transcripción de genes como p21, que es un potente supresor del crecimiento en el punto G1/S del ciclo celular, ó el gen supresor de tumores p53. BRCA2 presenta dominios de activación transcripcional y actividad acetiladora de histonas. Por tanto, parece que la función de las proteínas BRCA1 y BRCA2 está relacionada con el mantenimiento de la integridad del genoma pues la pérdida de la función de las proteínas que



codifican estos dos genes provoca anomalías y roturas cromosómicas acompañadas de un enlentecimiento anormal en la cinética de reaparición de la doble hebra de ADN. Por tanto, es muy probable que alteraciones en alguno de estos genes provoque el acúmulo de mutaciones en otros, cuya alteración estaría asociada a la etiología del cáncer de mama y ovario (Welch y King, 2001; 37, Wooster y cols., 1994; Scully, 2002).

Cuando un individuo es portador de una mutación en un gen BRCA en la línea germinal, ésta se encuentra presente en todas las células de su organismo. Un solo alelo sano es suficiente para mantener la funcionalidad del gen y por tanto es necesaria la pérdida de éste para desarrollar una neoplasia (Miki y cols., 1994). En base a este modelo conocido como *Two hit*, es correcto afirmar que el portador de la alteración en uno de estos dos genes hereda la susceptibilidad de desarrollar una neoplasia mamaria u ovárica, pues será la pérdida de heterocigosidad motivada por una nueva lesión genética no heredada, el evento que desencadene la formación del tumor (Knudson, 1971).

#### I.2.6 Patrón mamográfico

En contraste con la mayoría de factores de riesgo del cáncer de mama, la densidad mamaria es cambiante según la influencia de otros factores y además, este cambio puede ser monitorizado mediante mamografía estándar o digitalizada. En cuanto a dicho factor de riesgo existe un componente hereditario de elevada importancia como demuestran los resultados de los estudios llevados a cabo con gemelos monocigóticos y dicigóticos, que estiman que la heredabilidad es responsable del 63% de las variaciones en la densidad mamaria entre individuos. Existen igualmente factores externos capaces de modificar la densidad mamaria tales como la terapia hormonal sustitutiva combinada, que aumenta la densidad mamaria y también el riesgo de cáncer de mama, o la obesidad que medida como peso corporal o índice de masa corporal se correlaciona inversamente con la densidad mamográfica y con el riesgo de cáncer de mama. Estos datos se restringen a las mujeres premenopausicas ya que, una vez más, la edad sobredimensiona el efecto de estos dos factores (Yaffe y cols., 2005).

#### I.2.7 Anticonceptivos orales

La utilidad y beneficios asociados al uso de los anticonceptivos orales combinados son sobradamente conocidos, pero entre los efectos adversos de estos fármacos es necesario mencionar el aumento del riesgo del cáncer cervical y de mama aún cuando dicha relación es

actualmente un tema muy controvertido que confronta a científicos, profesionales sanitarios y sus pacientes.

El metanálisis publicado en 1996 por *The Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer* es probablemente la mayor y más completa fuente de información respecto a la relación existente entre el empleo de anticonceptivos orales y el riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria. En conjunto, los datos disponibles sugieren la inexistencia de una relación entre el aumento del riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria y el empleo de anticonceptivos orales. En mujeres de edad superior a los 35 años, el uso actual o anterior de anticonceptivos orales no aumenta el riesgo de cáncer de mama; este efecto es tan sólo ligeramente apreciable en mujeres de 20 a 30 años, en las que el riesgo absoluto de cáncer de mama es muy reducido. Dichas conclusiones no son aplicables a mujeres portadoras de mutaciones germinales predisponentes al cáncer de mama, en las que el esclarecimiento del papel de estos fármacos podría tener una aplicación preventiva (Hankinson y cols., 1997, Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1996).

### 1.2.7 Terapia hormonal sustitutiva

En el año 1997, *The Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer* publicó un trabajo colaborativo en el que reanalizaba aproximadamente el 90% de la información epidemiológica disponible en cuanto a la relación entre el empleo de la THS (terapia hormonal sustitutiva) y el riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997). Los resultados de tal estudio muestran que en las mujeres que siguen una THS o aquellas que la cesaron en los 1-4 años anteriores el RR de padecer un cáncer de mama incrementa en 1,023 por año de uso llegando a un aumento del RR de 1,35 en mujeres que han seguido el tratamiento durante 5 años. Este incremento en el riesgo mimetiza las consecuencias de una menopausia tardía, ya que el aumento del RR entre las mujeres que nunca han seguido una THS es de 1,028 por cada año que se retrasa la menopausia. Después de 5 o más años tras la interrupción del tratamiento el aumento del riesgo asociado al empleo de la THS no es significativo, ni en relación al cáncer de mama en general ni en cuanto a la duración del tratamiento.

En éste y otros estudios posteriores fue examinada la influencia que otros factores podrían ejercer sobre la relación entre el riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria y el empleo de la THS. De este modo fueron analizados el estatus menopáusico, la edad a la menopausia, el IMC

(índice de masa corporal) y el grado de diseminación tumoral en grupos de estudio caso y control en los que los datos fueron estratificados en función de la paridad, la edad en el primer embarazo, la historia familiar, la edad a la menarquia, el consumo de alcohol y tabaco, el grupo étnico y la edad al diagnóstico del cáncer de mama. Tras este intensivo análisis tan sólo el IMC y el peso fueron correlacionados significativamente con un incremento del riesgo de padecer cáncer de mama. Es conocida la relación directa entre el aumento del IMC y el riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria en mujeres posmenopáusicas, incrementando este último en un 3,1% por Kg/m<sup>2</sup>, ya que los niveles de estrógenos circulantes tras la menopausia son mayores en mujeres obesas debido a que el tejido adiposo se convierte en el principal sitio de síntesis de estrógenos durante esta etapa de la vida. El empleo de la THS modifica esta asociación invirtiéndola y este efecto es particularmente notable en aquellas mujeres que registran un bajo contenido de grasa corporal en las que el RR aumenta en un 0,12 por cada año de THS (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997; Schairer y cols., 2000; Lahmann y cols., 2004). El mecanismo biológico que origina tal modificación es complejo. Estudios consistentes en la implantación de tejido mamario humano en ratones atímicos sugieren la existencia de una dosis máxima efectiva de estradiol con respecto a su efecto estimulador de la proliferación celular en el tejido mamario, a partir de la cual, la administración de dosis mayores no modifica la tasa mitótica de las células. Este fenómeno podría explicar la ausencia del efecto de las hormonas exógenas con respecto al riesgo de padecer un cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas con un alto contenido en grasa corporal, en las que la concentración de estradiol es relativamente mayor que en mujeres con un bajo IMC debido a la síntesis no ovárica de estradiol en el tejido adiposo por aromatización de la androstendiona (Schairer y cols., 2000; Laidlaw, 1995).

Aunque en el análisis colaborativo fue llevado a cabo independientemente del régimen hormonal recibido por las pacientes, estudios posteriores muestran como la combinación de estrógenos con progesterona aumenta el riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria con respecto al régimen basado en la administración de estrógenos aislados (Schairer y cols., 2000).

Estos datos sugieren que es recomendable sopesar los riesgos y beneficios derivados de la THS, particularizando el tratamiento según las características individuales de cada mujer. Para ello es necesario considerar el régimen hormonal a emplear así como el IMC de la paciente propiciando la elección más segura y efectiva en cada caso.

### I.2.8 Peso

Los resultados de los estudios de correlación entre el peso corporal, ya sea medido como tal o como IMC, muestran en general una relación directa entre la obesidad o entre altos valores del IMC y el aumento del riesgo de desarrollar un cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas que no siguen o han seguido un tratamiento hormonal sustitutivo (Morimoto y cols., 2002; Huang y cols., 1999; Lahmann y cols., 2004; Lahmann y cols., 2005; Eliassen y cols., 2006). Concretamente se estima que aquellas con un  $IMC > 30$  presentan un riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria superior en un 31% al de otras con un  $IMC < 25$  (Lahmann y cols., 2004). Las mujeres posmenopáusicas con un elevado IMC presentan una concentración de estrógenos circulantes que dobla la de una mujer posmenopáusica con un ICM normal. Este fenómeno deriva de la producción periférica de estradiol en el tejido adiposo, como ha sido mencionado en el apartado anterior. Además, en mujeres posmenopáusicas obesas se han observado menores niveles de SHBG (*sex hormone-binding globuline*), cuya función es unirse y neutralizar la acción de los estrógenos de manera que, en general, este grupo de mujeres presentan mayores concentraciones de estrógenos biodisponibles capaces de influenciar su riesgo de desarrollar un cáncer de mama (Huang y cols., 1999).

En conjunto parece que el peso, la ganancia de peso y la distribución de la grasa corporal están relacionadas con el complejo proceso de la transformación celular. Dado que es una variable modificable, de cuyo control se derivan beneficios potenciales para la salud en general, el control del peso corporal debería ser incluido como una estrategia preventiva frente al desarrollo del cáncer de mama, especialmente en aquellos países donde la incidencia de esta enfermedad es mayor y también son más numerosos los casos de obesidad.

### I.2.9 Dieta

La influencia de la dieta sobre el riesgo de desarrollar un cáncer de mama es un tema de gran interés actual entre la comunidad científica. El hecho de que las tasas de incidencia de dicho cáncer varíen geográficamente, siendo superiores en el mundo desarrollado, sugiere que los factores ambientales y el estilo de vida, especialmente la dieta, podrían estar relacionados con el riesgo de cáncer de mama (World Cancer Research Fund, 1997).

El balance energético, como medida integradora del impacto del consumo calórico, la actividad física y la tasa metabólica, son importantes factores que influyen el riesgo de

desarrollar un cáncer de mama, si bien sus mecanismos no han sido bien elucidados. Estudios con animales y estudios epidemiológicos muestran que la restricción calórica, acompañada de una actividad física relativamente alta, se relaciona inversamente con el riesgo de desarrollar un carcinoma mamario, particularmente entre las mujeres premenopáusicas (Navarro y cols., 2006, Michels y Ekblom, 2004).

Algunos estudios epidemiológicos y experimentales muestran que los lípidos de la dieta poseen un importante papel en la etiología de esta enfermedad (Wynder y cols., 1997), sin embargo, esta relación y su influencia sobre el desarrollo de un carcinoma mamario es aún un tema de debate, ya que recientes estudios caso-control y estudios de cohortes publicados al respecto presentan resultados dispares que sugieren la inexistencia de una fuerte asociación y reflejan probablemente las numerosas limitaciones y fuentes de error asociadas a los registros dietéticos poblacionales. Alentados por estas discrepancias algunos investigadores han estudiado la influencia de las dietas ricas en grasas sobre la promoción y progresión del cáncer y descrito que esta relación depende de la cantidad y el tipo de grasas consumidas. Así, en general, un alto consumo de AGS (ácidos grasos saturados) se asocia positivamente con el riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria, mientras que en la mayoría de los estudios publicados se observa una asociación inversa entre el consumo de aceite de oliva rico en ácido oleico (18:1n-9) y el riesgo de cáncer de mama. La influencia de otros lípidos en el cáncer de mama, como la de los AGPI (ácidos grasos poliinsaturados) n-3 de cadena larga presentes en el pescado y aceites marinos y la de los AGPI n-6, principalmente el ácido linoleico (18:2n-6), presentes en los aceites de origen vegetal, es más modesta pero inversa en el caso de los primeros y directa en el caso de los segundos (Bahskarapillai y Mathew, 2005; Prentice y cols., 2006). Considerando las limitaciones metodológicas y los resultados de los estudios experimentales y epidemiológicos, parece pertinente concluir que existe una asociación positiva entre el consumo de ciertos tipos de lípidos en la dieta y el riesgo de cáncer de mama, a pesar de que no todos los estudios epidemiológicos encuentran una relación entre estas dos variables.

Estudios epidemiológicos caso-control y de cohortes han encontrado una correlación significativa entre el consumo de carne y el riesgo de desarrollar un cáncer de mama, especialmente entre aquellas mujeres que suelen comer carne muy cocinada. Dicho efecto podría ser atribuido a las aminos heterocíclicas que se producen al someter a altas temperaturas a la carne y que son mutágenas en animales (Dai y cols., 2002; De Stefani y cols., 1997).

En los últimos años algunos autores han hipotetizado que el consumo de carbohidratos, al influir en los niveles de insulina circulante, podría promover el crecimiento tumoral principalmente en mujeres con sobrepeso. Igualmente, el consumo de fibra dietética y su posible relación con la disminución en los niveles de estrógenos circulantes, ha sido el objetivo de algunos estudios recientes. Sin embargo, ni los estudios caso-control al respecto ni los meta-análisis llevados sobre los resultados de los mismos, encuentran relación alguna entre el riesgo de cáncer de mama y el consumo de fibra, ya sea medida como cantidad de fibra total ingerida o en sus fracciones. Tampoco el análisis de ingesta de carbohidratos muestra ninguna relación con el riesgo de cáncer de mama, pues las modestas diferencias apreciables entre los grupos experimentales de distintos estudios muestran resultados contradictorios y frecuentemente no significativos estadísticamente (Holmes y cols., 2004).

La semilla de lino es una rica fuente de fibra, ácido linoleico y lignanos. Los lignanos son metabolizados en el tracto digestivo a enterodiol y enterolactona, dos fitoestrógenos que desplazan el metabolismo del estradiol favoreciendo la vía de la 2-hidroxiestrone, que posee una actividad estrógena mínima y es no genotóxica (Davis y cols., 1993). Los estudios llevados a cabo en animales por Thompson y colaboradores muestran que, tras la inducción química de la carcinogénesis, una dieta rica en semilla de lino reduce el número de tumores por animal en un 46% al igual que reduce la tasa de crecimiento y el potencial metastásico de los tumores e incrementa la morfogénesis y diferenciación de las células de la glándula mamaria (Bergman y cols., 2007; Chen y cols., 2004; Thompson y cols., 2005). Otro vegetal cuyo consumo se ha correlacionado con un cierto efecto protector frente al cáncer de mama, tanto en mujeres premenopáusicas como posmenopáusicas, es la soja. Dicho efecto protector deriva de su contenido en fitoestrógenos, que al igual que en el caso de los fitoestrógenos contenidos en la semilla de lino, interfieren en el efecto promotor de la carcinogénesis llevado a cabo por los estrógenos endógenos (Wu y cols., 2002).

El consumo de productos lácteos ha sido relacionado con el riesgo de desarrollar un cáncer de mama tanto directa como inversamente. Las hipótesis que apoyan que el consumo de la leche y sus derivados incrementan el riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria incluyen el alto contenido de ácidos grasos saturados en estos productos, su posible contaminación con pesticidas y otros contaminantes potencialmente carcinogénicos y el posible contenido hormonal de los lácteos derivado de la práctica de la ganadería industrial. Por el contrario, otros investigadores se han centrado en las propiedades anticarcinogénicas del calcio, la vitamina D y

el ácido linoleico conjugado contenidos en los lácteos (Mooreman y Terry, 2004; Michels y cols., 2002).

El selenio es un mineral dotado de propiedades anticancerígenas, pues forma parte del centro activo de numerosas enzimas catalizadoras de reacciones redox y enzimas antioxidantes como la tioredoxina reductasa y la glutatión peroxidasa, promueve la formación de células *natural killer* y estimula la respuesta del sistema inmune a las infecciones, induce la detoxificación de ciertas moléculas carcinogénicas a nivel del enzima hepática p450, inhibe la acción inflamatoria de las prostaglandinas y disminuye la tasa de crecimiento tumoral. En general parece que las mujeres son menos sensibles a la protección conferida por el selenio, pues los estudios al respecto no han podido encontrar relación alguna entre el cáncer de mama y los niveles de selenio en el organismo (Donaldson, 2004), sin embargo, algunos datos preliminares sugieren que la adición de selenio en la dieta podría reducir la tasa de rotura cromosómica en tejidos sanos de portadoras de mutaciones en el gen BRCA1, por lo que este compuesto inorgánico está siendo investigado actualmente como posible agente quimiopreventivo (Alonso, 2006).

Las verduras crucíferas, tales como el brócoli, la calabaza o la coliflor, contienen sulforofanos que es un compuesto orgánico con propiedades anticancerígenas. Los resultados de un estudio caso-control en China revelan que el consumo de verduras crucíferas, medido como concentración de isocianato excretado por vía urinaria, está inversamente relacionado con el riesgo de desarrollar un cáncer de mama. Concretamente los individuos en el cuartil de consumo más elevado presentaron una reducción del riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria del 50% con respecto al grupo de individuos cuyo consumo de este tipo de verduras era menor (Fowke y cols., 2003).

Desde un punto de vista biológico es muy posible que las dietas ricas en frutas y verduras protejan frente al cáncer. Muchos de estos alimentos son ricos en sustancias bioactivas potencialmente anticancerígenas tales como vitaminas, minerales antioxidantes, fibra, ditioles, isocianatos, isoflavonoides, indol-3-carbinol, inhibidores de proteasas, fitoesteroles, carotenoides, luteína y ácido fólico entre los más importantes (Donaldson, 2004). La asociación entre el consumo de frutas y verduras y el riesgo de desarrollar un cáncer de mama ha sido el objetivo de numerosos estudios caso-control y de algunos estudios de cohortes. En 1997 *The World Cancer Research Fund* analizó los resultados de todos los estudios publicados al respecto

hasta entonces (World Cancer Research Fund, 1997), encontrando una relación protectora entre el consumo de frutas y verduras y el riesgo de cáncer de mama. El mismo resultado fue encontrado en posteriores meta-análisis, sin embargo, el análisis conjunto de algunos estudios de cohortes más recientes no evidencia el efecto protector frente al cáncer de mama atribuido ni a las frutas y vegetales en general, ni a grupos específicos de estos alimentos. Uno de los últimos meta-análisis realizados muestra una ligera disminución del riesgo de cáncer de mama en individuos que registran un alto consumo de vegetales versus a los que registran niveles de consumo moderados en 20 estudios caso-control, pero no así en los 7 estudios de cohortes analizados. Estos resultados tan confusos pueden ser debidos a diferencias en cuanto a su diseño experimental o a la selección inadecuada de las pacientes participantes, pues individuos que viven en la misma área geográfica tienden a desarrollar patrones nutricionales similares. Con el objetivo de esclarecer la relación entre la dieta y el cáncer, en el año 2005 se publicó un estudio llevado a cabo por el grupo de trabajo del EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*) en que participaron 10 países europeos y unos 520.000 individuos. En el caso concreto de la influencia entre el consumo de frutas y verduras y el riesgo de cáncer de mama, el proyecto EPIC no encontró ninguna asociación. Se ha sugerido que solamente cierto tipo de frutas o verduras poseerían esta capacidad protectora frente al cáncer de mama y puede que dicha asociación específica haya pasado desapercibida en el estudio EPIC, dado que su metodología determina que el análisis sea llevado a cabo por grupos de alimentos y en ningún caso analiza qué efecto podría ejercer sobre el riesgo de cáncer de mama el consumo de alimentos concretos (van Gils y cols., 2005).

### 1.2.10 Ingesta de vitaminas

Los resultados de estudios experimentales evidencian que algunas vitaminas, tales como las vitaminas A, E, C, los folatos y carotenoides, pueden jugar un papel importante en la etiología del cáncer de mama. El interés por el estudio de estas moléculas radica en sus propiedades antioxidantes, pues neutralizan ERO (especies reactivas del oxígeno) que son agentes potencialmente carcinogénicos capaces de inducir modificaciones en la estructura del ADN y modificar la expresión génica (Halliwell y Gutteridge, 2000). Además algunas de estas vitaminas, como la vitamina A, participan en procesos de diferenciación celular o, en el caso del ácido fólico, la vitamina B<sub>12</sub> y el piridoxal 5'-fosfato (principal forma activa de la vitamina B<sub>6</sub>), modulan la síntesis de ADN y su metilación (Sporn y Roberta, 1983). Por otra parte, existen datos experimentales que sugieren que la vitamina D ejerce una actividad antineoplásica. La vitamina D es generada a nivel de la epidermis gracias a la incidencia de la radiación solar y su forma



hormonalmente activa, 1,25 dihidroxicolecalciferol o calcitriol, actúa como un factor nuclear de transcripción regulando la expresión de genes relacionados con el metabolismo mineral y la regulación del ciclo celular a través de su unión al receptor de vitamina D (Donaldson, 2004; McCullough y cols., 2007).

A pesar de que los procesos celulares en los que intervienen las vitaminas y su alteración están íntimamente ligados a la transformación neoplásica, los estudios epidemiológicos al respecto muestran resultados no concluyentes. En general, los resultados del estudio publicado por Tamini y colaboradores, uno de los más amplios y recientes al respecto, muestran una relación inversa entre mayores concentraciones de carotenoides en plasma y el riesgo de desarrollar un cáncer de mama. Los resultados no permitieron limitar esta habilidad a ningún tipo concreto de carotenoide aunque la correlación fue mayor en el caso de los  $\beta$ -carotenos y más significativa en los casos de cáncer de mama invasivos con afectación ganglionar (Tamini y cols., 2005). Cho y colaboradores encontraron también una relación inversa entre los niveles de vitamina A y el riesgo de cáncer de mama limitada a las mujeres premenopáusicas fumadoras, pero ninguna evidencia que correlacionara dicho riesgo con el mayor consumo de vitaminas C, E o folatos (Cho y cols., 2003). Un reciente meta-análisis incide en la relación entre los niveles de ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub> y vitamina B<sub>6</sub> y el riesgo de cáncer de mama que es directa en el caso de mujeres que registran un moderado o elevado consumo de alcohol, ya que este último influencia negativamente la absorción y metabolismo de los folatos provocando un severo déficit que aumenta el riesgo de desarrollar un cáncer de mama (Zhang y cols., 2003; Larsson y cols., 2003). Por último, algunos estudios prospectivos muestran un discreto efecto protector de la vitamina D frente al cáncer de mama. Además estudios ecológicos observan que la exposición solar se relaciona directamente con una disminución del riesgo de cáncer de mama y por tanto, es posible que la exposición a la radiación solar y un adecuado consumo de vitamina D sean factores protectores frente al cáncer en aquellos órganos en los que se hayan presentes las hidroxilasas capaces de transformar la vitamina D en calcitriol, entre ellos la mama (Donaldson, 2004; Giovannucci, 2005), aunque los estudios epidemiológicos en cuanto al consumo de lácteos, la principal fuente de vitamina D, no encuentren una fuerte asociación.

### 1.2.11 Ejercicio

La actividad física es considerada como un factor modificable capaz de influenciar el riesgo de desarrollar un cáncer, entre ellos una neoplasia mamaria. La práctica habitual y

prolongada de ejercicio físico a lo largo de la vida se ha correlacionado positivamente con una reducción significativa del riesgo de desarrollar un cáncer de mama (Vainio y cols., 2002).

Son diversos los mecanismos biológicos propuestos como origen de esta relación. Entre ellos destacan que el ejercicio físico modula los niveles de estrógenos y progesterona, estimula al sistema inmune y reduce los niveles de insulina y otros factores de crecimiento (Margolis y cols., 2005). Parece que este efecto es especialmente notable en mujeres posmenopáusicas, pues el ejercicio físico previene la ganancia de peso y la obesidad que son dos factores de riesgo en cuanto al desarrollo de un cáncer de mama después de la menopausia (McTiernan y cols., 2003).

### 1.2.12 Alcohol

A lo largo de las dos últimas décadas se han publicado una serie de estudios epidemiológicos y estudios animales que evidencian la relación directa entre el consumo de alcohol y el mayor riesgo de desarrollar un cáncer de mama (Singletary y Gapstur, 2001). El meta-análisis publicado por Smith-Warner y colaboradores muestra que el RR de desarrollar una neoplasia mamaria en mujeres que ingieren  $\geq 30$  g/día de alcohol con respecto a mujeres abstemias es de 1,41 y que esta relación es dosis-dependiente, pues dicho riesgo relativo disminuye hasta alcanzar el valor de 1,09 cuando la ingesta de alcohol es de 10g/día (Smith-Warner, 1998).

En general, la relación entre el alcohol y el cáncer de mama ha sido observada independientemente del tipo de bebida alcohólica consumida o del estatus menopáusico, si bien parece existir una directa relación entre el consumo de alcohol y la sobreexpresión de receptores hormonales del tumor. En un reciente estudio el grupo de trabajo del *Women's Health Initiative Study* muestra una correlación positiva entre el consumo de alcohol y los tumores RE+RP+ (Zhang y cols., 2007). Esta observación es reforzada por el hecho de que el consumo de alcohol en mujeres premenopáusicas está asociado con mayores concentraciones de estradiol, estrona, androstendiona, testosterona y hormona folículo-estimulante. Comparadas con las mujeres abstemias, en aquellas que consumen alcohol aún moderadamente se observa una regularización y alargamiento del ciclo menstrual y por tanto una mayor exposición a las hormonas sexuales. Similares resultados han sido descritos en mujeres posmenopáusicas que

no siguen una THS y aún efectos mayores entre las que sí siguen dicha terapia (Singletary y Gapstur, 2001).

En cuanto a la modificación que otros factores nutricionales o genéticos desempeñan en la relación entre el consumo de alcohol y el cáncer de mama, destaca que el consumo de alcohol limita la disponibilidad de nutrientes esenciales considerados como protectores frente al cáncer de mama. En esta línea es conocido que una insuficiente ingesta de ácido fólico combinada con el consumo de alcohol origina una alteración del metabolismo del ácido fólico o la meteonina que podría alterar el proceso normal de metilación y reparación del ADN. El consumo de alcohol también ha sido correlacionado con la disminución en los niveles plasmáticos de luteína,  $\beta$ -carotenos y vitamina C. El hecho de que el consumo de alcohol no solo disminuya la biodisponibilidad de potenciales antioxidantes como las vitaminas, sino que además, su metabolismo origine especies óxido-reactivas de oxígeno directamente implicadas en la carcinogénesis mamaria, refuerza los resultados obtenidos numerosos estudios epidemiológicos que relacionan estas dos variables (Singletary y Gapstur, 2001; Dumitrescu y Shields, 2005).

### 1.2.13 Tabaco

Los resultados de los estudios epidemiológicos con respecto al consumo de tabaco y el riesgo de desarrollar un cáncer de mama no han resultado concluyentes. Durante las dos últimas décadas diversos estudios han mostrado en general una débil asociación o una asociación nula entre el riesgo de cáncer de mama y el consumo de tabaco. Sin embargo los más amplios y recientes trabajos muestran una asociación positiva entre el consumo de tabaco a largo plazo y el consumo de tabaco previo al primer embarazo (Gram y cols., 2005).

Comparadas con las mujeres no fumadoras, las fumadoras registran una menor concentración de estrógenos en orina durante la fase luteal del ciclo menstrual. Dicha relación motivó que durante varios años le fuera conferido al consumo de tabaco un papel antiestrogénico. Sin embargo la percepción de este efecto protector frente al cáncer de mama comenzó a perder consistencia con la publicación en el año 2002 de un meta-análisis de 53 estudios epidemiológicos en el que los autores concluyeron la positiva asociación entre el cáncer de mama y el consumo de tabaco (Hamajima y cols., 2002). Tras este estudio, los trabajos llevados a cabo al respecto tienden a corroborar dicha asociación y sugieren que el tabaco ejerce un efecto dual sobre las células mamarias epiteliales, cuyas consecuencias dependen del

estatus menopáusico, grado de diferenciación de las células epiteliales, edad en el comienzo del consumo de tabaco y duración del mismo. De este modo aquellas mujeres que comienzan a consumir tabaco en edades tempranas, es decir al menos en los 5 años siguientes a la menarquia, y continúan haciéndolo al menos durante 20 años registran un riesgo incrementado de padecer una cáncer de mama pues durante este tiempo las células epiteliales del tejido mamario no han llegado a diferenciarse completamente y por tanto son mucho más susceptibles al efecto mutagénico de los potentes carcinógenos contenidos en el humo del tabaco. El posible efecto antiestrogénico del tabaco en mujeres premenopáusicas sería prácticamente inapreciable e insuficiente como mecanismo protector dada la elevada producción de éstos por los ovarios; sin embargo, esta relación no es observada en mujeres posmenopáusicas fumadoras. Algunos compuestos del humo del tabaco son capaces de inhibir la aromatización de los andrógenos a estrógenos en el tejido adiposo y, dada que esta es la principal fuente de estrógenos en la mujer posmenopáusica, dicho efecto antiestrogénico podría ejercer un efecto protector aunque no exento de salvedades pues sólo afectaría a aquellas mujeres con un alto IMC en las que el contenido en tejido adiposo fuera suficiente como para que la producción periférica de estrógenos suponga un aumento significativo del riesgo (Gram y cols., 2005; Russo, 1998).

### 1.2.14 Radiación

La radiación ionizante es uno de los factores medioambientales mejor establecidos con respecto al riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria. Esta evidencia deriva de estudios epidemiológicos llevados a cabo en la población japonesa superviviente a las bombas de Hiroshima y Nagasaki, en pacientes que han recibido radioterapia o que se han sometido repetidamente a procedimientos diagnósticos con rayos-X. Se ha estimado que estas mujeres poseen un riesgo 1,4-2,2 veces superior al de mujeres que no han recibido radiación. La edad en la que se lleva a cabo la exposición es determinante, pues en su mayor parte los diagnósticos de cáncer de mama se llevan a cabo en mujeres jóvenes que fueron expuestas a la radiación en su adolescencia (Coyle, 2004; Mohan y cols., 2002).

Tanto pilotos como el personal de vuelo han sido objeto de algunos estudios observacionales con objeto de determinar si la exposición ocupacional de estos profesionales a la radiación cósmica, podría estar relacionada con un aumento en el riesgo de padecer un cáncer de mama. Los resultados de los estudios llevados a cabo son ciertamente dispares y además, existen otra serie de factores ligados a esta profesión, tales como alteraciones hormonales ocasionadas por el cambio del ritmo circadiano, exposición al combustible aéreo o la

influencia de la fuerza electromagnética, que podrían enmascarar el posible efecto de la radiación cósmica sobre el riesgo de desarrollar un cáncer de mama (Coyle, 2004; Kojo y cols., 2005).

En cuanto a la radiación solar, algunos estudios han valorado su efecto protector frente al cáncer de mama, particularmente por su relación con la vitamina D. De este modo se ha observado que aquellas mujeres diagnosticadas en verano de un cáncer de mama, cuando los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D son más elevados, registran mayores tasas de supervivencia que aquellas mujeres diagnosticadas en invierno o primavera (Grant y Gorham, 2006).

### 1.2.15 Xenoestrógenos y contaminantes ambientales

Aquellos compuestos químicos de estructura molecular muy similar a los estrógenos presentes en la dieta o el ambiente son conocidos como xenoestrógenos. Esta similitud estructural ha llevado a multitud de científicos a investigar el posible rol de dichos compuestos en la etiología del cáncer de mama y de este modo se han publicado trabajos tanto *in vitro* como *in vivo* que muestran que los xenoestrógenos alteran el metabolismo estrogénico induciendo la carcinogénesis (Davis y cols., 1993).

Los xenoestrógenos son un grupo diverso de compuestos químicos sintéticos, como algunos pesticidas organoclorados tales como el DDT -2,2-bis(p-clorofenil)-1,1,1 tricloroetano-, frecuentemente utilizados en pasadas décadas para el control de plagas de insectos en la agricultura, preservación forestal o zonas en construcción. Los compuestos organoclorados se degradan muy lentamente, son liposolubles y por tanto bioacumulables tanto en los alimentos como en la sangre, leche y tejido adiposo humano de tal forma que la exposición de las células a estos compuestos es prolongada una vez que son incorporados al organismo. Los BPC (bifenilos policlorados) presentes en plásticos y aislantes eléctricos poseen también cierta actividad estrogénica (Davis y cols., 1993; Safe, 1997).

En 1993 Wolff y colaboradores publicaron un estudio caso-control cuyos resultados mostraron que la incidencia de cáncer de mama era 4 veces superior entre mujeres con una alta concentración en sangre de DDE (Cloredifenildicloroetano), un metabolito de alta prevalencia derivado del DDT, y BPCs en comparación con aquellas mujeres que presentaron niveles reducidos en sangre de dichas sustancias. Tan solo un trabajo, el llevado a cabo por Hoyer y

colaboradores, ha analizado la relación entre el riesgo de cáncer de mama y la edad de exposición a los xenoestrógenos, obteniendo resultados que sugieren un incremento del riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria cuando la edad de exposición es anterior a los 10 años (Coyle, 2004).

Últimamente algunos investigadores han señalado la necesidad de estudiar factores genéticos de susceptibilidad a la posible acción carcinogénica de los xenoestrógenos, pues características individuales tales como la existencia de polimorfismos en genes que codifican enzimas metabólicas, podrían enmascarar o alterar la relación entre la exposición a los xenoestrógenos y el cáncer de mama. Por otra parte, es muy posible que los xenoestrógenos interactúen con otros factores ambientales, dietéticos o reproductivos dando lugar a un efecto antagonista o sinérgico sobre el riesgo de cáncer de mama y por tanto, no medible en base a diferencias en la concentración de una sola sustancia en el organismo (Ibarluzea y cols., 2004; Fernández y cols., 2007).

A pesar de que los estudios llevados a cabo, no han determinado de un modo concluyente la relación entre los contaminantes ambientales y el riesgo de cáncer de mama, sugieren que la exposición a los mismos combinada con la predisposición genética de una proporción de la población expuesta, la edad y las características particulares del metabolismo hormonal de cada individuo, ejercen un efecto acumulativo sobre el riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria.

### 1.3 Oncogénesis molecular

El cáncer es el resultado de la proliferación no controlada de un grupo de células que, posteriormente y como estrategia de supervivencia, adquieren cierta capacidad invasiva que les permite migrar y colonizar otros tejidos y órganos. La consecuencia es un desequilibrio entre una masiva división celular no compensada por la pérdida o muerte celular, que da lugar a la aparición de masas de células que invaden y dañan los tejidos y órganos del huésped.

El origen de estos eventos proliferativos es conocido como oncogénesis y se define como un complejo proceso dinámico en el que intervienen un elevado número de variables y se desarrolla a lo largo de múltiples etapas temporales y espaciales (Grizzi y cols., 2006). El proceso oncogénico se divide en tres etapas principales denominadas iniciación, que a su vez se subdivide en las etapas de inmortalización y transformación, promoción y progresión. Los

mecanismos moleculares que originan y permiten la consecución de estas etapas son alteraciones genéticas que pueden afectar a un solo nucleótido, pequeños fragmentos de ADN, genes completos, componentes estructurales de los cromosomas, cromosomas completos e incluso grupos de cromosomas. Por tanto el cáncer es una enfermedad de origen genético caracterizada por una marcada inestabilidad genética que ocasiona la adquisición de múltiples mutaciones que dan lugar al fenotipo transformado (Grizzi y cols., 2006, Russo y Russo, 1996).

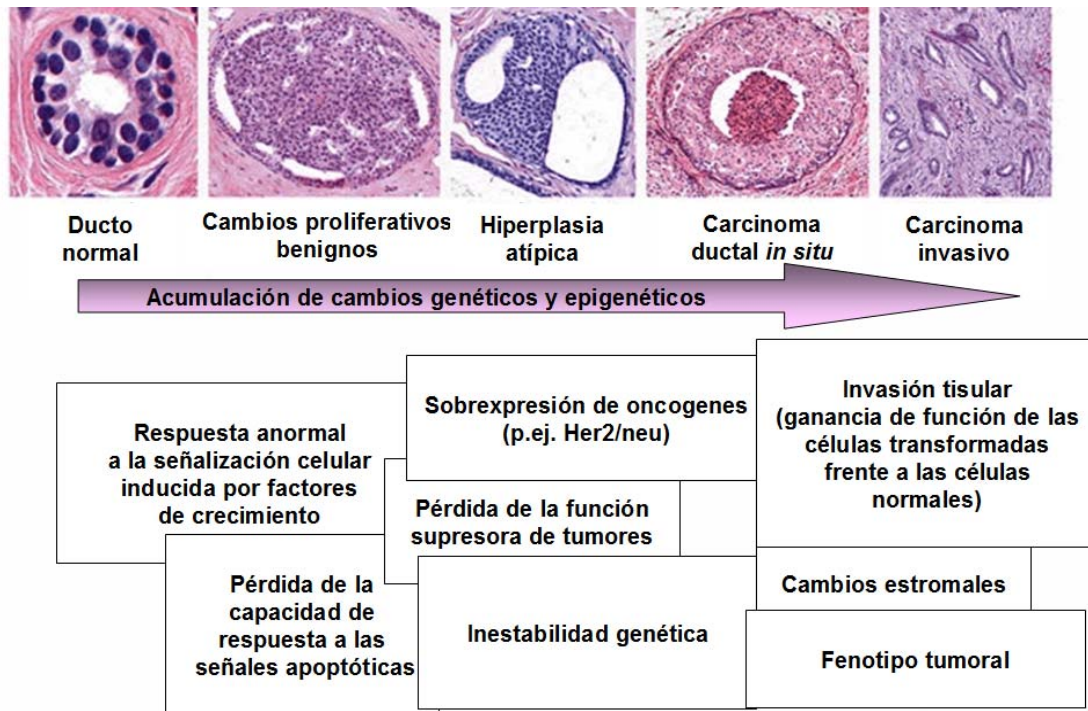


Figura 2. Secuencia de imágenes que ilustran la transformación oncogénica y esquema de los principales eventos que la acompañan

### 1.3.1 Iniciación

La iniciación consiste en un conjunto de aberraciones génicas y cromosómicas no letales que originan una célula alterada y, al menos, una ronda de replicación que fije dichas alteraciones en las dos células hijas resultantes.

La finalización del proyecto genoma y el espectacular avance en el desarrollo de las técnicas experimentales de las últimas décadas, han permitido identificar algunas mutaciones específicas que con alta frecuencia originan las neoplasias mamarias. A pesar de ello, el mecanismo de la oncogénesis es aún desconocido. Estudios *in vitro* con series de líneas celulares mamarias, como MCF10, permiten caracterizar algunos de las alteraciones citogenéticas y moleculares de mayor relevancia en la oncogénesis. Las grandes alteraciones

cromosómicas son un evento que puede ser observado repetitivamente en este tipo de estudios y su caracterización molecular permite encauzar la búsqueda de las alteraciones génicas que, en última instancia, son responsables de la oncogénesis. Aberraciones cromosómicas tales como translocaciones, amplificaciones, deleciones u otros tipos de reordenaciones cromosómicas alteran, por exceso o defecto, la expresión de genes cruciales en el control del crecimiento celular originando clones transformados. Concretamente se ha observado que, en series de células MCF10, el paso de células mamarias normales (MCF-10M) a células inmortales no transformadas (MCF-10A y MCF-10F) y progenitoras de subsecuentes células tumorigénicas, es precedido por una serie de reordenamientos cromosómicos que implican la ganancia a pérdida de copias de genes tan importantes en el control del crecimiento celular como CDKN2 (*cyclin dependent kinase inhibitor 2*), un inhibidor del ciclo celular localizado en 9p que en células inmortales es perdido por completo. También son frecuentes en este tipo de células la pérdida de una sola copia de genes concretos; este fenómeno es conocido como pérdida de heterocigosidad (cuyo acrónimo en inglés es LOH, *Loss of Heterocygosity*) y es uno de los eventos más frecuentes en la oncogénesis, ya que posibilita la expresión de mutaciones recesivas proto-oncogénicas por eliminación del alelo normal. Éste es el caso de genes como Bcl-2, situado en 18q, que codifica una proteína de la membrana mitocondrial que bloquea la apoptosis, o de los genes supresores de tumores BRCA2 y RB (gen del retinoblastoma), situados en 13q y el gen supresor de tumores p53 situado en 17q. Entre las ganancias iniciadoras del proceso de immortalización destacan la del gen c-Myc, que codifica un factor transcripción nuclear y la del factor de crecimiento Her2. Se cree que el proceso que da lugar a estas amplificaciones génicas implica inicialmente la formación de unidades extracromosómicas con capacidad para la autorreplicación, conocidas como *double-minute chromosomes*, que posteriormente se incorporan al cuerpo del cromosoma dando lugar a regiones de tinción homogénea. La transformación de células immortalizadas da lugar a clones capaces de formar un tumor viable en el tejido mamario. Entre las alteraciones génicas que posibilitan la transformación celular destacan la amplificación de genes que codifican proteínas relacionadas con la angiogénesis como el VEGF (*vascular endothelial growth factor*), con la señalización intracelular como el HRAS (*harvey rat sarcomal viral oncogene*) o el control del crecimiento celular como la IL13 (interleuquina 13), entre otros. En general los estudios muestran que las amplificaciones son más frecuentes en ciertas regiones de los cromosomas 1, 6, 13 y 16, mientras las pérdidas los son en regiones de los cromosomas 20 y 22 (Grizzi y cols., 2006; DeVita y cols., 2005; Russo y Russo, 2000).



### I.3.2 Promoción

Tras la transformación las células neoplásicas, capaces de crecer incontroladamente y evadir al sistema inmune, se dividen masivamente dando lugar a tumores invasivos. El tumor entra en la etapa de promoción de la carcinogénesis en la que adquiere nuevas mutaciones genéticas y alteraciones epigenéticas que le permiten crecer, obteniendo del huésped los nutrientes y el oxígeno necesario para ello. La etapa de promoción requiere la presencia continua de los estímulos oncogénicos y por tanto es un proceso reversible. En este punto resulta imprescindible la interacción positiva con toda la red de factores de crecimiento, de transcripción y, en el caso de la mama, factores hormonales que regulan la biología del tejido en que se aloja.

Entre las influencias hormonales en el desarrollo de una neoplasia mamaria, la ejercida por los estrógenos y progestágenos es considerada clave. Ambas hormonas son lipofílicas, por lo que difunden a través de las membranas celular y nuclear llegando al núcleo celular donde interactúan con sus receptores específicos. El RE (receptor de estrógenos) es un homodímero, mientras que el RP (receptor de progesterona) es una proteína heterodimérica. Ambos pertenecen a la superfamilia esteroide/tiroide de receptores hormonales nucleares que actúan como factores de transcripción. Existen dos tipos de receptores estrogénicos, RE $\alpha$  y RE $\beta$ , ambos poseen una estructura modular que incluye dominios de unión al ligando y a regiones específicas del ADN. Una vez que el RE se ha unido a su ligando, forma homodímeros que poseen la capacidad de unirse a regiones del ADN con alta afinidad conocidas como EREs (*estrogen responsive elements*) presentes en genes cuya expresión se haya modulada por los estrógenos; la interacción con los EREs activa el reclutamiento de coactivadores y moléculas constituyentes de la maquinaria de transcripción hacia regiones promotoras del gen, que consecuentemente se expresa. Este mecanismo es conocido como la vía genómica o vía clásica de acción de los estrógenos. Aunque ambos tipos de RE son homólogos en cuanto a sus regiones de unión al ADN y al ligando, el gen que codifica el RE $\beta$  es más pequeño y codifica una proteína de menor longitud. Algunos estudios experimentales sugieren que el RE $\beta$  estaría implicado en la modulación negativa de la actividad de la actividad del RE $\alpha$  e incluso, que podría ser el responsable de la modulación de la expresión de proto-oncogenes nucleares a través de las vías de señalización intracelular activadas por los factores de crecimiento celulares. Este último mecanismo es conocido como vía no-genómica o vía extranuclear de acción de los esteroides y es de especial interés en cuanto al estudio de la resistencia a la terapia antihormonal del cáncer de mama (Anderson, 2002; Song y Santen, 2006). Entre aquellos genes cuya expresión es sensible a los

estrógenos se encuentra el gen que codifica el RP. Dicho gen da lugar a dos tipos de RP transcritos desde codones de iniciación presentes en dos promotores alternativos, RPA y RPB. Tras su unión al ligando, activan la transcripción de genes diana por el mismo mecanismo que los REs, pues dichos genes presentan elementos PREs (*progesterone responsive elements*) que permiten tal interacción (Gao y Nawaz, 2002). La localización y cuantificación de los REs y RPs, tanto en células mamarias normales como en células neoplásicas, ha sido posible gracias a al desarrollo de técnicas de inmunohistoquímica. Dichos estudios muestran que los RE $\alpha$  y RPs se expresan específicamente en un 15-30% de las células epiteliales luminales del tejido mamario normal. Además, estudios de inmunofluorescencia con doble sonda, han demostrado que aquellas células que expresan ambos receptores esteroideos no proliferan, pero se encuentran espacialmente muy próximas a las células en división. Esta disociación lidera la hipótesis de que las hormonas esteroideas controlan la actividad proliferativa de células epiteliales luminales sanas de forma indirecta, actuando como sensores que activan la secreción yuxtacrina o paracrina de factores de crecimiento que influencia la actividad mitótica de células adyacentes y constituye un mecanismo de defensa que evita la proliferación excesiva y en momentos inadecuados (Anderson, 2002; Song y Santen, 2006). Sin embargo la mayoría de los tumores mamarios invasivos, en torno a un 70% del total, contienen una alta proporción de células que sobreexpresan RE $\alpha$  y que, contrariamente a lo que ocurre en el epitelio luminal normal, presentan una alta tasa de proliferación. Por tanto, una característica diferencial entre el tejido tumoral y el tejido sano es la pérdida de la relación inversa entre la tasa de proliferación y la expresión de RE $\alpha$  debido a la selección de un mecanismo autocrino prevalente en las células transformadas. Existen datos que muestran que la expresión de RE $\beta$  es menor en lesiones transformadas comparada con la del tejido mamario normal y que la proporción RE $\alpha$ /RE $\beta$  aumenta conforme aumenta la malignidad de dichas lesiones. Este hecho concuerda con la posible acción inhibitoria de RE $\beta$  sobre la expresión de RE $\alpha$  (Anderson, 2002). En cuanto al RP, se encuentra sobreexpresado en un 60% de los tumores mamarios invasivos y la proporción PRA/PRB, que permanece constante desde la pubertad a la gestación en el tejido mamario normal, aumenta conforme aumenta la malignidad de los mismos (Gao y Nawaz, 2002). Aquellas pacientes cuyos tumores expresan concomitantemente RP y RE $\alpha$  son inicialmente candidatas idóneas para recibir hormonoterapia, sin embargo, solamente dos tercios de las mismas responden al tratamiento endocrino (DeVita y cols., 2005), de lo que es posible deducir que el mecanismo molecular dependiente de hormonas esteroideas en el cáncer de mama no está completamente elucidado.

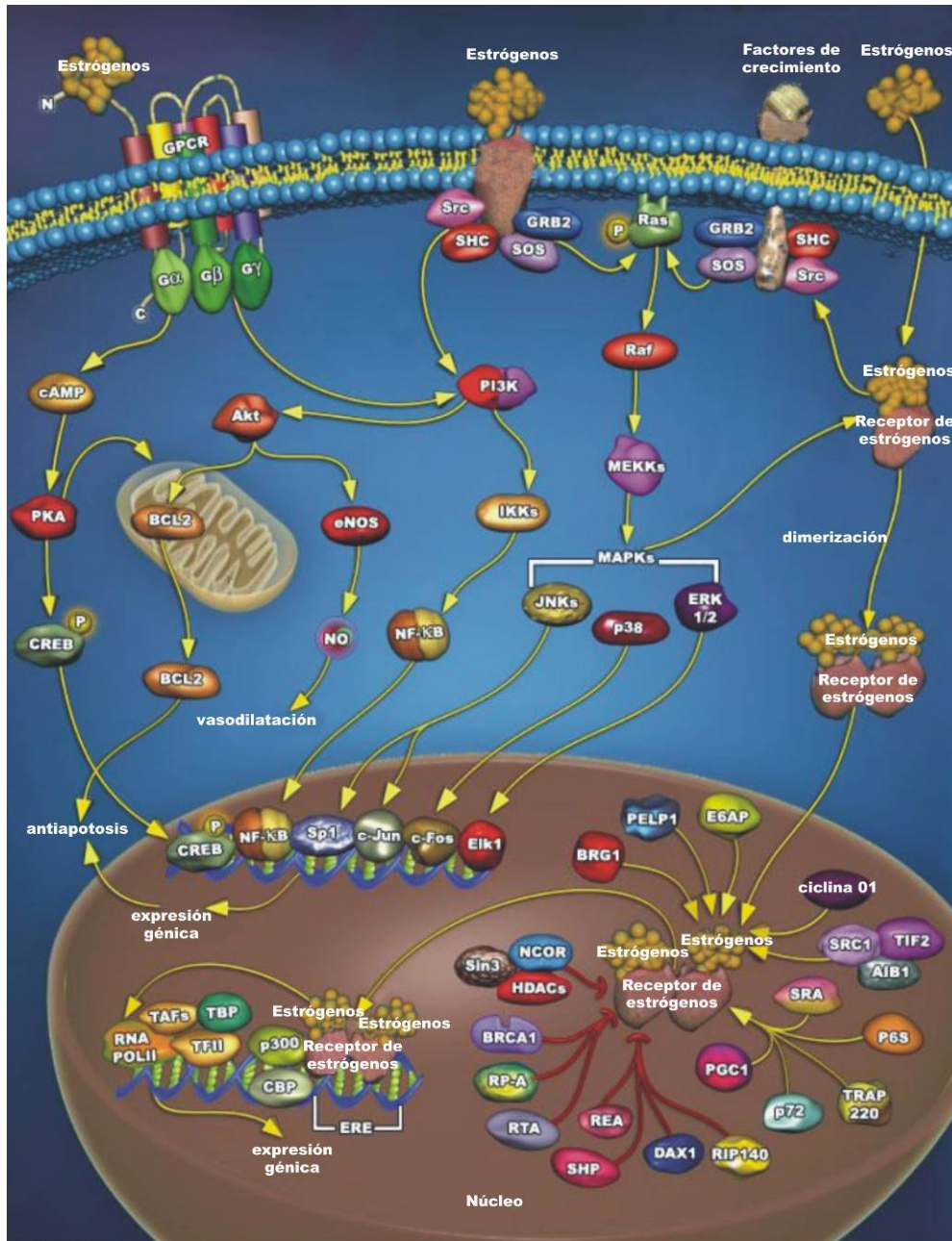


Figura 3. Esquema de la ruta de señalización intracelular activada por el RE

Además y pesar de que el cáncer de mama es una enfermedad hormonodependiente en una alta proporción de los casos, es también posible diagnosticar tumores que no sobrexpresan RE ni RP (RE-RP-). Generalmente los tumores RE-RP- suelen presentar una presentación de bajo grado de diferenciación y se asocian a un peor pronóstico, mayor riesgo de recaída y metástasis. En dichos tumores es también posible encontrar una elevada sobre-expresión de los factores de crecimiento, los receptores de éstos y proteínas implicadas en la transducción de señales, exhibiendo por tanto un crecimiento independiente de estímulos hormonales, adquirido gracias a la amplificación génica acontecida durante etapas tempranas de la carcinogénesis (Hamelers y Steenbergh, 2003; Mackay y Twelves, 2003; Fry, 2001). La mayor agresividad clínica de los

tumores RE-RP- concuerda con el hecho de que, conforme el tumor progresa, las células adquieren la capacidad de crecer autónomamente gracias a nuevas mutaciones genéticas y cambios epigenéticos adquiridos espontáneamente durante la intensiva actividad proliferativa, es decir, el tumor prolifera independientemente de los estímulos hormonales desarrollando resistencias al tratamiento antihormonal.

Las secreciones de la mama son ricas en factores de crecimiento. Los factores de crecimiento llevan a cabo importantes funciones tanto en el lactante como en el normal crecimiento y desarrollo de la mama. Además, como se menciona el párrafo anterior, las células que expresan RE activan la proliferación de células adyacentes mediante la secreción paracrina de factores de crecimiento. La familia del EGF (*epidermal growth factor*), que incluye al propio EGF, al TGF $\alpha$  (*transforming growth factor  $\alpha$* ), ampirregulinas y receptores de factores de crecimiento como EGRFR (*EGF receptor*) y el receptor relacionado con EGF, Her2; la familia IGF (*insulin growth factor*) que incluye al factor de crecimiento IGF-II, receptores como IGFIIR, IGFIIR y el receptor de la insulina, y proteínas de unión a los factores de crecimiento IGF-BPs (*IGFs binding proteins*) como IGF-BP3 e IGF-BP4 y FGF (*fibroblast growth factor*) (DeVita y cols., 2005), activan la vía de señalización intracelular mediada por receptores tirosín-quinasa que, tras la unión al ligando, sufren un cambio conformacional que estimula la autofosforilación por activación de la actividad tirosín-quinasa y la transfosforilación de proteínas adaptadoras unidas al receptor, que desencadenan la respuesta celular por la fosforilación de la proteína RAS. Subsiguientes fosforilaciones de otras quinasas como Raf-1, MAPKKs (*mitogen activated protein kinase kinases*) y MAPKs (*mitogen activated protein kinases*), factores de transcripción y quinasas del ciclo celular completan la cascada de activación, que culmina con la división celular (Xing e Imagawa, 1997; Andrecheck y Muller, 2000; Hamelers y Steenbergh, 2003; Powers y cols., 2000). Alternativamente, algunos miembros de estas familias de factores de crecimiento ejercen su efecto proliferativo a través de la activación de otras vías de señalización intracelular, como la vía de la IP3K (*inositol phosphatidil 3-kinase*), de la PLC $\gamma$  (*phospholipase C $\gamma$* ) o la vía JNK/STAT (*janus tyrosin kinases/signal transducers and transcription activators*). La vía de la IP3K consiste igualmente en una cascada de fosforilación iniciada por la autofosforilación de un receptor tirosín-quinasa unido a su ligando, que activa a la IP3K originando derivados como el PIP3 (*phosphatidil-inositol 3-phosphate*), capaces de activar a serín/treonín-quinasas como la PKB/AKT (*protein kinase B/v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*) que origina señales antiapoptóticas y proliferativas y reduce la adhesión intercelular aumentando la motilidad de las células (Fry, 2001; Xing e Imawa, 1999). En cuanto a la vía de la PLC  $\gamma$ , esta enzima es activada

por factores de crecimiento como FGFs, que una vez que se unen a sus receptores transmembrana tirosín-quinasa y se autofosforilan activando a la propia PLC $\gamma$  a la que se encuentran físicamente unidos por puentes disulfuro. PLC $\gamma$  activada cataliza la ruptura de una molécula de PIP2 (*phosphatidil-inositol-4,5-biphosphate*) liberando IP3 (*inositol triphosphate*) y DAG (diacilglicerol). Este último activa a la PKC (*protein kinase C*), cuya función será la de activar otras quinasas completando la cascada de activación que finalmente señala la transcripción de genes relacionados con la proliferación celular (Powers y cols., 2000; Mackay y Twelves, 2003). Finalmente, algunos factores de crecimiento como EGF, PDGF (*platelet derived growth factor*), hormonas como la GH (*growth hormone*) o la PRL (prolactina) y ciertas citoquinas llevan a cabo su función biológica a través de la activación de la vía JAK/STAT, pues la unión de estas moléculas a sus receptores estimula la actividad quinasa de estos últimos fosforilando y activando a las quinasas JAK, cuyo sustrato son las proteínas STAT. Una vez fosforiladas, las proteínas STAT dimerizan y se translocan al núcleo celular uniéndose a regiones promotoras de genes diana y activando su transcripción. La sobreexpresión de proteínas STAT es observable en multitud de líneas celulares tumorales y tumores primarios, incluyendo enfermedades sanguíneas y tumores sólidos como las neoplasias mamarias. Dicha sobreexpresión confiere a las células un fenotipo transformado, pues se asocian a la activación de la transcripción de inhibidores de la apoptosis, reguladores del ciclo celular e inductores de la angiogénesis. Por otro lado, la desregulación de las funciones de STATs en la actividad del sistema inmune contribuiría al crecimiento y desarrollo de las neoplasias mamarias (Calo y cols., 2003).

Otra importante familia de factores de crecimiento es la familia del factor de crecimiento TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) que incluye tres isoformas, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3, implicadas en procesos de regulación del crecimiento, síntesis de la matriz extracelular y modulación inmune. Estas actividades son llevadas a cabo a través de su unión a receptores transmembrana específicos con actividad serín/treonín-quinasa, T $\beta$ RI y T $\beta$ RII. Los TGF $\beta$ s se unen al T $\beta$ RII tras lo que T $\beta$ RI es reclutado al complejo ligando-receptor y fosforilado. T $\beta$ RI fosforilado y activo inicia una cascada de activación fosforilando a las proteínas Smad2 y Smad3, que se asocian a al transportador nuclear Smad4 y son translocadas al núcleo donde regulan la transcripción de genes asociados con la apoptosis y la inhibición de la proliferación celular. Además de esta acción directa sobre las células epiteliales de la mama, los TGF $\beta$ s actúan sobre el estroma manteniendo una correcta arquitectura tisular. Por tanto los TGF $\beta$ s son considerados como supresores tumorales capaces de inhibir la oncogénesis, sin embargo, estudios con modelos animales han demostrado que la pérdida de función de los TGF $\beta$ s a causa de la



inhibición de la expresión de T $\beta$ RII, está asociada a un mayor riesgo de transformación neoplásica, de hecho, se ha sugerido que la transcripción de T $\beta$ RII es reducida en etapas tempranas de la oncogénesis mamaria humana y que el mecanismo que confiere mayor potencial neoplásico es indirecto, ya que los TGF $\beta$ s actuarían sobre las células estromales disminuyendo la respuesta inmune y activando la angiogénesis. De todo ello es posible deducir que los TGF $\beta$ s poseen un rol dual en la oncogénesis mamaria que dependerá de la sensibilidad de las células epiteliales a este factor de crecimiento (Wakefield y cols., 2000; Muraoka-Cook y cols, 2005).

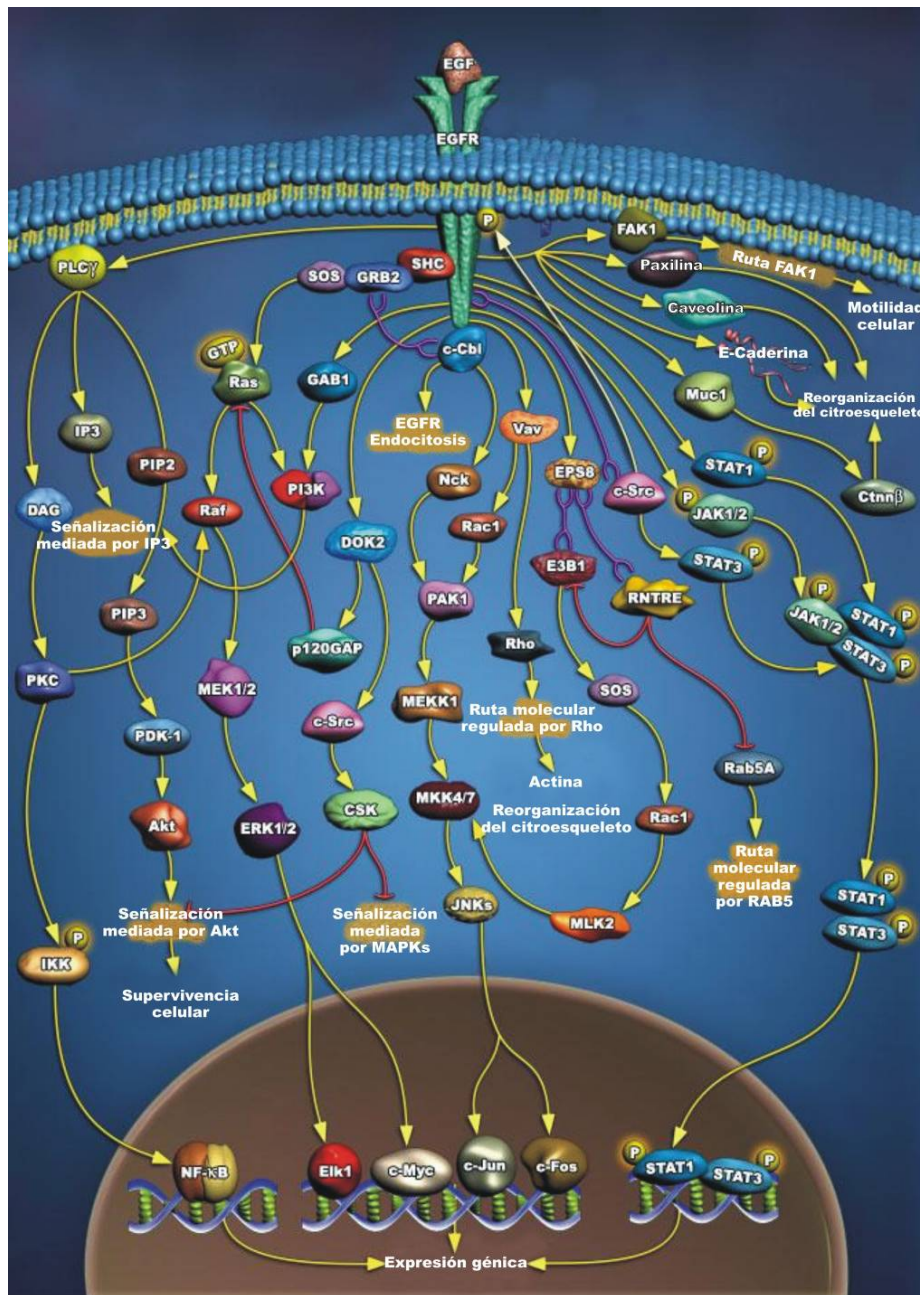


Figura 4. Esquema de la cascada de señalización intracelular activada por los factores de crecimiento de la familia EGF.

Todos los procesos reguladores endocrinos, autocrinos y paracrinos de la proliferación epitelial mamaria convergen en el ciclo celular. La regulación del ciclo celular es llevada a cabo por un complejo sistema de moduladores entre los cuales el producto del gen RB, las ciclinas, CDKs (*cyclin dependent kinases*) y CDKIs (*CDK inhibitors*), juegan un papel clave. El gen RB es considerado como un gen supresor de tumores, ya que la proteína que codifica, es capaz de inhibir la proliferación celular en la etapa G1 del ciclo celular. Las ciclinas son proteínas que regulan la actividad de quinasas implicadas en el control del ciclo celular a través de interacción directa. Las ciclinas son activadas secuencialmente, la ciclina D1 es activada durante la fase G1 del ciclo celular y la ciclina E en etapas posteriores, modulando la actividad de las CDKs cuya misión es fosforilar a RB, inactivándola y permitiendo la progresión del ciclo celular. Es posible observar amplificaciones del gen que codifica la ciclina D1 en un 20% de los casos de cáncer de mama y la sobre-expresión del mismo en más del 50%. La ciclina D1 no sólo activa directamente el ciclo celular, sino que además, activa al RE uniéndose físicamente a él y promoviendo la transcripción mediada por esteroides. Este hecho sugiere que la expresión de la ciclina D1 debe seguir un proceso de retroalimentación positiva en células transformadas. La ciclina E, al igual que la ciclina D1, modula la actividad de in CDK regulando la transición de la etapa G1 a la etapa S del ciclo celular inhibiendo a RB. La actividad ciclina E está frecuentemente desregulada en células transformadas, encontrándose sobre-expresada en algunos carcinomas mamarios RE- con moderados niveles de ciclina D1, sugiriendo que ambas ciclinas están involucradas en mecanismos de alteración del control del ciclo celular incompatibles. Además de los complejos ciclina-CDKs, la progresión del ciclo celular está regulada por los CDKIs, que son moléculas de bajo peso molecular que inhiben dicha progresión inactivando a las CDKs en respuesta a la actividad de otras proteínas como p53, de reconocida actividad supresora de tumores. La expresión de los genes codificantes de las CDKIs se encuentran frecuentemente mutados en las neoplasias mamarias, de tal forma que su actividad antiproliferativa es inhibida significativamente (Fernández y cols., 1998; Sutherland y Musgrove, 2002).

Frecuentemente, las mutaciones adquiridas por las células durante el proceso de la oncogénesis afectan a genes cuya función biológica consiste en inhibir la transformación celular. Dichas mutaciones son seleccionadas por las células tumorales, pues su inactivación resulta ventajosa en cuanto al crecimiento y supervivencia del tumor. La inactivación ha de ser bialélica, pues un solo alelo sano sería suficiente para mantener la función del gen supresor de tumores, por tanto, la pérdida de función de estos genes durante la oncogénesis corresponde al modelo secuencial *Two hit* de Knudson (DeVita y cols., 2005), por el que el inicialmente se inactiva uno

de los dos alelos a causa de una mutación puntual, tras lo que la delección del segundo alelo origina un fenómeno de LOH que permite la expresión del fenotipo alterado. Mecanismos de inactivación alternativos serían el silenciamiento transcripcional por metilación o pérdida de función por proteólisis o inactivación por fosforilación. Los genes supresores de tumores son clasificados como guardianes (*Gatekeepers*) o cuidadores (*Caretaker*). Los genes guardianes inhiben directamente la oncogénesis regulando el ciclo celular, la apoptosis, la adhesión celular, la transducción de señales y manteniendo la integridad del genoma. Dos de los guardianes más representativos y frecuentemente mutados e inactivados en el cáncer de mama son RB y p53. La inactivación del gen RB ha sido observada en un 20% de las neoplasias mamarias esporádicas mientras la inactivación del gen p53 lo ha sido en 15-70% de los mismos. Los estudios de predicción del pronóstico asociados a las mutaciones en estos dos genes han originado resultados conflictivos en el caso de RB y correlacionado la pérdida de función de p53 con un elevado grado de agresividad clínica del tumor y baja supervivencia general. Por otra parte ambos genes se relacionan con síndromes hereditarios que producen alteraciones oftalmológicas en el caso del gen RB y predisposición al cáncer, entre ellos el de mama, en el caso de p53 (Síndrome de Li-Fraumeni). Los cuidadores sin embargo, incluyen a genes que cuya inactivación no favorece directamente el desarrollo tumoral pero propicia el desarrollo de mutaciones. En un grupo intermedio se encontrarían los genes BRCA1 y BRCA2, responsables de la reparación del ADN, o el gen PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), que es un inhibidor de la vía PI3K/AKT. Estos dos últimos genes también están asociados a síndromes hereditarios de predisposición al cáncer, como el Síndrome del cáncer de mama y ovario hereditarios y el Síndrome de Cowden, mostrando la importancia de su actividad de estos genes en el normal desarrollo y mantenimiento celular (Oliveira y cols., 2005; Lacroix y cols, 2006).

En los últimos años se ha identificado en un número creciente de tumores, entre los que se encuentra el cáncer de mama, un tipo celular altamente indiferenciado que expresa un fenotipo que recuerda al de las células embrionarias totipotentes. Este tipo celular es conocido como células madre tumorales y se cree que son las células que inician el proceso oncogénico. Las células madre tumorales son capaces tanto de autorregenerarse, como de originar clones que se irán diferenciando a lo largo de sucesivas divisiones. Su elevado potencial mitogénico y fenotipo desdiferenciado han conducido a la hipótesis de las células madre tumorales, que las identifica como responsables de la oncogénesis y el mantenimiento de la masa tumoral (Eyler y Rich, 2008).



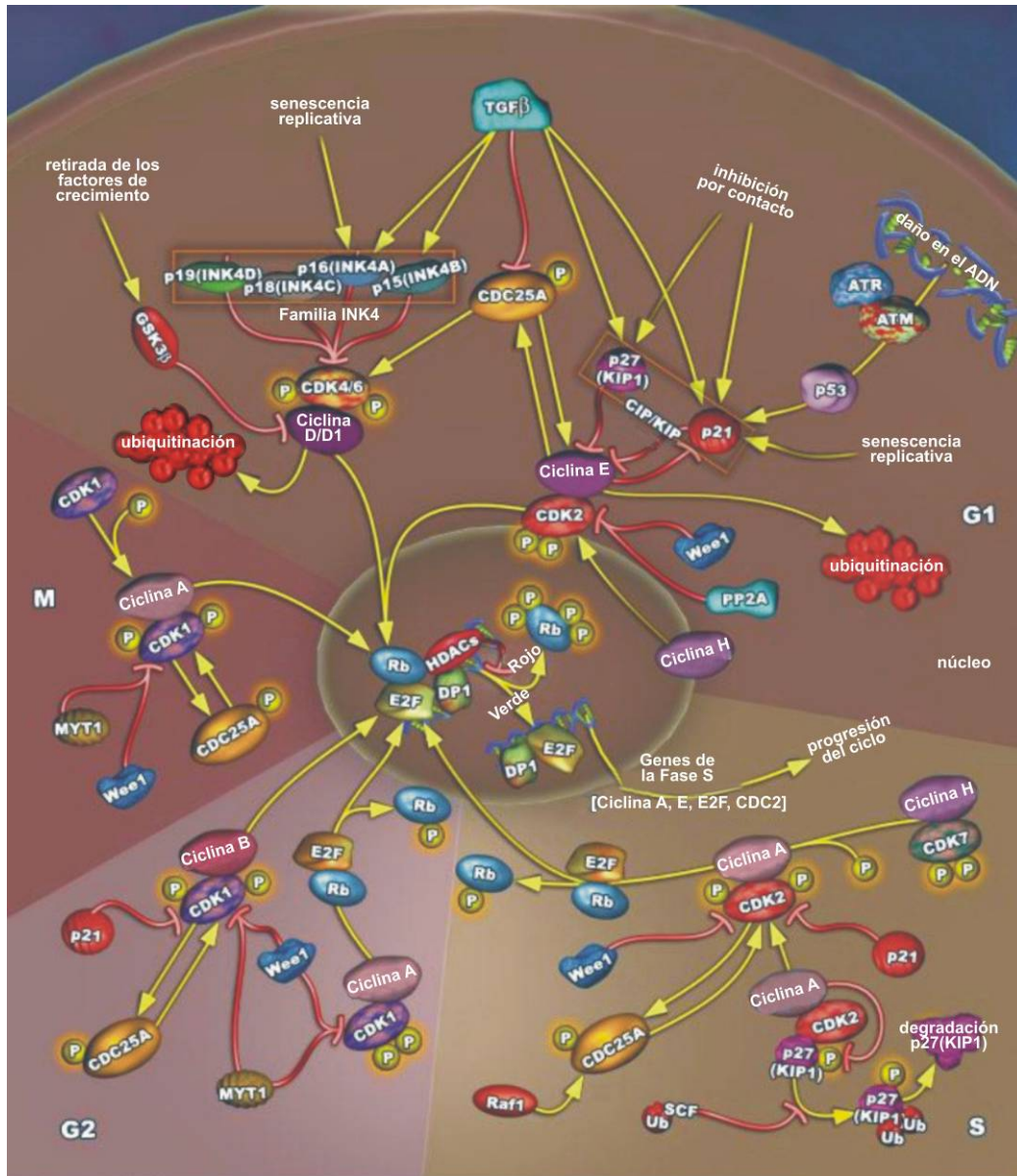


Figura 5. Proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular y su interacción con los genes supresores de tumores.

### 1.3.3 Progresión

La progresión es la etapa final de la oncogénesis y se caracteriza por la acumulación de alteraciones genéticas adicionales, dando lugar a la transición celular desde el fenotipo benigno al transformado. Este proceso se considera irreversible. Durante esta etapa las células tumorales adquieren un fenotipo invasivo que tiene su origen en la expresión de genes relacionados con la remodelación de la matriz extracelular, la motilidad celular y la inducción de la angiogénesis. La interacción entre el carcinoma y los componentes celulares del estroma peritumoral es una novedosa área de conocimiento en oncología molecular, cuyo estudio ha dado lugar a hipótesis que tienen una profunda repercusión en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. Estudios

basados en la implantación ortotópica de tumores humanos en animales han demostrado que el microambiente tumoral ejerce una influencia decisiva en el crecimiento tumoral, capacidad invasiva y respuesta a los quimioterápicos (DeVita y cols., 2005).

Entre la gran variedad de genes expresados de forma no regulada durante la etapa de progresión tumoral destaca un factor de transcripción conocido como NF- $\kappa$ B (*necrosis factor- $\kappa$ B*) pues este factor de transcripción activa la expresión de genes cuyos productos están relacionados con procesos celulares involucrados en la metástasis. De este modo activa la expresión de MMPs (*matrix metalloproteases*) implicadas en la degradación proteolítica de la matriz extracelular, del gen uPA (*urokinase plasminogen activator*) que es un marcador de mal pronóstico y activador de MMPs o de moléculas implicadas en la adhesión celular, como la subunidad  $\alpha_v$  de las integrinas, y en la invasión de la membrana basal, como la vimentina. Además, NF- $\kappa$ B es imprescindible para prevenir la muerte celular inducida por TNF $\alpha$ , la radiación ionizante o algunos quimioterápicos, confiriendo a las células un fenotipo altamente agresivo, metastásico y resistente a muchas de las medidas terapéuticas en el tratamiento del cáncer de mama (Nashatri y cols., 1997).

La influencia de las proteasas de la matriz extracelular y sus inhibidores sobre el proceso de invasión tumoral, ha sido recogida en numerosos artículos científicos. Estas enzimas son expresadas tanto por células tumorales como por células estromales, poniendo de manifiesto la influencia recíproca de ambos tipos celulares durante la invasión tumoral. Además de contribuir a la remodelación de la matriz extracelular para permitir la invasión celular y la angiogénesis, están implicadas en la regulación del crecimiento mediante la liberación de diversos factores de crecimiento, como PDGF, VEGF o FGF, unidos a proteínas de la matriz extracelular o mediante la inhibición de la adhesión celular mediada por la E-cadherina. La proteólisis de la E-cadherina activa la liberación de  $\beta$ -catenina, que juega un papel crucial en la transformación celular, promoviendo la expresión de un fenotipo indiferenciado. Las proteasas de la matriz extracelular también participan en la angiogénesis mediante la activación de las integrinas celulares, la estimulación de células endoteliales y la regulación de la transcripción y la liberación de VEGF (Chabottaux y Noel, 2007).

Las integrinas pertenecen a una familia de proteínas codificadas por genes cuya expresión se encuentra alterada durante la progresión tumoral. Se trata de proteínas transmembrana heterodiméricas que se unen a proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina, la

laminina o el colágeno. La unión de las integrinas a sus ligandos de la matriz extracelular activa las rutas moleculares mediadas por las MAPKs y PI3K/Akt, estimulando la autofosforilación de la FAK (*focal adhesion kinase*) que inicia las cascadas de señalización que regulan la proliferación, diferenciación, migración o anoikis. La influencia de estas proteínas sobre la progresión tumoral depende del tipo de integrina expresada. Por otra parte, la pérdida de expresión de la integrina  $\alpha_2\beta_1$  en células del epitelio mamario se correlaciona con el fenotipo transformado, mientras que las integrinas compuestas por la subunidad  $\alpha_v$  se correlacionan con la activación de la angiogénesis y la metástasis (Devita y cols., 2005; Huveneers y cols., 2007).

Durante la progresión tumoral, la expresión de genes relacionados con la remodelación del citoesqueleto celular es selectivamente activada con el objetivo de promover la motilidad celular y la capacidad migratoria de las células transformadas. La formación de protusiones de la membrana plasmática que aumentan la motilidad celular, está mediada por la actividad de las GTPasas Rho como Cdc42 y Rac-1. Los filopodios y lamelipodios, también conocidos como “invadopodios”, son el producto de la polimerización de filamentos de actina y miosina en regiones concretas de la célula. En la porción de la membrana plasmática situada en el extremo del invadopodio, se observa una anormal concentración de integrinas, que se unen a los elementos de la matriz extracelular dotando a la célula de una tracción adhesiva que permite el movimiento celular tras la contracción de los filamentos de actina y miosina (Vega y Ridley, 2008).

Por último, se ha demostrado que las células neoplásicas poseen un característico patrón de expresión de receptores de citoquinas que promueve la migración hacia ciertos órganos. Este fenómeno es el producto de la expresión en células transformadas, de receptores específicos de las citoquinas expresadas en el órgano diana. En el caso del cáncer de mama, se ha observado la sobre-expresión de los receptores CXCR4 y CXCR7, específicos de las citoquinas CXCL12 y CXCL21 respectivamente. Las citoquinas CXCL12 y CXCL21 son abundantemente expresadas en los nódulos linfáticos, la médula ósea y el hígado, tres tejidos en los que la metástasis de carcinomas de mama es frecuente (DeVita y cols., 2005).

Aunque las alteraciones génicas acontecidas durante la oncogénesis parecen ser iniciadas en momentos concretos del desarrollo tumoral, las evidencias experimentales indican que la progresiva acumulación de cambios es más importante que el orden en que suceden (Grizzi y cols., 2006).

## I.4 Historia natural

El cáncer de mama es una de las enfermedades neoplásicas que presentan mayor heterogeneidad en cuanto a su historia natural, pues puede tanto ser diagnosticada y dar lugar a un desenlace fatal en unos meses, como diagnosticada y tratada adecuadamente para reaparecer como una enfermedad metastásica dos o más décadas después (Weiss y cols., 2003).

Tradicionalmente la oncogénesis ha sido considerada como la progresión de una célula alterada genéticamente con una morfología anormal y que prolifera dando lugar a una lesión transformada, conocida como hiperplasia atípica, que evoluciona expresando un fenotipo invasivo y metastásico. Con el objetivo de comprender mejor este proceso y predecir sus consecuencias, han sido desarrollados varios modelos matemáticos que intentan una aproximación numérica a la cinética de crecimiento de los tumores transformados. Entre ellos destacan el modelo Gompertziano descrito por Benjamin Gompertz en 1885, pues aún hoy es considerado un buen descriptor matemático del crecimiento tumoral; dicho modelo propone que el crecimiento tumoral puede ser representado por una curva bifásica que indica que el tumor crece exponencialmente con respecto al tiempo hasta alcanzar un volumen tal que la tasa de crecimiento es estabilizada (Norton, 2005).

El intensivo crecimiento de las células transformadas demanda una mayor concentración de oxígeno y nutrientes de la que es capaz de satisfacer la vascularización preexistente al tumor y además, el aumento del volumen del mismo impide que los nutrientes difundan a través de la masa tumoral. Este es el mecanismo biológico que explica la inversa relación entre el aumento de la tasa de crecimiento de las células tumorales y el aumento del volumen tumoral. En estas condiciones, las células transformadas se encuentran sometidas a una presión adaptativa que promueve la selección de mutaciones que las dote de un fenotipo invasivo que les permita colonizar nuevos tejidos y continuar creciendo. En esta fase del desarrollo tumoral es fundamental la alteración de los procesos que regulan la transición mesénquima-epitelio, la hipoxia, la desmoplasia y la angiogénesis (Naumov y cols., 2006). De este modo, las células tumorales que han adquirido un fenotipo competente para la diseminación, infiltran directamente el parénquima mamario atravesando la membrana basal de los ductos o bien, acceden a la luz de los vasos linfáticos de la glándula atravesando el endotelio de los mismos llegando a afectar a los ganglios linfáticos axilares, mamaros internos y/o supraclaviculares. La presencia de células

tumorales en los ganglios linfáticos constituye un factor de mal pronóstico considerado como la manifestación de un cáncer con cierta capacidad metastásica regional (Lacroix y cols., 2004).

Por último, las células transformadas evolucionan hasta desarrollar la capacidad de colonizar otros tejidos y órganos. Para ello deben completar un complejo proceso que incluye la angiogénesis, infiltración de los vasos sanguíneos, resistencia a la presión sanguínea, adhesión al endotelio de los vasos, extravasación y adaptación a nuevas estructuras tisulares. Aunque las bases genéticas de estas propiedades metastásicas son desconocidas, hasta hace relativamente poco la comunidad científica aceptaba un modelo conocido como Hipótesis clonal que defiende que la adquisición de estas habilidades es un proceso selectivo adquirido en etapas tardías de la progresión tumoral. Sin embargo estudios más recientes sugieren que el potencial metastásico es una característica adquirida durante etapas tempranas de la oncogénesis en el tumor primario basándose en la similitud entre los patrones de expresión génica de los tumores primarios y sus metástasis distantes (Minn y cols., 2005, Weigelt y cols., 2003).

## I.5 Detección precoz

Actualmente son tres los procedimientos indicados para detectar precozmente el cáncer de mama: la autoexploración mamaria, la exploración mamaria clínica y la mamografía. De todos ellos la mamografía, con o sin exploración clínica, ha sido el más estudiado. Diversos estudios randomizados y no randomizados, así como varios meta-análisis de los mismos, ponen de manifiesto los beneficios del empleo de la mamografía como técnica de cribado en la población femenina de mayor riesgo, es decir, mujeres entre 50 a 69 años (Knuston y Steiner, 2007 ).

El desarrollo y la implementación de los programas de detección precoz mediante mamografías practicadas a mujeres asintomáticas, han permitido la detección de alteraciones mamarias no palpables (Berg y cols., 2004; Helbich y cols., 2004), modificando los procedimientos diagnósticos de tal forma que se ha llegado a generalizar el uso de algunas técnicas como la biopsia dirigida. Dichas medidas han posibilitado que cada vez sea mayor el número de mujeres afectadas que pueden optar a una cirugía conservadora y, en cualquier caso, permitido actuaciones terapéuticas más eficaces y menos agresivas (Agencia de evaluación de Tecnologías Sanitarias. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002), de hecho, el empleo de la mamografía como técnica de cribado se relaciona con una reducción de la mortalidad a corto plazo del 20% (Ferlay y cols., 2007).

Para aquellas pacientes de alto riesgo, como las portadoras de mutaciones predisponentes al cáncer de mama y ovario, las recomendaciones incluyen un examen por imagen ya sea mamografía, ecografía o resonancia magnética según las características de la paciente, con frecuencia anual y un examen físico semestral comenzando a partir de los 25-30 años. Este esquema enfocado al diagnóstico precoz se completa mediante ultrasonografía vaginal y medición del marcador tumoral específico CA125, con objeto de detectar precozmente el cáncer de ovario (Alonso y cols., 2002).

## **I.6 Clínica y diagnóstico en el cáncer de mama**

El cáncer de mama invasivo no está asociado a unos síntomas y signos concretos que permitan diferenciarlo de otras lesiones, como las lesiones mamarias benignas. Gracias a los programas de detección precoz, cada vez son más las mujeres diagnosticadas en estadios asintomáticos, pero en el resto de casos, el hallazgo más frecuente es una tumoración en la mama que puede o no ir acompañada de dolor. Además, este grupo de mujeres sintomáticas pueden presentar anomalías en el pezón tales como retracción, distorsión o eczema o alteraciones en la epidermis de la mama (Tavassoéli y Devilee, 2003).

Los síntomas deben ser evaluados a través de una triple aproximación consistente en exploración clínica, diagnóstico por imagen y biopsia. La técnica recomendada para obtener una biopsia es la punción con aguja gruesa, que permite extraer una muestra del tumor que debe ser analizado y caracterizado por un anatomopatólogo para el diagnóstico definitivo. Cuando dicho análisis da resultados no concluyentes con respecto a los síntomas, es recomendable llevar a cabo una biopsia escisional en el área en la que la tumoración es palpable (DeVita y cols., 2005).

Actualmente existe un elevado grado de consenso en cuanto a las características de las unidades clínicas en las que la patología mamaria debe ser controlada y tratada. Dichas unidades deben ser multidisciplinarias y estar integradas por cirujanos, cirujanos plásticos, especialistas en diagnóstico por imagen, oncólogos clínicos, anatomopatólogos, ginecólogos, psicólogos y/o psiquiatras. Además, los importantes avances que se vienen produciendo en las diferentes áreas de la genética y de la biología molecular, junto con el desarrollo que las técnicas de diagnóstico molecular en los últimos años, ponen de manifiesto la necesidad de incorporar especialistas en genética clínica en las unidades de patología mamaria.

## I.7 Tipos histológicos

Existen numerosas clasificaciones anatomopatológicas, pero la más empleada actualmente es la establecida por la Organización Mundial de la Salud (Tavassoéli y Devilee, 2003). La mayoría de las neoplasias mamarias se originan en el epitelio de los conductos galactóforos, por ello se denominan carcinomas ductales. El resto se desarrollan en las estructuras acinares de los lobulillos mamarios, recibiendo la denominación de carcinomas lobulillares. Ambos grupos presentan variedades infiltrantes o invasivas y no infiltrantes o *in situ*.

### I.7.1 Carcinoma *in situ*

El carcinoma *in situ* es definido como un conjunto de células epiteliales transformadas que proliferan y llenan los ductos –DCIS (carcinoma ductal *in situ*)- o los acinos lobulares –LCIS (carcinoma lobulillar *in situ*)- de la glándula mamaria, pero permanecen confinados en este espacio por la membrana basal sin invadir el tejido adyacente.

### I.7.2 Carcinoma invasivo

#### I.7.2.1 Carcinoma ductal infiltrante

En este grupo son clasificadas la mayoría de las neoplasias de la mama, llegando a representar el 40-75% de todos los carcinomas mamarios invasivos. El carcinoma ductal común es designado con las siglas NOS (*not otherwise specified*) para diferenciarlo de algunos subtipos morfológicos especiales que representan en torno al 10% de todos los carcinomas ductales invasivos.

*Carcinoma mucinoso*. Representa no más del 2% de los casos aunque su incidencia es ligeramente mayor entre las mujeres de mayor edad. Las células que originan este carcinoma producen una cantidad variable de mucina extracelular.

*Carcinoma medular*. Representa el 5% de todos los carcinomas ductales y se distribuye entre una población más joven. Crece según un patrón sincitial.

*Carcinoma papilar*. Este subtipo de carcinoma ductal puede ser invasivo o no invasivo, crece según un patrón papilar y representa no más del 1-2% de todos los carcinomas invasivos.

*Carcinoma tubular*. Los carcinomas tubulares presentan un elevado grado de diferenciación, son de reducido tamaño, bajo grado tumoral y crecen como pequeñas estructuras

acinares o túbulos que mimetizan los ductos mamario normales. Representan el 1-2% de todos los carcinomas invasivos.

*Carcinoma inflamatorio.* Esta variedad de carcinoma ductal es clínicamente muy agresiva. Característicamente da lugar a la inflamación e induración de la piel, piel de naranja y posee un crecimiento difuso.

*Otros subtipos.* El carcinoma quístico adenoide, carcinoma secretor, carcinoma apocrino, carcinoma cribiforme y carcinoma metaplásico, son formas poco frecuentes de carcinoma ductal invasivo que, colectivamente no representan más del 1% de todos los carcinomas mamarios invasivos.

#### 1.7.2.2 Carcinoma lobulillar infiltrante

Los carcinomas lobulillares infiltrantes epresentan del 5-15% de todos los tumores mamarios invasivos. Una de las características histológicas que definen este tipo de carcinoma es la tendencia de las células neoplásicas que lo componen a invadir el estroma en línea recta (patrón de crecimiento en fila india). Dicha tendencia es producto de una mutación en el gen que codifica la E-caderina.

#### 1.7.2.3 Carcinoma mixto

El exámen microscópico de este tipo de carcinoma permite observar áreas compatibles con un carcinoma ductal infiltrante y áreas compatibles con un carcinoma lobulillar infiltrante.

#### 1.7.2.4 Enfermedad de Paget

Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de células de Paget en la epidermis del pezón. Las células de Paget son células transformadas con núcleos pleomórficos. En muchos aspectos esta enfermedad recuerda a un DCIS y ha sido frecuentemente asociada a un carcinoma ductal, ya sea invasivo o no invasivo.



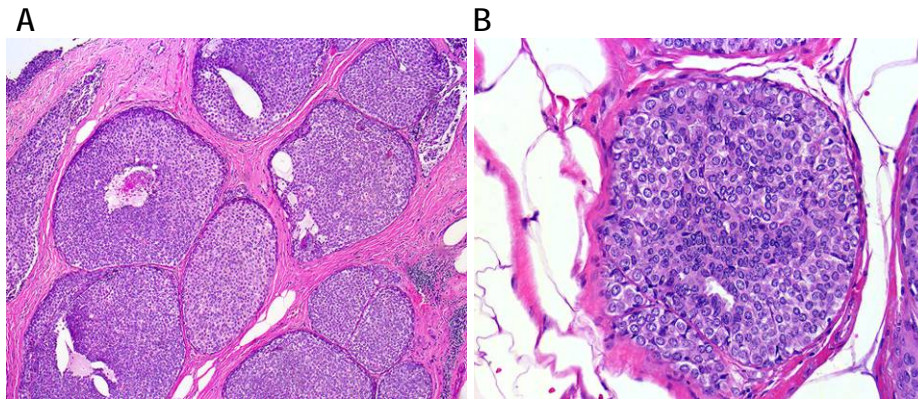


Figura 6. A) *Carcinoma lobulillar in situ de mama*; B) *Carcinoma ductal in situ de mama*

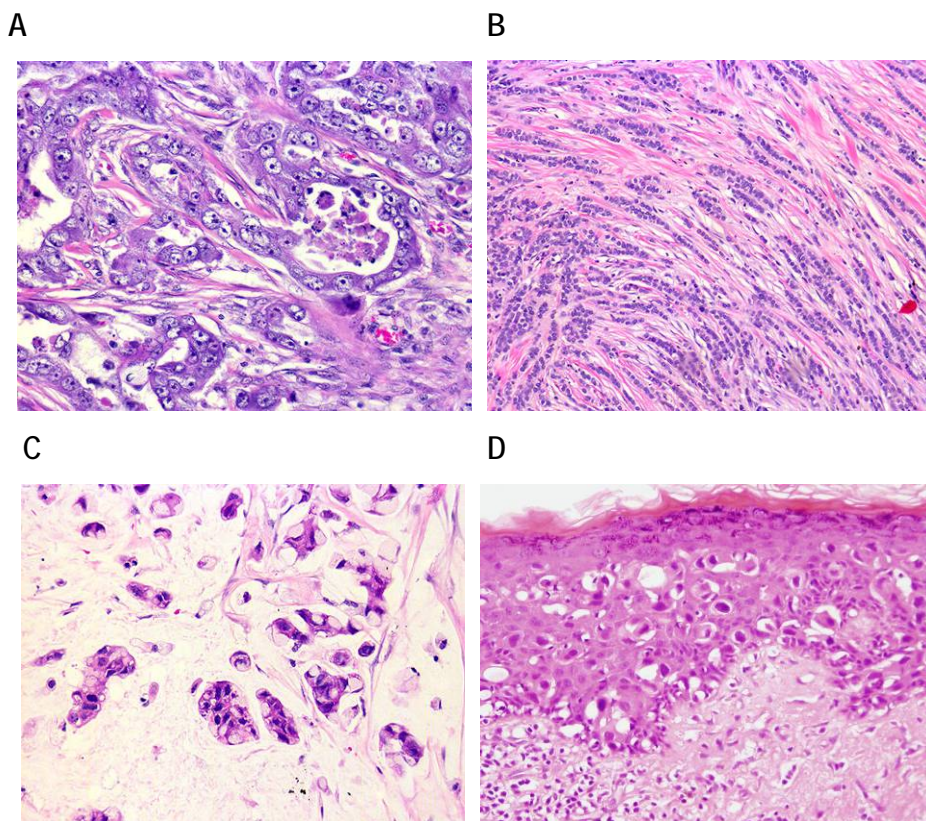


Figura 7. A) *Carcinoma ductal infiltrante*; B) *Carcinoma lobulillar infiltrante*; C) *Carcinoma ductal infiltrante mucinoso*; D) *Enfermedad de Paget*.

## I.8 Pronóstico del cáncer de mama

La habilidad de establecer un adecuado pronóstico de la evolución del cáncer de mama permitiría clasificar a las pacientes en grupos de mayor o menor riesgo de recaída, optimizando el manejo clínico de las pacientes en general y la administración de fármacos antineoplásicos en particular.

Hasta hoy, la práctica clínica en oncología se ha basado en la aplicación de factores pronóstico clínico-patológicos para estimar el riesgo de recurrencia de la enfermedad y pautar tratamientos tanto sistémicos como locales, de acuerdo con dicho riesgo. El estudio e integración de estos factores pronóstico han dado lugar a diversos sistemas de estadiaje, entre los cuales el más empleado es el publicado por el AJCC (*American Joint Committee for Cancer Staging*) (ver Anexo I). Entre los factores pronóstico de mayor importancia, el grado de afectación ganglionar axilar es determinante en cuanto al riesgo de enfermedad sistémica. El tamaño tumoral es el segundo factor en importancia empleado en la predicción del desenlace de la enfermedad, así como la presencia o ausencia de metástasis distantes en el momento del diagnóstico. Estas características clínicas del tumor junto con otras de naturaleza histológica y patológica, completan el procedimiento clínico actualmente empleado para la caracterización y clasificación taxonómica de un tumor mamario y son la herramienta utilizada como criterio para seleccionar el tratamiento antitumoral indicado para cada paciente (Greeny y cols., 2002).

Dicha clasificación fue diseñada como una aproximación comprensiva a la heterogeneidad clínica observable en pacientes con cáncer de mama, sin embargo, aunque la aplicación de estos criterios ha mejorado el manejo clínico de las pacientes, existen datos suficientes para afirmar que clasifican bajo el mismo grupo descriptivo tumores que exhiben un comportamiento clínico muy distinto y probablemente representan entidades moleculares diferentes. En la línea de estas recientes conclusiones y gracias al gran desarrollo que las técnicas moleculares han experimentado durante la última década, nuevos factores pronóstico han sido investigados y, hasta la fecha, dos de ellos implementados con éxito como factores predictivos en el tratamiento del cáncer de mama. Dichos factores moleculares son receptores hormonales como el RE y el RP, marcadores moleculares de la respuesta a la hormonoterapia, y el receptor del factor de crecimiento Her2 que es un eficiente marcador de la respuesta a la terapia biológica con el anticuerpo monoclonal Trastuzumab (Reis-Fihlo y cols., 2006). Dado el satisfactorio resultado de la terapia biológica con Trastuzumab, la eficacia antitumoral de otros anticuerpos monoclonales como Bevacizumab (anticuerpo monoclonal anti-VEGF) y otras moléculas, como el péptido interferente Lapatinib (interfiere con los receptores tirosín-quinasa EGFR y HER2), está siendo actualmente evaluada en algunos ensayos clínicos. El grado de invasión linfovascular, la tasa de proliferación medida como la expresión celular del marcador Ki-67 o la concentración tumoral del activador del enzima uPA y su inhibidor PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) son otros factores pronóstico moleculares cuyo valor predictivo está siendo actualmente evaluado (DeVita y cols., 2005).

La aplicación de estos marcadores ha llevado al desarrollo de las denominadas terapias dirigidas, que sientan las bases de un concepto hacia el que hoy son dirigidos la mayoría de los esfuerzos en la investigación del tratamiento contra el cáncer: la Medicina Personalizada. Dicho concepto encuentra sentido en la complejidad biológica de esta enfermedad, producto de la interacción entre factores genéticos inherentes a cada individuo, que pueden predisponerlo o protegerlo frente al desarrollo de una neoplasia, y la contribución ambiental al desarrollo de un cáncer. Dado el carácter individual de estos factores, es necesario desarrollar un sistema de clasificación de las neoplasias mamarias que aborde las circunstancias particulares de cada paciente, con el objetivo de establecer esquemas de tratamiento óptimos y capaces de incidir sobre el origen de las mismas o sus mecanismos de progresión (Colozza y cols., 2007).

Por último, es importante señalar que en los últimos nueve años estamos asistiendo a una verdadera revolución en cuanto al conocimiento del genoma humano, que afecta igualmente a los procesos neoplásicos. Existen todavía muchas respuestas sin contestar, no sólo en cuanto al pronóstico de los distintos tumores, sino también en cuanto a los procesos de quimiorresistencia, variabilidad en cuanto a la respuesta y toxicidad entre distintos pacientes a los que se administra un mismo fármaco (farmacogenómica), así como en la evaluación de los nuevos fármacos. El mejor conocimiento de la estructura génica de cada uno de los tumores, conocida como firma génica, sin duda puede llevarnos a una nueva clasificación, y sobre todo, responder a alguna de las preguntas planteadas con claras implicaciones en cuanto al pronóstico y tratamiento del cáncer. Los hallazgos y conclusiones en este área de conocimiento aplicados al estudio del tratamiento sistémico del cáncer de mama, serán revisados con detalle en el bloque III de la Introducción de esta Tesis.

## **I.9 Tratamiento del cáncer de mama**

Actualmente el tratamiento del cáncer de mama consiste en una serie de actuaciones médicas integradas que involucran a varios especialistas y servicios médicos, entre ellos, los servicios de Cirugía, Anatomía Patológica, Radioterapia Oncológica, Medicina Nuclear y Oncología.

Como norma general, antes de iniciar cualquier tratamiento en una paciente con cáncer de mama, se deben definir claramente el objetivo y la secuencia del mismo (Martin, 2005):

- **Objetivo:** Entre los objetivos del tratamiento se encuentran aumentar las posibilidades de curación, es decir, restablecer de salud a partir de la erradicación de todos los signos del tumor, y prolongar la supervivencia y/o la paliación de los síntomas. La mayoría de las neoplasias mamarias malignas son curables en estadios iniciales pero, desafortunadamente, no ocurre así en pacientes que presentan metástasis distantes. Sin embargo, la cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia y terapia biológica pueden mejorar sustancialmente la calidad de vida de estos pacientes, disminuyendo los síntomas y en ocasiones prolongando su supervivencia.
  
- **Secuencia:** La secuencia es el orden de administración del tratamiento. Según la secuencia la terapia es clasificada en:
  - **Terapia adyuvante.** La terapia adyuvante se define como la administración de tratamiento sistémico después de haber eliminado el tumor primario, usualmente mediante la resección quirúrgica, y sin evidencia clínica de la enfermedad tumoral. Su intención es eliminar la enfermedad residual microscópica, y de esta manera reducir el riesgo de recurrencia y aumentar la supervivencia de las pacientes.
  - **Terapia neoadyuvante.** La terapia neoadyuvante se define como aquella que se administra antes del tratamiento local con cirugía o radioterapia. Sus objetivos son la eliminación de la enfermedad micrometastásica para mejorar la supervivencia y disminuir la masa del tumor primario permitiendo un tratamiento local conservador de la mama.

### 1.9.1 Cirugía

La escisión tumoral amplia o lumpectomía con bordes quirúrgicos libres es el tratamiento de elección para la mayoría de las mujeres con cáncer de mama en estadios I y II (Veronesi y cols., 2002). En pacientes con tumores de mayor tamaño, en las que la escisión tumoral con bordes quirúrgicos libres no garantiza un buen resultado estético, carcinomas mamarios multicéntricos o en pacientes que no toleran suficientemente la radioterapia, la mastectomía radical modificada es la técnica quirúrgica indicada. Ambas estrategias registran similares tasas de supervivencia a largo plazo (Schwartz, 2006). Además, la disección de los ganglios linfáticos axilares está indicada en mujeres que presentan afectación regional en esta zona. Sin embargo, el desarrollo y la práctica de la inspección de ganglios linfáticos centinela y las técnicas de

biopsia están permitiendo la reducción de la linfadenectomía, más aún teniendo en cuenta que la mayoría de los cánceres de mama son diagnosticados en estadios precoces. Incluso, algunos estudios sugieren que hasta un 50% de las mujeres con un ganglio centinela afectado, no presentan mayor afectación ganglionar (Hwang y cols., 2003; Viale y cols., 2005). Por todo ello, existe la necesidad y oportunidad de desarrollar marcadores predictivos de la afectación de los ganglios linfáticos axilares, capaces de racionalizar y reducir el número de pacientes que han de ser sometidas a técnicas quirúrgicas invasivas como parte de su tratamiento. Además, la implantación de perfiles pronósticos más precisos, eliminaría la indicación de la estadificación ganglionar con fines pronósticos.

Para aquellas pacientes diagnosticadas de una neoplasia mamaria en estadios avanzados, según las características clínicas y/o grado de afectación metastásica de otros órganos, puede ser planteada una estrategia quirúrgica paliativa dirigida a intentar resolver la sintomatología de la paciente, bien porque el tumor haya alcanzado una extensión locoregional que lo haga irresecable o porque su resección conlleve riesgos o secuelas inaceptables para el paciente (Cortes-Funes, 1999).

Por último cabe mencionar la cirugía reconstructiva, cuyo objetivo es aumentar calidad de vida de aquellas pacientes que han sido sometidas a una mastectomía. Son dos los procedimientos actualmente empleados para la reconstrucción mamaria, uno de ellos implica el uso de implantes y expansores sintéticos y el otro, el empleo de tejido de la propia paciente. Generalmente el resultado estético es aceptable y la morbilidad escasa (Martin, 2005).

### 1.9.2 Radioterapia

La radioterapia se fundamenta en la utilización de radiaciones ionizantes como tratamiento de diversos procesos patológicos, fundamentalmente malignos, pero también algunos de etiología benigna. Al igual que la cirugía, su finalidad es el control local o locoregional de la enfermedad (Díaz-Rubio, García-Conde, 2000). El grupo de trabajo EBCTCG (*Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group*) publicó en el año 2005 un análisis de los ensayos clínicos randomizados relacionados con la radioterapia y la cirugía mamaria, llevados a cabo hasta esa fecha. En este trabajo los autores concluyen que la radioterapia administrada tras un tratamiento quirúrgico conservador de la mama, reduce el riesgo de recidiva local en un 19% durante los 5 años siguientes y el de muerte en un 5,4% en 15 años. Resultados similares son obtenidos al

comparar el curso clínico de pacientes sometidas a una mastectomía que recibieron radioterapia y que no recibieron radioterapia (Clarke y cols., 2006).

Los recientes avances metodológicos en las técnicas de imagen así como de la informática aplicada, han posibilitado administrar más dosis de radiación en los tejidos neoplásicos y minimizar los efectos secundarios en los órganos sanos más próximos al tumor. Además, existe un interés creciente por el desarrollo y establecimiento de factores pronóstico que permitan identificar a aquellas pacientes tratadas con cirugía conservadora de la mama o mastectomía total, cuyo riesgo de recidiva local o regional sea lo suficientemente reducido para evitar la radioterapia de un modo seguro (Schwartz y col., 2006; Luini y cols., 2007).

### 1.9.3 Hormonoterapia

La hormonoterapia representa la primera y más exitosa terapia molecular específica desarrollada hasta el momento. La eficacia de esta terapia contra el cáncer de mama se basa en el hecho de que una proporción importante de tumores mamarios exhiben un crecimiento hormonodependiente, sobretudo en los estadios iniciales de su desarrollo (Martin, 2005).

En el año 2005, el EBCTCG publicó un trabajo de revisión de las conclusiones derivadas de los estudios más relevantes en hormonoterapia (EBCTCG, 2005). Los resultados de este completo meta-análisis de 194 estudios aleatorizados, mostraron que la hormonoterapia adyuvante, basada en la administración de antagonistas estrogénicos como el tamoxifeno, reduce significativamente el riesgo de recidiva y muerte en pacientes no tratadas con respecto a pacientes tratadas. Concretamente, las tasas de reducción absoluta de la mortalidad y recurrencia son de 11,8% y 9,2% respectivamente en 15 años tras el diagnóstico. El efecto de esta estrategia terapéutica es claramente dependiente de las características moleculares de las células transformadas ya que, en mujeres con tumores mamarios que no sobreexpresan receptores hormonales, la hormonoterapia es ineficaz.

En cuanto a la duración de la hormonoterapia y dosis óptima de tamoxifeno, los resultados de estudios comparativos entre distintos esquemas de tratamiento han demostrado que 20 mg de tamoxifeno/ día durante 5 años es la pauta terapéutica más eficaz. Actualmente están en marcha diversos ensayos clínicos cuyo objetivo es determinar si la continuidad de esta terapia

por un periodo de tiempo superior podría mejorar las tasas de reducción de recurrencia y mortalidad por cáncer de mama, teniendo en cuenta que al tratamiento con tamoxifeno se asocian una serie de efectos adversos severos, como el cáncer de endometrio y enfermedades tromboembólicas, cuando es administrado por un periodo de tiempo prolongado (EBCTCG, 2005).

#### I.9.4 Quimioterapia

La quimioterapia es un tratamiento sistémico basado en el empleo de drogas que interfieren en diversos procesos celulares relacionados con la división celular, por tanto, estas drogas poseen una actividad citotóxica dirigida fundamentalmente a aquellas células con una intensa actividad proliferativa (Martin, 2005).

La proliferación celular se lleva a cabo a través de un proceso estrictamente regulado que se denomina ciclo celular. El ciclo celular comprende cuatro etapas o fases que se suceden de forma ordenada y puede ser descrito como una serie de eventos coordinados cuyo resultado es la división de una célula madre en dos células hijas genéticamente idénticas. Para ello la célula duplica su ADN durante una fase de síntesis conocida como fase S. Una vez que se ha completado la replicación del genoma, la segregación de los cromosomas y la división celular se lleva a cabo durante la mitosis o también conocida como fase M del ciclo celular. La mayoría de las células requieren mayor tiempo para crecer y duplicar su masa proteica y orgánulos de lo que necesita para duplicar su genoma, por ello entre las fases S y M se insertan dos fases de intervalo conocidas como *gap phases*  $G_1$  y  $G_2$ . De esta manera un ciclo celular típico en células eucariotas está compuesto de la siguiente secuencia:  $G_1$ , S,  $G_2$  y M. Las *gap phases* no sólo regulan temporalmente el ciclo para el completo crecimiento celular, sino que también lo hacen para permitir la monitorización y el control del entorno extracelular e intracelular. La fase  $G_1$  es especialmente importante a este respecto y su duración varía dependiendo en gran medida de las señales extracelulares emitidas por otras células. Si las condiciones extracelulares son adversas, la fase  $G_1$  es retrasada e incluso la célula puede entrar en una fase quiescente o de reposo conocida como fase  $G_0$ , que es mantenida por largos periodos de tiempo hasta que las condiciones vuelven a ser favorables al crecimiento. Entonces, la célula progresa hacia el final de la fase  $G_1$  hasta alcanzar el punto de restricción que constituye la señal que permite el inicio de la fase S (Alberts y cols., 2002). Hay drogas denominadas fase-específicas que eliminan a las células en determinadas fases del ciclo celular, pero que no dañan a las células en situación de

reposito proliferativo como en G0 o G1. En cambio otras son igualmente tóxicas en situación proliferativa como no proliferativa (no fase específicos) (Schwartz y Shah, 2005).

La eficacia del tratamiento con quimioterápicos ha sido evaluada en numerosos ensayos clínicos. El meta-análisis publicado por el EBCTCG en el año 2005 actualiza la información más reciente al respecto (EBCTCG, 2005) y concluye que el tratamiento con poliquimioterapia en mujeres diagnosticadas de cáncer de mama menores de 50 años, reduce las tasas absolutas de recurrencia y mortalidad en un 12,4% y 10% respectivamente en 15 años, con respecto a aquellas pacientes de su mismo rango de edad que no recibieron quimioterapia. El efecto de la poliquimioterapia en pacientes de 50-69 años de edad es menor pero aún significativo, registrando en el año 15 desde el comienzo del tratamiento una reducción de la tasa absoluta de recurrencia del 4,1% y del 3% en la de mortalidad. Por otra parte, el análisis de subgrupos de pacientes establecidos en función de la sobreexpresión del RE, mostró que tanto las pacientes con tumores RE<sup>+</sup> como RE<sup>-</sup> se benefician del tratamiento quimioterápico, especialmente en el caso de las primeras si la quimioterapia es acompañada por la administración de tamoxifeno.

En cuanto a la eficacia de distintos regimenes quimioterápicos, comparaciones directas entre esquemas de tratamientos basados en la administración de CMF (ciclofosfamida-metotrexato-5-fluorouracilo) versus tratamientos que incluyen en su formulación antraciclinas, muestran que los últimos registran mejores resultados clínicos reduciendo en mayor medida las tasas anuales de recurrencia y mortalidad que el régimen CMF.

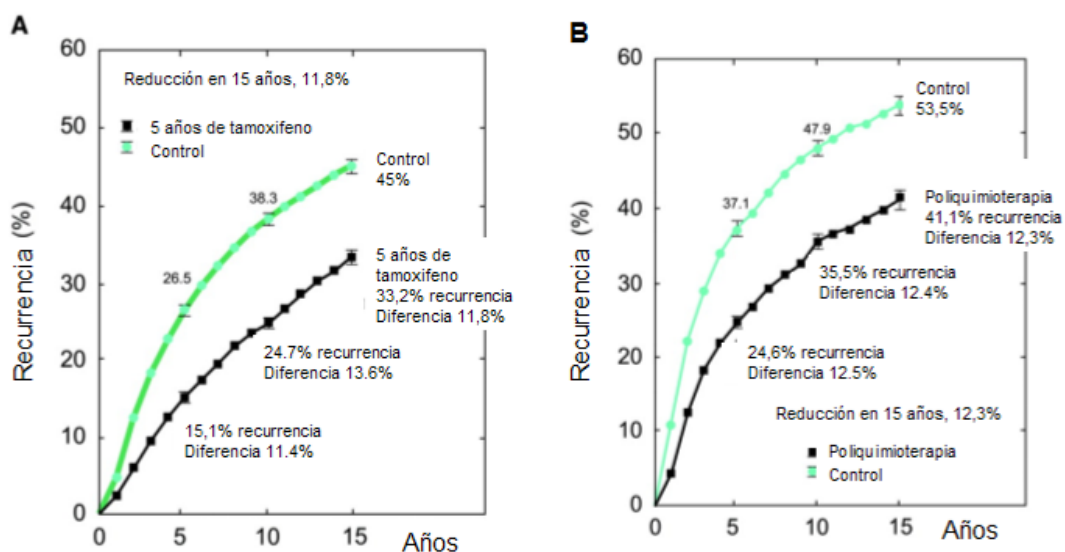


Figura 8. Riesgo de recurrencia en 15 años tras el diagnóstico de cáncer de mama. A) en pacientes tratadas con tamoxifeno, a menos durante 5 años vs. pacientes control; B) en pacientes tratadas con poliquimioterapia vs. pacientes control.



Integrando los resultados obtenidos en los meta-análisis, el grupo EBCTCG concluye que un tratamiento farmacológico combinado consistente en la administración de poliquimioterapia con antraciclinas y 5 años de tratamiento con tamoxifeno, reduce a la mitad el riesgo de muerte por cáncer de mama en los 15 años siguientes al tratamiento.

Por tanto, el tratamiento de referencia para pacientes con cáncer de mama incluye un esquema quimioterapéutico basado en antraciclinas, si bien el uso de otro agente citostático conocido con el nombre general de taxanos, ha ganado aplicabilidad en los últimos años gracias a los favorables resultados obtenidos por diversos ensayos clínicos. Entre ellos destaca el estudio CALGB 9344 (Henderson y cols., 2003), que comparó la eficacia de un esquema de quimioterapia adyuvante con 4 ciclos de adriamicina y ciclofosfamida con un esquema que incluyó igualmente 4 ciclos de adriamicina y ciclofosfamida, seguido de otros cuatro ciclos de paclitaxel. Tras 69 meses de seguimiento, los autores observaron una reducción del riesgo de recaída y del riesgo de muerte de un 17% y un 18% respectivamente, en las pacientes que recibieron paclitaxel frente a las que no recibieron este taxano. Este beneficio se tradujo en un aumento del 5% en la tasa de supervivencia libre de enfermedad y de un 3% en la tasa de supervivencia general, en términos absolutos. Un estudio similar fue el publicado por investigadores del NSABP (Mamounas y cols., 2005), que ofreció resultados equiparables en términos de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia general. En relación al docetaxel, BCIRG 0001, fue el primer ensayo con datos de eficacia con este taxano (Martin y cols., 2005). Este estudio mostró que las pacientes que recibieron docetaxel en secuencia adyuvante, registraron un aumento de la supervivencia libre de enfermedad del 7% y un aumento de la supervivencia general del 6% en 5 años.

La característica común a todos estos ensayos clínicos, fue que la población de estudio incluyó pacientes con afectación de los ganglios axilares. Aunque el beneficio del tratamiento con taxanos fue independiente de las variables pronósticas, es probable y lógico que el impacto beneficioso de los taxanos en el tratamiento de pacientes con axila positiva, no ocurra por igual en todas ellas. Sin embargo, los datos existentes hasta la fecha no excluyen con claridad a ningún grupo en relación con el tamaño tumoral, el número de ganglios afectados, el estatus hormonal o el de Her2.

En cuanto al tratamiento sistémico en secuencia neoadyuvante, el estudio NSABP-B18 mostró que la administración secuencial de docetaxel junto con un esquema de antraciclinas

preoperatorio durante 6 meses, supuso un incremento de las respuestas patológicas completas (R<sub>Pc</sub>) del 12,4% en pacientes con afectación axilar y del 7,4% en pacientes con ganglios negativos. En este estudio, el incremento de la R<sub>Cp</sub> predijo una mayor tasa de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia general (Rastogi y cols., 2008).

En conclusión, actualmente los regímenes que contienen antraciclinas y taxanos constituyen el referente estándar en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama y afectación axilar o mal pronóstico, mientras que las antraciclinas siguen siendo la referencia para pacientes con ganglios negativos.

### 1.9.5 Terapia biológica

La terapia biológica del cáncer de mama tiene por objetivo el bloqueo de las principales vías de transducción de señales implicadas en la regulación de funciones esenciales de la célula transformada y del estroma del tumor, interfiriendo en los distintos mecanismos que conducen a la proliferación autónoma y potencial replicativo indefinido, evasión de las señales apoptóticas y antiproliferativas, migración celular, invasión tisular y metástasis (Martin, 2005).

En los últimos años este tipo de terapia antineoplásica ha suscitado un gran interés debido a que constituye una estrategia específica dirigida exclusivamente a las células cancerosas, ya que su mecanismo de acción es dependiente de las características moleculares que definen el fenotipo transformado de éstas. Dichas características moleculares se concretan en la sobre-expresión de genes cuyos productos transcripcionales son proteínas clave en las vías de transducción de señales anteriormente mencionadas y al mismo tiempo, dianas farmacológicas de los agentes biológicos (Sanz, 2002).

Entre ellos destaca el receptor de membrana Her2, sobre-expresado en un 20-30% de las pacientes con cáncer de mama. El empleo de Her2 como diana terapéutica parece seguir los mismos pasos que el desarrollo del tratamiento hormonal. Primero se confirmó su especificidad en la enfermedad avanzada y posteriormente se demostró su eficacia en los grupos de tratamiento adyuvante y neoadyuvante. Son 4 los ensayos clínicos que han investigado el efecto y la seguridad del tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-Her2: NSABP B-31, NCCTG N9831, HERA y BCIRG 006. (Jahanzeb, 2008; Piccart-Gebhart y cols., 2005; Tan-Chiu y cols.,

2005). La adición de 1 año de tratamiento con el anticuerpo anti-Her2, Trastuzumab, en combinación con quimioterapia reduce el riesgo de recurrencia aproximadamente a la mitad en la población de mujeres que sobre-expresa el receptor Her2 y mejora significativamente las tasas de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia general en un 33-52%. La alta significación de estos resultados han llevado a la industria farmacéutica a desarrollar nuevos fármacos diana específicos como los péptidos bloqueantes de receptores tirosín-quinasa o nuevos anticuerpos monoclonales anti receptores de factores de crecimiento pro-angiogénicos como VEGF o PDGF.

### 1.9.6 Inmunoterapia

Se han descrito interacciones entre el sistema inmune y diversas neoplasias que constituyen la base de la terapia inmunológica. El tumor ejerce un efecto inmunodepresor sobre el huésped que modula negativamente la respuesta inmune de éste último, dificultando el control y eliminación de las células tumorales. Estas alteraciones inmunológicas están relacionadas con la expresión de moléculas inhibitorias por el propio tumor. Entre ellas destacan la IL-10 y VEGF. La afectación es global, provocando una deficiente presentación de los antígenos por las células presentadoras de antígeno, defectos en la función de los linfocitos T y disminución de la capacidad de fagocitosis, entre otras alteraciones. Además los tumores poseen la capacidad de variar la presentación de antígenos impidiendo la reacción inmune (Martin, 2005; Sanz, 2002).

Por tanto, aquellas sustancias que potencian la reacción inmune y aseguran el estímulo de las células inmunoefectoras potenciando su acción destructora sobre las células tumorales, podrían estimular o suplir la inmunodeficiencia provocada por el tumor. Entre ellas encontramos Citocinas (IL-2 y el interferón  $\gamma$ ), factores estimuladores de colonias, anticuerpos monoclonales o vacunas. El objetivo de las vacunas contra el cáncer es estimular el sistema inmune. Habitualmente contienen proteínas o péptidos que se encuentran o son producidas por las células transformadas. Al administrar estas proteínas, el tratamiento se enfoca en aumentar la respuesta inmune del organismo frente a las células cancerosas (Sanz, 2002).

### 1.9.7 Terapia génica

La terapia génica (TG) puede ser definida como una técnica terapéutica en la que un gen funcional es integrado en el genoma de las células del paciente para corregir un defecto congénito o para que las células adquieran una nueva función. Existe un gran número de

enfermedades candidatas para tratamientos basados en la TG incluyendo enfermedades monogénicas, cardiovasculares, infecciosas o neurodegenerativas, si bien la mayor parte de los protocolos terapéuticos aprobados hasta la fecha son precisamente para el tratamiento del cáncer.

Entre las estrategias de TG contra el cáncer se encuentran la terapia génica correctiva, que está dirigida frente a mutaciones consideradas como fundamentales para el desarrollo del fenotipo transformado. En estos casos se espera que la corrección revierta el fenotipo tumoral o induzca apoptosis o muerte celular programada. La terapia génica citotóxica se basa en la existencia de profármacos que al ser metabolizados por enzimas presentes en organismos vivos, originan productos tóxicos que pueden tener capacidad terapéutica. La introducción de algunos genes citotóxicos en células tumorales ha sido una de las estrategias más investigadas para la TG del cáncer. La terapia génica mediante genes de resistencia a fármacos intenta obviar la toxicidad generada por la administración de quimioterápicos, induciendo la expresión de proteínas de resistencia a la quimioterapia, como las proteínas del gen de resistencia a múltiples fármacos, en células sanas. Por último, la inmunoterapia por transferencia génica consiste en introducir dentro de las células determinados genes que aumenten la inmunogenicidad de las células tumorales generando actividad antitumoral sistémica que puede destruir células tumorales y vacunar al paciente contra posibles recurrencias del mismo tumor (Lattime y Gerson, 2005).

## II. Estrés oxidativo y mecanismos de defensa antioxidante en el cáncer de mama. Implicaciones patológicas y terapéuticas

### II.1 El balance oxidativo

Los radicales libres son especies químicas con electrones desapareados que les confieren gran reactividad química, lo que les conduce a interactuar rápidamente con cualquier molécula biológica con la que entren en contacto. Por su afección para aceptar electrones de las moléculas diana, los radicales libres pueden modificar la estructura y/o la función de éstas, actuando sobre componentes estructurales como la membrana plasmática y sobre procesos críticos intracelulares, entre los que se incluyen la maquinaria genética y diversos procesos enzimáticos (Halliwell y Gutteridge, 2000; Klauning y Kamendulis 2004).

Sin embargo, en nuestro organismo existe un sistema de defensa antioxidante cuya misión es evitar el daño que puede llegar a producir un aumento de los radicales libres. Por lo tanto, existe un equilibrio entre los sistemas de defensa antioxidante y el de producción de radicales, que se conoce como balance oxidativo, que al inclinarse hacia la producción de radicales da lugar a lo que se denomina estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 2000; Halliwell, 2007).

### II.2 Tipos de radicales libres y especies reactivas de oxígeno

El oxígeno es en las células de metabolismo aeróbico el principal responsable de la producción de especies oxidantes. Muchos autores utilizan el término genérico de especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO), dado que la mayoría de ellas son radicales libres que presentan como característica común su gran reactividad (Halliwell, 2007).

La actividad como agente pro-oxidante de un radical libre depende de su reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad (Halliwell, 2006).

#### II.2.1 Anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )

El  $O_2^{\cdot-}$  se produce en la reducción de oxígeno por la transferencia de un electrón o por autooxidación de metales de transición. El  $O_2^{\cdot-}$ , a pesar de no ser particularmente dañino, es importante como fuente de peróxido de hidrógeno y como reductor de metales de transición. La principal fuente de esta especie reactiva se produce en la mitocondria de forma accidental a nivel

de los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico, describiéndose que entre un 2 y un 5% del oxígeno se reduce incompletamente hasta este radical. Debido a que la formación de esta especie depende del flujo de la cadena de transporte de electrones, cualquier situación que aumente el consumo de  $O_2$ , aumentará proporcionalmente la generación del anión superóxido (Halliwell, 2006).

### II.2.2 Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

La génesis del  $H_2O_2$  proviene de la reducción espontánea con dos electrones del oxígeno, pudiendo ser también generado en los sistemas biológicos por la reacción de dos moléculas de anión superóxido, catalizada por la superóxido dismutasa. El  $H_2O_2$  no es un radical libre pero es considerado como una especie reactiva derivada del oxígeno y está involucrado en la producción de otros radicales libres. En presencia de iones metálicos produce el más reactivo y dañino radical libre, el radical hidroxilo (Valko y cols., 2006).

### II.2.3 Radical hidroxilo ( $OH\cdot$ )

El  $OH\cdot$  es extremadamente oxidante ya que reacciona con cualquier tipo de biomolécula. Los mecanismos de generación de este radical son:

(a) Por la descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición, principalmente hierro ( $Fe^{+2}$ ) y cobre ( $Cu^{+2}$ ). En el caso del hierro se trata de la denominada reacción de Fenton (Valko y cols., 2007).

(b) Los organismos vivos están expuestos a la radiación electromagnética ambiental, tanto natural como derivada de la actividad del hombre. La mayor parte de la energía de la radiación electromagnética de baja longitud de onda es captada y absorbida por el agua de las células. Se produce entonces la separación de una de las uniones covalentes entre el oxígeno y el hidrógeno del agua, dejando un electrón desapareado en el hidrógeno y formando así el radical  $OH\cdot$  (Halliwell y Gutteridge, 2000).

(c) En la reacción llamada de Haber-Weiss no catalizada por metales de transición o también en la denominada reacción de Fenton conducida por el  $O_2$ , el anión superóxido reacciona con el peróxido de hidrógeno (Liochev y Fridovich, 2007).

El  $OH\cdot$  es el más reactivo que se conoce. Este radical no tiene gran poder de difusión y su vida media es corta, pero ataca cualquier molécula próxima comenzando una reacción en

cadena que se propaga entre las moléculas circundantes generando importantes daños en la célula (Valko y cols, 2007, Gutteridge, 1995).

Otro grupo de radicales libres fisiológicos son los centrados en el átomo de nitrógeno, que en conjunto, son conocidos como especies reactivas del nitrógeno (ERN).

#### II.2.4 Óxido nítrico (NO<sup>•</sup>)

El NO<sup>•</sup> es un radical libre relativamente abundante que actúa como una molécula oxidativa importante en la señalización intracelular en una gran variedad de procesos biológicos como la neurotransmisión, regulación de la presión arterial, regulación de la respuesta inmune y relajación de la musculatura lisa. Es generado en el organismo por enzimas específicas conocidas como NOS (óxido nítrico sintasas), que metabolizan la arginina hasta citrulina través de una reacción oxidativa que implica la transferencia de 5 electrones y la producción de una molécula de NO<sup>•</sup>. La superproducción de NO<sup>•</sup> se conoce como estrés nitrosativo (Valko y cols., 2006).

#### II.2.5 Peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>)

El ONOO<sup>-</sup> es producto de la reacción entre el NO<sup>•</sup> y el O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. El anión ONOO<sup>-</sup> es un radical libre más reactivo que cualquiera de sus dos precursores y genera importantes daños celulares (Valko y cols., 2006).

#### II.2.6 Otros radicales libres

Otros radicales libres importantes son los radicales que se centran en el átomo de carbono, formados a partir del ataque sobre moléculas como los lípidos. Producen la peroxidación lipídica y atacan las cadenas de ácidos grasos, ácidos nucleicos, carbohidratos o proteínas. En la Figura 9 se muestra un resumen de algunos de los radicales libres y especies reactivas del oxígeno más importantes.

### Radicales libres y especies reactivas de relevancia biológica y vías metabólicas en las que se generan

Oxígeno singlete	$O_2$	Especies de oxígeno parcialmente reducidas	Peroxilo	$OO\dot{R}$	Deriva del anterior
Ozono	$O_3$		Aciloxilo	$\begin{array}{c} O \\    \\ R-C-\dot{O} \end{array}$	Ácidos grasos de fosfolípidos de la membrana
Dióxido de nitrógeno	$NO_2$	Atmósfera	Acilperoxilo	$\begin{array}{c} O \\    \\ R-C-\dot{O}O \end{array}$	Deriva del anterior
Óxido nítrico	$NO$	Metabolito de la Arginina	Ariloxilo	$Ar\dot{O}$	Fenol
Peróxido de hidrógeno	$H_2O_2$	Cadena de transporte electrónico mitocondrial y microsomal, XO/XDH, oxidasas celulares, fagocitos	Arilperoxilo	$Ar\dot{O}O$	Deriva del anterior
Hidroxilo	$HO\dot{O}$	Deriva del anterior	Ácido hipocloroso	$HOCl$	Se forma en fagocitos
Anión superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Ácidos grasos de fosfolípidos de la membrana, aminoácidos e hidratos de carbono	Radical semiquinona	$HQ\dot{O}$	Cadena respiratoria
Hidroperoxilo	$HOO\dot{O}$	Deriva del anterior	Radical anión semiquinona	$Q^{\cdot-}$	Cadena respiratoria
Alcoxilo	$OR\dot{O}$	Cadena de transporte electrónico mitocondrial, metabolismo de peroxisomas y degradación de purinas	Radical tiol	$R-S\dot{O}$	Aminoácidos azufrados

Figura 9. Resumen de los principales radicales libres en los sistemas biológicos

Los radicales libres provienen de fuentes exógenas y endógenas. Como se ha comentado anteriormente, los organismos vivos están expuestos a la radiación electromagnética ambiental capaz de activar la formación de  $OH\dot{O}$ . Otras fuentes exógenas de radicales libres son algunos xenobióticos como los compuestos clorados, fármacos como los barbitúricos o la adriamicina, iones metálicos y compuestos que estimulan la proliferación de los peroxisomas. Entre los radicales libres producidos fisiológicamente destacan algunas ERN como el  $NO\dot{O}$  y el anión  $ONOO^-$  y las ERO (Halliwell y Gutteridge, 2000; Klauning y Kamendulis 2004). Una de las fuentes endógenas más importantes, tanto de ERN como de ERO, son los fagocitos activados. Neutrófilos, eosinófilos y macrófagos aumentan de forma rápida pero transitoria su consumo de oxígeno generando  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  y  $NO\dot{O}$ ; además el  $O_2^{\cdot-}$  y el  $NO\dot{O}$  reaccionan formando peroxinitrito, que a pH fisiológico daña las proteínas celulares y se descompone en otras moléculas tóxicas dando lugar a la oxidación lipídica y fragmentación del ADN (Halliwell, 2006). Por otra parte, las ERO derivan parcialmente de accidentes químicos producidos en el organismo, como en el caso de la fosforilación oxidativa comentado en el apartado dedicado al  $O_2^{\cdot-}$ . Por último, la activación metabólica y la actividad de los peroxisomas y microsomas son otras dos importantes fuentes endógenas de ERO. En cuanto a la primera, son diversos los procesos propuestos y entre ellos se incluyen las reacciones redox cíclicas en presencia de oxígeno molecular, catabolismo oxidativo de drogas llevado a cabo por peroxidasas y desacoplamiento del ciclo catalítico del citocromo P450 (Lewis y cols., 1998). La proliferación de peroxisomas y el aumento de su



actividad enzimática propician el aumento de la tasa de producción y escape al espacio intracelular de  $H_2O_2$ , inclinando el balance oxidativo de la célula hacia el estado oxidado. Además, recientemente se ha identificado como importante fuente endógena de producción de  $H_2O_2$ , la oxidación peroximal de ácidos grasos como resultado del ayuno prolongado (Klauning y Kamendulis 2004; Rao y Reddy, 1991).

## II.3 Daños celulares producidos por los radicales libres

### II.3.1 Efectos sobre los lípidos. Peroxidación lipídica (PL)

La peroxidación lipídica es la destrucción de los AGPI en una reacción autocatalítica e incontrolada donde se forman hidroperóxidos y productos secundarios. Las membranas biológicas y las lipoproteínas plasmáticas son susceptibles de peroxidación porque contienen los sustratos necesarios para ello, como el ácido linoleico, araquidónico y docosahexanoico (Gutteridge, 1995).

En la PL se produce la oxigenación de AGPI (con 18 ó más átomos de carbono y con dos o más dobles enlaces conjugados en cis), tanto en la forma libre como esterificada, generándose peróxidos de ácidos grasos (Halliwell, 2006).

La peroxidación de los ácidos grasos modifica la estructura molecular de los lípidos que los contienen y provoca un cambio conformacional que es más importante en el caso de que los lípidos sean integrantes de membranas y sobre todo en la membrana mitocondrial, ya que el mal funcionamiento de la fosforilación oxidativa se asocia a destrucción de la membrana por alteraciones en la fluidez y la pérdida de ácidos grasos (Halliwell, 2006). Los hidroperóxidos lipídicos son el producto inicial de la oxidación de los AGPI, sin embargo, poseen una vida media muy corta pues o bien son rápidamente reducidos por acción de las enzimas del sistema de defensa antioxidante a alcoholes no reactivos, o bien reaccionan con metales para dar lugar a una variedad de productos altamente reactivos como los epóxidos o aldehídos. Entre los productos aldehídicos producidos a causa de la peroxidación lipídica destacan el malonilaldehído o el 4-hidroxinonenal. El malonilaldehído es mutagénico para las células de bacterias y mamíferos y carcinogénico en ratas, mientras que el 4-hidroxinonenal posee un potencial mutagénico débil, pero tiene un importante efecto sobre el fenotipo celular ya que interfiere en las rutas de transducción de señales intracelulares (Marnett, 2000).

Existe un mecanismo reparador del daño oxidativo de los lípidos que parece estar relacionado con la fosfolipasa A2, ya que su actividad en la membrana interna mitocondrial parece verse incrementada en situaciones asociadas a un aumento de la producción de ERO. Por tanto la fosfolipasa A2 parece ser una enzima reparadora que cataliza la eliminación de los lípidos oxidados de membrana. Sin este mecanismo reparador, los lípidos peroxidados se acumularían y las consecuencias de esto podrían ser, entre otras, un aumento de la permeabilidad de la membrana y una pérdida del control de la respiración mitocondrial (Kinsey y cols., 2007).

### II.3.2 Efectos sobre las proteínas

Las proteínas también son objeto de daño oxidativo alterándose su funcionamiento normal y por tanto su actividad biológica. Entre las alteraciones más frecuentes se encuentran la fragmentación, agregación y susceptibilidad a la degradación proteolítica. Los daños oxidativos en las proteínas originan agregación de las mismas por desnaturalización. Una proteína que ha sido objeto del daño oxidativo y está alterada ya no puede cumplir correctamente su función y se vuelve biológicamente inactiva o deficitaria. (Droge, 2002).

### II.3.3 Efectos sobre los hidratos de carbono

Algunos azúcares como la glucosa y otros desoxiazúcares, se auto-oxidan produciendo cantidades de  $H_2O_2$  que contribuyen a los niveles intracelulares de este compuesto. La auto-oxidación de la glucosa permite que esta pueda interactuar con otras moléculas provocando, por ejemplo, la glicosilación no enzimática de las proteínas (Roy y cols., 2004).

Por otra parte, el daño que los radicales libres producen en los desoxiazúcares que constituyen el ADN, aunque conocido desde hace mucho tiempo, ha recibido una creciente atención recientemente. Los fragmentos de desoxirribosa derivados del ataque de los radicales libres al ADN son potenciales mutágenos, ya que bloquean la actividad de enzimas como la ADN polimerasa o la ADN ligasa (Hwang y Bowen, 2007).

### II.3.4 Efectos sobre el material genético

Los radicales libres, bien endógenos o bien exógenos, pueden provocar lesiones en el material genético de las células, que de no ser reparadas eficientemente, dan lugar a mutaciones génicas y a sus consecuencias.

#### II.3.4.1 Daño en el ADN mitocondrial (ADNmt)

El ADNmit es muy susceptible al daño oxidativo ya que se localiza en una región cercana a la membrana mitocondrial interna, donde las ERO son generadas, es de pequeño tamaño y además carece de histonas. Por otra parte, la mitocondria posee un mecanismo de reparación del ADN incompleto en comparación con el sistema nuclear. El ADNmt codifica proteínas involucradas en el proceso de fosforilación oxidativa y por tanto, su fragmentación a causa de la presencia de radicales libres, da lugar a una disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial que favorece la generación de ERO, ERN y nuevo daño en el ADNmt en una secuencia de eventos que finalmente estimulan la inducción de la apoptosis (Hwang y Bowen, 2007).

#### II.3.4.2 Daño en el ADN nuclear

Los radicales libres producen directamente roturas simples o dobles de la cadena en el ADN, modificaciones en las bases nitrogenadas púricas o pirimidínicas y entrecruzamiento en el ADN. El daño persistente en el ADN puede dar lugar o bien a la detención o la inducción de la transcripción, a la inducción de las rutas de señalización intracelular, errores en la replicación e inestabilidad genómica en general (Klauning y Kamendulis, 2004; Valko y cols., 2006).

Se estima que una célula humana, en condiciones fisiológicas normales, está expuesta a  $1,5 \times 10^5$  lesiones oxidativas al día, que provocan modificaciones en el ADN de las cuales más de 100 han sido identificadas. Entre ellas destacan las generadas por el radical  $\text{OH}^\cdot$ , capaz de intercalarse entre los dobles enlaces de las bases nitrogenadas dando lugar a un radical muy inestable que reacciona con otros componentes del ADN y se oxida generando una base hidroxilada. Esta reacción en cadena da lugar a una amplia variedad de bases nitrogenadas y azúcares modificados, lugares libres de bases nitrogenadas, roturas del ADN e interacciones aberrantes entre ADN y proteínas. Un ejemplo bien estudiado de la consecuencias de un ataque del radical  $\text{OH}^\cdot$  sobre el ADN, es la formación de 8-OH-G (8-hidroxi-guanina). Ensayos de síntesis de ADN *in vitro* muestran que la 8-OH-G es un mutágeno potencial dado que provoca una alteración en la pauta de lectura de la hebra molde durante la replicación, induciendo transversiones A:T  $\rightarrow$  C:G. Otras lesiones en el ADN, como la 8-oxo-adenina, 5-hidroxi-deoxicidina, glicol-timina o algunos análogos del uracilo, son igualmente mutagénicos. Este tipo de modificaciones permanentes han sido encontradas en oncogenes y genes de supresores de tumores sugiriendo que el daño oxidativo está relacionado con los primeros estadios de la carcinogénesis (Marnett, 2000; Klauning y Kamendulis, 2004; Hwang y Bowen, 2007).

Además de las ERO, las ERN como  $\text{NO}^\bullet$  y  $\text{ONOO}^-$ , han sido relacionadas con el daño en el ADN. El radical  $\text{ONOO}^-$  reacciona con la guanina para formar 8-nitroguanina, que induce transversiones G:C  $\rightarrow$  T:A, cuya estabilidad es muy limitada en el ADN pero no así en el ARN, aunque la potencial conexión entre esta modificación y la carcinogénesis es aún desconocida (Klauning y Kamendulis, 2004; Valko y cols., 2006).

Los radicales libres no sólo inducen modificaciones químicas en el ADN, sino que su actividad mutagénica es también mediada por las alteraciones estructurales de la doble hélice a las que dan lugar. Entre ellas es posible destacar las alteraciones conformacionales inducidas por los residuos 8-OH-G, que en procesos que implican la separación de las dos hebras del ADN (replicación, transcripción, etc...), adoptan la conformación *sin* que bloquea el apareamiento con los residuos cisteína. La producción del aducto timidina glicol se ha asociado a la interrupción de la replicación un nucleótido antes y un nucleótido después de la lesión. La presencia de 5-hidroximetiluracilo se correlaciona con deleciones de media y elevada longitud en el ADN, que no son la consecuencia de un desapareamiento, sino de los errores que esta lesión induce en la actividad reparadora de la correspondiente ADN glicosilasa. La inestabilidad de microsatélites ha sido relacionada con los eventos oxidativos en las células mediante la inducción de mutaciones en las secuencias repetitivas de estas regiones y fenómenos de pérdida de heterocigosidad discontinua, que han sido descritos como parte del patrón mutacional inducido por los radicales libres. Por último, es conocido que los radicales libres, como el  $\text{OH}^\bullet$  y los productos intermedios derivados del ataque de los radicales libres a los componentes del ADN, reaccionan con los residuos desoxirribosa del esqueleto hidrocarbonado de la doble hélice originando rupturas de doble o simple hebra (Cooke y cols., 2003).

## II.4 Sistema de defensa antioxidante

Una sustancia es definida como antioxidante cuando es capaz de disminuir o inhibir el daño oxidativo sobre una molécula. Para la desintoxicación de ERO los organismos han desarrollado numerosos tipos de sistemas defensivos de prevención, interceptación y reparación, formados por atrapadores y sustancias neutralizantes no enzimáticas, así como por sistemas enzimáticos entre los que se encuentran las superóxido dismutasas, glutatión peroxidasas y la catalasa, entre otras. También otros sistemas importantes son las reacciones de regeneración y el sistema del glutatión (Halliwell, 2007; Halliwell, 2006).

## II.4.1 Sistema de defensa antioxidante no enzimático

### II.4.1.1 Antioxidantes extracelulares

Como se ha mencionado anteriormente, en la célula se forman continuamente radicales libres frente a los cuales las células actúan. Dado que los metales como el cobre o el hierro son promotores del daño oxidativo, los organismos han desarrollado un sistema de transporte y almacenamiento que evita que los iones metálicos circulen libremente. Un ejemplo sería la transferrina, que tiene capacidad de unirse al hierro plasmático de humanos, o la lactoferrina, que cumple la misma función en secreciones como las lágrimas o la mucosidad nasal. Otras proteínas transportadoras, como ceruloplasmina y la albúmina, se unen al cobre plasmático limitando la reactividad de este ión (Halliwell y Gutteridge, 2000; Gutteridge, 1995).

El ácido ascórbico también es un antioxidante importante presente en medio acuoso. El ácido ascórbico protege a los lípidos de las membranas, el ADN y los grupos amino de las proteínas del daño oxidativo, sin embargo, algunos estudios *in vitro* sugieren que el ácido ascórbico puede tener también un efecto pro-oxidante en presencia de iones metálicos, ya que los mantiene en estado reducido permitiendo que se unan a las cadenas de ADN e induzcan roturas de una sola hebra o modificaciones de las bases nitrogenadas y la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En contraste, la mayoría de estudios *in vivo* muestran que la suplementación dietética con vitamina C reduce predominantemente el daño oxidativo. Por tanto parece que la actividad pro-oxidante del ácido ascórbico se limita a aquellas situaciones no fisiológicas en las que se observa una contaminación del medio por iones metálicos (Valko y cols., 2006; Hwang y Bowen, 2007). También los uratos reaccionan directamente con los radicales libres, eliminándolos de forma no catalítica (Halliwell y Gutteridge, 2000).

### II.4.1.2 Vitamina E

Bajo el término de vitamina E se engloba un conjunto de 8 nutrientes liposolubles, de los cuales, el tocoferol predomina en muchas especies y es el de mayor actividad biológica. Su centro activo se relaciona con el grupo 6-OH, mientras que su cola fitilo es la responsable del transporte y el anclaje dentro de las membranas biológicas. La distribución de la vitamina E parece no ser homogénea pues se halla asociada a las zonas de la bicapa fosfolipídica más fluidas, cerca de los AGPI. Niki sugirió en 1987 que la vitamina E podría encargarse de la

eliminación de radicales en zonas más externas de la membrana y el coenzima Q en la zona interior hidrofóbica (Constantinou y cols., 2008; Yoshida y cols., 2007).

Los tocoferoles actúan como antioxidantes biológicos, constituyendo gran parte de la capacidad antioxidante liposoluble del plasma humano y de los eritrocitos. En consecuencia, la protección frente a la peroxidación lipídica es considerada su principal función en la célula (Yoshida y cols., 2007).

El tocoferol rompe la reacción en cadena de la peroxidación debido a que los radicales peroxilo reaccionan con otros lípidos a una velocidad aproximada de 50 por mol por segundo, mientras que con el tocoferol reaccionan 10<sup>4</sup> a 10<sup>5</sup> veces más rápido. Durante la reacción antioxidante, el  $\alpha$ -tocoferol es transformado en un radical tras la donación de un hidrógeno lábil a un lípido o un radical peroxilo. Aunque este radical es lo suficientemente estable como para que no continúe la cadena de eventos peroxidativos, es retirado del ciclo y reciclado mediante la acción de dos posibles moléculas, el ácido ascórbico y el coenzima Q. Es probable, en relación con la reversibilidad de la formación de radicales libres de tocoferol, que el dador de hidrógeno sea hidrosoluble y que el radical en cuestión se elimine de la membrana hacia el compartimento acuoso de la célula. Este hecho y otros datos recientes sugieren que el  $\alpha$ -tocoferol y el ácido ascórbico cooperan en una reacción antioxidante cíclica, que protege a la célula principalmente frente a la peroxidación lipídica (Valko y cols., 2006; Constantinou y cols., 2008).

#### II.4.1.3 Coenzima Q

La ubiquinona parece estar localizada en el plano medio de la bicapa lipídica, con la cabeza polar oscilando transversalmente de un lado a otro de la membrana. Este movimiento transversal de la ubiquinona probablemente esté limitado a oscilaciones de su grupo polar, permitiendo las interacciones con los agentes redox solubles en agua. El coenzima Q es el único antioxidante lipofílico biosintetizado en el organismo. El aportado exógenamente también protege a las células del estrés oxidativo tras ser reducido por acción de reductasas presentes en distintas fracciones celulares. El coenzima Q10 aportado exógenamente se acumula en la mitocondria en forma de cationes, previniendo la peroxidación lipídica y protegiendo frente al estrés oxidativo. Además, participa en el proceso de regeneración de la vitamina E (Genova y cols., 2003).

#### II.4.1.4 Glutation

Es el antioxidante no enzimático de bajo peso molecular más abundante en las células de mamíferos. Su forma reducida (GSH) se encuentra a una concentración 10-100 veces superior que su forma oxidada (GSSG). La proporción GSH/GSSG se encuentra estrictamente regulada en la célula y su alteración conduce a la activación de algunas rutas de señalización intracelular que inciden sobre el ciclo celular (Klauning y Kamendulis, 2004).

El glutatión es una molécula esencial en la defensa antioxidante de la célula debido principalmente a que actúa como cofactor de varias enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, que eliminan el  $H_2O_2$  generado en el citosol y la mitocondria, la glutatión transferasa, que elimina productos de la peroxidación lipídica como el 4-hidroxinonal, y otras. Además captura y neutraliza directamente radicales  $OH^\bullet$  y  $O_2^{\bullet-}$ , regenera importantes antioxidantes como las vitaminas E y C, mantiene en el núcleo el estado redox de proteínas con grupos sulfidilo críticas en los procesos de expresión y reparación del ADN y participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana celular (Valko y cols., 2006).

#### I.4.1.5 Carotenoides

Los carotenoides son antioxidantes biológicos que poseen 9 o más dobles enlaces conjugados capaces de neutralizar  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^\bullet$  y radicales peroxilo. Sin embargo algunos trabajos basados en la suplementación dietética con  $\beta$ -caroteno han puesto de manifiesto el posible efecto pro-oxidante de estas sustancias. Posteriores estudios demuestran que el cambio de actividad antioxidante a pro-oxidante depende de la presión parcial de oxígeno, ya que el radical carotenoide formado tras la transferencia electrónica a los diversos radicales libre durante el proceso de detoxificación, puede reaccionar con el oxígeno molecular dando lugar a un radical peroxilo que induce la oxidación de ácidos grasos insaturados. Por lo tanto, parece que a altas presiones de oxígeno los carotenoides pierden su actividad antioxidante e incluso adquieren propiedades pro-oxidantes (Valko y cols., 2006; Hwang y Bowen, 2007).

#### II.4.1.6 Flavonoides

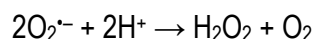
Los flavonoides son compuestos polifenólicos presentes en numerosos vegetales y que constituyen una parte esencial de la dieta humana. Los flavonoides actúan como quelantes finales de iones metálicos o interfieren en el proceso de peroxidación lipídica donando rápidamente un hidrógeno a los radicales. Tras esta donación se forma un fenoxi-radical muy

estable y no reactivo. A pesar de ello, los flavonoides, como el ácido ascórbico o los carotenos, bajo ciertas circunstancias, como altas concentraciones de antioxidantes fenólicos, la presencia de iones metálicos o un pH elevado, pueden comportarse como sustancias pro-oxidantes (Halliwell, 2008).

## II.4.2 Sistema de defensa antioxidante enzimático

### II.4.2.1 Superóxido dismutasa (SOD)

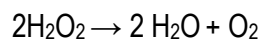
La enzima SOD fue descrita por McCord y Fridovich en 1968. Es uno de los antioxidantes enzimáticos más efectivos de la célula y cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido para dar lugar a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (Liochev y Fridovich, 2007):



La tasa de acción enzimática de la SOD es elevada y la reacción se cataliza a través de sucesivas oxidaciones y reducciones del ión metálico de su centro activo por un mecanismo enzimático tipo *Ping-Pong*. Existen varias isoformas de SOD que difieren en su secuencia aminoacídica, número de subunidades integrantes y en el metal de su centro activo. En tejidos humanos es posible encontrar hasta 3 SODs distintas: Cu/ZnSOD, que es citosólica, Mn-SOD mitocondrial y SOD extracelular (Halliwell, 2007; Valko, 2006; Rao y cols., 2008).

### II.4.2.2 Catalasa (CAT)

La catalasa es una enzima presente en la mayoría de los tejidos de mamíferos que se encuentra localizada en pequeños orgánulos llamados peroxisomas (80%) y en el citosol (20%). La catalasa elimina el  $\text{H}_2\text{O}_2$  rompiéndolo directamente hasta  $\text{O}_2$  y agua.



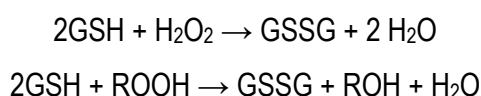
También tiene actividad peroxidativa produciendo la oxidación de donadores de hidrógeno como el etanol, metanol, ácido fórmico y fenoles con el consumo de un mol de peróxido. La actividad predominante depende de la concentración del donador de hidrógeno y de la concentración o producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el sistema. La catalasa tiene enorme capacidad para



destruir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es una de las enzimas más activas conocidas, aunque su afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es también baja y necesita elevadas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para actuar rápidamente (Kirkman y Gaetani, 2006).

#### II.4.2.3 Glutation peroxidadasas (GPx)

Se trata de una familia de 6 enzimas que utilizan GSH como donador de hidrógeno y que pueden aceptar peróxidos orgánicos además del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustratos. El radical R puede ser un grupo alifático, un grupo orgánico aromático o simplemente un hidrógeno.



Los tejidos humanos contienen glutatión peroxidasa, como enzima mayoritaria encargada de la eliminación de peróxidos, que son potenciales sustratos de reacciones Fenton. La regeneración del glutatión oxidado es efectuada por la enzima glutatión reductasa (Valko y cols., 2006).

La redundancia funcional de las GPx es sólo aparente, pues en los últimos años se ha investigado su especificidad biológica. Todas ellas poseen la capacidad de reducir hidroperóxidos a expensas de la oxidación de grupos tiol, mayoritariamente los presentes en el GSH, sin embargo la GPx-1, enzima localizada en la fracción citosólica, está implicada en el mantenimiento del balance oxidativo general, mientras el resto de los componentes de esta familia de selenoproteínas, parecen implicadas en funciones más específicas. La GPx-2 o GPx gastrointestinal es un componente de la respuesta adaptativa regulada por Nrf2 (*NF-E2-related factor 2*), protegiendo los tejidos donde éste se expresa de la inflamación y la transformación celular. La GPx4 o GPx de hidroperóxidos fosfolipídicos bloquea específicamente la señalización mediada por la IL-1 y dependiente del NF-κB inhibiendo la biosíntesis de leucotrienos y prostanoïdes al interferir con la actividad de las enzimas LOX (lipoxigenasa) y COX (ciclooxigenasa). La función de GPx3 o GPx plasmática, GPx5, expresada en el epidídimo de roedores y monos, y GPx6, tan sólo encontrada en el epitelio olfativo de humanos, es aún desconocida en gran medida (Brigelius-Flohe, 2006).

#### II.4.2.4 Tiorredoxina (TRX)

El complejo TRX es, junto con el GSH, el principal sistema encargado del mantenimiento de la homeostasis redox en la célula (Valko y cols., 2006). El complejo TRX se compone fundamentalmente de dos enzimas, la tiorredoxina y tiorredoxina reductasa (TRXr). Ambas son flavoproteínas que llevan a cabo su actividad catalítica mediante ciclos de oxidación/reducción de dos residuos cisteína de su centro activo. La misión de la TRXr es fundamentalmente recuperar la forma reducida y activa de la TRX, en un proceso que requiere la presencia del cofactor NADPH. El complejo actúa en procesos decisivos en la carcinogénesis como en la estimulación de la proliferación celular, en calidad de cofactor en la síntesis de ADN y a través de la activación de la expresión de citoquinas, factores de crecimiento y factores de transcripción, prevención de la apoptosis, estimulación de la angiogénesis y regulación de la actividad por unión directa a proteínas como ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) inhibiendo la señal apoptótica y otras quinasas implicadas en los mecanismos de transducción de señales intracelulares, factores de transcripción como NF- $\kappa$ B o proteínas implicadas en la reparación del ADN como Ape1 (Biaglow y Miller, 2005).

La contribución del complejo TRX a la expresión del fenotipo celular transformado ha sido trasladada a estudios clínicos, en los que se ha podido observar que la expresión de estas proteínas es significativamente superior en tejidos neoplásicos con respecto a tejidos sanos y que dicha sobre-expresión, se correlaciona con un peor pronóstico, una pobre supervivencia y un aumento de la resistencia a fármacos quimioterápicos (Kim y cols., 2005).

### II.5 Sistema de reparación del ADN

Las biomoléculas que poseen cierta tasa de recambio, como son las proteínas, los lípidos o el ARN, poseen una vida media discreta y son generalmente reemplazadas cuando han sufrido algún tipo de daño. Sin embargo el ADN es irremplazable, posee una estabilidad química limitada y, dado que se encuentra continuamente expuesto a agentes capaces de inducir modificaciones químicas y conformacionales en su estructura, todos los organismos han desarrollado un sistema de reparación capaz de mantener la integridad del genoma. Este sistema es esencial para la supervivencia y la propagación de la especie, por lo que es uno de los más conservados filogenéticamente, desde las bacterias hasta el hombre (Spry y cols., 2007; Gross y cols., 2002).

Como ha sido comentado anteriormente, los radicales libres generados a partir de la actividad metabólica de las células y de la exposición a agentes exógenos ionizantes como la radiación, provocan alteraciones en el ADN. La primera barrera de defensa frente al daño oxidativo es llevada a cabo por los sistemas antioxidantes que, aunque en condiciones fisiológicas previenen las consecuencias genotóxicas de la actividad química de estas sustancias, son insuficientes cuando la exposición a los radicales libres es persistente, especialmente cuando todos los sistemas se alteran como durante el proceso del envejecimiento o bajo ciertas condiciones patológicas. El daño generado debe ser reparado, sobretodo cuando afecta a las regiones codificantes de genes con una función biológica relevante, pues son potencialmente mutagénicas. Para ello, las células han desarrollado un complejo sistema de reparación del ADN que puede ser dividido en 5 rutas moleculares mayoritarias (Spry y cols., 2007):

- Mecanismo de reparación por escisión de bases nitrogenadas
- Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos
- Mecanismo de reparación de desapareamientos entre bases nitrogenadas
- Mecanismo de reparación por recombinación
- Unión no homóloga de extremos

Los radicales libres producen principalmente modificaciones químicas en los ácidos nucleicos dando lugar a aductos derivados de bases nitrogenadas, sitios abásicos y alteraciones en la estructura molecular de las desoxirribosas (Marnett, 2000), por lo que generalmente se asume que el principal mecanismo de reparación asociado al daño oxidativo es el REB (reparación por escisión de bases nitrogenadas) (Genova y cols., 2003; Sung y Demple, 2006). La REB es iniciada tras el reconocimiento y escisión de la base nitrogenada modificada por ADN glicosilasas específicas. En humanos hay dos tipos principales de ADN glicosilasas, monofuncionales, cuya actividad catalítica rompe el enlace N-glicosídico en el C1 que une la base nitrogenada a la molécula de desoxirribosa; y bifuncionales, que además de romper enlaces glicosídicos poseen actividad AP-liasa (apúrica/apirimidinica-liasa), que rompe el enlace fosfodiéster en el extremo 3' del lugar AP originando una muesca en la hebra de ADN donde se localizaba la base dañada. El proceso de reparación continúa con el reclutamiento de otras proteínas reparadoras con actividad endonucleasa, ADN polimerasa y ligasa, que procesan los sitios AP y restauran la secuencia nucleotídica original. La REB puede seguir dos vías distintas que implican el reclutamiento de distintos tipos de enzimas reparadoras: REB de fragmento

corto, que implica la escisión y reparación de un solo nucleótido y supone la activación de enzimas como Ape1, ADN Polimerasa  $\beta$ , XRCC1 (*X-ray cross-complementing group 1*) y ADN ligasa III, y REB de fragmento largo, en la que el proceso finaliza con la reparación de 2-12 nucleótidos tras la actividad de un grupo de enzimas ADN polimerasa y ligasas diferentes entre las cuales se han identificado las ADN Polimerasas  $\delta/\epsilon$  asociadas a PCNA (*proliferating celular nuclear antigen*), ADN ligasa 1 y la endonucleasa FEN1, si bien ambas vías comparten el requerimiento de la endonucleasa Ape1. El mecanismo regulador que desplaza la reparación del ADN hacia una u otra vía es aún desconocido (Sung y Demple, 2006; Fortini y cols., 1999; Gross y cols., 2002; Tudek, 2007).

Por otra parte, los aductos generados en el ADN a causa de la exposición a los radicales libres originan roturas en una de las hebras del ADN o en las dos (Song y cols., 2003). La fragmentación del ADN es reparada por las enzimas RPA (*replication protein A*) y el heterodímero Ku70/68, que son proteínas nucleares capaces de detectar los extremos libres en la doble hélice e iniciar la cascada de señalización conducente a su reparación. RPA es esencial para la iniciación del proceso de REN (reparación por escisión de nucleótidos) de roturas una sola hebra en el ADN, pues su unión a la hebra complementaria en el lugar donde se detecta la rotura, activa el reclutamiento de la proteína XPA (*xeroderma pigmentosum complementation group A protein*) y permite la unión de las endonucleasas XPG (*xeroderma pigmentosum complementation group G protein*) al extremo 3' y el complejo XPF-ERCC1 (*xeroderma pigmentosum complementation group F protein-excision repair cross-complementing 1*) al extremo 5' de la hebra dañada. Las endonucleasas catalizan la eliminación de una serie de nucleótidos en ambos sentidos creando un hueco que es reparado por acción de PCNA y la ADN Polimerasas  $\delta$  (Fanning y cols., 2006). Por otra parte el heterodímero Ku70/Ku86 es un enzima especializada en la reparación de roturas en las dos hebras del ADN mediante la unión no homóloga de extremos. Ku70/Ku86 detecta este tipo de roturas, se une a los extremos libres alineándolos para la reparación y activa el reclutamiento del complejo XRCC4-ADN ligasa IV, que cataliza la unión de los extremos (Hopfner y cols., 2002).

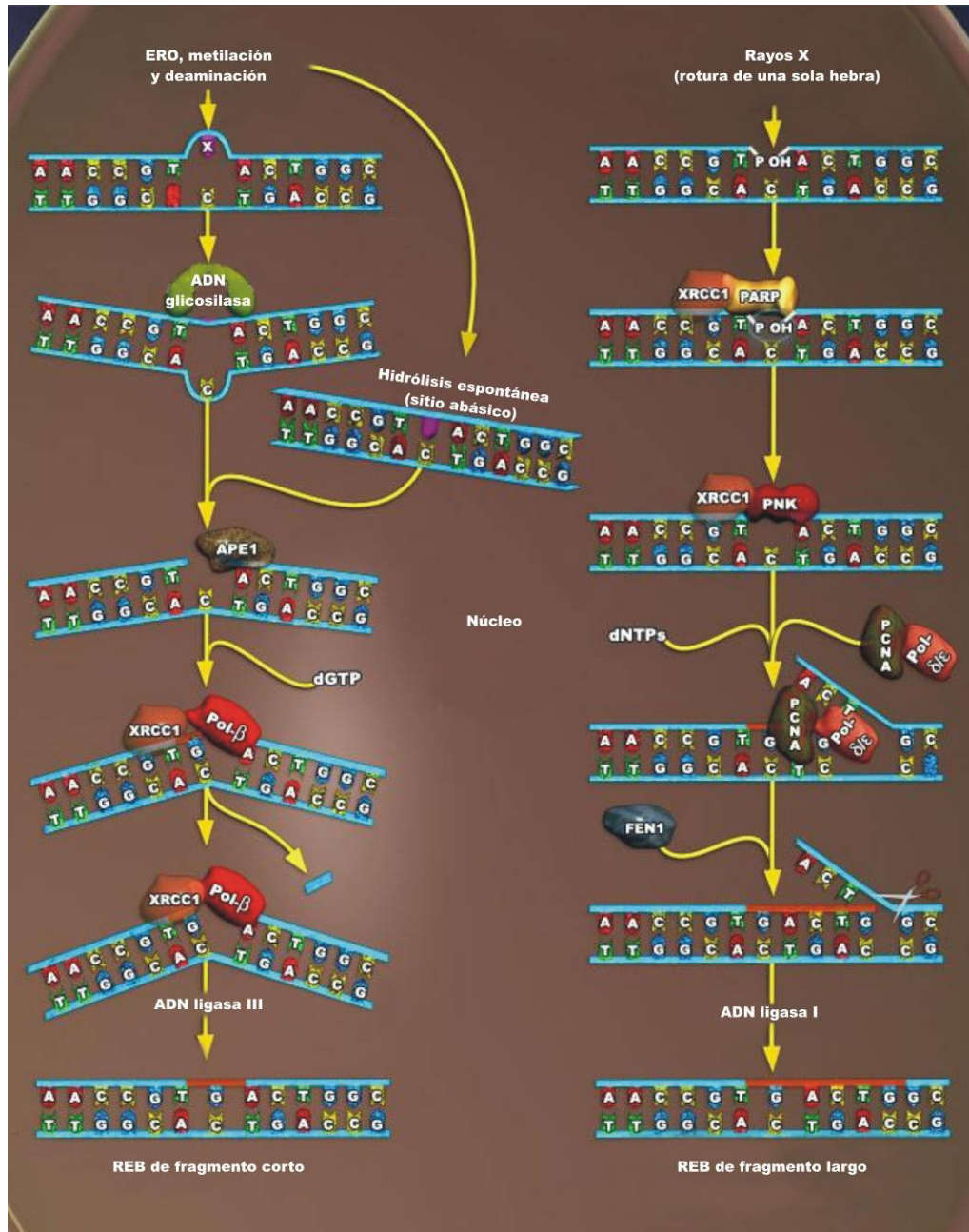


Figura 10. Esquema del mecanismo de reparación por escisión de bases nitrogenadas de fragmento corto y largo.

El daño no reparado eficientemente da lugar a la modificación permanente en la secuencia del ADN, que será perpetuada a lo largo de sucesivas replications del material genético y por tanto, a la pérdida de fidelidad del mensaje que codifica. Consecuentemente, dichas alteraciones pueden dar lugar a la expresión génica aberrante y, en última instancia, a proteínas afuncionales. Además, las alteraciones químicas en el ADN se acompañan frecuentemente de interacciones moleculares anormales entre bases de hebras complementarias y alteraciones en la estructura tridimensional de la molécula de ADN, que impiden los procesos de replicación y transcripción del ADN (Spry y cols., 2007; Marnett, 2000). Por todo ello, los radicales libres son considerados

como agentes mutágenos de primer orden y los defectos en el sistema de reparación del ADN relacionados con enfermedades como el cáncer, en las que la acumulación de mutaciones es una condición sinequanon en los primeros estadios de la carcinogénesis (Spry y cols., 2007; Tudek, 2007).

## II.6 El daño oxidativo en la carcinogénesis, invasión y metástasis en el cáncer de mama

En 1984 Zimmerman y colaboradores publicaron uno de los primeros estudios cuyos resultados sugirieron que las ERO, poseen un rol promotor durante las etapas iniciales de la oncogénesis (Zimmerman y Cerutti, 1984). Desde entonces, el papel de los radicales libres en el proceso de transformación carcinogénico, ha generado un creciente interés en la comunidad científica por la ubicuidad y multifuncionalidad de estas sustancias, ya que están implicadas tanto en procesos fisiológicos normales como en eventos patológicos.

En respuesta a la pregunta de si los radicales libres ejercen una función agonista o antagonista de la carcinogénesis, son numerosos los trabajos *in vitro* y con animales que han investigado las consecuencias de un aumento de la concentración de estas sustancias, gracias a la supresión de las defensas antioxidantes. Entre ellos, destacan los llevados a cabo con ratones *knockout* que carecen de enzimas antioxidantes fundamentales, como la SOD<sub>Cu/Zn</sub>, en los que se ha observado una tendencia a expresar un fenotipo variable entre cuyas características se incluye la muerte precoz por hepatocarcinoma (Sentman y cols., 2006), las glutatión peroxidasa GPx1 y GPx2, cuya afuncionalidad se correlaciona con el desarrollo de cáncer intestinal (Chu y cols., 2004), y las peroxirredoxinas, cuya supresión da lugar al aumento de la concentración de ERO y la promoción de linfomas, sarcomas y adenomas (Neumann y cols., 2003). Por último, se ha observado que ratones *knockout* defectivos en catalasa presentan una elevada tendencia a desarrollar tumores mamarios (Ishii y cols., 1996).

Por otra parte, se ha sugerido que las células transformadas suprimen la apoptosis, aceleran la proliferación, la metástasis y la angiogénesis utilizando los radicales libres como segundos mensajeros que participan en las rutas de señalización intracelular. Estudios con líneas celulares transformadas muestran que gran parte de ellas favorecen la formación de ERO en concentraciones anormalmente elevadas, en comparación con células sanas (Laurent y cols., 2005). La medida de la concentración de tales sustancias *in vivo*, es compleja y frecuentemente

inadecuada, por lo que la tendencia es analizar la concentración de los productos del daño molecular asociado al estrés oxidativo, obteniendo resultados que se correlacionan directamente con los alcanzados con los estudios *in vitro* (Halliwell, 2007).

De acuerdo con el modelo en trifásico de la carcinogénesis, que se caracteriza por la acción acumulativa de múltiples eventos que ocurren en una única célula, los radicales libres podrían ejercer su efecto promotor de la transformación neoplásica, tanto en las fases de iniciación y promoción como en la de progresión.

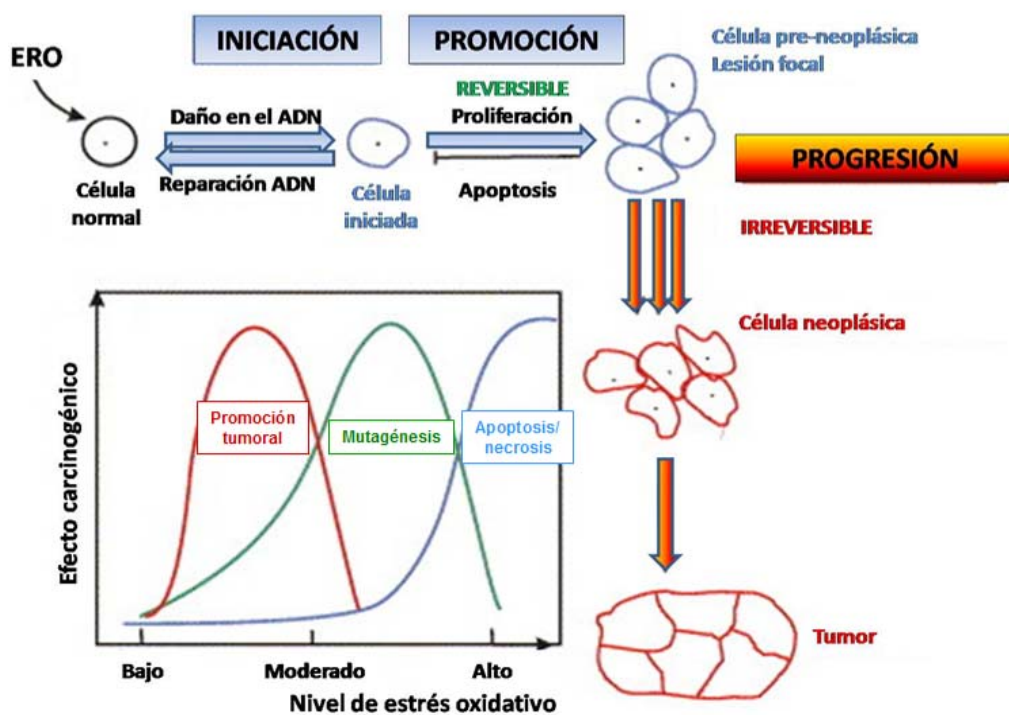


Figura 11. Magnitud del efecto carcinogénico frente a la concentración de radicales libres durante los tres estadios de la carcinogénesis. II.6.1 Iniciación

Durante la fase de iniciación se acumulan en la célula sana, mutaciones no letales que son fijadas mediante al menos una ronda de replicación del material genético. En esta etapa los radicales libres intervienen generando daño en el ADN directamente o bien indirectamente, a través de la producción de radicales libres altamente reactivos producto de la peroxidación lipídica o sus efectos sobre otras biomoléculas como los hidratos de carbono o las proteínas. Por tanto, los radicales libres contribuyen a la mutagénesis necesaria para la iniciación del proceso oncogénico, generando la inestabilidad genómica requerida para la transformación celular por medio de los eventos químicos descritos en apartados anteriores.

## II.6.2 Promoción

En la fase de promoción tiene lugar la expansión clonal de las células iniciadas a través de la inducción de la proliferación celular y/o inhibición de la apoptosis. El resultado es una lesión identificable que forma el tumor primario.

### II.6.2.1 Radicales libres y proliferación celular

Los radicales libres actúan como segundos mensajeros y tienen un importante papel dentro de la señalización celular asociada a los procesos de crecimiento y diferenciación celular. De acuerdo con el tipo y el estatus oxidativo celular, los radicales libres pueden promocionar bien una respuesta proliferativa positiva o bien inducir el proceso apoptótico en función de su concentración en la célula (Valko y cols., 2006).

Los mecanismos moleculares por los que los radicales libres participan e influyen los procesos de señalización intracelular incluyen la interacción con:

#### *Receptores de factores de crecimiento y citoquinas*

Una amplia variedad de citoquinas y factores de crecimiento, que se unen a receptores con actividad tirosín-quinasa de distintas clases, ejercen su efecto mitogénico a través de la producción de radicales libres en células no fagocíticas. Entre los factores de crecimiento destacan EGF, PDGF y VEGF. La estimulación de cualquiera de estos factores de crecimiento da lugar a un aumento transitorio de la concentración intracelular de ERO a través de la proteína de señalización Rac1 que activa la síntesis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por parte del enzima NADPH oxidasa y así facilita la autofosforilación del receptor y la inducción de la casacada de señalización dependiente del factor de crecimiento. Por otra parte, citoquinas e interferones, como  $\text{TNF-}\alpha$ , la IL-1 y el interferón  $\gamma$ , se unen a receptores transmembrana transmitiendo una señal que da lugar a la formación de ERO. La existencia de numerosos factores de crecimiento y citoquinas que activan la producción de radicales libres en la célula sugiere una relación cooperativa entre sus receptores para amplificar la señal intracelular y, de hecho, es el caso de algunos de ellos como el receptor de la angiotensina II y el receptor de EGF, pues la unión de la angiotensina II a su receptor da lugar a la transactivación mediada por ERO del receptor de EGF (Droge, 2002; Valko y cols., 2007).



### *Proteínas Tirosín-fosfatasas*

La exposición a concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> superiores a 1mM conducen a importantes cambios pro-oxidativos en la célula que como consecuencia tiene la fosforilación de numerosas proteínas, entre ellas las tirosín-fosfatasas. Estas proteínas contrarrestan el efecto de las proteínas tirosín-quinasa y devuelven a su conformación basal a los receptores transmembrana tras la unión con sus ligandos. Se cree que la inhibición por fosforilación de estas enzimas, directamente estimula la actividad de las proteínas tirosín-quinasa y por tanto activa las cascadas de señalización molecular que promueven el crecimiento celular (Valko y cols., 2006), aunque el papel fisiológico de este mecanismo de regulación es aún controvertido, pues la concentración de radicales libres necesaria para ello es muy elevada (Droge, 2002).

### *Proteín-quinasa citoplasmáticas*

Las proteín-quinasa citoplasmáticas, como las pertenecientes a las familias Src, JAK y MAPK, forman parte de las cascadas moleculares implicadas en la transducción de señales citoplasmáticas dirigidas al núcleo celular. Estas proteínas son activadas mediante la fosforilación de los residuos tirosina, serina o treonina de su centro activo en respuesta a la activación de receptores de factores de crecimiento, citoquinas y proteínas G heterodiméricas acopladas a receptores y transmiten la señal al fosforilar a su vez a otras proteín-quinasa hasta alcanzar a factores de transcripción que se translocan al núcleo y activan la expresión de genes implicados en la proliferación, diferenciación celular y apoptosis. Diversos estudios muestran como la actividad catalítica de estas proteínas es favorecida por la presencia de radicales libres, por el mismo mecanismo por el que éstos inhiben a las tirosín-fosfatasas. De especial importancia es la activación mediada por ERO de las 3 rutas de señalización intracelular en las que intervienen la familia de quinasa MAPK: ERKs (*extracelular-regulated kinases*), JNK (*c-jun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase*) y p38. Los estudios de activación de las MAPKs muestran que tal efecto es dependiente del tipo de estímulo, pues se ha comprobado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno induce la actividad de ERK, mientras que el exógeno induce la actividad de p38 (Droge, 2002; Laurent y cols., 2005). Por otra parte, el aumento de la concentración de ERO en la célula provoca la movilización de los depósitos de Ca<sup>+2</sup> intracelular o el influjo del Ca<sup>+2</sup> extracelular, aumentando los niveles citosólicos de este catión que contribuye a la activación de quinasa como PKC (*protein kinase C*) que juega un papel crítico en el proceso de la oncogénesis (Valko y cols., 2006).

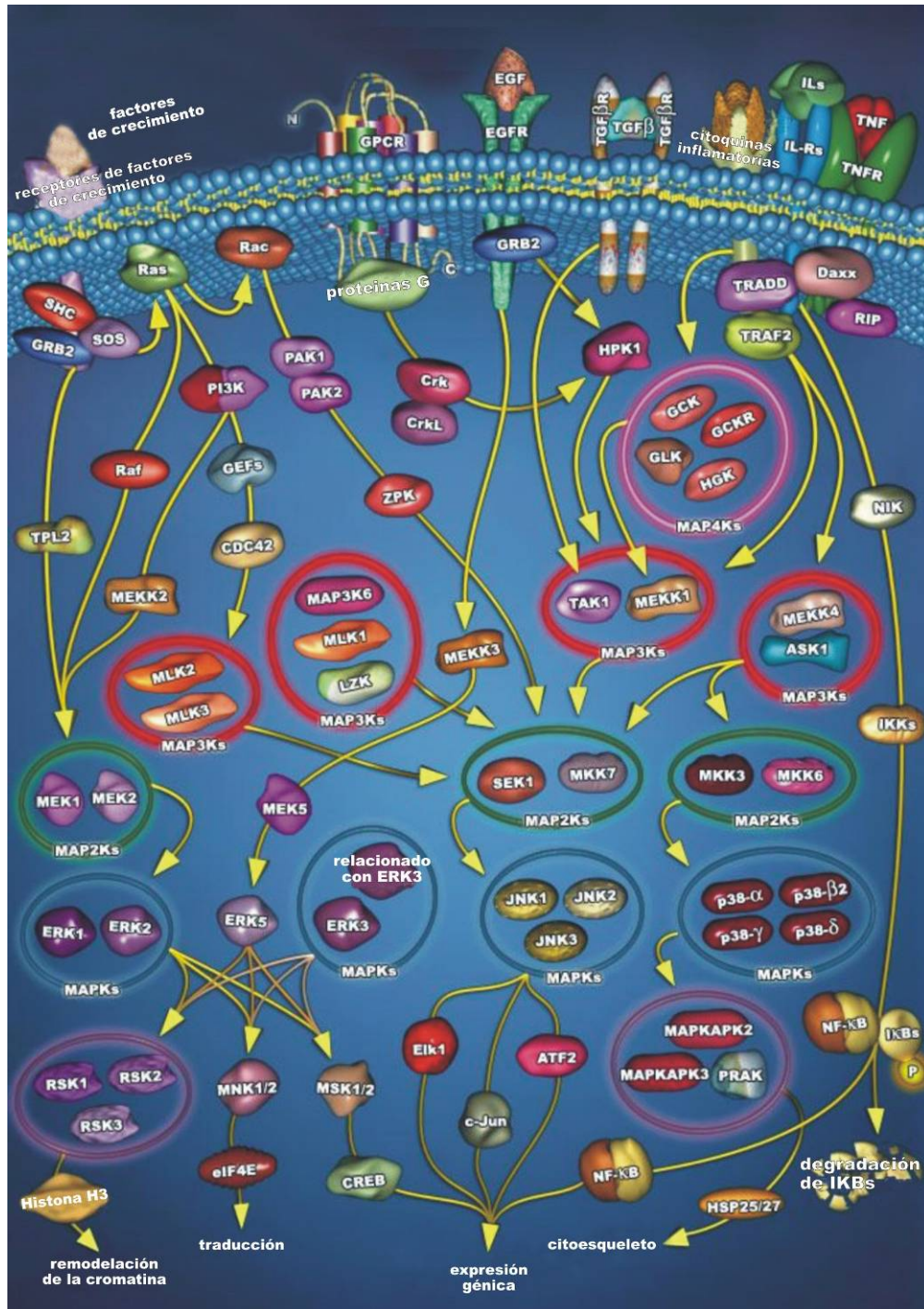


Figura 12. Principales rutas de transducción de señales activadas por los factores de crecimiento celulares, citoquinas e interleuquinas.

### Factores de transcripción

Los factores de transcripción controlan la expresión de genes implicados en la reparación del daño en ADN, la respuesta inmune, la proliferación celular y la apoptosis. Entre aquellos cuya actividad se encuentra modulada por los radicales libres destacan proteínas esenciales para el control del crecimiento celular como AP-1, NF-κB, o el factor HIF 1 (*hypoxic inducible factor 1*).

El factor de transcripción AP-1 se compone de las proteínas c-Fos y c-Jun, dos potentes reguladores positivos de la expresión génica cuya actividad se asocia con la estimulación de la proliferación celular y cuya relación con la oncogénesis ha sido bien documentada (Hsu y cols., 2003). La inducción de AP-1 mediada por los radicales libres se debe principalmente a la activación de las cascadas de señalización en las que intervienen las quinasas JNK y p38. Una vez fosforilada, JNK se transloca al núcleo donde fosforila a su vez a c-Jun en su dominio NH<sub>2</sub>-terminal promoviendo su actividad transcripcional. En el caso de p38, la activación de AP-1 está mediada por otra quinasa conocida como ASK1 que es fosforilada en respuesta a diferentes situaciones de estrés celular para activar a AP-1 (Nagaia y cols., 2007). Además de afectar a la proliferación celular, AP-1 actúa como modulador positivo o negativo de la apoptosis dependiendo del balance entre la expresión de genes pro- o anti-apoptóticos, la ruta de señalización empleada para activar AP-1, la duración del estímulo, del tipo celular o el estadio de diferenciación de la célula. Por último, uno de los genes cuya expresión se halla regulada por AP-1 es la ciclina D1, a cuyo promotor se une activando su expresión y estimulando la progresión del ciclo celular, asimismo, inhibe a proteínas como p21 que detienen el ciclo celular (Klauning y Kamendulis, 2004).

NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción ubicuo que se une a regiones específicas del ADN conocidas como sitios  $\kappa$ B activando la expresión de más de 200 genes involucrados en la supervivencia y diferenciación celular, la inflamación y la proliferación, en respuesta a diversos estímulos, entre ellos la presencia de radicales libres. Muchos de estos genes son críticos en las tres etapas de la carcinogénesis incluyendo la ciclina D1, proteínas supresoras de la apoptosis como Bcl2 y Bcl-XL y proteínas implicadas en la metástasis y angiogénesis como las MMPs o VEGF. En este caso, Las ERO actuarían como segundos mensajeros mediando la activación de NF- $\kappa$ B vía TNF e IL-1 (Valko y cols., 2007).

En la actualidad contamos con un nivel de evidencia científica suficiente para afirmar que las ERO generadas por la mitocondria de las células sometidas a condiciones hipóxicas, juegan un papel fundamental en el proceso de adaptación celular a la carencia de oxígeno (Kimbrow y Simons, 2006; Chandel y Simon, 2000; Kaelin, 2005). Teniendo en cuenta la elevada tasa de proliferación que caracteriza a tumores sólidos como los mamarios, la hipoxia generada por la insuficiente vascularización del tumor, es un factor constante en el microambiente tumoral. En tales condiciones, la proteína HIF-1 resulta estabilizada promoviendo la supervivencia celular, mediante la activación de la transcripción de proto-oncogenes, enzimas glicolíticas,

transportadores de glucosa, genes relacionados con la apoptosis, factores de crecimiento y factores angiogénicos implicados en procesos como la inhibición de la apoptosis, la immortalización celular, la proliferación, la angiogénesis, la metástasis y la resistencia a fármacos y por lo tanto, en la selección de los clones celulares que con mayor éxito formarán el tumor (Kimbrow y Simons, 2006; Iwao y cols., 2002). Las rutas moleculares que modulan la regulación de la transcripción de HIF-1 pertenecen a un subgrupo de vías de transducción de señales intracelulares mediado por tirosín-quinasas, que han sido tradicionalmente ligadas a los procesos oncogénicos. Entre ellas destacamos la ruta RAS-ERK, la ruta PI3K/AKT y la ruta mediada por STAT3 (Kimbrow y Simons, 2006; Lim y cols., 2004). Estas rutas moleculares son aquellas a través de las cuales las células, no sólo activan la transcripción constitutiva del factor HIF-1, sino que también son la vía por la que las células transformadas sometidas a un ambiente hipóxico potencian la expresión de HIF-1 y la de genes que dan lugar a un fenotipo potencialmente agresivo. Entre estos últimos caben destacar el gen de la survivina y el gen del factor de crecimiento endotelial (VEGF) (Peng y cols., 2006; Brown y Bicknell, 2001).

#### *Oncogenes y genes supresores de tumores*

La proteína supresora de tumores p53 desempeña un papel central en la prevención de la transformación oncogénica. Esta proteína lleva a cabo su función inhibiendo la proliferación de células cuyo ADN ha sido dañado y potenciando su reparación, o bien, si el daño es irreparable, induciendo la apoptosis. La relación de p53 y los radicales libres es compleja y dosis-dependiente pues en primer lugar, bajo condiciones fisiológicas normales, cuando la concentración de radicales libres es baja y la expresión de p53 moderada, esta proteína activa la expresión de genes que codifican proteínas antioxidantes con objeto de mantener el balance oxidativo. A medida que la concentración de radicales libres aumenta, generando estrés oxidativo y consecuentemente daño en el ADN, la expresión de p53 y su actividad aumentan promoviendo la producción de radicales libres y así la muerte celular por apoptosis. Los efectos pro-apoptóticos de p53 mediados por los radicales libres incluyen la activación de p66<sup>Shc</sup>, una proteína que interacciona con la cadena transportadora de electrones mitocondrial aumentando la generación de ERO, la inducción de la expresión de prolín-oxidasas, que generan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como producto secundario de su actividad catalítica, y el mantenimiento de la actividad citocromo oxidasa. Por el contrario, concentraciones muy elevadas de radicales libres y un estrés oxidativo severo pueden originar la inactivación de p53 a causa del daño directo que éstos provocan sobre el ADN del gen que codifica a la proteína supresora de tumores, de hecho, se han encontrado

mutaciones que inactivan el gen de p53 en más de la mitad de los tumores humanos (Valko y cols., 2007; Halliwell, 2007).

El oncogen Ras codifica proteínas G que conectan los dominios intracelulares de receptores transmembrana con los efectores intracelulares de las cascadas de señalización intracelular cuya principal función es la de regular el crecimiento celular e inhibir la apoptosis. Alrededor del 20% de todos los tumores malignos humanos presentan mutaciones en el gen Ras que contribuyen al fenotipo transformado incluyendo la capacidad invasiva, migratoria y la inducción de la angiogénesis (Shin y cols., 2005). Entre otros estímulos mutagénicos, el oncogen Ras es activado por la presencia de ERO (Valko y cols., 2006).

### *Caspasas*

Los radicales libres activan las señales nucleares y citoplasmáticas de transducción, controlando diversos puntos críticos de las rutas de apoptosis. Los múltiples efectos de las especies reactivas a este nivel sugieren que en general, pueden contribuir a todas las etapas del cáncer. El estrés oxidativo persistente da lugar a la formación de especies altamente reactivas que sufren posteriores transformaciones, generando productos secundarios capaces de unirse covalentemente a los residuos de cisteína del centro activo de las caspasas, así como al receptor celular CD95/Fas inhibiendo la apoptosis (Shacter y cols., 2000). Por otra parte, la elevación en la concentración de  $O_2^{\cdot-}$  intracelular causa un aumento del pH citosólico que regula negativamente la activación de las caspasas, sin embargo, la presencia de una elevada concentración de  $H_2O_2$  promueve la apoptosis, no solo por el daño que induce en el ADN o los cambios que provoca a nivel mitocondrial, sino también a través de la activación de las caspasas por disminución del pH citosólico. Los efectos de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  sobre el pH en la célula parecen estar mediados por la respectiva disminución o aumento de la actividad del sistema de intercambio  $Na^+/H^+$  de la membrana plasmática (Halliwell, 2007).

En cuanto a otros radicales libres, como las ERN, podemos establecer el mismo paralelismo funcional. ERNs, como el NO, promueven el daño en el ADN causando mutaciones e inhiben la actividad de enzimas caspasas obstaculizando la apoptosis y favoreciendo la supervivencia de células cuyo material genético contiene modificaciones potencialmente mutagénicas pero, por otra parte, bloquean la actividad del enzima citocromo oxidasa enlenteciendo la producción mitocondrial de ATP, deteniendo el ciclo celular e inhibiendo el crecimiento tumoral. Probablemente, esta última sea la causa de la frecuente presencia de

macrófagos en la inmediateces de muchos tumores sólidos, ya que estas células producen NO a través de la actividad del enzima iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) (Hofseth y cols., 2003; Halliwell, 2007).

### II.6.3 Progresión

La progresión es la tercera y última etapa de la carcinogénesis. Se caracteriza por una serie de cambios celulares y moleculares irreversibles, que dotan a las células del fenotipo transformado. En esta etapa las células neoplásicas desarrollan la capacidad de inducir la angiogénesis, un proceso clave en el crecimiento tumoral, cuando la lesión alcanza un volumen que impide el abastecimiento de oxígeno y nutrientes a las células que la forman.

#### II.6.3.1 Radicales libres, angiogénesis y metástasis

La angiogénesis es un proceso multifásico que comprende la degradación de la membrana basal del endotelio vascular, la migración de células endoteliales al estroma perivascular y la formación de nuevos capilares. Por otra parte, las células neoplásicas en fases avanzadas de su desarrollo adquieren la capacidad de migrar y colonizar, tanto el tejido circundante como el tejido de otros órganos de localización distante, a través de su escape al torrente sanguíneo. Por tanto, la angiogénesis y el desarrollo del potencial metastático de los tumores son dos procesos íntimamente ligados.

En organismos multicelulares, la comunicación y el intercambio intercelular es llevado a cabo a través de moléculas señalizadoras extracelulares o a través de las uniones intercelulares tipo GAP. Estas uniones consisten estructuralmente en placas formadas por uniones transmembrana compuestas de hexámeros de conexina, que contactan con los hexámeros de conexina de la célula adyacente para formar un canal que permite el intercambio de iones y compuestos hidrosolubles de bajo peso molecular (Yamasaki, 1990). Estudios llevados a cabo con líneas celulares humanas, muestran como las células neoplásicas inhiben selectivamente la formación de tales estructuras y promueven la eliminación de las uniones GAP pre-existentes. La producción de radicales libres modula la formación de estructuras de comunicación intercelular, tanto inhibiendo la expresión del gen que codifica la proteína conexina como su ensamblaje. El bloqueo de las uniones de tipo GAP es probablemente seleccionado por las células neoplásicas con la finalidad de limitar el intercambio de reguladores de la proliferación con células sanas vecinas, creando un microambiente en el que las células transformadas escapan a la

homeostasis celular y favoreciendo la expansión clonal, especialmente durante la etapa de progresión (Valko y cols., 2007; Trosko y cols., 2005).

La remodelación de la matriz extracelular es un proceso necesario para que la invasión tumoral sea posible. Durante la invasión tumoral, las células transformadas interactúan con las células estromales adyacentes originando la ruptura de la estructura estromal. Las enzimas que catalizan los cambios operados en la matriz extracelular corresponden con las MMPs, anteriormente mencionadas. Las MMPs no sólo contribuyen a la angiogénesis degradando la membrana basal y otros componentes de la matriz extracelular, sino que también liberan factores pro-angiogénicos unidos a la matriz como FGF, VEGF o TGF $\beta$ , que se unen a sus receptores en la membrana de las células endoteliales induciendo la proliferación celular, la expresión de moléculas de adhesión, la secreción de MMPs, la migración y la invasión (Valko y cols., 2007). En el caso del cáncer de mama, diversos estudios han observado una correlación positiva entre la sobreexpresión de MMP-2 y un pronóstico adverso relacionado con un alto riesgo de metástasis. Las ERO activan a MMP-2 posiblemente a través de la reacción con los grupos tiol de su centro activo. Además algunos inhibidores de proteasas son bloqueados mediante la oxidación de residuos metionina de sus centros activos mediada por ERO, lo que favorece la actividad de las MMPs (Brown y Bicknell, 2001).

Por otra parte, las ERO aumentan el potencial migratorio de las células transformadas a través de la activación de HSP27 (*heat shock protein 27*) mediada por la MAPK p38. HSP27 fosforilada induce cambios en la dinámica de la actina y promueve la migración celular. Además, las ERO median el papel de Rac-1 en la reorganización del citoesqueleto celular (Brown y Bicknell, 2001).

En conjunto, estos datos indicarían que el efecto neto de los radicales libres dependerá de la cantidad en que son producidas o están presentes, así como de la actividad de los distintos sistemas y moléculas antioxidantes, la eficiencia de los sistemas de reparación del ADN y la influencia de estas sustancias en las rutas de señalización intracelular. Por tanto, la aparente inconsistencia entre la actividad pro-carcinogénica de los radicales libres y sus efectos promotores de la apoptosis indicarían que es un fenómeno multifactorial y dosis-dependiente cuyo resultado no deriva simplemente de su capacidad de inducir directamente modificaciones químicas en el ADN, tanto en el compartimento nuclear como en el mitocondrial, sino que afectan a otros procesos celulares que contribuyen a la expresión del fenotipo transformado

(Halliwell, 2007). En general, existen suficientes datos para afirmar que las células tumorales favorecen la producción de radicales libres y que el aumento de su concentración activa tanto las defensas antioxidantes como los sistemas de reparación del ADN, aunque no en un orden de magnitud suficiente para contrarrestar dicho exceso. Sin embargo, el desplazamiento del balance oxidativo hacia el estado oxidado en las lesiones tumorales no es descontrolado, pues un exceso de radicales libres inhibiría el crecimiento celular y activaría la muerte celular por apoptosis o necrosis.

## **II.7 Metodología para el estudio de los marcadores de estrés oxidativo y defensa antioxidante**

En la actualidad, la comunidad científica mantiene un intenso debate acerca de los beneficios de la terapia antioxidante, en la prevención y tratamiento de enfermedades relacionadas con el daño oxidativo. Para evaluar correctamente la alteración del balance oxidativo, es necesario conocer cuál es el nivel de estrés oxidativo general, cuáles son las fuentes de radicales libres más probables y en función de ello, cuáles son los mecanismos de protección antioxidante activados.

El diseño de estrategias eficaces en la reducción del estrés oxidativo obliga en primer lugar, a analizar marcadores de daño oxidativo y protección antioxidante. La elección de un determinado marcador y la técnica empleada para su análisis, es aún un tema controvertido en esta área de conocimiento, debido a que tanto los radicales libres como los productos celulares derivados de su actividad oxidante, son moléculas químicamente muy inestables. Ya que los radicales libres reaccionan con todos los tipos de biomoléculas presentes en la célula, es necesario analizar marcadores de daño específicos para los componentes celulares mayoritarios, con el fin de evaluar globalmente las alteraciones causadas por esta agresión. Por tanto, el diseño experimental de un estudio de evaluación del daño oxidativo debe contemplar, al menos, el análisis de un marcador de daño oxidativo en lípidos, otro en proteínas y otro en ácidos nucleicos. El análisis de daño oxidativo en carbohidratos está relacionado con la producción de grupos carbonilo reactivos acoplada a procesos metabólicos y conectado principalmente con enfermedades como la diabetes o la aterosclerosis (Baynes y Thorpe, 1999), aunque como componente de los ácidos nucleicos, está relacionado con enfermedades de etiología genética.



### II.7.1 Análisis del daño oxidativo en lípidos

La peroxidación lipídica es un evento de esencial importancia en la alteración del balance oxidativo, que puede ser medido por una serie de métodos analíticos que incluyen el análisis cuantitativo de productos primarios y secundarios. Los productos primarios corresponden a dienos conjugados e hidroperóxidos lipídicos, mientras que los secundarios corresponden a sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), alcanos gaseosos e isoprostanos (Culter y Rodriguez, 2003).

Entre los métodos más sencillos y asequibles desde un punto de vista técnico, podemos citar los métodos colorimétricos y los inmunológicos. En cuanto a los primeros destaca uno de los primeros procedimientos analíticos aplicados al estudio de la peroxidación lipídica y que se basa en la reacción del malondialdeído con el ácido tiobarbitúrico, dando lugar a un color rosa cuya intensidad es medible a 540 nm. Esta técnica es bastante sensible pero muy inespecífica, ya que el malondialdeído no es la única sustancia capaz de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico. Los métodos inmunológicos han sido aplicados fundamentalmente al análisis de isoprostanos. Se han desarrollado anticuerpos frente a 15-F<sub>2t</sub>-isoprostanos empleados en la elaboración de kits comerciales. Uno de los principales inconvenientes del uso de estos kits comerciales es la limitada información disponible acerca de su especificidad y precisión, sobretudo en comparación con otras técnicas como la espectrometría de masas (Battistini y cols., 1998; Morrow y cols., 1999). El desarrollo de las técnicas inmunológicas para el análisis de los isoprostanos es uno de las líneas de investigación más prometedoras en el estudio de la peroxidación lipídica por su relativa sencillez y bajo coste, dado que los isoprostanos son uno de los marcadores de estrés oxidativo *in vivo* más precisos en muestras humanas y animales (Morrow y cols., 1990)

La cromatografía de gases/espetrometría de masas es una técnica altamente específica y sensible para detectar la formación de ambos tipos de productos. La mayor desventaja de este método es el requerimiento de analitos volátiles y por tanto, la derivatización de la muestra. Esto complica considerablemente el procesamiento de la muestra y puede causar pérdida de información analítica (van Kuijk y cols., 1990). Por otra parte, la más reciente aplicación metodológica al estudio de la peroxidación lipídica es el empleo de la espectrometría de masas por ionización electrospray (ESMS). El acoplamiento de la cromatografía líquida de alta presión en fase normal o reversa (HPLC) a ESMS (LC-MS) permite la separación de los lípidos previa a la ionización, aumentando la sensibilidad de la técnica (Brügger y cols., 1997; Kim y cols., 1994).

En general, no existe un consenso en cuanto a cuál es el mejor marcador ni la técnica más adecuada para analizar el grado de peroxidación lipídica en un sistema biológico. La elección del método analítico es aún más dificultosa si nos centramos en las determinaciones *in vivo*, ya que las muestras biológicas, como el plasma, son muy complejas y requieren una manipulación previa al análisis, que resulta poco recomendable teniendo en cuenta la inestabilidad química de los analitos, sobretodo en el caso de las técnicas más específicas. Las técnicas colorimétricas requieren un mínimo procesamiento de la muestra previo al análisis, pero su baja especificidad reduce la información analítica.

### II.7.2 Análisis del daño oxidativo en proteínas

En las últimas décadas se ha llevado a cabo un importante progreso en el desarrollo de métodos para el estudio del daño oxidativo en proteínas. Entre ellos el más frecuentemente empleado es el método espectrofotométrico basado en la reacción de 2,4-dinitrobenzilhidracina (DNPH) con los grupos carbonilo de las proteínas oxidadas y descrito por Levine y colaboradores (Levine y cols., 1990). La contaminación con ácidos nucleicos y los residuos de DNPH libre son los principales problemas asociados a esta metodología, por ello el empleo de HPLC y derivatización en SDS (sodio duodecil sulfato) para separar las proteínas de los ácidos nucleicos previo al análisis del contenido de grupos carbonilo, es una interesante modificación (Levine y cols., 1994).

La inmunodetección de proteínas carbonilo mediante el empleo de anticuerpos monoclonales y policlonales unidos a DNPH, ha sido otra de las estrategias analíticas aplicadas al estudio de la modificación proteica a causa del estrés oxidativo. Protocolos basados en el método Western blot e inmunoenzimoensayo (Levine y cols., 1994; Buss y Winterbourn, 2002) han dado buenos resultados, aunque el problema de la contaminación con ácidos nucleicos y reacciones no ha sido evaluado en este tipo de ensayos y además miden los grupos carbonilo de carbohidratos y lípidos unidos a proteínas.

Como métodos alternativos podríamos citar aquellos basados en la detección de modificaciones covalentes en los aminoácidos producidas por el ataque de los radicales libres sobre las proteínas. Entre ellos destaca el empleo de la cromatografía de gases/espectrometría de masas y la HPLC (Heinecke y cols., 1999; Kettle, 1999).

### II.7.3 Análisis del daño oxidativo en el ADN

El daño oxidativo en el ADN puede ser estimado mediante el empleo de una variedad de técnicas analíticas que incluyen los ensayos inmunohistoquímicos, los ensayos post-marcaje con isótopos radioactivos, el ensayo comet, elución alcalina con el uso de enzimas de reparación del ADN, HPLC con detección electroquímica, cromatografía de gases/espectrometría de masas, cromatografía líquida/espectrometría de masas y cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem. Las técnicas que omiten el uso de la espectrometría de masas, detectan tan sólo uno de los productos derivados de la interacción entre los radicales libres y el ADN, sin embargo, otros procedimientos como el ensayo comet, detectan el daño global en el ADN en base a las alteraciones estructurales inducidas por el estrés oxidativo en la doble hélice (Culter y Rodriguez, 2003).

Uno de los productos secundarios a la interacción entre radicales libres y ADN más estudiados es la 8-hidroxiguanina, debido principalmente a su potencial mutagénico. La optimización de un protocolo experimental basado en el uso de HPLC con detección electroquímica acoplado a la hidrólisis enzimática del ADN, ha propiciado el empleo de este marcador para el análisis del daño oxidativo en el material genético. Sin embargo esta no es la única base nitrogenada modificada a causa de la exposición del ADN a los radicales libres, de este modo el análisis de un solo marcador desprendería información biológica relevante para el estudio del daño oxidativo en el ADN. En contraste, el empleo de técnicas basadas en la espectrometría de masas permite el análisis de los productos oxidados derivados de las cuatro bases nitrogenadas. Además permite determinar los entrecruzamientos entre ADN y proteínas, alteraciones en el esqueleto de desoxirribosa del ADN y la cinética de unión y escisión de varias enzimas reparadoras del ADN. Sin embargo, la derivatización de la muestra es la causa de la frecuente sobre-estimación de los niveles de bases nitrogenadas modificadas al emplear esta técnica; una de las estrategias que solucionan este problema es el acoplamiento de la cromatografía líquida a la espectrometría de masas y además previene la oxidación artefactual del ADN generada por la cromatografía de gases, aunque los picos obtenidos en el cromatograma no son tan altos y estrechos, perdiendo sensibilidad (Hwang y cols., 2007)

Como técnica para el análisis del daño oxidativo global en el ADN, el ensayo comet es una alternativa sensible, relativamente sencilla y rápida. Esta técnica ha sido empleada para evaluar el daño oxidativo en el ADN inducido por la quimioterapia en pacientes con cáncer y estudios nutricionales. Por tanto es una técnica versátil, no invasiva y adecuada a estudios de

biomonitorización en humanos. Al evaluar el daño general en el ADN, la importancia del estudio del daño oxidativo en carbohidratos en relación a enfermedades de origen genético queda relegado a un segundo plano, ya que la información extraída del ensayo abarca todos los componentes del ADN (Culter y Rodriguez, 20003).

## II.7.4 Técnicas para el análisis de antioxidantes

### II.7.4.1 Capacidad de unión al hierro

La capacidad de unión al hierro es la cantidad de transferrina, ferritina y albúmina libre y que puede, por tanto, aceptar átomos de hierro. Estas proteínas son muy eficaces en la prevención de la formación de radicales libres, son sintetizadas en el hígado y mantenidas a niveles constantes en el torrente sanguíneo. El método por el que se determina su concentración en plasma fue descrito por Goodwin y colaboradores. (Goodwin y cols., 1996) y se basa en una determinación espectrofotométrica.

### II.7.4.2 Ceruloplasmina

La ceruloplasmina une el 95% del cobre presente en el suero sanguíneo y su concentración es directamente proporcional a la del cobre, en condiciones fisiológicas normales. Además tiene actividad ferroxidasa, inhibiendo la participación del hierro libre en procesos oxidativo y eliminando su exceso. Altas concentraciones de cobre libre son frecuentes en el suero de pacientes en los que es posible detectar elevadas concentraciones de peróxidos lipídicos. La técnica empleada para su determinación es un método turbidimétrico que implica la inmunoprecipitación de la ceruloplasmina (Culter y Rodriguez, 2003).

### II.7.4.3 Capacidad antioxidante total del plasma

La capacidad antioxidante total del plasma se refiere a todas aquellas sustancias antioxidantes presentes en el plasma sanguíneo capaces de catalizar la reducción de radicales libres. Su análisis es llevado a cabo mediante un método espectrofotométrico sencillo, que consiste en la reacción reducción del radical 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS<sup>•+</sup>) según Re y colaboradores (Re y cols., 1999). Este marcador es especialmente interesante en la determinación del estatus antioxidante global en humanos, para evaluar el contexto fisiológico en que se llevan a cabo otros procesos de oxidación y como procedimiento previo al estudio específico de antioxidantes concretos.

#### II.7.4.4 Antioxidantes hidrosolubles

Entre los antioxidantes hidrosolubles más importantes podemos citar el ácido ascórbico, la bilirrubina, los tioles y el ácido úrico. Todos estos antioxidantes pueden ser determinados mediante métodos espectrofotométricos sencillos, tan estandarizados que casas comerciales como Roche o Hitachi, han optimizado los protocolos de análisis para ser llevados a cabo en analizadores robóticos (Culter y Rodriguez, 2003). El ácido ascórbico puede ser igualmente medido mediante HPLC.

#### II.7.4.5 Antioxidantes liposolubles

Los antioxidantes liposolubles de mayor importancia biológica son los carotenos, criptoxantina, luteína, licopeno, retinol, tocoferoles, coenzima Q10 y zeaxantina. La metodología más frecuentemente aplicada a su estudio es la HPLC, según el protocolo descrito por Browne y Armstrong (Browne y Armstrong, 1998).

#### II.7.4.6 Enzimas antioxidantes

La actividad de las principales enzimas antioxidantes, como la catalasa, glutathion peroxidasa, superóxido dismutasa y tioredoxina, es determinada mediante métodos espectrofotométricos sencillos basados en su propia actividad catalítica (Aebi 1984; Flohé y Wolfgang, 1984; Fridovich, 1975, Holmgren, 1995).

#### II.7.4.7 Agentes soporte de los antioxidantes

Las proteínas plasmáticas totales (albúmina e inmunoglobulinas) poseen grupos tiol activos con capacidad antioxidante mediante la unión a metales pro-oxidantes libres presentes en el plasma y pueden ser estimadas mediante métodos espectrofotométricos sencillos. Por otra parte, el magnesio, el selenio, el azufre o el zinc participan como cofactores en multitud de procesos enzimáticos de actividad antioxidante. Todos ellos pueden ser determinados mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo, según el método descrito por Inagaki y Haraguchi. (Inagaki y Haraguchi., 2000).

### III. Estudio del perfil de expresión génica para la identificación de nuevos factores pronósticos y predictivos aplicados al tratamiento del cáncer de mama

Desde la publicación de los resultados del Proyecto Genoma Humano en el año 2001, hemos asistido a una auténtica revolución en el desarrollo de técnicas de análisis genómico. La expresión génica está regulada a múltiples niveles (transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional) para equilibrar el delicado balance funcional de un organismo. La transcripción gen-específica es uno de los procesos biológicos claves en el control de la expresión génica de la célula y se encuentra influenciado tanto por el tipo y grado de diferenciación celular como por estímulos externos. Aunque aún no se ha elucidado completamente el mecanismo funcional de los circuitos de regulación de la expresión génica, las alteraciones en dichos circuitos, que caracterizan enfermedades biológicamente distintas y son en última instancia la causa del desarrollo de una enfermedad oncológica, pueden ser identificadas mediante la cuantificación de los transcritos derivados de cada gen (Gruvberger-Saal y cols, 2006).

#### III.1 Técnicas de alto rendimiento para el estudio de la expresión génica

##### III.1.1 Tecnología de microarrays

Los Microarrays de ADN forman parte de una tecnología que permite evaluar la expresión de miles de genes simultáneamente en una única muestra biológica y por tanto, caracterizar el perfil de expresión en un único tumor permitiendo visualizar el circuito transcripcional de las células.

Existen varias plataformas de microarrays que difieren en su fabricación, marcaje y protocolo de análisis, sin embargo, en todos los casos la técnica se basa en la unión específica o hibridación de las cadenas de ADN con sus copias complementarias exactas unidas a un sustrato sólido (sondas). En primer lugar el ARN de la muestra de interés es aislado, purificado, retrotranscrito a ADNc (ADN complementario) y marcado. A continuación la muestra se hibrida con el microarray, que contiene fragmentos de ADN correspondientes a la secuencia codificante de genes individuales y dispuestos ordenadamente sobre la superficie sólida del microarray. Por

último, el microarray es examinado y escaneado en un microscopio de fluorescencia. El grado de fluorescencia en la posición de cada sonda puede ser cuantificado y representa la abundancia de un transcrito específico.

Actualmente son dos las plataformas de microarrays empleadas para el análisis de expresión génica de alto rendimiento: Los microarrays de ADNc y los de oligonucleótidos. La principal diferencia entre ambas radica en la longitud de las sondas dispuestas en el microarray, pues los de ADNc utilizan sondas de más de 100 nucleótidos y las de oligonucleótidos son sondas de 25-70 nucleótidos. Una y otra estrategias conllevan la adopción de protocolos experimentales ligeramente diferentes. En el caso de los microarrays de ADNc, el ARN extraído de la muestra y el ARN procedente de una muestra de referencia, son retrotranscritos en presencia de nucleótidos marcados con dos fluoróforos de distinto color y posteriormente cohibridados con el microarray. En este sistema bicolor la abundancia de cada transcrito es expresada en relación a la expresión de los genes de la muestra de referencia. En cambio, en el caso de los microarrays de oligonucleótidos, el ARN de la muestra es inicialmente retrotranscrito a ADNc y de nuevo transcrito *in vitro* con nucleótidos marcados con biotina a ARNc (ARN complementario). El ARNc marcado es hibridado con el microarray y posteriormente teñido con una solución que contiene estreptavidina conjugada con un fluoróforo. El resultado es una imagen monocolor en la que la intensidad de fluorescencia de cada punto representa la abundancia específica de cada transcrito en términos absolutos.

Ambos métodos generan resultados razonablemente concordantes, sin embargo, en los últimos años se ha generalizado el uso de los microarrays de oligonucleótidos debido a que estas plataformas ofrecen una mayor sensibilidad que las de ADNc, ya que su diseño minimiza las hibridaciones cruzadas entre genes homólogos y permite el análisis de variantes producidas por *splicing* (López y cols., 2002).

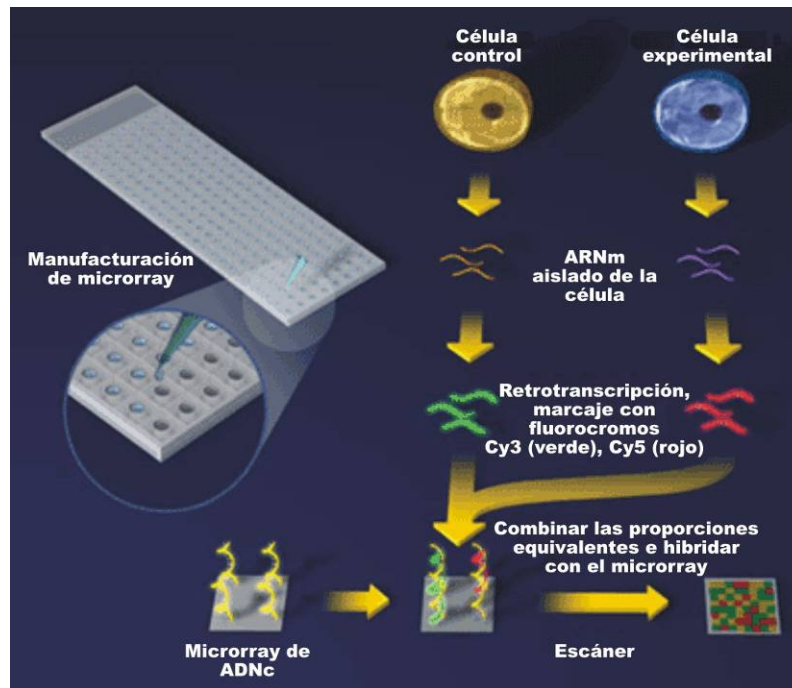


Figura 13. *Esquema del análisis con microarrays de ADNc.* El ARN de la muestra experimental y la muestra de referencia es extraído y marcado con dos fluoróforos distintos. Tras la hibridación con el microarray, se escanea y estudia el patrón de colores resultante.

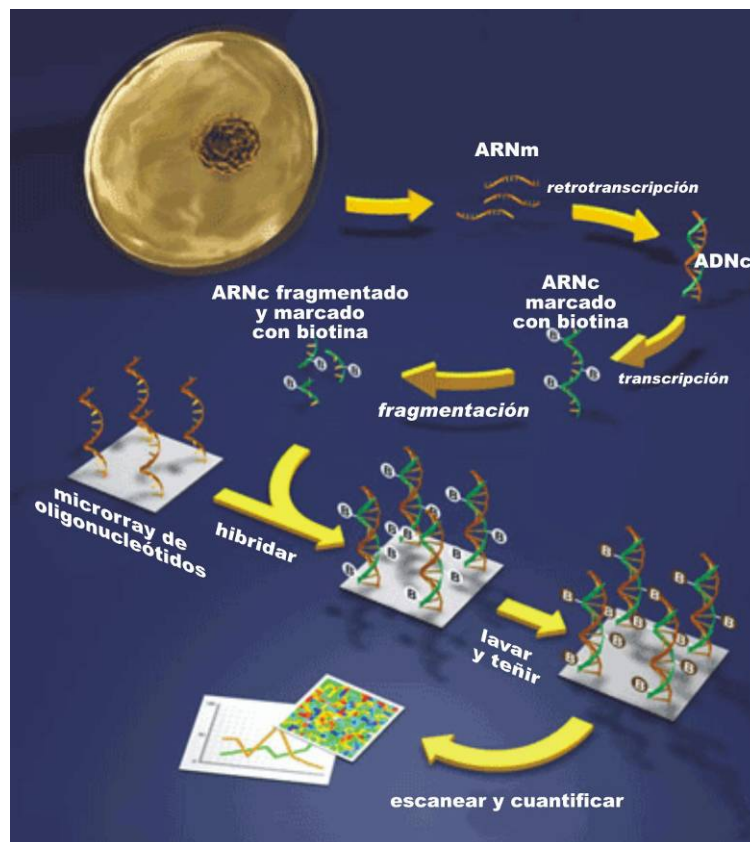


Figura 14. *Etapas del análisis con microarrays de oligonucleótidos.* Se aísla y purifica el ARN de la muestra. Se marca la muestra con biotina y se hibrida con el microarray. Después de las etapas de hibridación, lavado y tinción se escanea el microarray y se analizan los datos.



### III.1.2 PCR a tiempo real

Otra técnica utilizada en el análisis de la expresión génica de muestras biológicas es la RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real). Esta técnica ha experimentado un notable desarrollo en los últimos años permitiendo analizar varios cientos de genes simultáneamente, por lo que ha sido incluida dentro del grupo de técnicas de análisis de alto rendimiento con la denominación de RT-PCR múltiple. Además, para muchos investigadores la RT-PCR múltiple es la técnica cuantitativa de elección para confirmar o validar los resultados obtenidos del análisis de expresión génica mediante microarrays.

La RT-PCR es una adaptación de la técnica de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) originalmente desarrollada por Mullis K y colaboradores a mediados de los años 80. Mediante la PCR cualquier secuencia nucleotídica presente en la muestra a analizar es amplificada en un proceso cíclico para generar un gran número de copias idénticas. Este proceso consta esencialmente de tres etapas: la etapa exponencial, durante la cual el producto se duplica en cada ciclo, la etapa lineal, fase de gran variabilidad en la que los reactivos se consumen progresivamente y el producto no es duplicado en cada ciclo, y la fase de meseta, en la que la reacción finaliza y el producto no es amplificado.

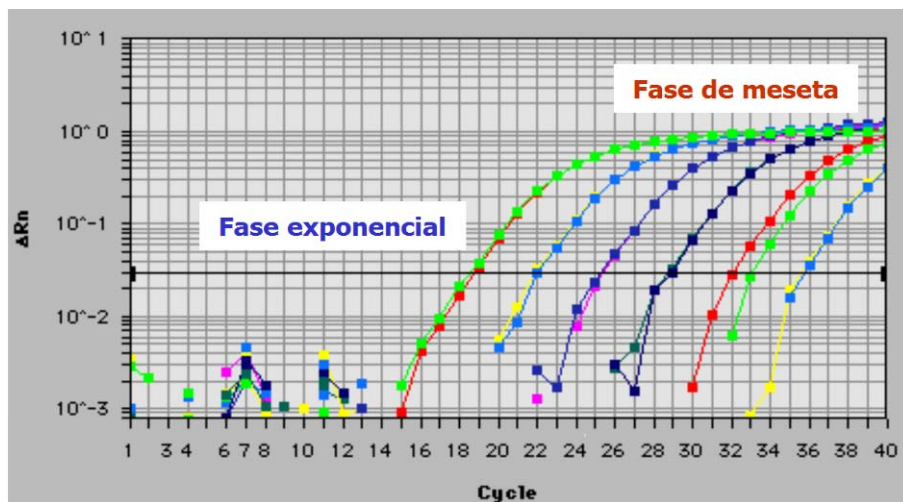


Figura 15. Fases exponencial y de meseta durante el transcurso de una reacción de PCR con diluciones seriadas de una misma muestra.

La PCR como técnica analítica es muy sensible aunque no es cuantitativa, ya que tras varios ciclos de amplificación, se obtiene la misma cantidad de producto independientemente de la concentración inicial en la muestra de las secuencias de ADN de interés. En la Figura 15 se representa la PCR de varias diluciones seriadas de una misma muestra. Inicialmente cada

dilución contiene una concentración diferente de ADN, sin embargo, al final de la reacción se obtiene la misma cantidad de producto de todas ellas.

Esta limitación fue superada en el año 1992 con el desarrollo de la RT-PCR o qPCR (PCR cuantitativa) por Huichi R y colaboradores. La RT-PCR permite monitorizar la cantidad de producto formado durante el transcurso de la reacción y recoger la información a medida que la reacción ocurre y no al final de la misma. Según la gráfica de la figura 15 el momento idóneo para recoger los datos sería durante la fase exponencial, en la que las diferencias de concentración de ADN entre las muestras se traducen en una velocidad de amplificación distinta para cada una. En efecto, en la RT-PCR, las reacciones son caracterizadas por el momento en que el producto en amplificación comienza a ser detectado y mientras mayor sea el número de copias iniciales de una secuencia de ADN concreta, antes será detectado en una RT-PCR (Kubista y cols., 2006).

Para medir la cantidad de ADN amplificado en cada ciclo se emplean métodos de detección por fluorescencia. Amplificación y detección son dos procesos simultáneos, de tal forma que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de producto formado. Los sistemas de detección empleados son de dos tipos: agentes intercalantes, como el SYBR Green, o sondas específicas marcadas con fluorocromos, como las sondas TaqMan. Las sondas TaqMan son oligonucleótidos doblemente marcados: 5'-FAM como fluorocromo *reporter* o donador que emite fluorescencia al ser excitado y 3'-BHQ como fluorocromo *quencher* o aceptor que absorbe la fluorescencia liberada por el donador, mientras ambos fluorocromos se encuentren espacialmente próximos. Durante la reacción la sonda se alinea e hibrida con su secuencia diana en el ADN permaneciendo intacta hasta que la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa), que se desplaza a lo largo de la cadena complementaria en sentido 3'-5' durante la amplificación, choca con ella y su actividad 5'-3' exonucleasa hidroliza el extremo 5' de la sonda liberando al fluorocromo emisor que, espacialmente lejos del fluorocromo aceptor, emite una señal fluorescente captada por el lector (Wilhelm y Pingoud 2003).

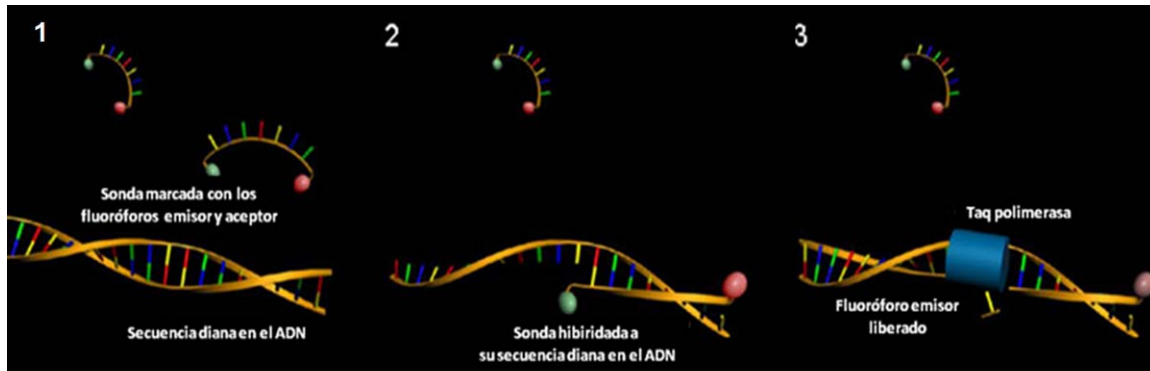


Figura 16. Esquema de una reacción TaqMan

### III.1.3 Análisis de datos

Los avances logrados en las técnicas de secuenciación a finales del pasado siglo permitieron llevar a cabo estudios de secuenciación dirigidos a la elucidación de la secuencia completa del ADN de diferentes organismos. Este desarrollo tecnológico ha modificado drásticamente el planteamiento de las hipótesis científicas en el campo de la Biología Molecular, pues de conocer una función biológica concreta, buscar el gen responsable y estudiar la proteína que codifica, hemos pasado a disponer de una gran cantidad de información referente a la expresión de miles de genes y preguntarnos cuál es su función y cómo interactúan las proteínas que codifican. Este enfoque global se ve reflejado en el desarrollo de lo que se ha denominado como la era -ómica. El sufijo -oma tiene un origen latino que significa conjunto de. La adición de este sufijo a diferentes áreas de la biología define con mayor exactitud las nuevas aproximaciones globales en las que se está enfocando recientemente el estudio de los organismos vivos.

El estudio de la Genómica y la Proteómica conlleva la generación de una ingente cantidad de información, que precisa ser analizada y modelada para poder extraer conclusiones clínicamente relevantes. Como respuesta a esta necesidad ha surgido una nueva disciplina científica conocida como Bioinformática o Biología Molecular Computacional, que utiliza tecnología de la información para organizar, analizar y distribuir información de biomoléculas con la finalidad de responder a preguntas complejas. La Bioinformática contempla tanto la creación y mantenimiento de bases de datos donde se almacena la información biológica, como los procesos de análisis e interpretación de dichos datos. Este último proceso es conocido como biocomputación y abarca el desarrollo y aplicación de herramientas matemáticas (algoritmos) y estadísticas capaces de relacionar partes de un conjunto de datos (Martínez, 2006).

Hasta hoy, una multitud de sofisticados métodos bioinformáticos han sido desarrollados con el objetivo de llevar a cabo un análisis comprensivo de los datos generados por los estudios de expresión génica con microarrays. Básicamente se distinguen dos tipos de aproximaciones conocidas como métodos de análisis supervisado y no supervisado. Los métodos de análisis supervisados requieren un conocimiento biológico o clínico previo para discriminar genes distribuidos con distinta probabilidad estadística entre grupos de muestras diferentes. Los métodos de análisis no supervisados son empleados para investigar las diferentes estructuras incluidas en un grupo de datos, generalmente utilizando algoritmos de reconocimiento de patrones para definir grupos de muestras con similares perfiles moleculares. En el caso concreto de la aplicación de estos métodos de análisis de datos a la investigación oncológica, los métodos no supervisados son eficaces al clasificar tumores molecularmente similares cuando se dispone de información referente a un gran número de genes, pero menos efectivos en la identificación de pequeños grupos de genes con expresión diferencial que se correlacionan con importantes parámetros clínicos y por tanto no son adecuados para la identificación de nuevos factores pronóstico. La identificación de estas diferencias sutiles, que probablemente ayuden a refinar la clasificación de los tumores o permitan predecir la respuesta de los pacientes a un determinado fármaco o su evolución clínica, precisa la aplicación de los métodos de análisis supervisados (Gruvberger-Saal y cols, 2006). Además, actualmente se encuentran tanto comercial como académicamente disponibles, diversas herramientas bioinformáticas y bases de datos que facilitan el análisis funcional y la interpretación biológica de los datos obtenidos en un estudio de expresión génica global en muestras tumorales. Entre ellos destacan:

Bases de datos de secuencias nucleotídicas:

- GenBank del “National Center for Biotechnology information (NCBI)”:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
- Nucleotide Sequence Database en el “European Bioinformatics Institute (EBI)” del “European Molecular Biology Laboratory (EMBL)”: <http://www.ebi.ac.uk/embl/>
- DNA Database of Japan (DDBJ) del National Institute of Genetics:  
<http://www.ddbj.nig.ac.jp>

Estas tres bases de datos forman el “International Nucleotide Sequence Database” (<http://www.insdc.org/>).

Bases de datos de secuencias y estructuras protéicas:

- Protein Database del NCBI (Entrez Proteins): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
- SWISS-PROT y TrEMBL (Translated EMBL): <http://www.expasy.org/sprot>
- PIR (Protein Information Resource): <http://pir.georgetown.edu>
- Protein data Bank (PDB): <http://www.rcsb.org/pdb>

Bases de datos y “software” para el análisis funcional:

- GeneOntology: <http://www.geneontology.org/>, que incluye un enlace desde el que es posible acceder a la mayoría de herramientas bioinformáticas disponibles para el análisis génico funcional (DAVID, GoMiner, GFINDER, THEA, FIVA, ...): <http://www.geneontology.org/GO.tools.microarray.shtml>
- Biocarta: <http://www.biocarta.com>
- KEGG: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
- PharmGKB: <http://www.pharmgkb.org/>
- GenMAPP: <http://www.genmapp.org/>
- Ingenuity Systems: <http://analysis.ingenuity.com>
- MetaCore: <http://www.genego.com/metacore.php>
- Paquete de herramientas Babelomics: <http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>

Bases de datos públicas de expresión génica:

- Gene Expresión Omnibus (GEO): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>
- Array Express: <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>
- CiBEX: <http://cibex.nig.ac.jp/>

## III.2 Aplicación de la tecnología de microarrays de ADN al estudio del cáncer de mama

En los últimos diez años, la tecnología de microarrays de ADN ha sido aplicada al análisis de la variabilidad genética entre tumores mamarios con el objetivo de definir una combinación de genes (firma genética) capaz de clasificar molecularmente los tumores y predecir de un modo más preciso el curso clínico de las pacientes y su respuesta al tratamiento antineoplásico (Gong y cols., 2007).

### III.2.1 Clasificación molecular del cáncer de mama

Algunos de los primeros estudios en emplear los microarrays de ADN mostraron que los tumores mamarios pueden ser clasificados en subgrupos en base únicamente a su perfil de expresión génica.

En el año 2000 Perou CM y colaboradores, un grupo multicéntrico en el que participaron investigadores de la Universidad de Stanford e instituciones Noruegas, publicaron un trabajo (Perou y cols., 2000) en el que analizaron la variación de los patrones de expresión génica entre muestras de tejido mamario, normales y transformados, procedentes de 42 pacientes. Los “retratos moleculares” obtenidos tras el análisis jerarquizado por grupos, que organiza las muestras de tumores según la similitud global de sus patrones de expresión génica, segregaron a las muestras en 4 subgrupos principales:

- 1) Grupo Her2, caracterizado por la sobreexpresión del gen Her2 así como de otros genes localizados en el amplicón Her2
- 2) Grupo *normal-like*, compuesto de tumores que expresaron genes característicos de células normales del epitelio.
- 3) Grupo *basal-cell-like*, en el que se agruparon tumores con una expresión relativamente elevada de genes característicos de células basales del epitelio mamario, particularmente de las citoqueratinas 5 y 17.
- 4) Grupo *luminal-cell-like*. En este grupo fueron clasificados tumores que mostraron una expresión génica característica de las células luminales del epitelio mamario, incluyendo el receptor de estrógenos y algunos genes cuya expresión está regulada por los estrógenos.

Los autores seleccionaron aquellos genes que presentaron mayor variabilidad en cuanto a su expresión entre los distintos grupos de tumores obteniendo una firma genética compuesta de 427 genes conocida como Firma Intrínseca. La conclusión más importante de este novedoso estudio fue que, por primera vez, se publicaron datos que mostraban que la frecuente clasificación clínica RE<sup>+</sup>/RE<sup>-</sup>, en realidad incluye varios subtipos de enfermedades con características moleculares diferenciales, que deben ser tratadas de un modo distinto.

Un año más tarde, Sorlie T y colaboradores, miembros del mismo grupo de investigación, perfeccionaron esta clasificación al analizar un mayor número de muestras utilizando una

plataforma similar de microarrays (Sorlie y cols., 2001). En este segundo estudio, los investigadores reconocieron dentro de los tumores luminales/ER<sup>+</sup>, al menos, dos subgrupos diferentes en base a su distinto perfil de expresión génica: el subgrupo luminal A y un segundo subgrupo que podría dividirse a su vez en dos unidades menores, los subgrupos luminales B y C, con una expresión más moderada de los genes luminales específicos. Con el objetivo de investigar si los subtipos moleculares constituían a su vez entidades clínicas diferentes, los autores correlacionaron cada subtipo con la supervivencia libre de enfermedad y con la supervivencia general en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado y tratadas uniformemente, obteniendo marcadas diferencias entre grupos. Concretamente, los subtipos Basal-cell-like y Her2 se correlacionaron con el peor pronóstico y el subtipo luminal A obtuvo los valores de supervivencia más favorables. Una de las características más atractivas de este análisis fue que los tumores RE<sup>+</sup> pudieron ser subdivididos en al menos dos subgrupos con distinto pronóstico, luminal A frente a luminal B+C, corroborando las frecuentes diferencias en el curso clínico de pacientes con tumores RE<sup>+</sup>. Por tanto, la firma génica intrínseca no sólo aporta nuevos datos aplicables a la taxonomía del cáncer de mama, sino que también posee un valor pronóstico.

En un estudio posterior Sorlie T y colaboradores analizaron el grado de correlación entre los perfiles de expresión génica, las características clinicopatológicas y el pronóstico clínico en el cáncer de mama, en 99 muestras tumorales procedentes de una cohorte independiente de pacientes (Sorlie y cols., 2003). Los resultados fueron significativos por su coincidencia con los obtenidos en los estudios anteriores, a pesar de las diferencias existentes en las poblaciones de las pacientes, en los tratamientos utilizados y en las plataformas tecnológicas empleadas. Se observó que la expresión tumoral de RE era el discriminador más importante de los subtipos de expresión, confirmando que la biología celular asociada al RE ocupa un papel central durante la carcinogénesis, definiendo la configuración del tumor. La asociación entre los perfiles de expresión génica y el grado tumoral fue moderada. En cambio, no fue posible encontrar correlación alguna entre el estado menopáusico, el tamaño tumoral o la afectación ganglionar axilar de las pacientes y los perfiles de expresión génica de sus tumores. De nuevo, la correlación entre el pronóstico de cada paciente y la clasificación molecular de sus tumores según el perfil de expresión génica de cada uno, reveló que el grupo *luminal-cell-like* presentaba tasas de supervivencia libres de recaída mayores que los grupos *basal-cell-like* y Her2 y que dichas tasas eran también diferentes incluso entre los tres subgrupos luminaloides, mostrando

como la clasificación de los tumores y el pronóstico y el tratamiento de la enfermedad oncológica en base a marcadores tan importantes como la expresión del RE es útil pero insuficiente.

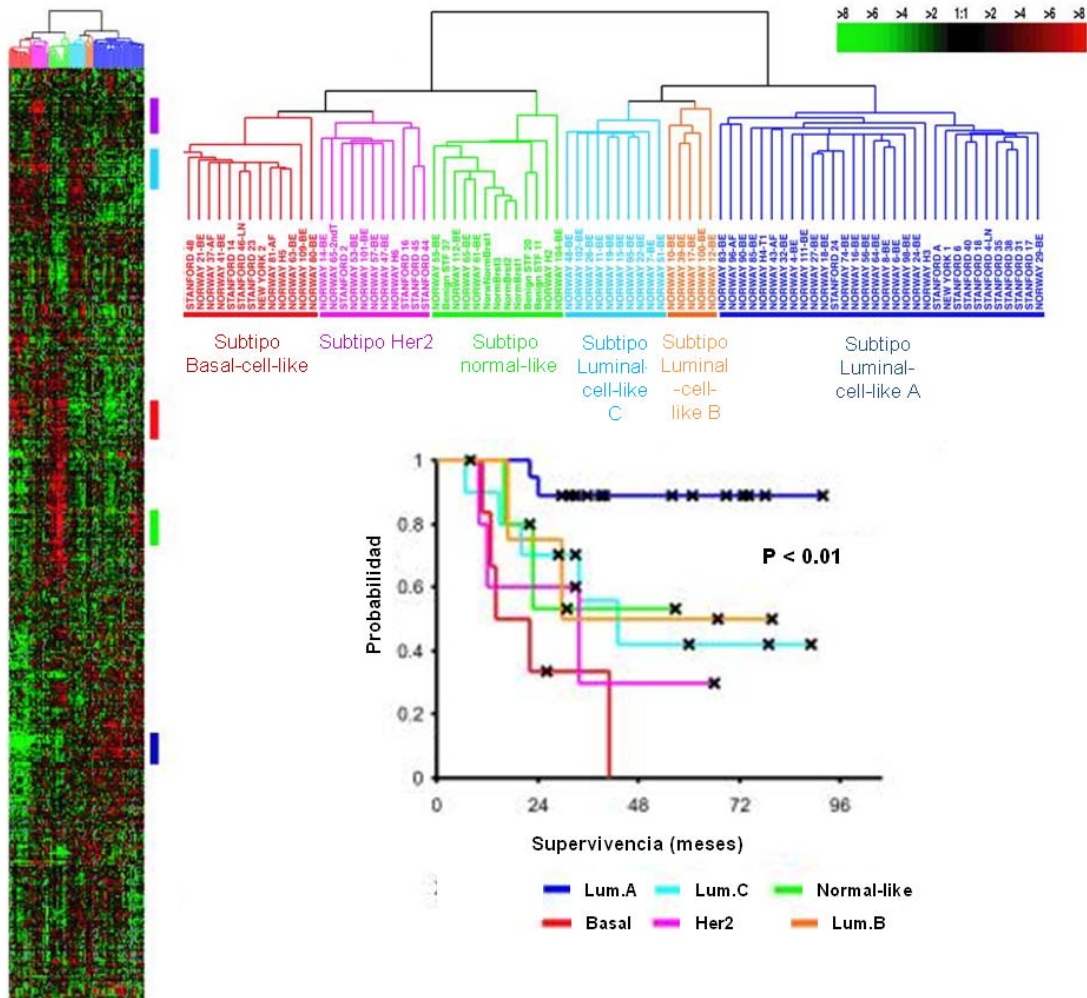


Figura 17. Perfiles de expresión génica de 78 carcinomas mamarios, 3 tumores benignos y 4 muestras de tejido mamario normal. Las muestras se agrupan según su expresión génica en los 5 grupos anteriormente descritos. La gráfica inferior representa la probabilidad de sobrevivir a la enfermedad con respecto al tiempo para cada subtipo molecular.

### III.2.2 Predicción del potencial metastásico del cáncer de mama primario

Las metástasis son la primera causa de muerte por cáncer de mama. Clínicamente aparecen como masas sólidas que forman tumores en órganos distantes y son la consecuencia de la diseminación vía sanguínea de células transformadas procedentes del tumor de mama primario. El modelo tradicional por el que este proceso ocurre, sugiere que la capacidad metastásica es adquirida en etapas tardías de la carcinogénesis mediante un proceso selectivo. Por lo tanto las metástasis son el producto de la selección, supervivencia en el torrente sanguíneo y migración de un subclón de células que sería molecularmente distinto del resto de



células del tumor primario (Fidler, 1990). Sin embargo, algunos estudios más recientes muestran que la activación de un único gen podría ser suficiente para desencadenar el proceso metastásico y que en general, la progresión del cáncer de mama no está acompañada de grandes cambios a nivel de la expresión génica (Eccles y Welch, 2007).

Desde esta perspectiva van't Veer LJ y colaboradores diseñaron un estudio de análisis de los perfiles de expresión génica en tumores de mama primarios, con el objetivo de encontrar una firma genética capaz de predecir el riesgo de desarrollar metástasis a corto plazo (van't Veer y cols, 2002). Para ello seleccionaron un grupo de 78 pacientes jóvenes, menores de 55 años, con tumores mamarios esporádicos en estadios T1/T2, N0 y M0 en el momento del diagnóstico y que no hubieran recibido tratamiento sistémico alguno. De ellas, 34 habían desarrollado metástasis distantes en 5 años y 44 permanecieron libres de enfermedad durante ese periodo. Tras el análisis de las muestras con microarrays de oligonucleótidos y la aplicación de un método de clasificación supervisado que correlacionó la expresión génica de las muestras con el curso clínico que había seguido cada paciente, los investigadores encontraron una firma genética, hoy conocida como Firma de Ámsterdam, compuesta por 70 genes informativos capaz de clasificar correctamente en grupos con alto o bajo riesgo de desarrollar metástasis en 5 años, al 83% de las pacientes incluidas en el estudio.

Por otra parte, el análisis funcional de los 70 genes seleccionados corroboró las bases moleculares del mecanismo biológico conducente al desarrollo de metástasis a corto plazo, pues los genes significativamente sobre-expresados en aquellas pacientes con mal pronóstico están implicados en el ciclo celular, la invasión, la angiogénesis y los mecanismos de transducción de señales intracelulares. Además, el valor pronóstico de la firma fue superior al obtenido de otros factores clinico-patológicos clásicos como el grado o el tamaño tumoral, el grado de angioinvasión o el estatus RE y aún más, su evaluación en un modelo multivariante que incluyó todos los factores clásicos mencionados, indicó que la firma genética es un factor pronóstico independiente.

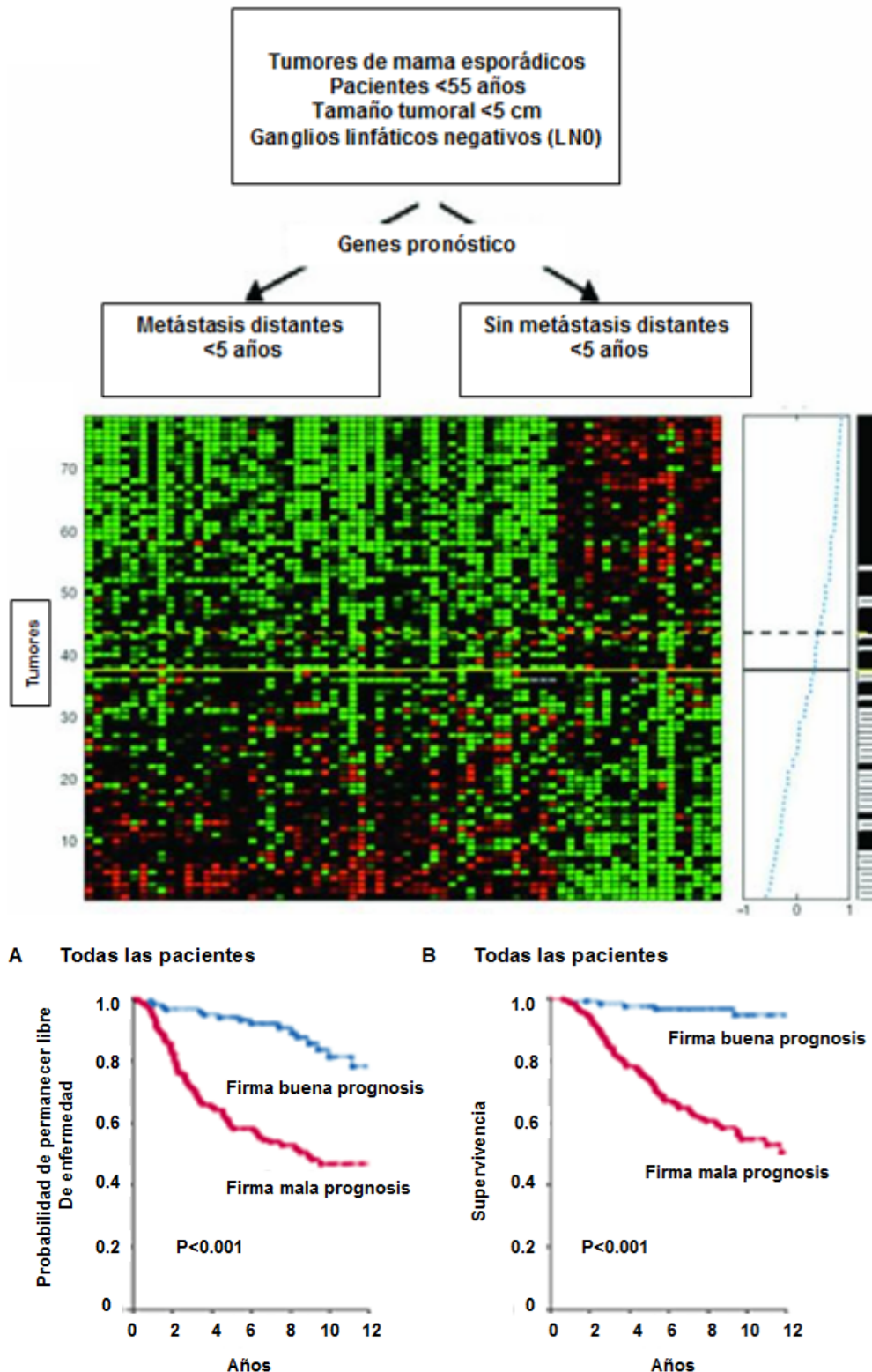


Figura 18. Clasificación de los tumores de mal y buen pronóstico tras el análisis supervisado. Los tumores se hallan ordenados según su correlación con el perfil de buena prognosis. Las muestras correspondientes a las pacientes con peor prognosis se encuentran en la parte superior de la matriz y las de mejor prognosis en la zona inferior. El estado metastático de cada paciente se muestra a la derecha de la figura. La gráfica inferior muestra la probabilidad de permanecer libre de enfermedad a los largo del tiempo para las pacientes con una firma de buen pronóstico (azul) y de mal pronóstico (rojo).

Para establecer el grado de validez clínica de sus resultados, van't Veer LJ y colaboradores calcularon la probabilidad de supervivencia libre de metástasis en 295 pacientes de acuerdo con la firma de Ámsterdam y compararon estos cálculos con estimaciones basadas en los criterios pronóstico estándar, que por consenso se aplican actualmente en la actividad asistencial (van de Vijver, 2002). En este estudio fueron también reclutadas aquellas pacientes que presentaban afectación de los ganglios linfáticos axilares en el momento del diagnóstico y pacientes que habían recibido terapia sistémica adyuvante. Los resultados confirmaron el poder pronóstico de la Firma de Ámsterdam, pues fue capaz de discriminar a las pacientes con excelentes tasas de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años de las que presentaron una elevada tasa de mortalidad. Es importante destacar que este estudio validó la habilidad pronóstica de la firma en una población heterogénea en cuanto al grado de afectación ganglionar y el tratamiento adyuvante prescrito, lo que confirmaría su independencia pronóstica. Además predijo de un modo más eficaz el riesgo de metástasis a corto plazo que los criterios consenso de St. Galen (Goldhirsch, 2005) y del NIH (*Nacional Institute of Health*) (Barrett, 2006), basados en características clínicas y patológicas de las pacientes.

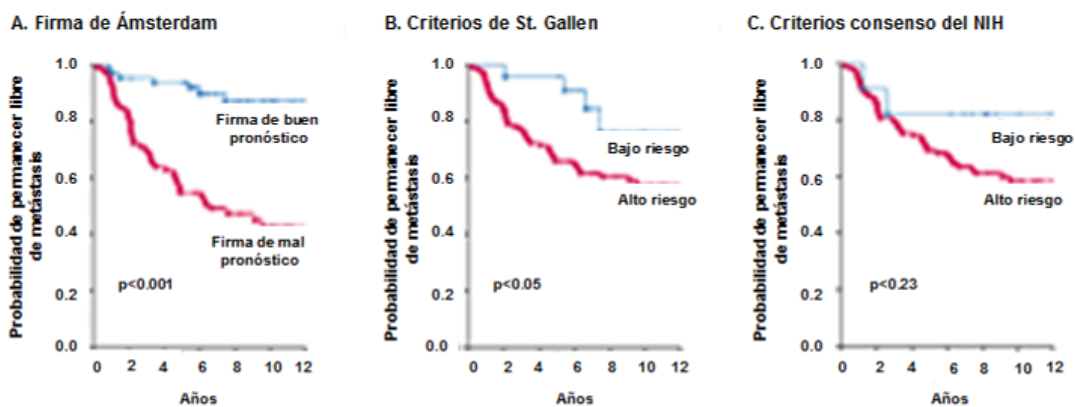


Figura 19. *Análisis Kaplan-Meier de la probabilidad de 151 pacientes de permanecer libres de metástasis con respecto al tiempo según las estimaciones de la firma de Ámsterdam (A), los criterios de St. Gallen (B) y los criterios del NIH (C).*

Es posible extraer dos importantes conclusiones de este estudio:

1. En primer lugar, el hecho de que el análisis del perfil de expresión génica en tumores de mama primarios permita predecir el riesgo de desarrollar una metástasis distante, indica que las alteraciones genéticas que dan lugar a un fenotipo metastásico son adquiridas por las células en estadios precoces de la carcinogénesis, siendo esta habilidad una característica propia del tumor. En un estudio posterior van't Veer LJ y colaboradores confirmarían esta hipótesis

llevando a cabo el análisis de los perfiles de expresión génica de tumores de mama primarios y sus metástasis asociadas. Los investigadores no encontraron grandes diferencias entre la expresión génica global de cada tumor y sus metástasis (Weigelt y cols., 2003, Weigelt y cols., 2005). Por otra parte, el hecho de que la firma genética predijera el riesgo de desarrollar una metástasis independientemente del grado de afectación ganglionar, indica que los procesos biológicos conducentes a la diseminación tumoral regional son distintos de aquellos que originan las metástasis distantes.

2. Las pacientes con peor pronóstico son las candidatas a recibir quimioterapia adyuvante, pues este tratamiento reduce el riesgo de metástasis en un tercio aproximadamente. Según los criterios consenso de St. Gallen y del NIH, hasta un 90% de las mujeres jóvenes con cáncer de mama y sin afectación de los ganglios linfáticos axilares son candidatas al tratamiento con quimioterapia adyuvante. Al aplicar estos criterios consenso al grupo de pacientes del estudio y comparar sus estimaciones con el pronóstico derivado de la Firma de Ámsterdam, los investigadores concluyeron que podrían reducir de manera eficaz y segura la proporción de mujeres que no se beneficiarían del tratamiento con quimioterapia en un 30% aproximadamente. De esta forma la aplicación de una firma genética pronóstico a la práctica clínica mejoraría la clasificación de las pacientes en grupos de riesgo y reduciría la proporción de pacientes sobretratadas.

En el año 2004 Piccart y colaboradores, en nombre del consorcio TRANSBIG (*Translating molecular knowledge into early breast cancer management: building on the Breast International Group network for improved treatment tailoring*), publicaron un trabajo de validación externa y multicéntrica de la Firma de Ámsterdam. En este caso se analizó tejido tumoral mamario de 301 pacientes de las que se disponía información clínica hasta 10 años después del diagnóstico. De nuevo la firma de los 70 genes demostró ser altamente pronóstica superando a los paneles de criterios clásicos, sin embargo, la magnitud del efecto fue menor que en los trabajos originales del grupo holandés. La EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*) ha diseñado un amplio ensayo clínico prospectivo para validar la utilidad clínica de la Firma de Ámsterdam conocido como MINDACT (*Microarray in Node Negative Disease may Avoid Chemotherapy*) (Buyse y cols., 2006).

Paralelamente, Chang H y colaboradores obtuvieron una firma génica conocida como *Wound Response* a partir de cultivos celulares tumorales (Chang y cols., 2004). Funcionalmente los genes corresponden al programa de activación de fibroblastos en respuesta a procesos de reparación y cicatrización tisular, asociados a la proliferación y migración celular, reclutamiento de células inflamatorias y angiogénesis. Para investigar la utilidad pronóstica de esta firma en pacientes con cáncer de mama, los autores analizaron el nivel de expresión de los genes seleccionados en un grupo de datos independiente, como el obtenido por van't Veer LJ y colaboradores. Sorprendentemente las dos firmas clasificaron a las mismas pacientes en grupos pronóstico equivalentes a pesar del escaso solapamiento entre ambas. Más allá de su equivalencia pronóstica, la combinación de ambas firmas subclasificó a las pacientes con mal pronóstico en grupos con distinta probabilidad de sobrevivir libres de enfermedad. En la Figura 20 se muestra la probabilidad de no desarrollar una metástasis distante en 5 años de las pacientes con cáncer de mama que expresan una firma, otra o ambas y el esquema del algoritmo propuesto por los investigadores para combinar el análisis del riesgo de cada paciente refinando la predicción de su pronóstico.

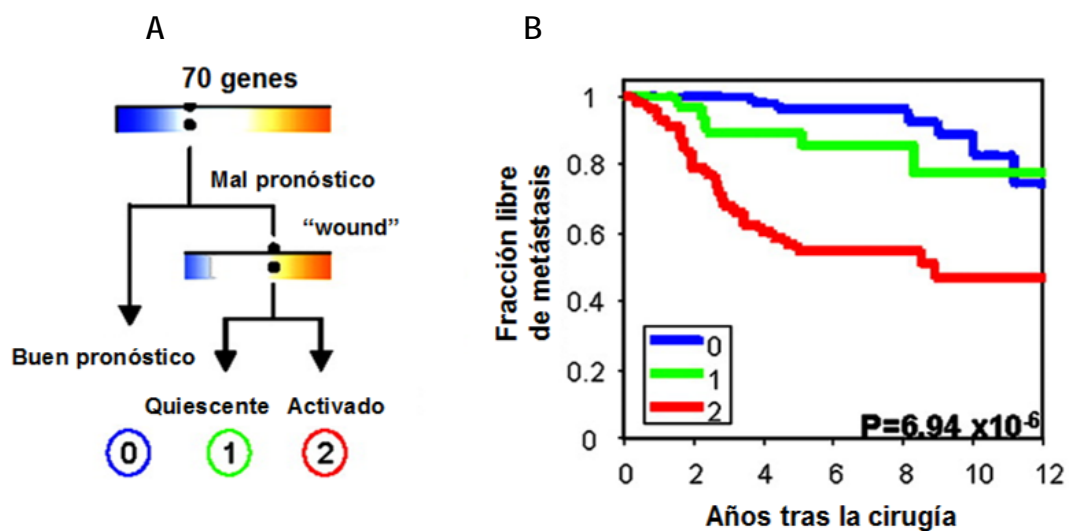


Figura 20. Integración de las firmas genéticas de *Ámsterdam* y *Wound Response*. (A) Resumen del algoritmo de decisiones propuesto por Chang y cols. (B) Probabilidad de no desarrollar una metástasis en los 10 años siguientes al tratamiento quirúrgico de las pacientes estratificadas según el algoritmo combinado. Dicha probabilidad es del 89% para las pacientes del grupo 0, del 78% para las del grupo 1 y del 47% para las del grupo 2.

Este estudio sugiere que la integración de ambas firmas génicas mejora la estratificación de las pacientes en función del riesgo de recurrencia de la enfermedad, sobretudo en aquellos casos en que el pronóstico derivado de la aplicación de varias firmas diverge, y refleja que el

mismo mecanismo molecular subyacente es la causa común de la activación de programas transcripcionales distintos (Chang y cols., 2005).

Desde el año 2002 un creciente número de trabajos relacionados con la predicción del curso clínico de pacientes con cáncer de mama y el empleo de los microarrays han sido publicados. En el año 2005, Wang Y y colaboradores obtuvieron una firma genómica de 76 genes tras el análisis con microarrays de oligonucleótidos de 286 pacientes sin afectación de los ganglios axilares y que no había recibido tratamiento adyuvante sistémico alguno (Wang y cols., 2005). La firma genómica identificó, con un 48% de especificidad y un 93% de sensibilidad, el riesgo de metástasis de las pacientes en cinco años tras el diagnóstico. Usando la firma genómica solamente el 52% de las pacientes clasificadas en el grupo de bajo riesgo serían candidatas para un tratamiento sistémico con quimioterapia en comparación con el 90% resultante de la aplicación de las recomendaciones de St. Gallen o el NIH. Al igual que la firma genética de Ámsterdam, la firma pronóstica desarrollada por Wang Y y colaboradores ha sido validada por el consorcio TRANSBIG, que a mediados del año 2007 publicaba un trabajo independiente y de carácter multicéntrico que confirmó su utilidad pronóstica y se suma a la creciente evidencia de que las firmas genéticas son clínicamente relevantes (Desmedt y cols., 2007).

Otro reciente trabajo, publicado por Pawitan Y y colaboradores, analizó la expresión génica global de muestras de tejido tumoral mamario procedentes de dos cohortes de pacientes que habían recibido tratamiento hormonal y quimioterápico adyuvante y pacientes que no lo habían recibido (Pawitan y cols., 2005). El objetivo de los autores fue obtener una firma génica que discriminara aquellas pacientes que se beneficiaron de un tratamiento adyuvante de las que no, en función del resultado clínico de su enfermedad a los 5 años del diagnóstico, identificando genes asociados con la prognosis que evaluaran el impacto de las terapias adyuvantes. La firma genética hallada permitió clasificar a las pacientes en un grupo con un buen pronóstico que no experimentaron un claro beneficio del tratamiento adyuvante y en otro, a aquellas con tumores fenotípicamente agresivos que no respondieron al tratamiento, o bien, desarrollaron una resistencia a la terapia y progresaron.

Este último estudio representa la transición hacia otra de las aplicaciones de la tecnología de microarrays en la investigación aplicada al tratamiento del cáncer de mama: la identificación de firmas génicas capaces de predecir la respuesta de las pacientes al tratamiento.

### III.2.3 Predicción de la respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer de mama

Desde el punto de vista experimental, la quimioterapia neoadyuvante es un excelente modelo para el estudio e identificación de predictores moleculares de respuesta al tratamiento y sus mecanismos moleculares, ya que permite la monitorización in vivo de la respuesta del tumor a los fármacos antes de la cirugía. En general la quimioterapia neoadyuvante no ofrece ventajas en cuanto a la supervivencia de las pacientes comparada con el efecto que a este nivel ejerce la quimioterapia adyuvante pero es segura y tan eficaz como ésta última y permite identificar a aquellas pacientes con tumores muy sensibles a los fármacos que reaccionan remitiendo completamente, es decir, que presentan una RPc (Bear y cols., 2006). Ya que la RPc se asocia con una excelente prognosis y la supervivencia libre de enfermedad a largo plazo, definir la población sensible al tratamiento que registra una RPc es el objetivo común a diversos experimentos con microarrays publicados recientemente.

Entre estos trabajos destacan los publicados por Chang JC y colaboradores (Chang y cols., 2003). El docetaxel es una de las drogas antineoplásicas disponibles más eficaces, sin embargo, aproximadamente la mitad de las pacientes a las que se administra no responden al tratamiento y sufren efectos adversos graves. El grupo de investigación de Chang JC diseñó un estudio en que el perfil de expresión génica fue analizado en biopsias mamarias tomadas de 24 pacientes, antes de comenzar el tratamiento neoadyuvante con docetaxel y correlacionado con el grado de respuesta patológica experimentado por cada una tras el tratamiento quirúrgico. Previo análisis bioinformático, obtuvieron una firma génica compuesta de 92 genes cuya expresión predecía la respuesta al tratamiento de las pacientes con una precisión media del 88%.

A pesar de la heterogeneidad molecular de los tumores mamarios, la función biológica de los 92 genes fue indicativa de los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia o sensibilidad al docetaxel, ya que aquellos tumores sensibles al tratamiento expresaron genes relacionados con la transducción de señales intracelulares, el citoesqueleto, procesos de adhesión celular y en el transporte proteico, la apoptosis o el procesamiento post-transcripcional del ARN, mientras que aquellos con una pobre respuesta a la terapia con docetaxel mostraron una expresión incrementada de genes involucrados en la transcripción del ARN, la síntesis proteica y el ciclo celular. En un estudio posterior, Chang JC y colaboradores analizaron el perfil de expresión génica del tumor residual obtenido en el tratamiento quirúrgico tras 3 meses de tratamiento con docetaxel (Chang y cols., 2005). De las 24 pacientes inicialmente reclutadas, 13

fueron seleccionadas para este segundo análisis dando lugar a 13 pares de muestras correspondientes a las biopsias pre-tratamiento y post-cirugía. De las 13 muestras obtenidas tras la cirugía, 8 fueron procesadas para la captura de células neoplásicas mediante microdissección con láser. Analizaron el perfil de expresión génica de los 13 pares de muestras mediante microarrays y los resultados mostraron como, de nuevo, las biopsias previas al tratamiento podrían ser clasificadas por la firma génica de los 92 genes en grupos de buena y mala respuesta al tratamiento con docetaxel, sin embargo, al analizar las muestras post-cirugía no observaron diferencias alguna entre el perfil de expresión génica de pacientes con tumores que registraron una buena respuesta al docetaxel y pacientes con tumores resistentes a esta terapia, ni en las muestras enriquecidas con células tumorales mediante microdissección con láser ni en las muestras resultantes de la disección de la pieza quirúrgica.

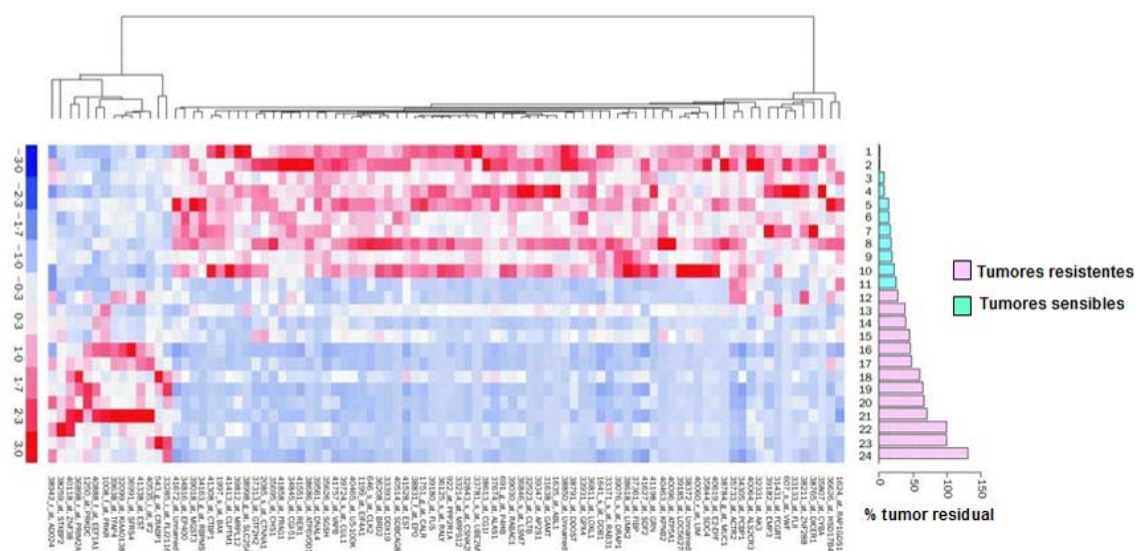


Figura 21. *Agrupamiento jerárquico de los genes correlacionado con la respuesta al docetaxel.* Los genes sobrexpresados se muestran en rojo y los genes cuya expresión es inferior a la media de la expresión de todos los genes se muestran en azul. A la derecha de la imagen se encuentran representados las muestras y el porcentaje de tumor residual tras el tratamiento con docetaxel.

Según los autores, los resultados sugieren que las células supervivientes al tratamiento con docetaxel son el producto de la selección clonal de un fenotipo resistente a las drogas. Funcionalmente los genes expresados diferencialmente entre los pares pre y post-tratamiento codifican en su mayoría proteínas implicadas en el metabolismo de los ácidos grasos y los fosfolípidos así como en la vía de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), que promueve la supervivencia celular favoreciendo el reclutamiento de nutrientes y mitógenos.



En esta misma línea de investigación, Ayers M y colaboradores publicaron un trabajo en el que aplicaron la tecnología de microarrays al desarrollo de un predictor farmacogenómico de la respuesta al tratamiento neoadyuvante secuencial con T/FAC (paclitaxel-fluorouracilo-doxorrubicina-ciclofosfamida) en un total de 42 pacientes, 18 de las cuales fueron reclutadas como grupo de validación independiente (Ayers y cols., 2004). Tras el análisis con microarrays y el procesamiento bioinformático, obtuvieron una firma genética compuesta por 74 marcadores que predijo el resultado clínico de las pacientes con una precisión del 78%. En un estudio de validación posterior (Hess y cols., 2006), los investigadores refinaron la firma genética reduciendo el número de marcadores a 30 pues observaron que, aunque la firma genómica predecía con mayor eficacia el resultado clínico de las pacientes conforme aumentaba el número de genes que la componían, alcanzaba una fase estacionaria cuando superaba los 40 genes. Ayers M y colaboradores seleccionaron los 30 genes que se correlacionaron en mayor medida con el grado de respuesta patológica para construir un nuevo clasificador farmacogenómico, que identificó correctamente al 92% de las pacientes que registraron una RPc al tratamiento con T/FAC con una sensibilidad superior a la de otras variables aplicadas rutinariamente en la práctica clínica actual.

Por último, en un esfuerzo por investigar si las diferencias pronósticas asociadas a los 4 subtipos moleculares de cáncer de mama definidos por la firma intrínseca desarrollada por Sorlie T, Perou CM y colaboradores, fueron debidas a los distintos potenciales metastásicos de cada subtipo o bien a su diferente sensibilidad a los fármacos antineoplásicos, investigadores del Instituto MD Anderson en Houston analizaron la tasa de respuesta patológica registradas por cada subtipo molecular en pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante basada en la administración de antraciclinas y taxanos (Rouzier y cols., 2006). Dichas tasas variaron considerablemente entre las cuatro clases moleculares registrando hasta un 45% de RPc en los subtipos basal y Her2 y una RPc prácticamente nula en los subtipos luminal y normal. Estos resultados corroboran la conocida relación entre la sensibilidad a la quimioterapia de tumores de alto grado nuclear y receptores estrogénicos negativos, ya que los subtipos basal y Her2 corresponden a este perfil, mientras que los subtipos luminal y normal son predominantemente RE<sup>+</sup> y de bajo grado nuclear. Por otra parte, los genes cuya expresión se correlacionaba con una RPc en el subtipo basal fueron diferentes de aquellos correlacionados con una RPc en el subtipo Her2, lo que sugiere que los mecanismos biológicos de resistencia a los fármacos quimioterápicos difieren entre los subtipos moleculares de cáncer de mama, confirmando que son entidades biológicamente distintas.

### III.3 Estandarización de los trabajos con microarrays

Una de las consecuencias del rápido desarrollo de la tecnología de microarrays es la ausencia de consenso en cuanto a los protocolos experimentales, la selección de pacientes, las plataformas de microarrays o la metodología analítica empleada entre distintos grupos de investigación. La diversidad de protocolos o diseños experimentales posibles y la complejidad de los datos derivados de los estudios de expresión génica con microarrays, hizo necesario establecer un criterio unificado en cuanto al formato en que los resultados de tales estudios deben ser comunicados, con el objetivo de que sean accesibles a la comunidad científica y con ello permitir a cualquier investigador reproducir, confirmar o discutir los resultados. De esta problemática surgieron las normas MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment*), que describen la mínima información requerida para asegurar que los datos procedentes de un experimento con microarrays pueden ser fácilmente interpretados e independientemente verificados. Estas normas se componen de seis secciones que indican cómo deben ser comunicados datos referentes al diseño experimental, diseño del microarray, procesamiento y marcaje de las muestras, protocolo de hibridación, cuantificación y normalización, filtrado y procesamiento matemático de los datos (Brazma y cols., 2001). Estas normas son aplicadas por varias bases de datos públicas desarrolladas para que los investigadores depositen los resultados de sus experimentos con microarrays. Las más utilizadas se mencionan en el apartado de bioinformática.

La publicación en las bases de datos públicas de muchos de los trabajos que han aplicado la tecnología de microarrays al estudio del cáncer de mama, ha posibilitado realizar estudios comparativos entre las firmas genómicas resultantes de los mismos, permitiendo extraer interesantes conclusiones al respecto. La comparación entre la lista de genes que componen algunas de las firmas genómicas descritas anteriormente, tan sólo muestran un ligero solapamiento. Las razones de esta escasa concordancia son desconocidas, pero probablemente incluyan algunas de las diferencias metodológicas señaladas anteriormente. Aún más importante es si, estas firmas genómicas escasamente concordantes en cuanto a la identidad de los genes que las componen, lo son en cuanto a sus predicciones. Para esclarecer este importante interrogante se han llevado a cabo algunos estudios que comparan las predicciones derivadas de la aplicación de varias firmas genómicas. Los autores de las firmas genómicas más relevantes llevaron a cabo un análisis comparativo de las predicciones derivadas de la aplicación de la firma intrínseca, la firma de *Ámsterdam*, la firma *Wound Response* y el algoritmo

RS (*Recurrence Score*) en un mismo grupo de datos de expresión génica. Los resultados muestran que estos cuatro modelos establecen predicciones similares clasificando aproximadamente las mismas muestras en grupos de mal pronóstico, de tal forma que los tumores clasificados dentro de los grupos moleculares basal, Her2 y luminal B por la firma intrínseca fueron clasificados como de mal pronóstico por las firmas de *Ámsterdam*, *Wound Response* y RS. Este análisis sugiere que el resultado clínico de una paciente con cáncer de mama puede ser predicho por una amplia variedad de genes y que cualquier modelo que emplee un número suficientemente representativo de ellos es efectivo. Este fenómeno es probablemente debido a que la expresión de genes individuales está interrelacionada con muchos otros, que a su vez, se correlacionan en grado variable con el resultado clínico final observado en la paciente. Por lo tanto varios grupos de genes pueden ser empleados como predictores del curso clínico de una enfermedad neoplásica, pues cada uno de ellos monitoriza un conjunto de características biológicas comunes a los diferentes subgrupos de pacientes, dando lugar a predicciones similares (Fan y cols., 2006).

#### **III.4 PCR a tiempo real. Una técnica de alto rendimiento alternativa para el análisis de la expresión génica aplicada al estudio del cáncer de mama**

A pesar del alto rendimiento de los microarrays, la aplicación de esta tecnología en la clínica de rutina se encuentra limitada por su elevado coste y sus requerimientos técnicos. En este contexto, recientemente se optimizó un protocolo experimental que permite la extracción de RNA de tejido incluido en bloques de parafina, en una concentración suficiente para realizar análisis de expresión de varios cientos de genes simultáneamente mediante RT-PCR múltiple con una elevada reproducibilidad, especificidad y sensibilidad, a pesar de las frecuentes modificaciones químicas y frecuente fragmentación del ARN contenido en el tejido a consecuencia del proceso de fijación con formalina (Cronin y cols., 2004).

Esta fue la técnica empleada por investigadores del NSABP (*National Surgical Adjuvant and Bowel Project*) para desarrollar y comercializar, en colaboración con científicos de Genomic Health Inc., una firma genética predictiva conocida como Oncotype DX. Dicha firma fue desarrollada en base a la selección de 250 genes candidatos identificados a través del estudio de la bibliografía disponible, bases de datos genómicas y trabajos previos basados en la aplicación de los microarrays al estudio del cáncer de mama. Fueron tres los estudios independientes que analizaron mediante RT-PCR la expresión de los 250 genes candidatos en

muestras de tejido mamario neoplásico incluido en parafina y correlacionaron la expresión de estos genes, con la tasa de recurrencia de la enfermedad en un total de 447 pacientes con cáncer de mama sin afectación de los ganglios linfáticos axilares, ER<sup>+</sup> y tratadas con tamoxifeno adyuvante (Esteban y cols., 2003; Cobleigh y cols., 2003; Paik y cols., 2003). Los datos obtenidos permitieron seleccionar un panel de 16 genes específicos relacionados con el cáncer y 5 genes de referencia para desarrollar un algoritmo matemático, conocido como RS, capaz de asignar a las pacientes en tres grupos de riesgo de recurrencia en 10 años tras el diagnóstico. Posteriormente, la firma genética fue aplicada con éxito a 668 pacientes tratadas con tamoxifeno adyuvante a través del ensayo clínico NSABP B-14 (Paik y cols., 2004). El algoritmo clasificó correctamente a las pacientes en grupos de alto, medio y bajo riesgo de recurrencia de la enfermedad y su habilidad pronóstica fue validada gracias al alto grado de correlación entre los grupos de riesgo obtenidos y el resultado clínico de las pacientes, estableciendo una prognosis de mayor exactitud que otros factores clínicos como la edad o el tamaño tumoral.

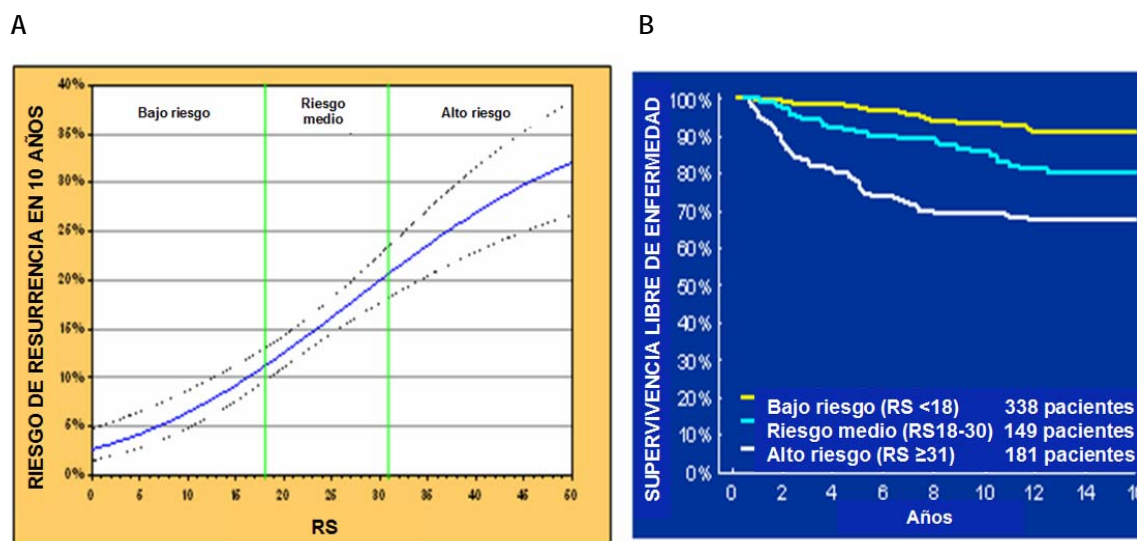


Figura 22. (A) Relación entre el valor del algoritmo RS y el riesgo de recurrencia de la enfermedad en 10 años. (B) Probabilidad de permanecer libre de enfermedad a lo largo del tiempo para los tres grupos de riesgo descritos por el algoritmo RS.

Desde la publicación de este trabajo, la firma de los 21 genes ha sido aplicada a varias cohortes de pacientes con el objetivo de explorar su capacidad pronóstica y predictiva: 1) Principalmente son dos los estudios que han examinado la utilidad clínica del RS en cohortes con diferentes características a las empleadas en el desarrollo del algoritmo RS. En el primero de ellos, Cobleigh M y colaboradores analizaron la expresión de 203 genes candidatos en 78 tumores mamarios incluidos en parafina derivadas de pacientes con afectación ganglionar axilar (Cobleigh y cols., 2005). De ellos, 22 genes se correlacionaron significativamente con la

supervivencia libre de enfermedad y 14 de estos genes se encuentran representados en el panel de los 16 genes específicos relacionados con el cáncer empleados para desarrollar el RS, lo que contribuyó al desarrollo del RS como factor pronóstico, no sólo útil en pacientes sin afectación de los ganglios axilares, sino también en aquellas con ganglios positivos. Como se esperaba, la proporción de pacientes con RS de bajo valor y por tanto con un bajo riesgo de recurrencia, fue mucho menor en la cohorte de pacientes de este estudio que en la cohorte del estudio de validación original del RS. Posteriormente Esteva FJ y colaboradores examinaron la habilidad pronóstica del RS en 149 pacientes sin afectación de los ganglios axilares y que no recibieron tratamiento con tamoxifeno ni quimioterapia (Esteva y cols., 2005). Los autores no encontraron ninguna correlación entre el RS y la supervivencia libre de enfermedad, sin embargo encontraron una elevada concordancia entre los resultados obtenidos mediante RT-PCR e inmunohistoquímica validando algunos aspectos técnicos del ensayo conducente al desarrollo del algoritmo RS. Esteva y colaboradores sugieren en su artículo, que las discrepancias observadas entre sus resultados y los obtenidos por Paik y colaboradores, pueden en cierta medida ser debidas a que gran parte de la contribución a la capacidad predictiva del RS de los genes relacionados con el RE, sea en realidad el reflejo de la respuesta al tamoxifeno de las pacientes, ya que el algoritmo fue desarrollado a partir de una cohorte enteramente tratada con este fármaco. Para esclarecer esta importante objeción técnica, Paik y colaboradores evaluaron la firma de los 21 genes en una cohorte de pacientes que recibieron placebo en vez de tamoxifeno en el ensayo clínico NSABP B14. Este estudio mostró que el RS tiene un valor predictivo también en pacientes no tratadas con tamoxifeno, y aún más, demostró ser un factor altamente predictivo de la respuesta y el beneficio derivado de este tratamiento en cada paciente (Paik S y cols., 2005).

2) Los resultados obtenidos tras la aplicación del RS a la cohorte NSABP B-14 tratada con tamoxifeno, fueron de nuevo validados por un estudio caso-control independiente que incluyó 220 pacientes fallecidas a causa del cáncer de mama de mama y 570 pacientes con cáncer de mama pareadas con el anterior grupo en cuanto a edad, raza, tratamiento hormonal con tamoxifeno y año en el que fueron diagnosticadas (Habel y cols., 2006). Este estudio mostró la asociación entre el RS y el riesgo de muerte por cáncer de mama en pacientes sin afectación ganglionar axilar, RE<sup>+</sup>, tratadas y no tratadas con tamoxifeno. En este, como en otros estudios de validación de la firma de los 21 genes, se observó que, aunque el RS se correlacionaba con el tamaño y grado tumoral, pudieron ser identificadas un pequeño grupo de pacientes con tumores de gran tamaño y/o pobremente diferenciados que registraron bajos valores de RS y con un buen pronóstico a pesar de las conclusiones derivadas de la aplicación única de criterios clínicos. Los autores concluyen señalando la conveniencia de

diseñar nuevos estudios, ya sean retrospectivos o prospectivos, para evaluar el valor pronóstico del RS en pacientes ER<sup>-</sup> y pacientes ER<sup>+</sup> no tratadas con tamoxifeno. 3) Por otra parte, Gianni L y colaboradores encontraron una fuerte correlación entre la tasa de RPc de pacientes con cáncer de mama tratadas con quimioterapia neoadyuvante y el RS resultante de la expresión del panel de 21 genes validado por Paik S y colaboradores, que sugirió que aquellas pacientes con mayor riesgo de recurrencia se beneficiarían en mayor medida del tratamiento quimioterápico (Gianni y cols., 2005). 4) En un estudio posterior, Paik S y colaboradores confirmaron el potencial predictivo de la firma de los 21 genes en la cohorte de pacientes ER<sup>+</sup> y sin afectación de los ganglios axilares del ensayo clínico NSABP B-20 tratadas con quimioterapia adyuvante. Los resultados mostraron que aquellas pacientes que registraron altos valores de RS experimentaron mayor beneficio de la quimioterapia, mientras que las pacientes con bajos valores de RS experimentaron un beneficio mínimo o nulo del tratamiento, sugiriendo que la aplicación del RS como criterio de selección del tratamiento habría identificado a pacientes con pronóstico tan favorable que podrían haber evitado de forma segura el tratamiento con quimioterapia (Paik and cols., 2006).

En el año 2006 se puso en marcha un amplio estudio prospectivo conocido como TAILORx *-Assigning Individualized Options for Treatment (Rx)-*, para evaluar la indicación de un tratamiento con quimioterapia en pacientes que registran valores intermedios del algoritmo RS. Este estudio dará lugar a un valioso conjunto de datos que permitirá optimizar y validar la aplicación del RS al tratamiento del cáncer de mama (Sparano, 2006).

En esta revisión es necesario mencionar un interesante trabajo publicado en el año 2005 por Iwao-Koizumi K y colaboradores (Iwao-Koizumi y cols., 2005). El diseño de este estudio incluyó el análisis mediante RT-PCR de 44 muestras de tumor mamario incluidas en parafina previas al tratamiento neoadyuvante con docetaxel. De los 2.453 genes analizados, 85 fueron seleccionados en base a su expresión diferencial entre pacientes con buena y pobre respuesta al tratamiento. Esta firma génica predijo la respuesta al docetaxel con una precisión del 80% en 26 muestras previamente no incluidas en el diseño experimental. El perfil de expresión génica de las pacientes que registraron una pobre respuesta al tratamiento se caracterizó por una significativa sobreexpresión de genes implicados en el control del estado oxidativo del microambiente celular, tales como la tiorredoxina, glutatión-S-transferasa y la peroxirredoxina. Para evaluar la contribución de estas tres proteínas al mecanismo biológico de resistencia al docetaxel los investigadores transfectaron células MCF-7, generalmente sensibles al docetaxel, con los genes

que las codifican y cultivaron estas células y otras células MCF-7 control no transfectadas en un medio al que añadieron una dosis de 10nm/l de docetaxel. Los resultados mostraron que mientras tan sólo el 60% de las células control sobrevivieron al tratamiento con docetaxel, el 90% de las células modificadas genéticamente fueron resistentes y sobrevivieron al tratamiento. Ambos experimentos sugieren que los genes implicados en el metabolismo redox juegan un papel central en el desarrollo de la resistencia al docetaxel.

### III.5 Metodología para la traslación de la investigación genómica a la práctica clínica en tratamiento del cáncer de mama

El uso de las tecnologías de alto rendimiento para el análisis del perfil de expresión génica, no ha alcanzado aún el grado de evidencia científica suficiente para ser aplicado a la práctica clínica. Si bien este tipo de tecnología ha demostrado ser una prometedora herramienta para mejorar nuestra comprensión de la compleja biología de las neoplasias mamarias, refinar el pronóstico y prever la respuesta al tratamiento de las pacientes con cáncer de mama, todavía quedan por resolver importantes cuestiones referentes a la selección de las pacientes, plataformas de microrrays y protocolos experimentales (Gruvberger-Saal, 2006).

Generalmente se establecen tres niveles fundamentales de validación para poder aplicar una nueva tecnología al tratamiento de los pacientes:

- Validación analítica: establece características técnicas del procedimiento analítico tales como la sensibilidad y la especificidad del ensayo o la reproducibilidad del mismo.
- Validación clínica: establece la asociación entre marcadores moleculares selectos y el resultado clínico en poblaciones relevantes (Ej. Asociación entre la firma génica y el riesgo de recurrencia de la enfermedad o respuesta al tratamiento).
- Utilidad clínica: Establece en poblaciones de pacientes relevantes, el efecto de la aplicación de la tecnología a validar sobre el resultado clínico de las pacientes (Ej. Efecto de la aplicación de las firmas génicas sobre la supervivencia libre de enfermedad o el grado de beneficio del tratamiento seleccionado).

Los principales modelos predictivos han sido validados analítica y clínicamente, si bien aún quedan por resolver algunos importantes aspectos tales como refinar los intervalos que definen

los grupos de alto y bajo riesgo de recurrencia de la enfermedad para minimizar clasificaciones erróneas (Blue Cross and Blue Shield Association, 2005). Hasta hoy tan sólo se ha abordado el estudio de la utilidad clínica de los modelos de la firma génica de Ámsterdam y la firma de los 21 genes, mediante la puesta en marcha de dos ensayos clínicos fase I conocidos como MINDACT y TAILORx respectivamente. Se espera que estos estudios prospectivos resuelvan algunas de las incógnitas que actualmente se plantea la comunidad científica con respecto a la aplicación de las firmas génicas a la práctica clínica y que futuros ensayos clínicos a gran escala permitan llegar a una o previsiblemente varias firmas génicas consenso que personalicen y optimicen el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama (Murphy y cols., 2005).







# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## MATERIAL Y MÉTODOS

### I. Diseño experimental

Este estudio observacional, prospectivo y de seguimiento pretendió identificar, como potenciales marcadores de predicción de la respuesta a fármacos, genes que experimentaron cambios de expresión durante la quimioterapia neoadyuvante. Paralelamente se analizaron marcadores de estrés oxidativo y respuesta antioxidante en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama invasivo con y sin metástasis, con el fin de explorar la influencia del tratamiento quimioterápico sobre el balance oxidativo en la población de estudio.

El diseño de este estudio comprende tres grupos experimentales definidos por la secuencia en la que se administró el tratamiento quimioterápico. En función de esta variable fueron definidos tres grupos experimentales denominados neoadyuvancia (N), adyuvancia (A) y metástasis (M).

Tabla 2. *características terapéuticas de los grupos experimentales N, A y M.*

	<i>Secuencia del tratamiento con QT</i>
Grupo N	QT curativa previa a la cirugía
Grupo A	QT curativa posterior a la cirugía
Grupo M	QT paliativa

N= neoadyuvancia; A= adyuvancia; M= metástasis;  
QT= quimioterapia

Para análisis de los marcadores de estrés oxidativo y respuesta antioxidante, se extrajeron muestras de sangre total procedentes de las pacientes de los tres grupos experimentales en dos momentos diferentes, antes y después del tratamiento con quimioterapia. El análisis de expresión génica fue llevado a cabo exclusivamente en biopsias tumorales mamarias de pacientes pertenecientes al grupo experimental N. Cada paciente donó dos muestras de tejido extraídas en momentos diferentes. La biopsia previa al tratamiento fue extraída en el momento del diagnóstico histológico y, la posterior al tratamiento, durante el procesamiento intraoperatorio de la pieza quirúrgica resultante de la extracción del tumor mamario. Las muestras de tejido tumoral fueron seleccionadas mediante el análisis de sus características histológicas y composición celular, por lo que, previamente al procesamiento del tejido para el análisis genómico, fueron examinadas por un anatomopatólogo experto. Por último, se llevó a cabo el

análisis de la información clínica disponible en cada caso, dando lugar a una base de datos que incluyó información relativa a la evolución de la enfermedad oncológica y los parámetros bioquímicos de cada una de las pacientes del estudio.

Los resultados obtenidos dieron lugar a tres grandes bloques analíticos clasificados como análisis de variables clínicas e histopatológicas, evaluación del balance oxidativo y análisis de la expresión génica.

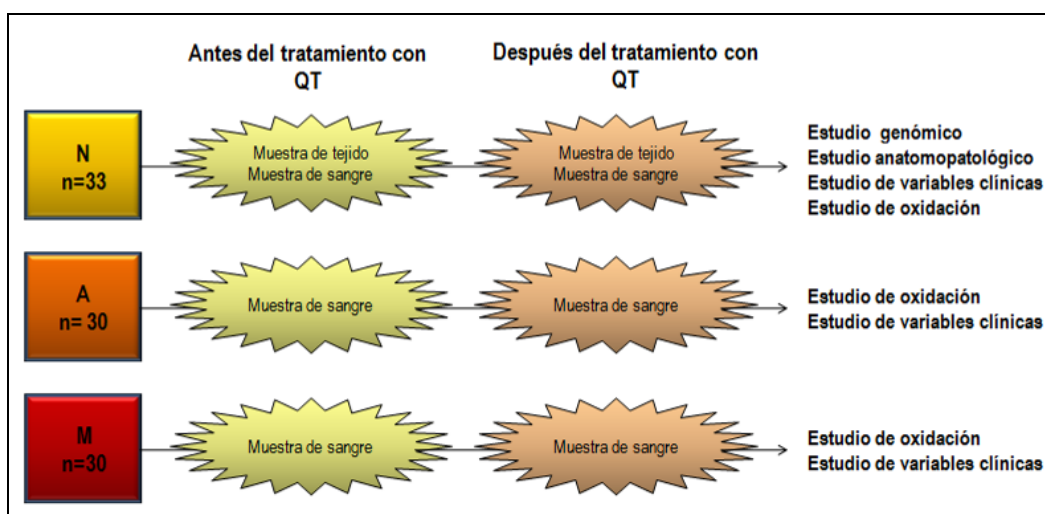


Figura 23. Esquema de recogida de muestras biológicas y distribución de las participantes en los grupos experimentales y el grupo control.

## II. Cálculo del tamaño muestral

Dado que este estudio comprende varios bloques analíticos, el cálculo del tamaño muestral fue llevado a cabo según dos aproximaciones distintas:

### II.1 Cálculo del tamaño muestral para el análisis del perfil de expresión génica mediante microarrays de oligonucleótidos

Para el análisis de perfiles de expresión génica asociados al tratamiento, un tamaño muestral de 32 pares de muestras en el grupo experimental N permitirá valorar cambios de magnitud 2 en el parámetro guía y hallar diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica entre los dos grupos de datos resultantes (antes y después del tratamiento), con un error  $\alpha$  de 0,001 y una potencia estadística del 90%, en el 75 % de los genes con menor variación (percentil 75 de las desviaciones típicas). Dada la complejidad de los datos obtenidos a partir de un análisis con microarrays de ADNc, no existe hasta el momento ningún método

estadístico estandarizado para el cálculo del tamaño muestral, por lo que nos remitimos a estudios previos llevados a cabo con el objetivo de analizar la influencia de esta variable en el análisis de expresión génica con microarrays de ADNc (Wei y Bumgarner, 2004).

## II.2 Cálculo del tamaño muestral para la evaluación del balance oxidativo

Con el objetivo de conseguir una potencia del 90% para detectar diferencias en el contraste de la hipótesis nula  $H_0: \mu_0 = \mu_1$  mediante una prueba T-Student bilateral para dos muestras relacionadas, teniendo en cuenta que el nivel de significación es 5% y asumiendo que la media del grupo de referencia es de 4300 unidades, que la media del grupo experimental es de 5590,00 unidades y que la desviación típica de la variable Diferencia es de 2000 unidades, será necesario incluir 28 parejas de unidades experimentales en el estudio. Este cálculo fue llevado a cabo utilizando el software específico Ene 2.0 desarrollado por el Departamento de Biometría de Glaxo-SmithKline y el Servicio de Estadística de la Universidad Autónoma de Barcelona (<http://www.ene-ctm.com>).

Ya que el tamaño muestral requerido para el análisis de la variabilidad genética supera al requerido para el estudio de estrés oxidativo, ajustamos el número de pacientes por grupo experimental a 32 para el primer bloque de análisis y a 30 para el segundo.

## III. Población de estudio

Las pacientes participantes en el estudio fueron reclutadas en las consultas externas del Servicio de Oncología del Hospital Médico-Quirúrgico de Jaén. Los criterios de inclusión y exclusión aplicados a la selección de las pacientes que integraron los tres grupos experimentales fueron los siguientes:

### III.1 Criterios de inclusión

Las pacientes fueron seleccionadas para el estudio según unos criterios generales y posteriormente incluidas en cada grupo experimental según criterios específicos.

### III.1.1 Criterios de inclusión generales

1.- Mujeres diagnosticadas de cáncer de mama invasivo confirmado mediante biopsia incisional o con trucut.

2.- Estadio funcional de 0 a 2 en la escala de ECOG (Grupo oncológico cooperativo del este) (véase apéndice 1, Criterios de inclusión.1).

3.- Presentar, como mínimo, una lesión medible según se define en los criterios para la evaluación de la respuesta de los tumores sólidos (RECIST) (véase apéndice 1, Criterios de inclusión.2): al menos, 20 mm, si se realiza la medida con técnicas convencionales (mamografía o resonancia magnética).

4.- Edad mínima de 18 años y máxima de 80.

5.- Esperanza de vida de al menos 6 meses.

6.- Función orgánica adecuada, que abarca los índices siguientes:

6.1.- Reserva medular adecuada: RAN (recuento absoluto de neutrófilos)  $\geq 1,5 \times 10^9/L$ , plaquetas  $\geq 100 \times 10^9/L$  y hemoglobina  $\geq 9$  g/dl.

6.2.- Función hepática: bilirrubina, PA (fosfatasa alcalina), ASAT (aspartato amino transferasa) y ALAT (alanina amino transferasa)  $\leq$  LNS (límite superior de la normalidad).

6.3.- Función renal: Aclaramiento de creatinina (ACr)  $\geq 45$  ml/minuto, calculado según la fórmula estándar de Cockcroft y Gault (véase apéndice 1, Criterios de inclusión.3)

7.- Función cardíaca normal, a juzgar por la exploración física y el electrocardiograma. La fracción de eyección del ventrículo izquierdo deberá ser  $> 55\%$ , de acuerdo con las técnicas de medicina nuclear o el ecocardiograma.

8.- Cumplimiento terapéutico y proximidad geográfica que faciliten un seguimiento adecuado.

9.- Firma del consentimiento informado (véase apéndice 1, Criterios de inclusión.4).

10.- Las mujeres en edad fértil deberán seguir un método anticonceptivo fiable durante y hasta 3 meses después del tratamiento; se exigirá una prueba negativa de embarazo en suero y no estar en periodo de lactancia materna.

### III.1.2 Criterios de inclusión específicos

#### III.1.2.1 Pacientes neoadyuvantes

- 1.- Pacientes con diagnóstico histológico documentado de cáncer de mama invasivo localmente avanzado, con un tamaño  $\geq 2$  cm .
- 2.- Ausencia de tratamiento previo para cáncer de mama.

#### III.1.2.2 Pacientes adyuvantes

- 1.- Pacientes con diagnóstico histológico documentado de cáncer de mama invasivo operable.
- 2.- Ausencia de tratamiento previo para cáncer de mama.
- 3.- El tratamiento quirúrgico definitivo debe consistir en mastectomía o cirugía conservadora de la mama. Los márgenes de la muestra diseccionada durante la intervención quirúrgica deben estar histológicamente libres de adenocarcinoma invasivo y DCIS. El LCIS no es tenido en cuenta como margen positivo.

#### III.1.2.3 Pacientes metastásicas

- 1.- Pacientes con diagnóstico histológico documentado de cáncer de mama metastásico.
- 2.- Pacientes que hayan recibido no más de cinco líneas de quimioterapia previas para el tratamiento del cáncer de mama. De ellos, uno o dos regímenes pueden haber sido administrados como tratamiento neoadyuvante y/o adyuvante.
- 3.- Expectativa de vida superior a 4 meses.
- 4.- Función orgánica adecuada, que abarca los índices siguientes:
  - 4.1.- Reserva medular adecuada: RAN  $1,5 \times 10^9/L$ , plaquetas  $\geq 100 \times 10^9/L$  y hemoglobina  $\geq 10$  g/dl.
  - 4.2.- Función hepática: bilirrubina  $\leq 1,5$  LSN, ASAT y ALAT  $\leq 3 \times$  LSN (en caso de metástasis hepáticas,  $\leq 5 \times$  LSN). PA  $< 5 \times$  LSN, excepto en presencia de únicamente metástasis óseas y en ausencia de cualquier trastorno hepático. No serán elegibles para el estudio las pacientes con ASAT y/o ALAT  $> 1,5 \times$  LSN asociada(s) a PA  $> 2,5 \times$  LSN.



### III.1.3 Criterios de exclusión

Fueron excluidas del estudio aquellas pacientes que cumplieron alguno de los siguientes criterios:

1.- Tratamiento en los últimos 30 días con un fármaco que no haya recibido la aprobación de las autoridades sanitarias para ninguna indicación en el momento en que se inicie el estudio. Segunda neoplasia maligna primaria, a excepción de carcinoma *in situ* del cuello uterino o de un cáncer de piel no melanomatoso, tratado correctamente. Sólo se permitirían los casos de neoplasias malignas previas si hubiera sido diagnosticada y tratada definitivamente como mínimo 5 años antes y no hubiera ningún indicio posterior de recidiva.

2.- Enfermedad general grave asociada (p. ej., infección activa, incluyendo VIH, o enfermedad cardíaca) que, en opinión del oncólogo médico responsable, ponga en peligro la salud de la paciente o su capacidad para completar el estudio o cualquier otra enfermedad que pueda empeorar con la quimioterapia o los posibles tratamientos de apoyo.

3.- Antecedentes de arritmias aurículo-ventriculares y/o insuficiencia cardíaca congestiva, o de ambas, aun cuando se hallen bajo control médico, o bloqueo cardíaco activo de segundo o de tercer grado. Antecedentes de infarto de miocardio en los seis meses anteriores al reclutamiento o hipertensión arterial no controlada o maligna.

4.- Antecedentes de hipersensibilidad a los fármacos quimioterápicos o de reacciones alérgicas a alguno de sus componentes.

5.- Neuropatía sensorial o motora de severidad > grado 1 según los criterios de terminología común para efectos adversos del NCI (*National Cancer Institute*), versión 3.0 (<http://ctep.cancer.gov>).

6.- Pacientes gestantes.

## IV. Consideraciones éticas

El estudio fue realizado siguiendo el código ético del Hospital Médico-Quirúrgico de Jaén, así como los principios y recomendaciones para la investigación biomédica con sujetos humanos, establecidos en la declaración de Helsinki (Asamblea General de la Asociación Médica Mundial, Helsinki, Finlandia 1964).

Las pacientes fueron informadas previamente de las características del estudio y se les entregó una hoja informativa, explicándoles la voluntariedad del mismo, el uso confidencial de los datos y la posibilidad de revocar su consentimiento en cualquier momento. Antes de entrar a formar parte del estudio las pacientes firmaron un consentimiento informado.

Tanto el diseño del estudio como el modelo de consentimiento informado entregado a las pacientes, fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética del Hospital Médico-Quirúrgico de Jaén.

## V. Análisis de variables clínicas e histopatológicas

### V.1 Variables clínicas

Durante la recogida de muestras biológicas, fue diseñada una base de datos con el objetivo de recopilar toda aquella información clínica relevante acerca del curso clínico de las pacientes y de las incidencias acontecidas durante el tratamiento antineoplásico.

Entre las variables clínicas que conformaron la base de datos se encuentran parámetros relativos a la historia ginecológica, marcadores clínicos pronósticos y predictivos, pauta y secuencia de los tratamientos quirúrgico, radioterápico y quimioterápico, tal y como se indica en la Tabla 3.

Todos estos datos fueron extraídos, bajo la supervisión de un oncólogo experto, de los informes médicos recogidos en las historias clínicas que a tal efecto el personal administrativo y auxiliar del Hospital Médico-Quirúrgico de Jaén archiva.

Tabla 3. *Parámetros clínicos y bioquímicos analizados en pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas.*

<i>Parámetros clínicos</i>	
Edad al diagnóstico	Estadio clínico
Estado menopáusico	RE
Tamaño tumoral	RP
Tipo histológico	Her2
Grado histológico	Cirugía
TNM al diagnóstico	Hormonoterapia adyuvante

<i>Parámetros bioquímicos</i>	
Glucosa	Sodio
Urea	Potasio
Creatinina	Cloruros
Ácido úrico	Calcio
Colesterol	Hierro
HDL	Hemoglobina
LDL	Hematocrito
Colesterol/HDL	Hematíes
Triglicéridos	Leucocitos
Proteínas	Neutrófilos
Bilirrubina total	Linfocitos
Bilirrubina conjugada	Monocitos
Aspartato amino transferasa	Basófilos
Alanina amino transferasa	Eosinófilos
Gamma glutamil transferasa	Células LUC
Fosfatasa alcalina	Plaquetas
Lactato deshidrogenasa	

## V.2 Variables histopatológicas

La influencia sobre el análisis de la expresión génica de las características celulares e histológicas de las muestras de tejido y la importancia de las variables histopatológicas en la toma de decisiones terapéuticas en oncología, hacen del análisis morfológico de los tumores mamarios un procedimiento ineludible.

Los datos derivados del análisis anatomopatológico, llevado a cabo de forma rutinaria por el Servicio de Anatomía Patológica, fueron recogidos en la base de datos elaborada para el bloque de análisis clínico e histopatológico. Para confirmar estos datos, los cristales teñidos con hematoxilina-eosina correspondientes a los casos del estudio fueron seleccionados del archivo y revisados por un patólogo experto, según los criterios de clasificación establecidos por la OMS (Tavassoéli y Devilee, 2003). En el caso de los marcadores RE, RP y Her2 se repitieron los ensayos de inmunohistoquímica según el protocolo especificado en el punto V.2.1. Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis morfológico de las biopsias pre-tratamiento y post-tratamiento recogidas para el análisis de expresión génica mediante ADNc microarrays. Para ello las muestras conservadas a -80°C fueron seccionadas, teñidas y examinadas al microscopio óptico tal y como se detalla en el punto V.2.2.

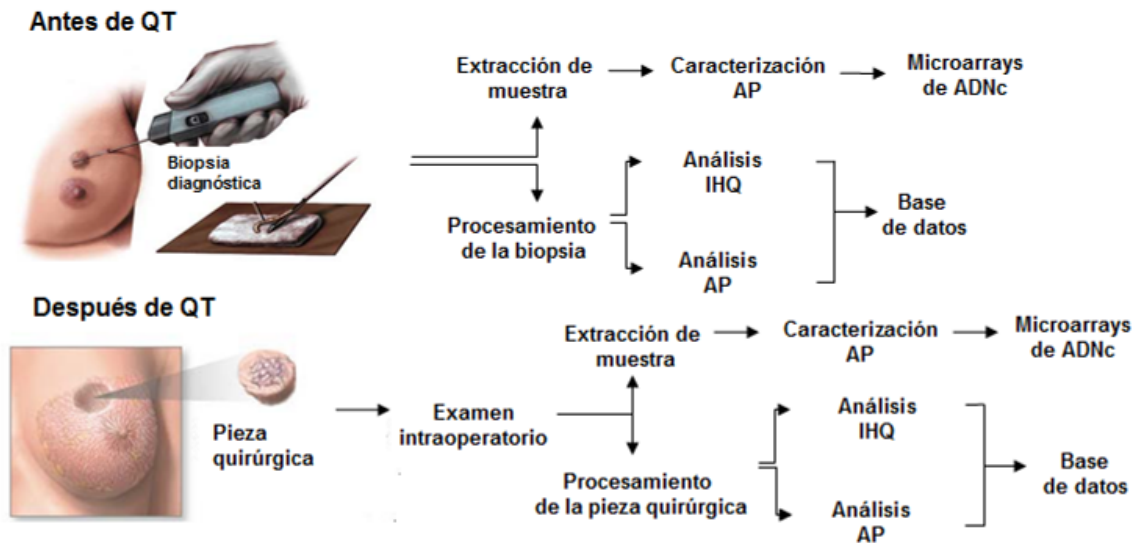


Figura 24. Esquema de la recogida de muestras de tejido y su procesamiento según el tipo de análisis a realizar. QT=, quimioterapia; AP= anatomopatológico; IHQ= inmunohistoquímico.

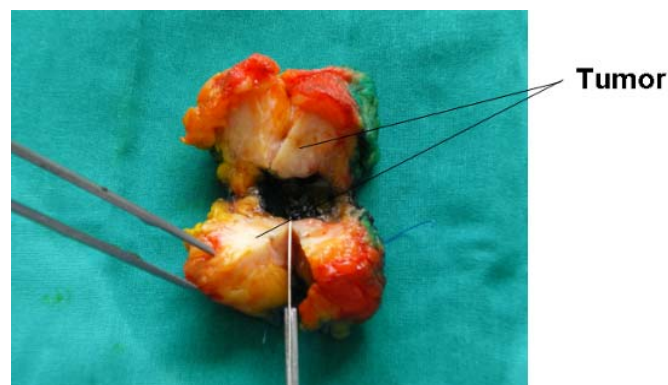


Figura 25. Pieza quirúrgica durante el examen intraoperatorio

## V.2.1 Procesamiento de tejido mamario y tinción inmunohistoquímica

### V.2.1.1 Material

- Portaobjetos para inmunohistoquímica Dako REAL™ Capillary Gap Microscope Slides (Dako Denmark A/S, Dinamarca)
- Placa fría Leica EG1150C (Leica, Wetzlar, Alemania)
- Microtomo Leica RM2235 (Leica, Wetzlar, Alemania)
- Baño histológico para inclusión en parafina Termofin (JP Selecta, Barcelona, España)
- Cuchillas para microtomo de 250 µm de grosor (Feather Safety Razor Co, Ltd, Osaka, Japón)

- Estufa Incubat (JP Selecta, Barcelona, España)
- Equipo de recuperación antigénica PT Link (Dako Denmark A/S, Dinamarca)
- Equipo de inmunotinción automática Autostainer Plus Link (Dako Denmark A/S, Dinamarca)
- Software para el equipo de inmunotinción automática DakoLink, versión 1.5.2.1 (System Dynamics, New Jersey, USA)
- Equipo de tinción automática Leica Autostainer XL (Leica, Wetzlar, Alemania)
- Montador automático Leica CV5030 (Leica, Wetzlar, Alemania)
- Microscopio óptico ECLIPSE E600 (Nikon Co., Tokio, Japón)
- Tampón de desenmascaramiento antigénico Dako Target Retrieval Solution, pH 6 (Dako Denmark A/S, Dinamarca)
- Tampón de desenmascaramiento antigénico Dako Target Retrieval Solution, pH 9 (Dako Denmark A/S, Dinamarca)
- Solución de lavado Dako Wash Buffer 10× (Dako Denmark A/S, Dinamarca)
- Solución bloqueante de peroxidasa DakoCytomation Peroxidase Blocking Reagent (Dako Denmark A/S, Dinamarca)
- Anticuerpo primario anti-RP procedente de ratón clona hPR2a+hPR3a (Máster Diagnóstica S.L., Granada, España)
- Anticuerpo primario anti-RE procedente de conejo, clon SP1 (Máster Diagnóstica S.L., Granada, España)
- Herceptest TM DakoCytomation Autostainer (Kits) que incluye Anticuerpo Policlonal de conejo anti-Her-2 (Dako Denmark A/S, Dinamarca)
- Sistema de detección inmunohistoquímica Dako Real™ EnVision System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Dako Denmark A/S, Dinamarca)
- Hematoxilina para tinción inmunohistoquímica Dako Automation Hematoxylin Histological Staining Reagent (Dako Denmark A/S, Dinamarca)
- Etanol 100% (Etanol absoluto parcialmente desnaturalizado QP, Panreac Química Sau, Barcelona, España)
- Agua destilada estéril (Fresenius Kabi AG, Sevres, Francia)

- Isoparafina H (Isoparafina H -Sustituto de Xileno- DC, Panreac Química Sau, Barcelona, España)
- Medio de montaje (Medio de Montaje para sustitutos de xileno DC, Panreac Química Sau, Barcelona, España)

#### V.2.1.2 Método

##### *Procesamiento del tejido*

Las biopsias diagnósticas y piezas quirúrgicas fueron procesadas para su inclusión en bloques de parafina, según el protocolo estándar aplicado en Servicio de Anatomía Patológica. Los bloques correspondientes a los casos del estudio fueron extraídos del archivo, cortados en un microtomo e inmunoteñidos.

##### *Microsección*

En primer lugar el bloque de parafina, en el que se encuentra incluida la muestra, se depositó sobre la placa fría e incubó 20 minutos a 4°C con el objetivo de enfriar la superficie del bloque para facilitar el corte. A continuación, se ensambló el bloque en el microtomo y se cortó su superficie hasta que ésta quede igualada, para obtener un corte representativo de la muestra. Tras programar el espesor del corte a 3  $\mu\text{m}$ , se llevaron a cabo varios cortes seriados del bloque que, con ayuda de una aguja histológica y se depositaron en una bañó de agua suplementado con etanol absoluto para extender los cortes y evitar pliegues. Una vez extendidos, se recogieron los cortes con un portaobjetos limpio y se dejaron secar en una estufa a 37°C durante 1 hora.

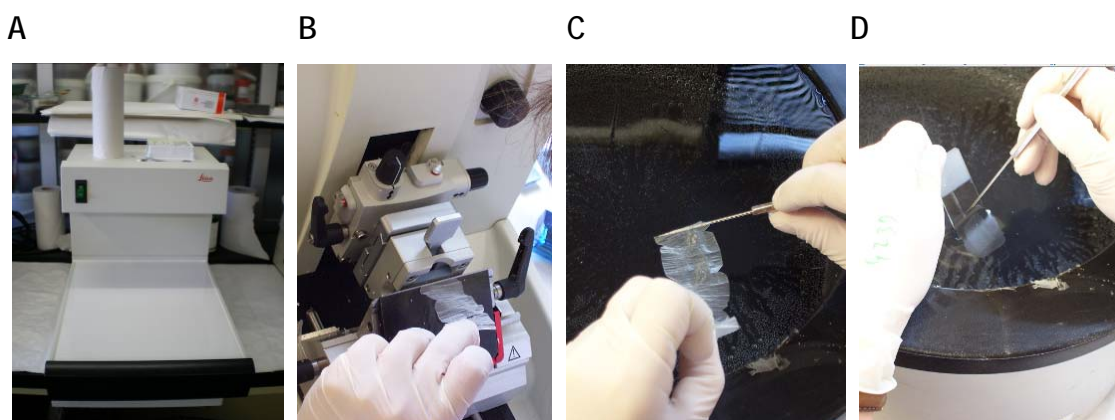


Figura 26. *Material necesario para la obtención de preparaciones histológicas a partir de muestras de tejido mamario incluidas en bloques de parafina.* (A) placa fría. (B); microtomo durante el corte de un bloque de parafina. (C) extensión del corte en un bañó de agua y etanol a 37°C. (D) recogida del corte con un portaobjetos para la inmunotinción.

### *Recuperación antigénica o desenmascaramiento antigénico*

La fijación del tejido en formalina y su inclusión en parafina da lugar a la pérdida de inmunoreactividad de la muestra pues, sobretodo el tratamiento con formol y aldehídos, origina entrecruzamientos proteicos que ocultan los antígenos de interés. Para conseguir una buena reacción antígeno-anticuerpo es necesario realizar previamente un proceso denominado recuperación o desenmascaramiento antigénico.

Para ello, se utilizó un equipo automático de recuperación antigénica. El equipo consta de dos tanques con capacidad de 1,5 litros que se llenaron de tampón de desenmascaramiento diluido en agua destilada (dilución 1:10), cuyo pH varió en función del anticuerpo empleado para la inmunotinción. A continuación, se dispusieron las muestras en una gradilla y se sumergieron en el tampón. Tras introducir los tanques en la cámara del equipo se programó el desenmascaramiento antigénico según los siguientes parámetros:

- Pre-tratamiento: aumento gradual de la temperatura de 23°C a 97°C
- Desenmascaramiento: 97°C durante 20 minutos
- Enfriamiento: disminución gradual de la temperatura de 97°C a 65°C

El tampón de desenmascaramiento fue sustituido por tampón de lavado diluido con agua destilada (dilución 1:10), donde se incubaron los portaobjetos durante 10 minutos a temperatura ambiente.

### *Inmunotinción*

Para la inmunotinción se empleó un equipo automático y software específico. En primer lugar se programó el equipo según el protocolo especificado para cada antígeno. Una vez programado, el mismo equipo establece los reactivos y el orden en el que éstos deben ser cargados en el reservorio. De forma general, la reacción de inmunotinción se basa en la adicción a la muestra de un anticuerpo primario que reconoce un antígeno específico en la superficie del corte histológico. Una vez llevada a cabo la reacción antígeno-anticuerpo, se añade una solución bloqueante con el objetivo de neutralizar las peroxidasas endógenas contenidas en la muestra y minimizar la inmunotinción inespecífica, pues el sistema de inmunodetección se basa en la unión al complejo antígeno-anticuerpo de un polímero compuesto de un esqueleto de dextrano al que se acoplan hasta 100 moléculas de HRP (peroxidasa de rábano) y hasta 20 moléculas de

anticuerpo secundario anti-ratón/conejo (solución de detección). Por último se añade el sustrato, consistente en una solución de DAB (3,3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro) que debe ser diluida en un tampón orgánico que provee la casa comercial (dilución 1:50), y una solución de hematoxilina específica para el equipo de inmunotinción. La HRP acoplada al polímero cataliza la peroxidación de la DAB, que vira a un color marrón en el lugar de unión del antígeno con el anticuerpo. La hematoxilina tiñe el núcleo de las células.

#### Protocolo de inmunotinción para el RE

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)	Tiempo de incubación (minutos)
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
Solución bloqueante	200	5
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
Anticuerpo anti-RE*	200	30
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
Solución de detección	200	30
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
DAB+Cr	200	5
DAB+Cr	200	5
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
Hematoxilina	200	7
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
Agua destilada	exceso (2-3 ml)	0

\*Solución comercial de anticuerpo pre-diluida

#### Protocolo de inmunotinción para el RP

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)	Tiempo de incubación (minutos)
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
Solución bloqueante	200	5
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
Anticuerpo anti-RP*	200	20
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
Solución de detección	200	20
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0



Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
DAB+Cr	200	5
DAB+Cr	200	5
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
Hematoxilina	200	7
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
Agua destilada	exceso (2-3 ml)	0

\*Solución comercial de anticuerpo pre-diluida

#### Protocolo de inmunotinción para Her2

Reactivo	Volumen (µl)	Tiempo de incubación (minutos)
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
Solución bloqueante	200	5
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
Anticuerpo anti-c-ERB2*	200	20
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
Solución de detección	200	20
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
DAB+Cr	200	5
DAB+Cr	200	5
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
Hematoxilina	200	7
Tampón de lavado	exceso (2-3 ml)	0
Agua destilada	exceso (2-3 ml)	0

\*Solución comercial de anticuerpo pre-diluida

Para finalizar, los portaobjetos fueron extraídos de la cámara del equipo automático de inmunotinción, ordenados en una gradilla e introducidos en un tanque con agua destilada. El tanque con los portaobjetos se ensambló en la cámara de un equipo teñidor automático con el objetivo de deshidratar y parafinar las muestras, por lo que se programó para llevar a cabo exclusivamente estas dos tareas, que implicaron 3 lavados consecutivos en soluciones etanólicas al 70%, 80% y 100% y dos inmersiones en isoparafina. Los portaobjetos fueron transferidos a un equipo montador automático.

### *Análisis microscópico*

Las muestras fueron evaluadas por un patólogo experto que estableció la expresión de cada marcador en términos cuantitativos (porcentaje de células positivas) y cualitativos (positivo/negativo), a excepción del Her2 que se valoró de la siguiente forma:

- 0 = Negativo (No sobre-expresión). No tinción o menos del 10% de células con tinción incompleta de membrana (componente infiltrante).
- 1+ = Negativo (No sobre-expresión). Tinción de membrana incompleta y débil en más del 10% de células tumorales (componente infiltrante).
- 2+ = Positivo (Sobre-expresión). Tinción débil/moderada completa de membrana en más del 10% de células tumorales positivas (componente infiltrante).
- 3+ = Positivo (Sobre-expresión). Tinción fuerte completa de membrana en más del 10% de células tumorales positivas (componente infiltrante).



Figura 27. *Microscopio óptico para el análisis histopatológico de las muestras de tejido mamario.*

## V.2.2 Caracterización anatomopatológica de muestras de tejido mamario ultracongeladas

### V.2.2.1 Material

- Criostato Micron HM 550 (Microm Internacional GmbH, Walldorf, Alemania)

- Montador automático Leica CV5030 (Leica, Wetzlar, Alemania)
- Balanza de precisión Sartorius H51 (Sartorius AG, Goettingen, Alemania)
- Microscopio óptico ECLIPSE E600 (Nikon Co., Tokio, Japón)
- Portaobjetos Menzel-Glaser (Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Alemania)
- Solución O.C.T Tissue-Tek (polivinil alcohol < 11%, carbowax < 5%, ingredientes no reactivos > 85%) (Sakura Finetek, Torrence, CA).
- Etanol 100% (Panreac Química S.A.U., Barcelona, España)
- Solución descontaminante RNaseZap. (Ambion, Inc. Austin, USA)
- Agua destilada estéril (Fresenius Kabi, Sevres, Francia)
- Nitrógeno líquido (Carburos Metálicos S.A, Madrid, España.)
- Solución hematoxilina de Harris (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- Etil Eosina (Carlo Elba Reagents, Milán, Italia)
- Solución de amoniaco al 25% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- Ácido acético glacial (Panreac Química S.A.U., Barcelona, España)
- Isoparafina H (Panreac Química S.A.U., Barcelona, España)
- Medio de montaje (Panreac Química S.A.U., Barcelona, España)
- Etanol 100% (Etanol absoluto parcialmente desnaturalizado QP, Panreac Química Sau, Barcelona, España)
- Agua destilada estéril (Fresenius Kabi AG, Sevres, Francia)

#### V.2.2.2 Método

##### *Criosección*

Con el objetivo de preservar la integridad del RNA de las muestras, el proceso fue llevado a cabo sobre superficies estériles y el material no estéril en contacto con las muestras descontaminado. Para ello, se empleó etanol al 100% y una solución detergente con actividad inhibidora de RNAasas. Las muestras fueron transportadas hasta el criostato en un contenedor con nitrógeno líquido y permanecieron en éste hasta su procesamiento. La temperatura de criosección fue programada a -20°C y todo el material en contacto con las muestras enfriado, bien en la cámara del criostato o bien por inmersión en nitrógeno líquido, para mantener la cadena de frío durante todo el proceso. En primer lugar se aplicó el medio de inclusión OCT sobre el soporte de corte del criostato, seguidamente la muestra fue extraída del criotubo donde se había preservado hasta entonces y embebida en el medio OCT. Tras el montaje, se introdujo

el soporte de corte en la cámara del criostato y fue necesario esperar unos minutos hasta que el medio OCT solidificó completamente por efecto de la baja temperatura. Se ensambló el soporte de corte enfrentándolo a la cuchilla y se orientó en un ángulo adecuado. La anchura de corte seleccionada fue 3  $\mu\text{m}$ . Con el objetivo de preservar la mayor cantidad de tejido posible, se procedió cuidadosamente durante el corte de la muestra procurando obtener una sección representativa de la misma y desprejar el mínimo tejido posible. Tras eliminar el exceso de medio OCT se obtuvieron al menos dos cortes por cada muestra de tejido, que fueron recogidos estirando desde el borde de la cuchilla con un pincel sintético del n°2 y adhiriéndolos a un portaobjetos por efecto de la diferencia de temperatura entre las dos superficies. Por último, la muestra restante fue retirada del soporte de corte y el exceso de medio OCT eliminado con un bisturí para ser introducida en un nuevo criotubo y conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

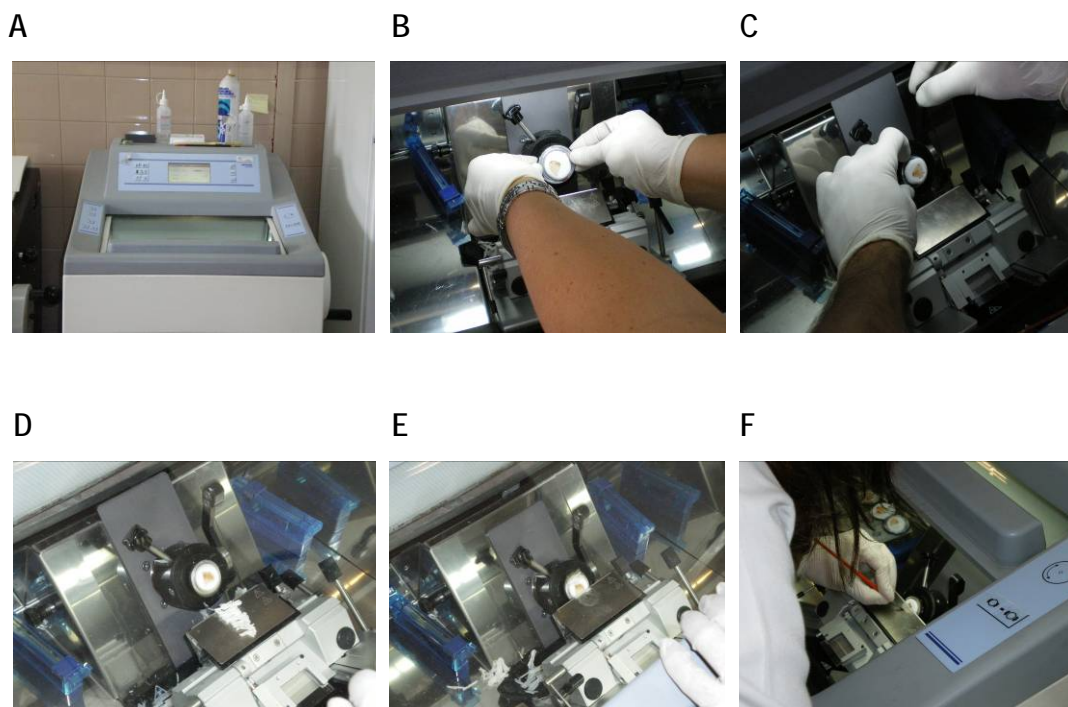


Figura 28. Secuencia de imágenes que ilustran el proceso de criosección de una biopsia mamaria. (A) criostato. (B) y (C) ensamblaje del soporte de corte con la muestra en la cámara del criostato. (D) eliminación del excedente de medio OCT. (E) corte de la biopsia a 3  $\mu\text{m}$ . (F) extracción del corte.

### *Tinción y montaje*

Los cortes de tejido adheridos a los portaobjetos fueron introducidos en una cubeta de tinción con solución de hematoxilina de Harris durante 2 minutos, transcurridos los cuales, se llevaron a cabo tres lavados consecutivos para eliminar el exceso de hematoxilina : primero con agua corriente, luego con agua amonacal (dilución 1/200) y un último lavado con agua corriente. Seguidamente fue añadida a la cubeta de tinción una cantidad de solución alcohólica de eosina

suficiente para cubrir todos los portaobjetos y se incubó durante 1 minuto. Una vez teñidas las muestras, los pasos previos a su observación al microscopio consisten en deshidratar, parafinar y montar los portaobjetos. Para deshidratar las muestras, los portaobjetos fueron lavados en una batería de soluciones con un contenido creciente de etanol según el siguiente esquema:

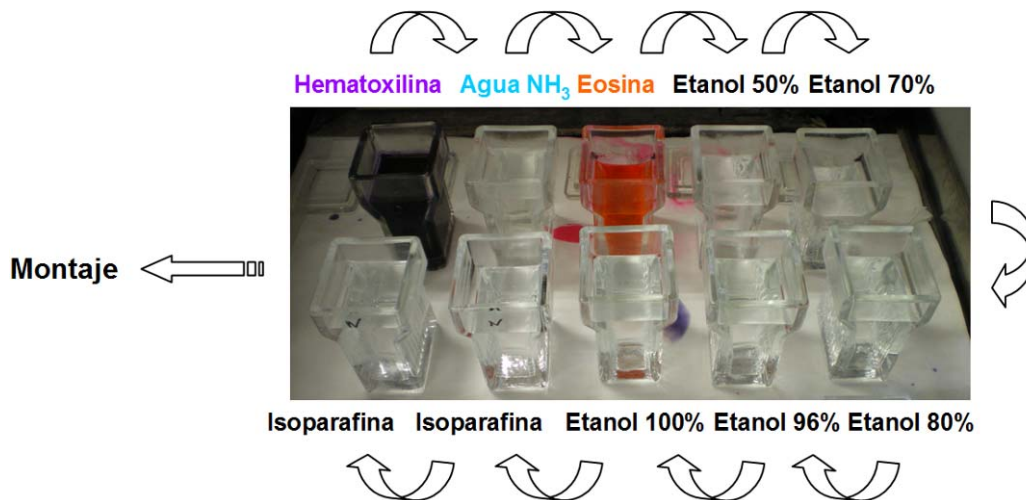


Figura 28. Batería de soluciones para la tinción hematoxilina-eosina

Por último, el montaje de los portaobjetos fue llevado a cabo mediante un sistema automatizado y las preparaciones histológicas almacenadas hasta el análisis microscópico.

#### *Análisis microscópico*

Las muestras fueron analizadas por un patólogo experto, con el objetivo de caracterizar morfológicamente las muestras según los siguientes parámetros:

- Porcentaje de la pieza ocupado por el tumor
- Porcentaje de células tumorales infiltrantes
- Porcentaje carcinoma *in situ*
- Porcentaje necrosis
- Porcentaje de células epiteliales sanas
- Porcentaje fibrosis
- Porcentaje células inflamatorias

A partir de estos datos se calcularon dos parámetros esenciales para la evaluación de las muestras de tejido: el porcentaje del total de células presentes en la pieza y el porcentaje de células tumorales respecto del total de células presentes en la pieza.

Estos parámetros fueron empleados para seleccionar aquellas muestras de tejido con un contenido suficiente en células neoplásicas, que asegurara que los resultados derivados del análisis con microarrays, correspondieran predominantemente al perfil genotípico de las células transformadas

## VI. Análisis del balance oxidativo

Las técnicas empleadas para el análisis de los marcadores del estado oxidativo fueron llevados a cabo en el Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Granada, por lo que gran parte del equipamiento y material empleado fue común a todos los ensayos llevados a cabo en este centro. A continuación se detallan los datos técnicos del material de uso general en el laboratorio:

- Agitador de microplacas Shaker PSU2T Plus. BOECO (Alemania).
- Agitador magnético con calefactor AGIMATIC-E. JP-SELECTA, S.A (Barcelona, España).
- Balanza digital GRAM PRECISION (Gram Precision, SL. Barcelona, España).
- Balanza electrónica de precisión SARTORIUS BP110S. SARTORIUS AG (Göttingen, Alemania).
- Baño termostatzado de metacrilato P-SELECTA (JP-Selecta, SA. Barcelona, España).
- Calibre electrónico pie de rey digital (Afora).
- Cámara HITACHI (Standard Video with Meteor II).
- Centrífuga refrigerada de mesa BECKMAN mod GS-6R (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, EEUU).
- Congelador de -20°C LIEBHER (LIEBHER, Biberach, Alemania).
- Congelador de -80°C REVCO (REVCO, Asheville, NC, EEUU).
- Cubetas de electroforesis CONSORT (Belgium).
- Estufa MEMMERT (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Alemania).
- Fuente de alimentación CONSORT E802 (300V-2000mA) (Bélgica).
- Lector de microplacas SYNERGY HT, Multi-Dection Microplate Reader, BIO-TEK (BioTek Instruments, Inc. Highland Park, Vermont, EEUU).
- Máquina productora de hielo SCOTSMAN AF-10 (Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, EEUU).

- Microcentrífuga para eppendorfs HETTICH EBA12 ZENTRIFUGEN (HettichLab GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Alemania).
- Micropipetas electrónicas EPPENDORF RESEARCH® PRO. EPPENDORF AG (Hamburgo, Alemania).
- Microscopio-UV Leica DMLS con filtro de excitación de 435nm, y amplificador de 400 (Leica Microsystems. Nusstoch, Alemania).
- pH-metro GLP 21, CRISON (Barcelona, España).
- Pipetas automáticas NICHIPET EX (Nichiryō, Tokio, Japón).
- Baño seco digital (LABNET INTERNATIONAL, Inc. Woodbridge, NJ, EEUU).
- Vortex VWR (VWR International Eurolab S.L. Barcelona, España).

## VI.1 Extracción de plasma y linfocitos de sangre periférica

### VI.1.1 Fundamento

Para aislar los linfocitos de muestras de sangre periférica se empleó una solución comercial de polisacarosa y diatrizoato sódico, con una densidad de  $1,077 \pm 0,001$  g/ml, conocida como HISTOPAQUE®-1077.

Una vez separadas las fracciones celulares y plasmáticas de las muestras de sangre total, los linfocitos y otras células mononucleares son aislados gracias al gradiente de densidad creado a lo largo del tubo del tubo de ensayo por este reactivo. Las plaquetas y eritrocitos se agregan por efecto de la polisacarosa y sedimentan rápidamente durante la centrifugación, mientras que los linfocitos son retenidos en la interfase.

### VI.1.2 Material

- Tubos con anticoagulante BD Vacutainer®EDTA Tubes (BD, New Jersey, USA)
- Contenedor de isopropanol Nalgene™ Cryo 1°C Container (Cole-Palmer, Illinois, USA)
- Suero fetal Bovino (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, USA).
- DMSO 10% (Dimethyl sulfoxide, minimum 99.5% GC, SIGMA®. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, USA).
- HISTOPAQUE®-1077 (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, USA).

- RPMI (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, USA).
- Isopropanol (2-Propanol -Reag. Ph. Eur.- PA-ACS-ISO. Panreac Química S.A.U., Barcelona, España)

### VI.1.3 Método

Las muestras de sangre total de las pacientes de los tres grupos experimentales y las voluntarias del grupo C, fueron extraídas mediante punción venosa por el personal de enfermería del hospital de día del Servicio de Oncología Médica del Hospital Médico-Quirúrgico de Jaén. En cada extracción se obtuvieron 5 ml de sangre total que fueron depositados en un tubo con EDTA para evitar su coagulación. Inmediatamente después, cada muestra fue centrifugada a 1000 ×g durante 15 minutos. Tras la centrifugación es posible observar tres fases claramente separadas en el tubo. La fase superior, de color amarillento, corresponde al plasma, que fue transferido con una pipeta a otro tubo y alicuotado en viales de 500 µl para su inmediata congelación a -80°C. La interfase de color blanquecino corresponde con los linfocitos, que fueron recogidos con una pipeta y transferidos a un tubo de ensayo con medio RPMI. Se mezclaron cuidadosamente los linfocitos con el medio RPMI, obteniendo una suspensión que fue transferida a un segundo tubo de ensayo con 3 ml de HISTOPAQUE®-1077 dejándola resbalar suavemente por las paredes del tubo para evitar mezclar las dos fases. Tras este paso, los tubos fueron centrifugados a 700 ×g durante 30 minutos y sin freno, obteniendo de nuevo una interfase blanquecina que contiene los linfocitos y que fue transferida a otro tubo de ensayo con 5 ml de medio RPMI. Esta mezcla fue centrifugada a 700 ×g durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 5ml de solución de lavado compuesta de medio RPMI + suero fetal bovino (9:1). Tras una centrifugación a 700 ×g durante 15 minutos se obtuvo un sedimento blanquecino correspondiente al los linfocitos, que fue resuspendido en 2 ml de solución de congelación compuesta de suero fetal bovino + DMSO (9:1). En estas condiciones las muestras fueron alicuotadas en viales de 1 ml y congeladas a una tasa de 1°C/minuto en contenedores de isopropanol, hasta alcanzar una temperatura final de -80°C.

## VI.2 Análisis del daño oxidativo en el ADN de linfocitos de sangre periférica

### VI.2.1 Fundamento

Para cuantificar las cadenas de ADN dañadas en linfocitos, se empleó la técnica Comet siguiendo el método descrito por Collins y colaboradores (1996). Se trata de un método adaptado



de la técnica de electroforesis en microgel de Östling y Johanson (Östling y Johanson, 1984) quienes observaron que, el ADN de células de linfoma de ratones previamente irradiadas con radiación gamma, suspendidas en gel de agarosa en un portaobjetos, lisadas con un detergente neutro y expuesto a un campo eléctrico débil, migró más hacia el ánodo que el ADN de aquellas células no irradiadas. Propusieron que la radiación produce roturas en la cadena de ADN, permitiendo la relajación del ADN superenrollado y dando lugar a una migración más pronunciada de éste en el gel y como resultado, una imagen muy particular semejante a un cometa.

Las variantes más comunes de ensayo Comet son: Comet alcalino, Comet neutro, y uso de enzimas lesión-específicas. El ensayo Comet alcalino es el resultado de la modificación llevada a cabo por Singh y colaboradores (Singh y cols., 1988), quienes optimizaron la desnaturalización alcalina del ADN y las condiciones de electroforesis, permitiendo la evaluación del daño de las cadenas de ADN y de los lugares sensibles a medio alcalino. Actualmente se usa el protocolo introducido por Singh pero simplificado (Duthie, 2003; Collins, 2004)

## VI.2.2 Material

### Tampón de Electroforesis/Tratamiento alcalino (pH≥13)

- Hidróxido sódico 0.3 M (Sodium hydroxide, SigmaUltra, minimum 98%; SIGMA-ALDRICH®. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, USA).
- EDTA Na<sub>2</sub> 1 mM (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate 99+% SIGMA®. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, USA).

### Tampón de Neutralización (pH 7.5)

- Tris Base 0.4 M (SIGMA 7-9® SIGMA®, BioChemika. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, USA).
- Ácido clorhídrico 37% (Ácido clorhídrico 37%, PA-ACS-ISO, PANREAC. Panreac Química SA, Barcelona, España).

### Tampón de Lisis (pH 10)

- Cloruro sódico 2.75 M (Sodium Chloride, SIGMA®. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, USA).

- EDTA Na<sub>2</sub> 0.11 M. (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate 99+% SIGMA®. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, USA).
- Tris Base 11 mM. (SIGMA 7-9®, BioChemika. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, USA).
- Triton® X-100 1% v/v (Triton® X-100 SigmaUltra. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, USA).
- DMSO 10% (Dimethyl sulfoxide, minimum 99.5% GC, SIGMA®. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, USA).

#### Agarosas

- Agarosa de bajo punto de fusión 1% (Agarose Low melting point. Invitrogen™. Invitrogen, Ltd. Paisley, Scotland, UK).
- Agarosa de grado electroforesis 1% (Agarose electrophoresis grade. Invitrogen™. Invitrogen, Ltd. Paisley, Scotland, UK).

### VI.2.3 Método

La técnica usada en nuestro estudio es el ensayo Comet alcalino. De forma general, el ensayo Comet alcalino cursa con varias fases comenzando con el aislamiento de las células, incorporación de la agarosa, lisis con detergente y un alto contenido en sales, tratamiento alcalino para desenmarañar las hebras de ADN y electroforesis, neutralización, tinción y análisis.

Los linfocitos, aislados según el método anteriormente descrito, fueron resuspendidos en una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en PBS a pH 7,4. La muestra fue depositada en un portaobjetos impregnado de agarosa de alto punto de fusión al 1% previamente calentada a 37°C. Se llevo la mezcla a 4°C durante 5 minutos y, transcurrido este tiempo, se introdujeron los portas en solución de lisis a 4°C durante 1 hora para eliminar las proteínas celulares. Posteriormente, los portas fueron situados en el tanque de electroforesis con tampón alcalino durante 40 minutos y a 4°C con el objetivo de eliminar completamente las membranas nucleares y celulares. Tras el tratamiento alcalino, fue iniciada la electroforesis a 37V (1V/cm), 30 mA, 30 minutos, empleando como fuente de alimentación un equipo Consort E802 Electrophoresis power supply. Finalizada la electroforesis, los portas fueron lavados 3 veces a 4°C durante 5 minutos en solución de neutralización. Los nucleoides de cada gel fueron

teñidos con una solución 1mg/ml de DAPI (4,6- diamidino-2- fenil indol) y examinados en un microscopio de fluorescencia UV con filtro de excitación de 435 nm y 400 × de magnificación.

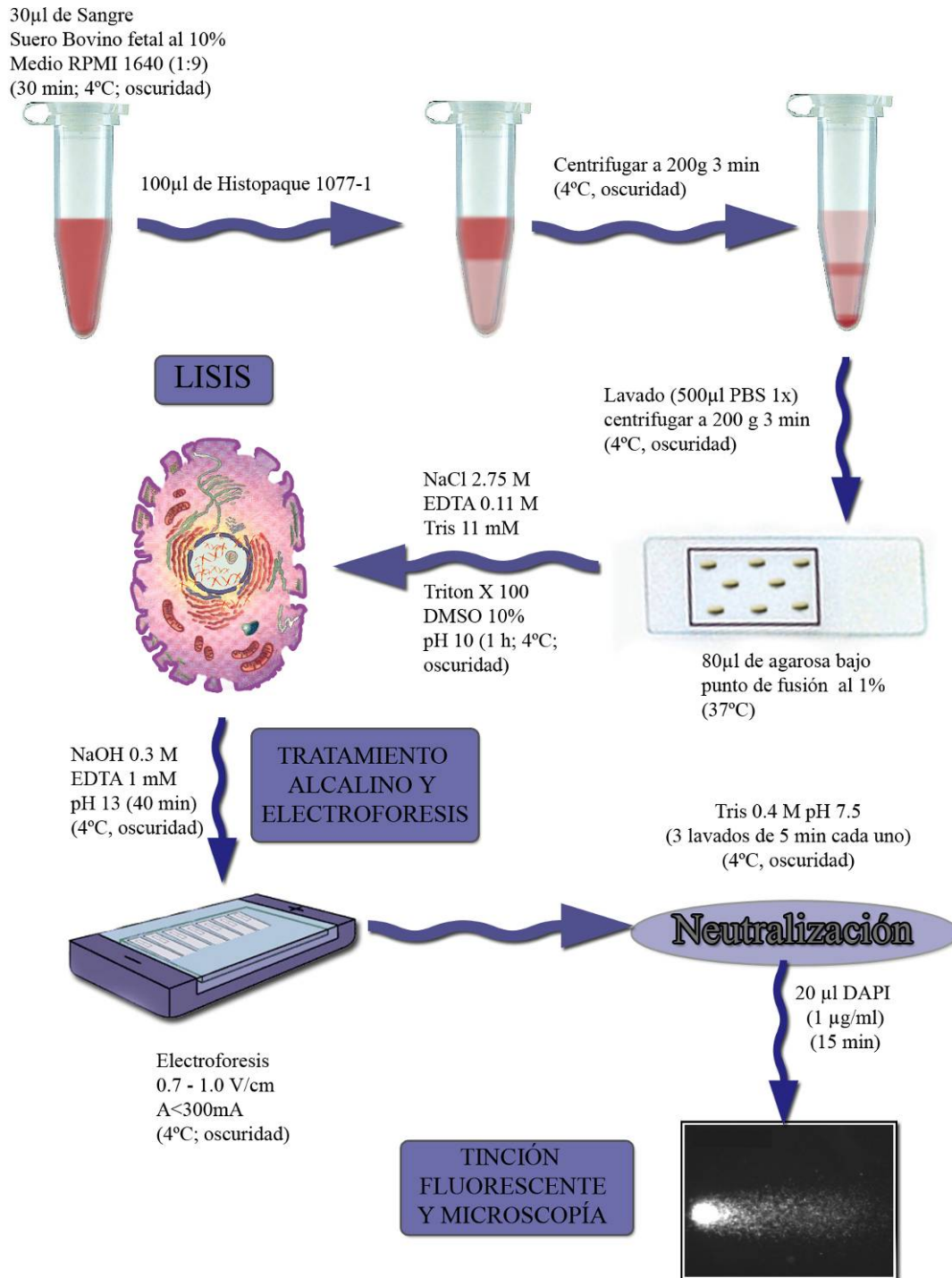


Figura 29. Esquema del protocolo empleado en la técnica de comet alcalino

#### VI.2.4 Cálculos y expresión de los resultados

La medida de los cometas se puede llevar a cabo mediante un recuento manual o bien haciendo un análisis de imagen. El recuento mediante análisis de imagen se llevo a cabo a través de una serie de paquetes de software disponibles en el mercado. En nuestro estudio el análisis se realizó con una cámara Hitachi (Satandard Video with Meteor II) empleando el software para imágenes Kinetic Imaging Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK). Estos programas nos dan una gran variedad de parámetros relativos a los cometas. Los más usados son la longitud de la cola, intensidad relativa de fluorescencia (normalmente expresado como porcentaje de ADN en la cola), momento de la cola (producto del porcentaje del ADN en la cola y la longitud de la misma) y porcentaje de ADN en la cabeza. De ellos, el porcentaje de ADN en la cola representa el parámetro más útil, ya que guarda una relación lineal con la frecuencia de rotura, se afecta relativamente poco por los ajustes del umbral, y permite la discriminación del daño por encima del rango más amplio posible (teóricamente, desde 0 a 100 % de ADN en la cola). Se recomienda contar 50 cometas por muestra (Collins, 2004).

### VI.3 Análisis de la actividad reparadora del ADN

#### VI.3.1 Extracción de la fracción proteica del compartimento nuclear de linfocitos de sangre periférica

##### VI.3.1.1 Fundamento

Las proteínas nucleares de linfocitos de sangre periférica fueron extraídas resuspendiendo las células en tampón PBS suplementado con inhibidores de fosfatasas, para prevenir posibles modificaciones proteicas durante el proceso de extracción. Con el objetivo de romper la membrana celular y liberar las proteínas citoplasmáticas, se sometió a los linfocitos a un choque osmótico al añadir una solución hipotónica y una solución detergente. Tras la separación de las fracciones nuclear y citoplasmática por centrifugación diferencial, los núcleos fueron lisados y las proteínas nucleares obtenidas al añadir una solución tampón con un contenido suficiente en inhibidores de proteasas y DTT (ditiotreitól), que asegurara su integridad y máxima eficiencia en el proceso de aislamiento.

### VI.3.1.2 Material

Para la obtención de la fracción proteica nuclear, se empleó DEL kit comercial Nuclear Extract Kit (Active Motif, Tokio, Japón).

### VI.3.1.3 Método

Los linfocitos, aislados de muestras de sangre total según el protocolo resumido en el punto II.7.1, fueron cuantificados como paso previo a la extracción de proteínas nucleares. Para ello, se empleó un contador Coulter (O) que estimó el tanto el número total de células blancas/ $\mu\text{l}$  de suspensión celular, como el número de linfocitos/ $\mu\text{l}$  de suspensión celular. Las células, congeladas en una solución suero fetal bovino: DMSO 9:1, fueron centrifugadas a 500 rpm durante 5 minutos y a  $4^{\circ}\text{C}$ , se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 ml de la solución PBS/fosfatasas. La suspensión celular así obtenida, fue de nuevo centrifugada a 500 rpm durante 5 minutos y a  $4^{\circ}\text{C}$ , el sobrenadante descartado y el sedimento resuspendido en 500  $\mu\text{l}$  de tampón hipotónico. Tras incubar la mezcla durante 15 minutos en hielo, se añadieron 25  $\mu\text{l}$  de solución detergente, se agitó en un vórtex durante 10 segundos a máxima velocidad y se centrifugaron durante 30 segundos a  $14000 \times g$  y  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante obtenido, correspondiente a la fracción citoplásmica, fue descartado y el sedimento resuspendido en 50  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis. La suspensión celular se agitó en un vórtex a máxima velocidad durante 10 segundos y se incubó durante 30 minutos en hielo y agitación ( $\sim 150$  rpm). Tras otra agitación en un vórtex durante 30 segundos a máxima velocidad, las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a  $14000 \times g$  y  $4^{\circ}\text{C}$ , para obtener el sobrenadante correspondiente a la fracción proteica nuclear.

## VI.3.2 Cuantificación de proteínas nucleares

### VI.3.2.1 Fundamento

Para medir la concentración de proteínas en los extractos nucleares obtenidos se empleó el método del BCA (ácido bicinconínico). Este método se basa en la reducción del  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  mediada por proteínas en medio alcalino. Esta reacción posibilita la detección colorimétrica de un compuesto soluble formado por ión  $\text{Cu}^{+1}$  y el BCA, cuya absorbancia es directamente proporcional a la concentración de proteínas presente en la muestra.

## VI.3.2.2 Material

Para la cuantificación de proteínas en la fracción nuclear, se empleó el kit comercial BCA Protein Assay Reagent (bicinchoninic acid) (Pierce Biotechnology, Illinois, USA).

## VI.3.2.3 Método

Inmediatamente después de la extracción nuclear, las muestras fueron depositadas en hielo mientras se prepararon los reactivos necesarios para medir la concentración de proteínas en el extracto nuclear. En primer lugar se preparó la curva estándar a partir de una solución patrón 2 mg/ml de ABS (albúmina bovina sérica) según la siguiente tabla:

Tabla 4. *Curva estándar de BSA para la cuantificación de proteínas nucleares*

Vial	Agua ( $\mu$ l)	BSA ( $\mu$ l)	Concentración final de BSA ( $\mu$ g/ml)
A	0	300 de la solución patrón BSA	2000
B	125	375 de la solución patrón BSA	1500
C	325	325 de la solución patrón BSA	1000
D	175	175 del vial B	750
E	325	325 del vial C	500
F	325	325 del vial E	250
G	325	325 del vial F	125
H	400	100 del vial G	25
I	400	0	0

A continuación, se pipetearon 25  $\mu$ l de cada muestra y estándar por duplicado en una placa de 96 pocillos, se añadieron 200  $\mu$ l de solución de trabajo a cada pocillo -Solución BCA A (BCA en 0,1M de NaOH ) y solución BCA B ( $\text{CuSO}_4$  al 4%) en proporción 50:1- y, tras agitar, las muestras fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos. Por último, se enfrió la placa a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 562 nm.

## VI.3.2.4 Cálculos y expresión de los resultados

En primer lugar obtuvimos la Densidad Óptica corregida (DOc) restando al valor de DO de cada muestra el valor de absorbancia del vial patrón I o blanco. La media y el coeficiente de variación entre la réplicas fueron calculados para los valores de DOc de cada muestra y estándar, obteniendo los valores  $X_{DOc}$  y CV respectivamente.

Para cuantificar el contenido de proteínas en cada extracto nuclear, enfrentamos los valores de  $X_{DOc}$  de cada estándar a su concentración de BSA en  $\mu\text{g/ml}$ , obteniendo una recta patrón en cuya ecuación interpolamos los valores de  $X_{DOc}$  de las muestras.

El resultado final fue expresado como  $\mu\text{g}$  de proteínas/ml de extracto nuclear.

### VI.3.3 Determinación de la actividad enzimática de las proteínas nucleares Ku68 y RPA

#### VI.3.3.1 Fundamento

La proteína Ku es un heterodímero compuesto de las proteínas Ku70 y Ku86, que se une directamente a los extremos libres del ADN y participa en el proceso de reparación de las roturas de doble hebra del ADN.

Por otra parte, la proteína RPA es una proteína compuesta de las subunidades RPA70, RPA32 Y RPA14, que se une directamente a los extremos libres del ADN y es crítica en el proceso de reparación de las roturas de una sola hebra de ADN. RPA participa en varias rutas de reparación del ADN por su asociación con proteínas como la glicosilasa UDG o las proteínas XPA y RAD52, implicadas en mecanismos de reparación por escisión o reparación por recombinación homóloga.

Para analizar la actividad enzimática de ambas proteínas se empleó un kit comercial basado en la técnica de inmunoenzimoensayo. Cada kit contiene una placa de 96 pocillos en los que una molécula de ADN con roturas monohebra o roturas en las dos hebras está inmovilizada. El enzima RPA o Ku68 contenida en el extracto nuclear se une específicamente a esta molécula de ADN y su unión es detectada por un anticuerpo anti-RPA o anti-Ku68, que reconoce una región del enzima sólo cuando ésta se halla unida al ADN. La unión de un anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano al complejo ADN-RPA-AntiRPA o ADN-Ku68-AntiKu68, inicia una reacción colorimétrica medible por espectrofotometría.

#### VI.3.3.2 Material

Ambos kits comerciales son de Active Motif: Ku70/86 DNA Repair Protein Kit, y RPA Repair Protein Kit (Active Motif, Tokio, Japón)

### VI.3.3.3 Método

#### *Unión de Ku a la sonda inmovilizada en la placa*

##### Diseño de la placa

- Blanco: 40  $\mu$ l de tampón de unión AM6 y 10  $\mu$ l de tampón de lisis.
- Control positivo: 40  $\mu$ l de tampón de unión AM6 y 1  $\mu$ l de extracto nuclear de células Raji diluido en 9  $\mu$ l de tampón de lisis.
- Control negativo: 40  $\mu$ l de tampón de unión AM6 y 2  $\mu$ l de la solución que contiene un oligonucleótido competitivo.
- Muestras: 40  $\mu$ l de tampón de unión AM6 y 10  $\mu$ l de extracto nuclear (aproximadamente de 10  $\mu$ g de proteínas nucleares).

Tras añadir a cada pocillo los reactivos según el diseño de la placa, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación (100 rpm). Transcurrido este tiempo se llevaron a cabo 3 lavados sucesivos añadiendo a cada pocillo 200  $\mu$ l de tampón de lavado 1 $\times$ .

#### *Unión del anticuerpo primario*

A continuación se añadieron a cada pocillo 100  $\mu$ l de solución de anticuerpo primario (anti-Ku68 o bien anti-RPA) dilución 1:1000. Para ello añadimos 10  $\mu$ l de solución de anticuerpo a 100 ml de tampón de unión al anticuerpo 1 $\times$  y se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación (100 rpm).

#### *Unión del anticuerpo secundario*

Tras lavar la placa 3 veces añadiendo 200  $\mu$ l de tampón de lavado 1 $\times$  a cada pocillo, se añadieron 100  $\mu$ l de anticuerpo anti-rabbit HRP-conjugado (dilución 1:1000) y se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación (100 rpm). Durante este tiempo, se descongeló la solución de revelado a temperatura ambiente y oscuridad. Los lavados con 200  $\mu$ l de tampón de lavado 1 $\times$  se repitieron otras 4 veces más.

#### *Reacción colorimétrica*

Por último se añadieron 100  $\mu$ l de solución de revelado a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente y oscuridad durante 4 minutos en el caso del kit para la determinación de la actividad de Ku68 y 10 minutos en el caso del kit para la determinación de la actividad de



RPA (según recomendaciones del fabricante). Para finalizar la reacción, se añadieron a cada pocillo 100  $\mu$ l de solución de parada e inmediatamente después se leyó la absorbancia a 450 nm

#### VI.3.3.4 Cálculos y expresión de los resultados

En primer lugar obtuvimos la DOc restando al valor de DO de cada muestra el valor de absorbancia de su correspondiente del blanco. A continuación se estimaron los  $\mu$ g de proteína nuclear en los 10  $\mu$ l de extracto empleados en la reacción, a partir de la concentración de proteínas nucleares obtenida anteriormente para cada muestra. Por último, dividimos la DOc por los  $\mu$ g de proteína nuclear.

El resultado final fue expresado como DOc/ $\mu$ g de proteína nuclear

### VI.4 Determinación de la concentración de proteínas totales en plasma

#### VI.4.1 Fundamento

En medio alcalino, los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con las sales de cobre, y dan lugar a un intenso color violeta azulado. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de proteína total presente en la muestra.

#### VI.4.2 Material

Para la determinación cuantitativa de proteínas totales en muestras de plasma humanas, se empleó un kit comercial de la casa Spinreact (Proteínas totales; Biuret. Colorimétrico. SPINREACT, S.A. Barcelona, España).

#### VI.4.3 Método

En primer lugar, se depositaron por duplicado 5 $\mu$ l de cada muestra en los pocillos de una placa y se adicionaron 200 $\mu$ l de reactivo Biuret (Potasio sodio tartrato 15 mM, Yoduro sódico 100 mM, Yoduro de potasio 5 mM y Sulfato de cobre (II) 5 mM). Paralelamente se preparó una solución estándar de albúmina bovina (7 g/dl) que fue procesada del mismo modo que las muestras. La mezcla obtenida se agitó vigorosamente y se incubó durante 5 minutos a una temperatura de 37°C. Transcurrido este tiempo, se efectuó la lectura de la DO del estándar, las muestras y el blanco (reactivo Biuret) a una longitud de onda de 540 nm.

#### VI.4.4 Cálculos y expresión de los resultados

Para hallar la concentración de proteínas totales en plasma, obtuvimos la Densidad Óptica corregida (DOc) restando al valor de DO de cada muestra el valor de absorbancia del blanco. La media y el coeficiente de variación entre la réplicas fueron calculados para los valores de DOc de cada muestra, estándar y blanco, obteniendo los valores  $X_{DOc}$  y CV respectivamente. A continuación, insertamos los valores de  $X_{DOc}$  obtenidos en la siguiente ecuación:

$$\text{Proteínas totales (mg/ml)} = [(X_{DOc} \text{ Muestra} / X_{DOc} \text{ Patrón}) \times 7] \times 10$$

Los resultados finales fueron expresados en mg proteínas totales/ml plasma

### VI.5 Cuantificación del contenido de proteínas carbonilo en el plasma

#### VI.5.1 Fundamento

Uno de los métodos más eficaces para cuantificar el contenido de grupos carbonilo en proteínas plasmáticas, es el basado en la reacción entre el DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) y las proteínas carbonilo. El DNPH reacciona con éstas formando una base de Schiff para producir la correspondiente hidrazona, que puede ser cuantificada espectrofotométricamente.

#### VI.5.2 Material

Para el análisis del contenido plasmático en proteínas carbonilo, se empleó un kit comercial de CAYMAN (Protein Carbonyl Assay Kit. Cayman Chemical Company, MI, USA).

#### VI.5.3 Método

100  $\mu$ l de plasma fueron transferidos a dos tubos de plástico de 2ml identificados como tubo Muestra (M) y tubo Control (C). A continuación se añadieron 400 $\mu$ l de una solución HCl 2,5 M y DNPH al tubo M y 400 $\mu$ l de HCl 2.5M al tubo C e incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente durante 1 hora. Durante este periodo cada tubo fue agitado vigorosamente en un vórtex cada 15 minutos. Posteriormente se añadió a cada tubo 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20 % y, tras agitar en un vórtex, los tubos fueron incubados en hielo durante 5 minutos. Esta mezcla fue centrifugada a 10.000 x g y 4°C durante 10 minutos, obteniendo un sedimento que fue resuspendido en 0,5 ml de TCA al 10%. La nueva solución fue incubada en hielo durante

5 minutos y posteriormente centrifugada a 10.000 x g y 4°C durante 10 minutos. El sedimento obtenido tras la centrifugación fue resuspendido en 0,5 ml de una mezcla de etanol:acetato de etilo (1:1) y de nuevo centrifugada a 10.000 x g y 4°C durante 10 minutos. Este último paso fue repetido una vez más y sedimento obtenido fue resuspendido en 250 µl de hidrocloreuro de guanidina. Una última centrifugación a 10.000 x g y 4°C durante 10 minutos, permitió obtener un sobrenadante de cada tubo M y C de los que se tomaron 220 µl que fueron transferidos a un pocillo de una placa de lectura. La absorbancia de cada muestra y su correspondiente control fue medida a 370 nm en un equipo lector de placas.

#### VI.5.4 Cálculos y expresión de los resultados

En primer lugar obtuvimos la Densidad Óptica corregida (DOc) restando al valor de DO de cada muestra M el valor de absorbancia de su correspondiente control C. Para cuantificar el contenido de proteínas carbonilo de la muestra de plasma, insertamos los valores de DOc obtenidos en la siguiente ecuación:

$$\text{Proteínas carbonilo (nmol/ml)} = (\text{DOc} / *0.011 \mu\text{M}^{-1})(250 \mu\text{l} / 100 \mu\text{l})$$

\* donde 0.011 µM<sup>-1</sup> proviene de adecuar el coeficiente de extinción molar del DNPH, medido a una longitud de onda de 370nm (0.022 µM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), a la longitud de paso que presenta la solución en el pocillo.

El resultado final fue expresado como nmol de proteínas carbonilo/mg de proteínas totales. Para ello se emplearon los datos de concentración de proteínas totales en plasma obtenidos según el procedimiento anterior.

### VI.6 Análisis de la concentración de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

#### VI.6.1 Fundamento

El malondialdehído es el producto final del proceso de peroxidación de los ácidos grasos insaturados. La medida de la concentración de estos compuestos en plasma indica la velocidad

a la que se produce la peroxidación lipídica así como la acción de antioxidantes como la vitamina E, el coenzima Q o la glutatión peroxidasa que se oponen a las reacciones de peroxidación.

El malondialdehído reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando un pigmento de color rosa. La reacción es muy sensible, por ello y por ser una de las más utilizadas como aproximación a la cuantificación de las reacciones de peroxidación lipídica en plasma, ha sido empleada independientemente de su baja especificidad.

#### VI.6.2 Material

- TBA al 0,8% (2-Thiobarbituric Acid, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- Acético glacial al 20% en solución acuosa (Panreac Química S.A.U., Barcelona, España)

#### VI.6.3 Método

La técnica consiste en añadir a 50  $\mu$ l de muestra 375  $\mu$ l de TBA al 0,8%, 375  $\mu$ l de Acético glacial al 20% y completar con agua bidestilada hasta alcanzar un volumen final de 1 ml. Esta mezcla fue incubada a 100°C durante 15 minutos, tras lo que fue centrifugada a 2500  $\times$ g durante 15 minutos con el objetivo de precipitar las proteínas contenidas en el plasma. Por último se leyó la absorbancia a 540 nm.

#### VI.6.4 Cálculos y expresión de los resultados

En primer lugar obtuvimos la Densidad Óptica corregida (DOc) restando al valor de DO de cada muestra el valor de absorbancia de su correspondiente blanco. La media y el coeficiente de variación entre la réplicas fueron calculados para los valores de DOc de cada muestra, obteniendo los valores  $X_{DOc}$  y CV respectivamente. Para cuantificar el contenido de TBARS de las muestras de plasma, insertamos los valores de  $X_{DOc}$  obtenidos en la siguiente ecuación:

$$\text{TBARS (nmol/ml)} = (24 \times X_{DOc} / 56)(1000 \mu\text{l} / 50 \mu\text{l})$$

El resultado final fue expresado como nmol de TBARS/ml de plasma.

## VI. 7 Determinación de la capacidad antioxidante total del plasma

### VI.7.1 Fundamento

La capacidad antioxidante total del plasma fue determinada mediante el ensayo con el radical catiónico 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS<sup>•+</sup>) según Re y colaboradores (Re y cols., 1999). El ABTS se incubó con persulfato potásico para producir un catión radical, que es relativamente estable y de color verde azulado. Los antioxidantes presentes en la muestra reducen el catión ABTS<sup>•+</sup> causando la supresión del color de éste de manera proporcional a su concentración, por lo que determinamos la capacidad antioxidante total del plasma en función del grado de decoloración de la solución de trabajo de ABTS.

### VI.7.2 Material

#### Solución madre de ABTS

- ABTS 7 mM (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt. BioChemika, purum, ≥99.0% (HPLC), Fluka, St. Louis, USA)
- Persulfato potásico 140 mM (Potassium persulphate, max. 0.001% N, GR. MERCK. E.Merck, Darmstadt, Alemania).

La solución madre de radical ABTS se preparó mezclando una solución acuosa de ABTS 7 mM, con 88 µl de persulfato potásico 140 mM y fue incubada en oscuridad y temperatura ambiente, durante 16 horas con una ligera agitación continua. El ABTS y el persulfato potásico reaccionan estiquiométricamente en una proporción 1:0,5, resultando en una oxidación incompleta del ABTS que genera el catión radical ABTS<sup>•+</sup>, de color verde azulado y con un máximo de absorción a 734nm.

#### Solución de trabajo de ABTS<sup>•+</sup>

Antes de la realización del ensayo, la disolución madre preparada anteriormente se diluyó con PBS 1X (PBS 10X pH7.4 GIBCO®, CaCl<sub>2</sub>-MgCl<sub>2</sub> free, Invitrogen, NY, USA), con el fin de ajustar la DO a 0,70±0,02 (734nm).

## Estándares de TROLOX en solución etanólica

- TROLOX 1 mM ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid. Purum, ≥ 98.0% (HPLC); Fluka, St. Louis, USA).
- Etanol ultrapuro HPLC (Ethanol, gradient grade for liquid chromatography. LiChrosolv®. MERCK. Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

## VI.7.3 Método

Preparamos una solución de trabajo con una concentración final de ABTS 7mM y persulfato potásico, que fue incubada en oscuridad durante toda la noche. Tras ajustar la DO de la solución ABTS, fueron preparadas diluciones 1:10 de las muestras tomando 2µl de plasma y 18µl de PBS. 4µl de la muestra diluida fueron depositados por duplicado en una placa de 96 pocillos. A continuación se añadieron 196µl de solución de trabajo diluida de ABTS a cada pocillo, se agitó la mezcla durante 1 minuto y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 minutos. Durante este tiempo los antioxidantes presentes en la muestra reducen el catión radical de la solución de trabajo de ABTS, suprimiendo el color de ésta en una intensidad proporcional a su concentración. La capacidad antioxidante total del plasma de cada muestra, fue determinada por comparación con una curva estándar de TROLOX cuyo diseño se muestra a continuación:

Tabla 5. *Curva estándar de TROLOX para la determinación de la capacidad antioxidante total del plasma*

Reactivos	Blanco	Estándar 1	Estándar 2	Estándar 3	Estándar 4	Estándar 5
TROLOX 1 mM (µl)	-	125	250	500	750	1000
etanol (µl)	1000	875	750	500	250	-
Volumen final (µl)	1000					
Concentración (µM)	0	125	250	500	750	1000

Los estándares de TROLOX fueron depositados por duplicado en los pocillos de la placa que quedaron inmediatamente debajo de aquellos en los que se había depositado previamente la muestra y se procesaron del mismo modo. Por último, la lectura de muestras y estándares fue realizada a 734 nm en un lector de placas

## VI.7.4 Cálculos y expresión de los resultados

Para la cuantificación de capacidad antioxidante total de las muestras plasmáticas, en primer lugar se calculó la DOc restando al valor de DO de cada muestra el valor de absorbancia

de su correspondiente blanco. A continuación se calcularon la media y el coeficiente de variación entre las réplicas para los valores de DO<sub>c</sub> de cada muestra y estándar, obteniendo los valores X<sub>DO<sub>c</sub></sub> y CV respectivamente. Por último, se extrapolaron las X<sub>DO<sub>c</sub></sub> en la función de calibración obtenida con los patrones, usando para ello el software Slide Write® Plus para Windows y se multiplicaron los resultados por el factor de dilución (Fd= 10).

El resultado final fue expresado como µM de Trolox.

## VI.8 Extracción y determinación de antioxidantes liposolubles mediante HPLC

### VI.8.1 Fundamento

La cromatografía en fase reversa permite separar moléculas en base a su polaridad. La fase estacionaria es de partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos, lo que convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar. Por lo tanto, para este tipo de cromatografías se emplean mezclas de solventes polares, tales como agua, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y alcoholes alifáticos. Las moléculas se retienen en la columna en virtud de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílica modificada. Aunque, las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, son también a menudo muy numerosas y para eluir las moléculas es casi siempre necesario disminuir la polaridad del disolvente; para ello se sustituye el agua de la fase móvil por un solvente orgánico cuya concentración se va aumentando gradualmente. La cromatografía en fase reversa ha sido adaptada para el uso de columnas. La versatilidad y eficiencia de este tipo de cromatografía se ha visto incrementada con el uso de sistemas de alto rendimiento (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) que utilizan alta presión para mejorar la resolución y reducir los tiempos de separación.

### VI.8.2 Material

- Bomba Beckman System Gold 125 pump (Beckman Instruments, Fullerton, CA)
- Inyector automático WATERS™ 717 Plus (Waters Corporation, Milford, MA, EEUU).

- Columna capilar FUSED SILICA SP-2330 de 60 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y 0.20 mm de espesor de fase estacionaria.
- Detector de Diodos Array (System Gold Diode Array Detector Module 168) BECKMAN (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, EEUU).
- Detector electroquímico ESA Coulochem III (ESA Biosciences, Inc. Chelmsford, MA, EEUU).
- Software System Gold de Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, CA)
- 1-Propanol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- Perclorato de litio (Lithium perchlorate 95+% A.C.S reagent. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, USA).
- Ácido perclórico 70% (Ácido perclórico 70% PA-ACS-ISO, PANREAC. Panreac Química SA, Barcelona, España).
- Acetonitrilo (Acetonitrilo-isocrático-preparativa para análisis instrumental, PANREAC. Panreac Química SA, Barcelona, España)
- Metanol ultrapuro HPLC (Methanol gradient grade for liquid chromatography, Licheosolv Etanol ultrapuro HPLC (Methanol, gradient grade for liquid chromatography. Prepsolv®. MERCK. Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).
- Etanol ultrapuro HPLC (Ethanol, gradient grade for liquid chromatography. LiChrosolv®. MERCK. Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

### VI.8.3 Método

#### *Extracción*

La extracción de los antioxidantes liposolubles analizados fue llevada a cabo añadiendo 300 µl de 1-propanol a 100 µl de plasma y centrifugando tras agitar en un vórtex a 11.200 xg durante 5 minutos y a 4°C. Se extrajo el sobrenadante que fue almacenado a -80°C hasta su procesamiento. Todo el proceso se realizó preservando las muestras de altas temperaturas y de la luz directa, con el objetivo de proteger los antioxidantes contenidos en ella.

#### *Técnica de HPLC-EC*

La separación cromatográfica se realizó por HPLC-EC utilizando un equipo compuesto de una bomba Beckman System Gold 125 pump, un inyector automático Water 717 plus y una columna de acero inoxidable de 15 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno, empaquetada



con 3 mm ODS Supelcosil. El detector electroquímico fue el modelo Coulochem III de la casa ESA, una célula guarda modelo 5020 y una célula analítica 5011. Los cromatogramas se integraron mediante un software System Gold de Beckman. Para el coenzima Q, la fase móvil se compuso de 20 mM de perclorato de litio, 10 mM de ácido perclórico, etanol al 20 %, metanol al 80% a un flujo de 1 ml/min; el electrodo 1 se ajustó a  $-0.5$  V y el electrodo 2 a  $+0.35$  V. Para retinol y los tocoferoles la fase móvil consistió en 20 mM de perclorato de litio, 10 mM de ácido perclórico, 10% de agua purificada, 90% de acetonitrilo a 1,5 ml/min; el electrodo 1 se ajustó a  $-0.5$  V y el electrodo 2 a  $+0.40$  V. Se inyectaron 50  $\mu$ l de la solución obtenida tras la extracción en el equipo de HPLC que fueron procesados durante... Los distintos antioxidantes fueron identificados y cuantificados mediante rectas patrones de estándares puros.

## VII. Tratamiento estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos tras la cuantificación de marcadores de estrés oxidativo y respuesta antioxidante y los datos bioquímicos extraídos de los informes clínicos de las pacientes, fueron analizados empleando el programa informático SPSS 12.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Todos estos datos se expresaron como valor medio  $\pm$  error estándar de la media ( $n=30$ ). El análisis estadístico incluyó comparaciones entre los datos de muestras pareadas (previas y posteriores al tratamiento con quimioterapia) y comparaciones entre los datos de los 3 grupos experimentales antes y después de la quimioterapia.

Dada la complejidad de los datos derivados del estudio de expresión génica, se emplearon herramientas de análisis estadístico específicas para estos resultados, tal y como se detalla en adelante.

Antes de establecer comparaciones, se estudió la normalidad de las variables por el método de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de la varianza de las distintas variables por el método de Levene. Cuando las variables no siguieron el criterio de normalidad y/o homogeneidad, fueron analizadas mediante métodos no paramétricos.

Las diferencias entre los resultados de muestras previas y posteriores a la quimioterapia fueron analizadas empleando el método paramétrico de la T de Student. Cuando la distribución de las variables no siguió el criterio de normalidad y las varianzas no fueron homogéneas se aplicó el método no paramétrico de Wilcoxon. Las comparaciones entre grupos se llevaron a

cabo mediante un análisis de la varianza (ANOVA de una vía) utilizando como test *a posteriori* (*post-hoc*) de comparación entre grupos y el test Bonferoni para variables de distribución normal y varianzas homogéneas. Para variables de distribución no normal y varianzas no homogéneas, se emplearon los tests no paramétricos de la U-Mann Whitney y Kruskal-Wallis como test *a posteriori*. En todos los casos, se consideraron como significativas las comparaciones con un valor p (nivel de significación) inferior a 0,05, como muy significativas las comparaciones con un valor p inferior a 0,01 y altamente significativas las comparaciones con un valor p inferior a 0,001.

## VIII. Análisis del perfil de expresión génica

### VIII.1 Envío de las muestras

Las muestras fueron enviadas por mensajería urgente, en una caja de poliespam y cubiertas de nieve carbónica para impedir que se descongelaran. En menos de 24 horas fueron recepcionadas por el personal de Progenika Biopharma (Bilbao, España) y conservadas en frío hasta su procesamiento y posterior análisis genómico.

Previamente a la manipulación de las muestras, los códigos asignados a cada biopsia fueron cambiados para adecuarlos al análisis de expresión génica y facilitar el procesamiento de los datos resultantes, según la Tabla 6.

Tabla 6. *Códigos clínicos y códigos genómicos para cada muestra*

<i>Código original</i>	<i>Código para análisis genómico</i>	<i>Código original</i>	<i>Código para análisis genómico</i>
N1/1	08SE128	N26/1	08SE166
N1/2	08SE129	N26/2	08SE167
N2/1	08SE130	N27/1	08SE168
N2/2	08SE131	N27/2	08SE169
N3/1	08SE132	N28/1	08SE170
N3/2	08SE133	N28/2	08SE171
N/5I1	08SE134	N29/1	08SE172
N/5I2	08SE135	N29/2	08SE173
N5D/1	08SE136	N30/1	08SE174
N5D/2	08SE137	N30/2	08SE175
N6/1	08SE138	N32/1	08SE176
N6/2	08SE139	N32/2	08SE177
N8/1	08SE140	N33/1	08SE178
N8/2	08SE141	N33/2	08SE179
N9/1.a	08SE142	N34/1	08SE180
N9/2	08SE143	N34/2	08SE181

N10/1	08SE144	N35/1	08SE182
N10/2	08SE145	N35/2	08SE183
N11/1	08SE146	N37/1	08SE184
N11/2	08SE147	N37/2	08SE185
N14/1	08SE148	N40/1	08SE186
N14/2	08SE149	N40/2	08SE187
N16/1	08SE150	N41/1	08SE188
N16/2	08SE151	N41/2	08SE189
N17/1	08SE152	N46/1	08SE190
N17/2	08SE153	N46/2	08SE191
N18/1	08SE154	N4/1	08SE273
N18/2	08SE155	N4/2	08SE274
N19/1	08SE156	N45/1	08SE275
N19/2	08SE157	N45/2	08SE276
N21/1	08SE158	N45/2	08SE277
N21/2	08SE159	N43/1	08SE278
N22/1	08SE160	N43/2	08SE279
N22/2	08SE161	N43/2	08SE280
N24/1	08SE162	N14/1	08SE281
N24/2	08SE163		
N25/1	08SE164		
N25/2	08SE165		

Tal y como se puede observar en la Tabla 6 algunos códigos aparecen repetidos. Esto se debe a que se enviaron distintos fragmentos de la misma biopsia cuando hubo suficiente material biológico para ello, con el objetivo de asegurar la obtención de la cantidad de ARN total requerida para el análisis.

A continuación, aparecen detallados los protocolos para el análisis de expresión génica diferencial. Todos los procedimientos y equipos empleados fueron los oficialmente recomendados por Affymetrix (Gene Chip Expression Analysis, Technical Manual, <http://www.affymetrix.com/support/index.affx>). Tanto el procesamiento de las muestras como la hibridación, revelado, escaneado de los chips y análisis bioinformático y estadístico de los resultados fueron realizados en Progenika Biopharma.

## VIII.2 Extracción de ARN total

### VIII.2.1 Procesamiento de las muestras

El tejido recibido se pulverizó en mortero en presencia de nitrógeno líquido. A partir del pulverizado se extrajo RNA total con el RNeasy Mini kit y las columnas QIAshredder (Qiagen, Alemania). Para ello, se añadieron 600 µl de tampón RTL a 30 mg de tejido pulverizado y se

transfirió esta mezcla a una columna QIAshredder insertada en un tubo colector de 2 ml de capacidad. Tras centrifugar 2 minutos a máxima velocidad, se descartó la columna y de nuevo se centrifugó el lisado durante 3 minutos a máxima velocidad. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo al que se añadieron 600  $\mu$ l de etanol al 70%. Un máximo de 700  $\mu$ l de esta mezcla fueron depositados en columnas RNeasy insertadas en tubos colectores de 2 ml de capacidad. Las columnas fueron centrifugadas durante 15 segundos a 8000  $\times$ g. A continuación se añadieron 700  $\mu$ l de tampón RW1 a las columnas que fueron de nuevo centrifugadas durante 15 segundos a 8000  $\times$ g. Posteriormente y de modo secuencial, se efectuaron dos lavados añadiendo 500  $\mu$ l de tampón RPE a las columnas y centrifugándolas a 8000  $\times$ g durante 15 segundos en el caso del primer lavado y durante 2 minutos en el caso del segundo. Por último, se añadió a cada columna 35  $\mu$ l de agua libre de ARNasas y tras una centrifugación a 8000  $\times$ g durante 1 minuto, se obtuvieron los extractos de ARN total purificados correspondientes a cada una de las muestras.

#### VIII.2.2 Medida de la concentración y pureza del ARN

La concentración de ARN extraído de cada muestra fue determinada empleando un método espectrofotométrico consistente en medir la absorbancia de la muestra a 260 nm ( $A_{260}$ ), ya que una unidad de absorbancia a esa longitud de onda equivale a 40  $\mu$ g/ml de ARN medida en una cubeta de cuarzo de 1 cm de anchura. En este caso se empleó un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) que, basándose en esta correspondencia, utiliza tan solo 1  $\mu$ l de muestra sin diluir para medir la  $A_{260}$  y re-calcular la concentración de ARN (ng/ml) en función de la anchura de la plataforma en la que se deposita la muestra y es atravesada por el haz de luz. Aquellas muestras que presentaron una baja concentración de ARN fueron analizadas de nuevo empleando el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, California), que emplea la tecnología de microfluidos para dar lugar a una lectura extremadamente precisa de cualquier ácido nucleico presente en la muestra. Para determinar la pureza del ARN extraído se midió la absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ) para calcular la relación  $A_{260}/A_{280}$ . Valores entre 1,9 y 2,1 indican una buena pureza, pero un valor menor indica contaminación con proteínas.

#### VIII.2.3 Visualización de la integridad del ARN

Con el objetivo de comprobar la integridad del ARN extraído, es recomendable llevar a cabo una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,8% para verificar que la relación de

intensidad entre las bandas correspondientes a las subunidades ribosómicas 28S y 18S, es de 2:1. Para ello se cargaron 1 µl de cada extracto en un total de 6 geles. Tras la electroforesis, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo una lámpara de luz ultravioleta.

En el caso de las muestras analizadas en el Agilent 2001 Bioanalyzer, el software del equipo da lugar a una estimación de la degradación del ARN del extracto representada por el valor del parámetro *RNA Integrity Number* (RIN).

### VIII.3 Análisis genómico

#### VIII.3.1 Microarrays de oligonucleótidos

Los microarrays fueron adquiridos a través de Progenika Biopharma. La plataforma empleada fue la de Affymetrix® GeneChip Expression Analysis (Affymetrix Inc, Santa Clara, California) y el formato el Human Genome Array U133 Plus 2.0. Se trata de un microarray de oligonucleótidos en el que está representado el genoma humano completo. Cada chip incluye 54.675 secuencias o sondas, que representan aproximadamente 47.400 transcritos correspondientes a 38.500 genes. En los chips de la plataforma de Affymetrix, las sondas corresponden a 11 pares de secuencias de 25 nucleótidos de longitud, por lo que generalmente son denominadas grupos de sondas o *probe set*. Para interpretar correctamente los resultados derivados de un microarray de oligonucleótidos de la plataforma de Affymetrix, es necesario tener en cuenta que un mismo chip puede presentar varios grupos de sondas que representen a un mismo gen o un grupo de sondas que represente a distintos genes. Estas particularidades son especificadas en el código que identifica a cada grupo de sondas. Dicho código es conocido como AFFY ID y consiste en una secuencia numérica a la que sigue un sufijo que indica la especificidad con la que el grupo de sondas hibrida con el ARN de la muestra ([http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/hgu133\\_design\\_technote.pdf](http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/hgu133_design_technote.pdf)):

Tabla 7. Significado de los sufijos de los códigos de las sondas

Sufijo	Descripción
_at	Grupo de sondas correspondientes a un transcrito
_a_at	Grupo de sondas que hibridan con múltiples transcritos c
_s_at	Grupo de sondas correspondientes a transcritos derivados del procesamiento post-transcripcional de un solo gen o de la expresión de genes homólogos
_x_at	Grupo de sondas que comparte algunas sondas con dos o más genes distintos

Dado el diseño de los chips, en adelante nos referiremos a los genes como secuencias representadas por los identificadores de Affymetrix. Igualmente es necesario destacar que no todas las sondas incluidas en el chip corresponden a genes conocidos, por lo que Affymetrix dispone una base de datos que actualiza continuamente e incorpora nuevas anotaciones acerca de sus genes conforme se van descubriendo. Para actualizar las anotaciones relativas a nuestros resultados hemos empleado periódicamente la herramienta *Batch Query* disponible en NetAffx Analysis Center (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>). Las anotaciones utilizadas en este trabajo fueron las más recientes disponibles hasta el momento, siendo la última fecha de revisión el „,de,,del 2008.

### VIII.3.2 Síntesis de ARNc biotinilado

La molécula diana del estudio de expresión génica es el ARNm (ARN mensajero). Dado que el extracto obtenido a partir de las muestras de tejido contiene una mezcla de diferentes tipos de ARN, es necesario purificar el ARNm contenido en dicho extracto. Para ello, el ARN fue retrotranscrito a ADNc empleando cebadores oligo-(dT). Posteriormente el ADNc es transformado en ARNc empleando para ello nucleótidos marcados con biotina, obteniendo así el ARNc marcado que hibridamos con el chip.

#### VIII.3.2.1 Síntesis de ADNc

A partir de 1µg del ARN total extraído de cada una de las muestras, se sintetizó ADNc con el One-Cycle cDNA Synthesis kit (Affymetrix Inc, Santa Clara, California). Para ello, se añadió a cada muestra 2 µl de ARN poly-A de los controles *spike in*, 2 µl de cebadores T7 oligo-(dT) y agua libre de ARNasas hasta un volumen final de 11 µl. Esta mezcla fue incubada durante 10 minutos a 70°C y a 4°C durante 2 minutos. A continuación se añadieron 7 µl de la mezcla First-Strand Master Mix y se incubaron a 42°C durante 2 minutos. Tras esta última incubación, se añadió 1 µl de del enzima SuperScript II a cada muestra y se incubaron a 42°C durante 1 hora y a 4°C durante 2 minutos. Una vez enfriadas, se añadió a cada muestra 130 µl de la mezcla Second-Strand master Mix y se incubaron durante 2 horas a 16°C. Por último, se añadieron 2 µl de ADN-Polimerasa T4, se incubaron 5 minutos a 16°C y, pasado este tiempo, se añadieron 10 µl de EDTA para finalizar la reacción.

#### VIII.3.2.2 Síntesis de ARNc y marcaje con biotina

Este proceso fue llevado a cabo empleando el GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix, Santa Clara, California). Para ello, se añadieron a cada vial de ADNc obtenido en el proceso anterior, 4 µl de tampón de unión 10×, 12 µl de mezcla NTP, 4 µl de mezcla enzimática y agua libre de ARNasas hasta un volumen final de 40 µl. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 16 horas.

#### VIII.3.2.3 Purificación del ARNc

El ARNc sintetizado, se purificó con el GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix, Santa Clara, California). Para ello, se añadieron a las muestras 600 µl de tampón de unión. De esta mezcla, 500 µl fueron transferidos a una columna y ésta centrifugada a 8000 ×g durante 1 minuto. Este paso se repitió cargando en la columna el resto de muestra. Tras descartar el sobrenadante, la columna se introdujo a un tubo nuevo y se añadió sobre aquella 750 µl de tampón de lavado. Tras centrifugar durante 1 minuto a 8000 ×g, se descartó el líquido eluido y se repitió la centrifugación a velocidad máxima durante 5 minutos. Finalmente, se insertaron las columnas en tubos de 1,5 ml de capacidad, se añadieron 22 µl de agua libre de ARNasas y se centrifugaron durante 1 minuto a máxima velocidad. El ARNc obtenido y purificado fue cuantificado y visualizado siguiendo los métodos descritos en los apartados VIII.2.2 y VIII.2.3 de esta Tesis.

#### VIII.3.3 Fragmentación del ARNc biotinilado

La fragmentación del ARNc como paso previo a la hibridación con los chips de Affymetrix es fundamental para asegurar que la sensibilidad de la técnica sea óptima. El protocolo se basa en una reacción de hidrólisis inducida por metales y está diseñado para obtener fragmentos de 35-200 nucleótidos de longitud. Para ello, se añadieron al ARNc marcado 18 µl de tampón de fragmentación, incluido en el GeneChip Sample Cleanup Module e incubaron la mezcla resultante a 94°C durante 35 minutos. Tras la incubación, las muestras fueron conservadas a -20°C hasta el momento de la hibridación con los chips. El ARNc fragmentado fue cuantificado y visualizado siguiendo los métodos descritos en los apartados VIII.2.2 Y VIII.2.3 de esta Tesis.

### VIII.3.4 Hibridación con los chips

Tras fragmentar el ARNc se prepararon las mezclas de hibridación: 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de ARNc fragmentado; 50pM de oligo control B2; 1,5, 5, 25 y 100 pM de los controles bioB, bioC, bioD y cre respectivamente; 0,1 mg/ml de ADN de esperma de arenque; 0,5 mg/ml de ABS (albúmina bovina sérica), tampón de hibridación 1 $\times$ ; 10% de DMSO. Las mezclas fueron calentadas a 99°C durante 5 minutos. Durante ese tiempo se humedecieron los chips con tampón de hibridación 1 $\times$  y se incubaron a 45°C durante 10 minutos. Las mezclas de hibridación calentadas fueron transferidas a un baño seco programado a 45°C durante 5 minutos, tras lo que se aplicaron sobre el chip y se incubaron en el horno de hibridación a 45°C durante 16 horas.

### VIII.3.5 Lavado, tinción y escaneado

#### VIII.3.5.1 Lavado

El lavado de los chips es esencial para eliminar los fragmentos de ARNc que no hayan hibridado con las sondas del chip. Para ello, los chips fueron extraídos del horno de hibridación y transferidos a una estación de lavado Fluidics Station 400 (Affymetrix, Santa Clara, California), donde se realizó un primer lavado con la solución tampón de lavado A (NaCl 0,9 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,06 M, EDTA 6 mM EDTA, Tween-20 0,01%). a 25°C y un segundo lavado con tampón de lavado B – MES (Ácido morfolinoetanosulfónico) 100mM,  $[\text{Na}^+]$  0,1M Tween-20 0,01%- a 50°C.

#### VIII.3.5.2 Tinción

En primer lugar se aplicó sobre los chips hibridados y lavados, la solución SAPE (MES 100 mM,  $[\text{Na}^+]$  1M, Tween-20 0,05%, ABS 2 mg/ml, estreptavidina-ficoeritrina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a 25°C durante 10 minutos, tiempo durante el cual el complejo estreptavidina-ficoeritrina se unió a la biotina de los ARNc marcados. A continuación se efectuó un nuevo lavado con tampón de lavado A a 25°C y se aplicó sobre los chips la solución de anticuerpo (MES 100 mM,  $[\text{Na}^+]$  1M, Tween-20 0,05%, ABS 2 mg/ml, anticuerpo IgG Goat 0,1 mg/ml, anticuerpo biotinilado 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se incubaron durante 10 minutos a 25°C. La última tinción fue llevada a cabo con solución SAPE, a la que sucedió un último lavado con tampón de lavado A a 30°C.



### VIII.3.5.3 Escaneado

Tras eliminar el exceso de tampón de lavado A, se introdujeron los chips en el escáner GeneChip® Scanner 3000 Targeted Genotyping System (Affymetrix, Santa Clara, California). El resultado es una imagen de fondo oscuro y puntos luminosos cada uno de los cuales corresponde a un grupo de sondas concreto y cuya intensidad es cuantificada para obtener una medida de la expresión de cada transcrito en las muestras.

La inspección visual de los microarrays proporciona una idea general de la calidad del experimento. Puede considerarse como válida una imagen con fondos oscuros y señales de hibridación brillantes, mientras que una muestra problemática, mala hibridación o incorrecta adquisición por el escáner, puede resultar en elevadas señales de fondo y de ruido que ocultarían la señal real.

## VIII.4 Análisis bioinformático

### VIII.4.1 Controles de calidad

Una vez observadas las imágenes de cada chip, existen dos parámetros fundamentales para valorar la calidad de las mezclas de hibridación: la presencia de los controles *spike* y la relación 3'/5' de los genes domésticos o *housekeeping*. Por otra parte, los parámetros estudiados en relación a la calidad de los microarrays son *P call %*, *Array Outlier* y las gráficas NUSE (Normalized Unscaled Standard Error) y el escalado de los datos proporciona una estimación de la fiabilidad de los resultados:

#### VIII.4.1.1 Controles *spike*

Los controles *spike* son sondas control para secuencias que se incluyen en la mezcla de hibridación. La presencia de estos controles indica que los procesos de hibridación, lavados, revelado y escaneado han resultado correctos. Los controles *spike* utilizados fueron BioB, BioC, BioD y Cre. El BioB fue el control menos representado en la mezcla, por lo que fue principalmente utilizado para valorar la sensibilidad del experimento.

#### VIII.4.1.2 Genes domésticos o controles *housekeeping*

Los genes domésticos son sondas para genes expresados constitutivamente en todo tipo de tejidos. En el microarray se incluyeron sondas correspondientes a las zonas 3', central y 5' de estos genes. La relación entre las señales de hibridación para las sondas 3' respecto a la de las 5' indica la integridad de los ARNc sintetizados, siendo ésta reflejo de la calidad del RNA original utilizado para la síntesis. Así, una relación 3'/5' entre las señales de hibridación cercana a 1 indica integridad total del ARN y ARNc sintetizado. En función del órgano de procedencia de la muestra y del tratamiento aplicado, y dado que las condiciones no siempre son las ideales, es difícil obtener un ARNc totalmente íntegro, por lo que el criterio para considerar un experimento como satisfactorio (siguiendo las recomendaciones de Affymetrix), es que la relación 3'/5' no debe superar el valor de 3. Por otra parte, el carácter constitutivo de los genes representados como *housekeeping* no siempre se cumple para todo tipo de tejidos o condiciones experimentales, tal y como está ampliamente reflejado en la literatura. Así, entre los genes representados en el microarray, el que más frecuentemente se comporta como verdadero *housekeeping* es el que codifica el enzima GADPH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

#### VIII.4.1.3 *P call %*

*P call %* indica el porcentaje de transcritos detectados como presentes en un microarray. En condiciones de procesamiento adecuadas, este valor sirve para evaluar la calidad de la muestra.

#### VIII.4.1.4 *Array Outlier*

Indica el porcentaje de transcritos cuyos niveles en un microarray son inconsistentes con respecto a los niveles en el resto de microarrays del experimento. El programa de análisis utilizado, dChip ([www.dchip.org](http://www.dchip.org)), recomienda tomar con precaución aquellas muestras que superen el valor de 5%, y eliminar aquellas que superen el 15%. Un valor superior indicaría una imagen potencialmente contaminada, principalmente por rastros de burbujas, arañazos o un problema a nivel de preparación o hibridación de la muestra.

#### VIII.4.1.5 *Gráficas NUSE*

Las gráficas NUSE fueron generadas mediante el empleo del paquete informático BioConductor affyPLM ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)), que permite ajustar los microarrays a un modelo

lineal robusto que incluye información de sondas y chips. El ajuste permite obtener valores de error estándar no escalados normalizados (valores NUSE) para cada grupo de sondas a partir de los valores de intensidad de cada sonda en el grupo. Al igual que en el caso de los *array outlier*, deben ser tomados con precaución los resultados derivados del análisis de aquellas muestras que superen el valor de 5% y eliminar aquellas que superen el 15%.

#### VIII.4.1.6 Escalado de los datos

Como paso previo a la comparación de los microarrays se llevó a cabo el escalado de los datos de cada microarray, con el fin de minimizar las discrepancias debidas a variables tales como la preparación de la muestra, la hibridación, etc. Usando el software de Affymetrix GCOS 1.4, todos los microarrays se escalaron definiendo como la intensidad media el valor arbitrario de 100. GCOS 1.4 calcula la intensidad media de todo el microarray promediando los valores de intensidad de todos los sets de sondas, a excepción del 2% de los valores con mayor y menor intensidad. Esa intensidad media es multiplicada por un factor de escalado que la convertirá en el valor definido por el usuario (en este caso 100). El factor de escalado de los microarrays del mismo experimento debe ser próximo entre ellos (sin que el factor de escalado de un microarray sea superior a tres veces el de cualquiera de los otros) y cercano a 1 en la medida de lo posible.

#### VIII.4.2 Normalización de los datos por el método RMA

Para medir la expresión génica de forma precisa y fiable, es importante tener en cuenta la variabilidad experimental (debida a las muestras) y sistemática (debida al procesado) que puede asociarse a un experimento de estas características. El término normalización hace referencia al proceso llevado a cabo para minimizar los efectos de dicha variación sobre el análisis. Así pueden distinguirse más fácilmente las diferencias biológicas, al mismo tiempo que permite la comparación de niveles de expresión en el conjunto de los microarrays estudiados.

Los valores de intensidad de cada sonda en el microarray son procesados y normalizados por el método RMA (Robust Multichip Average) para obtener un valor de intensidad individual para cada grupo de sondas, utilizando el programa de análisis Partek Genomics Suite v7.3.1 (Partek Incorporated, Missouri, USA).

#### VIII.4.2.1 Primer filtrado de los datos

Los datos de los chips fueron filtrados para eliminar las secuencias control y aquellas secuencias con señal de hibridación cercana al fondo.

#### VIII.4.2.2 Normalización

En el análisis que nos ocupa se llevó a cabo mediante el método de normalización por cuantiles (como parte del proceso de normalización por RMA) aplicado a los datos de los microarrays almacenados en los archivos \*.cel (ficheros de salida de Affymetrix).

#### VIII.4.2.3 Segundo filtrado de los datos

Por último, esta lista de secuencias se filtró para eliminar aquellas sondas que no presentaron ningún cambio de expresión en todas las muestras, basándose en la desviación estándar de los datos de intensidad normalizados. El valor utilizado como límite de cambio de expresión entre condiciones permite eliminar secuencias que no varían en la comparación entre cualquier muestra del experimento y por lo tanto no son informativas. Este filtrado dio lugar a un listado de secuencias que formaron la lista de trabajo.

### VIII.4.3 Aplicación de herramientas bioinformáticas para la obtención de diferencias en la expresión génica en las muestras

Uno de los principales objetivos de este experimento fue analizar los cambios de expresión génica como consecuencia del tratamiento. Para ello, definimos la variable Periodo (inicial o pre-tratamiento y final o post-tratamiento) que hace referencia al momento en que fue tomada la muestra de tejido. De este modo las muestras seleccionadas para este análisis fueron agrupadas en base a las variables Periodo (Tabla 8).

Además de aquellas que son de interés para este estudio, existen variables biológicas y no biológicas que podrían afectar a los resultados por lo que, de manera previa a la realización de cualquier prueba estadística, se realizó un análisis de la distribución muestral según el estadístico F de Snedecor, que permite observar en qué medida las diferentes variables asociadas al experimento pueden afectar a los resultados.

Tabla 8. Descripción de las muestras utilizadas en el análisis. Los números entre paréntesis informan acerca del emparejamiento de las muestras

Periodo	Muestras
Inicial	08SE133(3), 08SE157(13), 08SE177(23), 08SE181(25), 08SE279/280(33), 08SE191(30) 08SE131(2), 08SE137(5), 08SE139(6), 08SE143(8), 08SE147(10), 08SE155(12), 08SE161(15), 08SE163(16), 08SE165(17), 08SE167(18), 08SE169(19), 08SE175(22), 08SE183(26), 08SE185(27), 08SE274(31), 08SE129(1), 08SE135(4), 08SE141(7), 08SE153(11), 08SE159(14), 08SE171(20), 08SE173(21), 08SE179(24), 08SE189(29), 08SE276/277(32)
Final	08SE132(3), 08SE144(9), 08SE156(13), 08SE176(23), 08SE180(25), 08SE186(28), 08SE190(30), 08SE278(33) 08SE130(2), 08SE136(5), 08SE138(6), 08SE142(8), 08SE146(10), 08SE154(12), 08SE160(15), 08SE162(16), 08SE164(17), 08SE166(18), 08SE168(19), 08SE174(22), 08SE182(26), 08SE184(27), 08SE273(31) 08SE128(1), 08SE134(4), 08SE140(7), 08SE152(11), 08SE158(14), 08SE170(20), 08SE172(21), 08SE178(24), 08SE188(29), 08SE275(32)

#### VIII.4.3.1 Análisis estadístico

Al aplicar herramientas estadísticas se obtienen listas de sondas que presentan diferencias de expresión entre las muestras comparadas (con un valor de significación p, que por defecto es seleccionado como 0,05). En base a los objetivos de nuestro estudio, se hizo la comparación según la variable Periodo, Final vs Inicial. Para el cálculo de la tasa de cambio de expresión entre las distintas condiciones, se selecciona como condición basal o línea base la condición que se encuentra en segundo lugar en la comparación. Todos estos pasos son descritos con más detalle en los siguientes apartados.

#### *Regresión lineal*

Para la identificación de cambios en expresión estadísticamente significativos entre los grupos de muestras se realizó un modelo de regresión lineal teniendo en cuenta el factor periodo (con dos niveles), empleando para ello el *software* Partek Genomics Suite v7.3.1. Con objeto de determinar el efecto del tratamiento sobre la expresión génica se creó el siguiente modelo de regresión:

$$[1] Y_i = \text{Periodo} * \text{Emparejamiento} + \epsilon$$

donde  $Y_i$  es la intensidad Y para cada secuencia i, En el modelo 1, Periodo se refiere al efecto del tratamiento en la intensidad observada y Emparejamiento es el factor que nos indica el emparejamiento de las muestras y que se marca con un asterisco para indicar que el factor periodo está influenciado por dicho factor. De esta manera, se pueden obtener las secuencias diferencialmente expresadas debido al factor de nuestro interés.

### *Test de corrección múltiple*

Cuando se buscan diferencias significativas entre varias condiciones, algunas secuencias pueden aparecer como significativas por azar, es decir, ser falsos positivos (error de tipo I). El propósito de la aplicación de un test de corrección múltiple es tratar de disminuir la probabilidad de que aparezcan falsos positivos de manera más rigurosa que el especificado por el nivel de significación. El test de corrección múltiple de *Bonferroni* es de los más conservadores que existen y determina el número de falsos positivos en función del valor de significación asignado. En nuestro experimento, al considerar un valor de corte de 0,05, se estima que 0,05 secuencias pueden haber sido seleccionadas al azar. El FDR (*False Discovery Rate*) es uno de los estadísticos más relevantes en los estudios de genómica y hace referencia a la tasa de error de las secuencias seleccionadas como discriminantes. Se trata del porcentaje de falsos positivos en cada uno de los factores estudiados. En nuestro caso, al aplicar una significación de 0,05, se estima que el 5% de las secuencias significativas a las que se le haya aplicado esta corrección podría ser un falso positivo. Por último, cuando no se aplica ninguna corrección se estima que un 5% de las pruebas estadísticas realizadas podrían haber sido seleccionadas de forma casual.

En la lista de genes expresados diferencialmente obtenidas tras este análisis se muestran los datos normalizados como valores de cambio entre condiciones -cambio de orden de magnitud o FC (*Fold Change*)-. Para ello, los datos de las dos condiciones experimentales que se comparan están normalizados frente a la media geométrica de los microarrays de las muestras pertenecientes a la condición Control. El valor utilizado en las listas será el FC. A mayor valor absoluto de FC (con signo negativo para las secuencias reprimidas y positivo para las sobre expresadas) la tasa de cambio será mayor.

#### VIII.4.3.2 Análisis de Componentes principales y Clúster jerárquico

El PCA (Análisis de Componentes Principales) es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión de los datos (en este caso los valores de expresión de cada sonda). El objetivo principal que persigue el PCA es la representación de las medidas numéricas de las sondas en un espacio de pocas dimensiones donde nuestros sentidos puedan percibir relaciones que de otra manera permanecerían ocultas en dimensiones superiores. Dicha representación debe ser tal que al desechar dimensiones superiores (generalmente de la tercera o cuarta en adelante) la pérdida de información sea mínima. Es decir, ante un banco de datos con muchas variables (cada uno de los valores de expresión de cada gen), el objetivo será

reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible. La elección de los factores o componentes se realiza de tal forma que el primero recoja la mayor proporción posible de la variabilidad original presente en el experimento; el segundo factor debe recoger la máxima variabilidad posible no recogida por el primero, y así sucesivamente. El número de factores o componentes principales que se toma por defecto es de 3 y con él se explicará un porcentaje de la varianza existente especificado en el gráfico. La imagen resultante se compara con los factores experimentales conocidos con el fin de asociar la variabilidad observada (o lo que es lo mismo, diferencias) a alguno de ellos.

Un clúster o árbol jerárquico es un método estadístico que permite la clasificación de objetos, en este caso perfiles de expresión de genes o muestras, en grupos o clústeres por similitud entre ellos. Para llevar a cabo este procedimiento se calcula la distancia de cada gen o muestra con todos los demás y se agrupan los dos genes que presenten una correlación más alta. A continuación se calcula la media del perfil de expresión de esos dos y con este gen o muestra sintética se repite el cálculo de la distancia para todos los demás objetos. Este proceso se repite hasta que todos los genes o muestras han sido agrupados por parejas. Posteriormente, se calculan los ratios de separación y la medida de similitud que organizarán el árbol formando grupos discretos y ramificaciones, respectivamente.

Los clúster jerárquicos del presente estudio se realizaron utilizando el software Partek Genomics Suite v7.3.1, aplicando como medida de similitud la distancia euclídea y como método de agrupación el método de Average linkage.

#### VIII.4.3.3 Análisis complementarios

A continuación se realizaron un PCA y clúster jerárquico de las listas de genes resultantes de la aplicación de las herramientas estadísticas. Este análisis de PCA y clúster jerárquico se denomina supervisado, porque la lista de genes que se analiza es el resultado de la aplicación de un test estadístico.

### VIII.5 Análisis funcional *Functional enrichment*

Una vez realizado el filtrado y análisis estadístico de los datos de expresión, se obtienen listados de genes que aparecen sobre-expresados o reprimidos de manera estadísticamente significativa entre varias condiciones comparadas. Para procesar esta ingente cantidad de

información y traducirla en información biológica útil, es necesario llevar a cabo un análisis funcional de los datos obtenidos. Existen numerosas bases de datos públicas y fuentes bibliográficas disponibles para el estudio de la función génica, sin embargo, la gran cantidad de información como resultado de un experimento con microarrays hace inviable esta aproximación al estudio funcional. Para ello, en los últimos años se han desarrollado una serie de herramientas bioinformáticas que permiten clasificar a los genes en función de los procesos biológicos en que intervienen, las funciones moleculares de las proteínas que codifican y las rutas de señalización en las que participan. Este tipo de análisis es conocido como *Functional enrichment* y consiste en el procesamiento de un listado de genes definido por el investigador y clasificado por el programa en distintas categorías funcionales según umbrales de corte de valores de  $p$ , FC o ambos.

En nuestro caso, la lista de genes seleccionada para el análisis funcional estuvo compuesta por aquellos genes diferencialmente expresados al aplicar el test de corrección múltiple de *Bonferroni*, por ser este análisis el más restrictivo en cuanto a los errores tipo I, a la comparación entre las condiciones pre-tratamiento y post-tratamiento.

#### VIII.5.1 Análisis *Functional enrichment* con el programa *PANTHER*

*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships* (PANTHER), (<http://www.pantherdb.org>) es un programa de acceso público que clasifica a genes según sus funciones, en base a evidencias científicas experimentales y relaciones evolutivas publicadas en distintas bases de datos científicas. Para ello, las proteínas codificadas por los genes de interés son clasificadas en familias y subfamilias con función biológica compartida y más tarde categorizadas según los términos ontológicos Función molecular o Proceso biológico. El programa fue utilizado para hacer otro tipo de análisis conocido como *Pathway*, en el que clasificó los genes en función de las rutas de señalización intracelular en que participan las proteínas que codifican (Thomas y cols., 2003).

Su funcionamiento sigue los siguientes pasos: a) introducir el listado de genes a analizar (los genes fueron introducidos según el sistema universal de codificación UniGene); b) seleccionar la lista de referencia con la que se desea comparar (en nuestro caso el genoma de *Homo sapiens*); c) seleccionar el criterio de clasificación (proceso biológico, función molecular o



ruta de señalización). El programa clasifica a los genes en función de un test estadístico binomial cuya significación viene dada por el valor p en la relación de resultados (Figura 30).

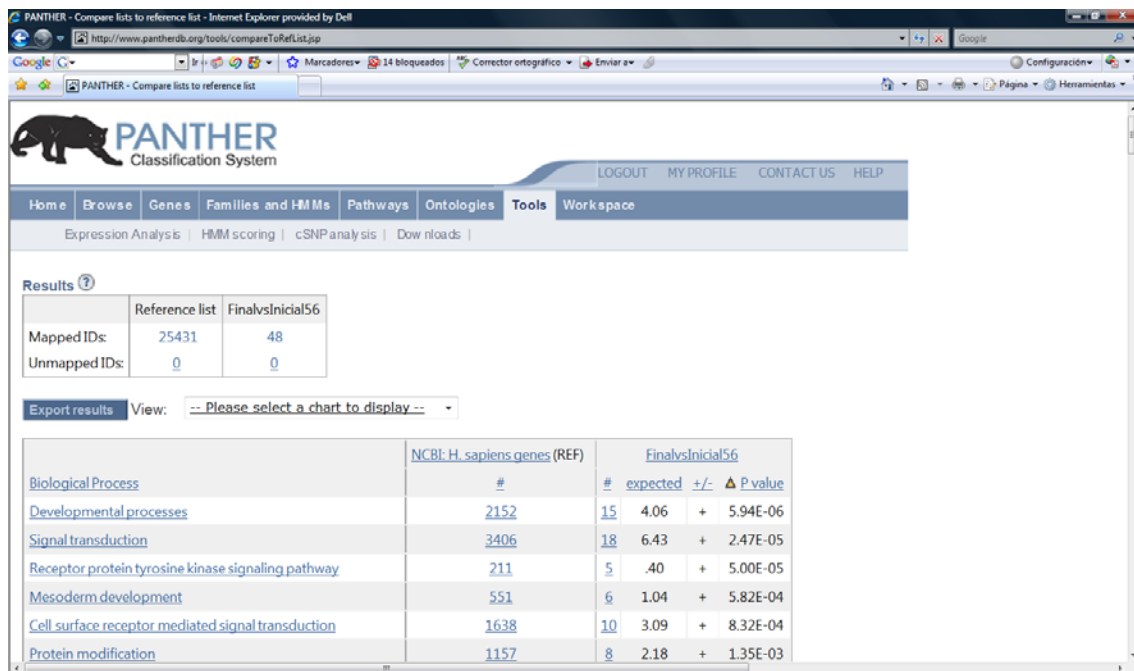


Figura 30. Ejemplo de la clasificación de una lista de genes efectuada por PANTHER según proceso biológico

### VIII.5.2 Análisis *Functional enrichment* con el programa DAVID

Empleamos el programa *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) 2008* (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>), que es la sexta versión de un programa que proporciona un conjunto de herramientas para llevar a cabo anotaciones funcionales según las categorías de las bases de datos *GeneOntology (GO)* y *Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)* (Dennis y cols., 2003).

Este programa clasifica a los genes en las categorías procesos biológicos, función molecular y componente celular efectuando el test exacto de Fisher, sin embargo y dada la peculiar estructuración de las base de datos GO, los términos funcionales, según los cuales los genes son clasificados, están jerarquizados y presentan una estructura en forma de árbol en función de la especificidad de dichos términos. De este modo, los términos en la parte inferior de la escala se refieren a conceptos generales y, a medida que ascendemos en la jerarquía, las definiciones son más detalladas y por tanto las clasificaciones más restrictivas en cuanto al número de genes de la lista que clasifica. En los resultados esta jerarquía se traduce en niveles de clasificación, que en nuestro caso comienzan en el nivel 1 (el más general) y finalizan en el

nivel 5 (el más específico y más restrictivo). Para seleccionar el nivel de clasificación a emplear en nuestro análisis, se hicieron varias pruebas clasificando las listas de genes según distintos niveles. Dado que nuestras listas constan de un número reducido de genes, sobretodo en comparación de las empleadas en otros trabajos de análisis genómico, fue necesario tomar una opción alternativa a la elección de uno de los niveles de clasificación anteriormente descritos para evitar perder demasiada información biológica. El programa DAVID cuenta con un nivel de clasificación denominado `_ALL` que acepta en el análisis a la mayoría de los genes de la lista, pero tiene en cuenta todos los términos empleados para la clasificación, desde los más generales a los más específicos.

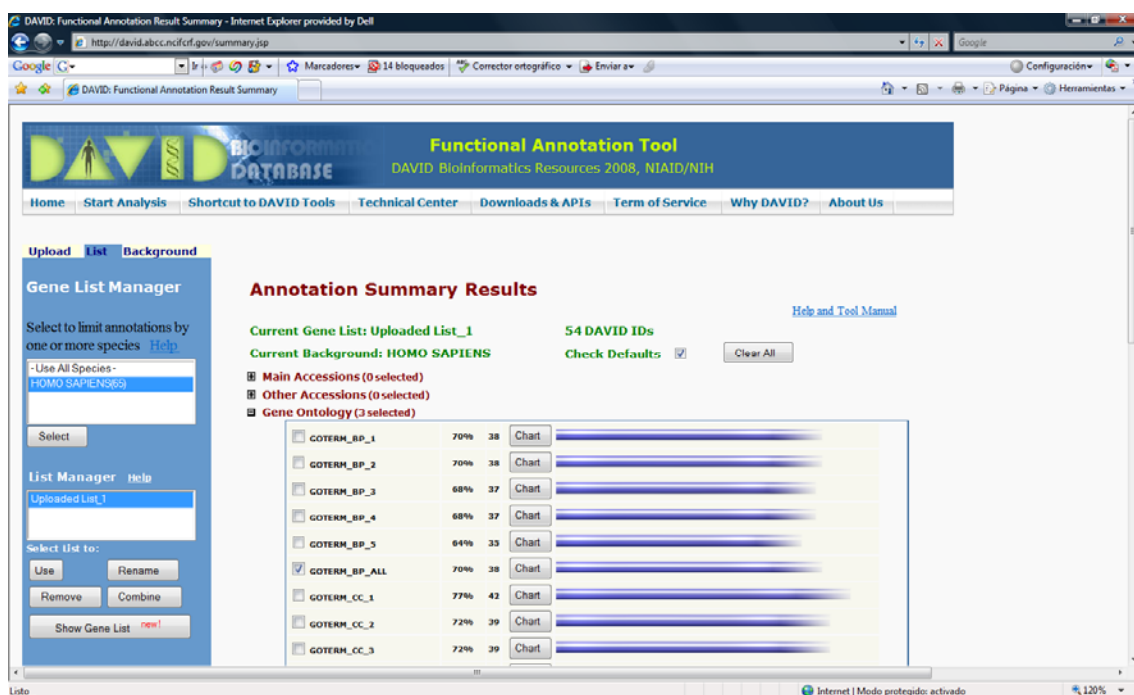


Figura 31. Ejemplo de la clasificación de una lista de genes efectuada por DAVID

El programa presentó recientemente un novedoso análisis conocido como *Functional Annotation Clustering Report* cuya aplicación agrupa los términos biológicos en función de los cuales se clasifican los genes para evitar la frecuente redundancia observada en otros análisis. El algoritmo matemático empleado en este análisis integra las técnicas estadísticas Kappa y *Fuzzy Heuristic Clustering* para medir el número de genes comunes a dos categorías funcionales y clasificar anotaciones funcionales similares de acuerdo con los valores Kappa, respectivamente.

Para todos los análisis efectuados con DAVID, el sistema fue el mismo y básicamente coincidente con el seguido para los análisis llevados a cabo con el programa PANTHER, sólo que en esta ocasión los genes de las listas fueron identificados por el código para grupos de sonda de Affimetrix (Affy ID).



# RESULTADOS



## RESULTADOS

### I. Análisis de variables clínicas e histopatológicas

#### I.1 Variables clínicas

##### I.1.1 Caracterización de la población de estudio

De la información clínica recogida se extrajeron aquellos parámetros que resultaron útiles para la caracterización de la población y que se resumen en la Tabla 9. El resto de datos relativos al tratamiento, la toxicidad y los efectos adversos asociados al tratamiento, fueron guardados en una base de datos en formato electrónico para su empleo en estudios futuros.

En el grupo de neoadyuvancia, las muestras de tejido para el análisis genómico y las de sangre para el análisis de marcadores de estrés oxidativo y defensas antioxidantes, fueron extraídas de las mismas pacientes. Sin embargo, durante el procesamiento del tejido para la extracción de ARN algunas muestras fueron descartadas (ver apartados III.1, III.3 del bloque de Resultados y Tabla 18) y sustituidas por muestras de tejido de otras pacientes que habían sido conservadas a tal efecto. La información clínica recogida en la Tabla 9 representa las características clínicas de todas las pacientes neoadyuvantes que participaron en este estudio.

Tabla 9. Características clínicas de la población de estudio al diagnóstico

Características	Neoadyuvantes (n = 33)	Adyuvantes (n = 30)	Metastásicas (n = 30)
	Número de casos (%)		
Edad al diagnóstico (años)			
< 40	3 (9,1)	3 (10)	5 (16,7)
40-49	11 (33,3)	13 (43,3)	9 (30)
50-59	10(30,3)	7 (23,3)	7 (23,3)
≥ 60	9 (27,3)	7 (23,3)	9 (30)
Media	53	51	51
Rango	29-74	28-73	29-70
Estado menopáusico			
Pre-	13 (39,4)	12 (40)	13 (43,3)
Peri-	1 (3)	0 (0)	0 (0)
Post-	19 (57,6)	18 (60)	17 (56,7)
Tamaño tumoral (cm)			
< 1	0 (0)	2 (6,7)	0 (0)
1-1,9	1 (3)	12 (40)	7 (23,3)
2-2,9	3 (12,1)	9 (30)	4 (13,4)
3-3,9	4 (21,2)	2 (6,7)	7 (23,3)
4-4,9	9 (27,3)	1 (3,3)	3 (10)

≥ 5	12 (36,4)	4 (13,3)	9 (30)
Tipo histológico			
ductal infiltrante	28 (84,8)	24 (80)	24 (80)
lobulillar infiltrante	5 (15,2)	4 (13,3)	3 (10)
mixto	0 (0)	2 (6,7)	1 (3,3)
inflamatorio	0 (0)	0 (0)	2 (6,7)
*Grado histológico			
I	2 (6,1)	3 (10)	2 (6,7)
II	16 (48,5)	10 (33,3)	4 (13,3)
III	15 (45,5)	17 (56,7)	16 (53,3)
no evaluable	0 (0)	0 (0)	8 (26,7)
TNM clínico al diagnóstico			
T			
T1	0 (0)	15 (50)	5 (16,7)
T2	0 (0)	11 (36,7)	9 (30)
T3	22 (66,7)	3 (3)	5 (16,7)
T4	10 (30,3)	1 (3,3)	7 (23,3)
Tx	0 (0)	0 (0)	4 (13,3)
N			
N0	9 (27,3)	13 (43,3)	6 (20)
N1	1 (3)	11 (36,7)	8 (26,7)
N2	4 (12,1)	4 (13,3)	9 (30)
N3	0 (0)	1 (3,3)	1 (3,3)
Nx	19 (57,6)	1 (3,3)	6 (20)
M			
M0	33 (100)	33 (100)	16 (53,3)
M1	0 (0)	0 (0)	14 (46,3)
Mx	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Estadio clínico			
I	0 (0)	7 (23,4)	2 (6,7)
II	32 (97)	21 (70)	18 (60)
III	1 (3)	1 (3,3)	7 (23,3)
IV	0 (0)	0 (0)	0 (0)
No evaluable	0 (0)	1 (3,3)	3 (10)
RE			
+	26 (78,8)	19 (63,3)	18 (60)
-	7 (21,2)	11 (36,7)	12 (40)
no evaluable	0 (0)	0 (0)	0 (0)
RP			
+	25 (75,8)	19 (63,3)	12 (40)
-	8 (24,2)	11 (36,7)	18 (60)
no evaluable	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Her2			
+	7 (21,2)	5 (16,7)	11 (36,7)
-	26 (78,8)	25 (83,3)	19 (63,3)
no evaluable	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Cirugía			
conservadora	26 (78,8)	15 (50)	10 (33,3)
no conservadora	7 (21,2)	15 (50)	10 (33,3)
no evaluable	0 (0)	0 (0)	10 (33,3)
Hormonoterapia adyuvante			
si	25 (75,8)	20 (66,7)	15 (50)
no	5 (15,2)	6 (20)	5 (16,7)
no evaluable	3 (9,1)	4 (13,3)	10 (33,3)

RE= Receptor de estrógenos; RP= Receptor de progesterona

\*Según la clasificación de Bloom-Richardson modificada de Nottingham

### I.1.2 Estudio de la influencia de la quimioterapia sobre los parámetros bioquímicos de pacientes con cáncer de mama

La información relativa al perfil bioquímico de las pacientes, antes y después del tratamiento con quimioterapia, fue obtenida del mismo modo que la información que caracterizó clínicamente a la población de estudio. Los resultados del análisis estadístico de estos datos se muestran en la Tabla 10.

Las comparaciones entre los resultados de muestras previas y posteriores a la quimioterapia dentro del mismo grupo experimental, o bien, entre distintos grupos experimentales antes o después del tratamiento con quimioterapia, pusieron de manifiesto que 19 de los 33 marcadores bioquímicos evaluados varían por efecto de la quimioterapia. Entre ellos, los niveles séricos de ácido úrico son significativamente mayores en el grupo de neoadyuvancia que en los grupos de adyuvancia y metástasis tras el tratamiento con quimioterapia. El colesterol total en sangre aumenta de forma significativa después del tratamiento en el grupo de adyuvancia y dicho aumento es mayor que el experimentado por las pacientes neoadyuvantes y metastásicas en ese mismo momento o periodo del tratamiento. Concretamente, parece que el aumento de colesterol es debido al incremento significativo en la concentración de LDL (*low density lipoprotein*) tras la quimioterapia, que a su vez es mayor que el registrado por pacientes metastásicas tras el tratamiento, pero no presenta diferencias frente a la concentración de LDL en pacientes neoadyuvantes tras completar los ciclos de quimioterapia pautados. Consecuentemente, el cociente entre el colesterol total y el colesterol HDL (*high density lipoprotein*) aumenta en las pacientes adyuvantes tras finalizar el tratamiento con quimioterapia. Los niveles de triglicéridos en sangre también aumentan significativamente en el grupo de adyuvancia tras la quimioterapia, pero dicho aumento no presenta diferencias con los valores registrados por los demás grupos de pacientes durante ese mismo periodo. En cuanto a las proteínas totales, únicamente el grupo de neoadyuvancia registra un descenso de la concentración sérica de proteínas tras la quimioterapia.

La función hepática y el metabolismo óseo y muscular fueron evaluados mediante el análisis de los niveles séricos de bilirrubina, en los que observamos un aumento de la concentración de la forma conjugada en el grupo de adyuvancia respecto de los grupos de neoadyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia, y la concentración de enzimas metabólicas. Entre estas últimas, tanto la transaminasa ASAT como la PA, presentaron valores significativamente mayores en el grupo de metástasis respecto de los grupos de neoadyuvancia y adyuvancia antes del tratamiento. Además,



en el caso de PA, las diferencias entre los niveles registrados por pacientes metastásicas respecto de pacientes adyuvantes tras la quimioterapia fueron significativamente mayores. Por último la LDH (lactato deshidrogenasa) aumentó de forma significativa en los grupos de neoadyuvancia y adyuvancia tras la quimioterapia, siendo este aumento mayor en pacientes adyuvantes comparado con el registrado por las pacientes neoadyuvantes o el valor observado en pacientes metastásicas durante el mismo periodo.

En cuanto a los electrolitos, los resultados mostraron que los niveles de calcio en sangre fueron menores en el grupo de adyuvancia que en los grupos de neoadyuvancia y metástasis antes del tratamiento. El hierro sérico disminuyó significativamente en los grupos de neoadyuvancia y adyuvancia tras el tratamiento.

Por último, el análisis de los componentes celulares de la serie roja y de la serie blanca reveló que la concentración de hematíes disminuyó significativamente tras la quimioterapia en los grupos de neoadyuvancia y adyuvancia, siendo los niveles previos al tratamiento más elevados en el grupo de neoadyuvancia que en el resto. El hematocrito disminuyó significativamente sólo en el grupo de neoadyuvancia tras el tratamiento. En relación a la serie blanca, destaca la disminución de la concentración de leucocitos en los grupos de adyuvancia y metástasis tras el tratamiento. El valor de la concentración de leucocitos no varió significativamente en el grupo de neoadyuvancia tras el tratamiento y fue mayor que los registrados por los grupos de adyuvancia y metástasis tras la quimioterapia. Al analizar detalladamente las fracciones leucocitarias observamos que el porcentaje de neutrófilos aumentó en el grupo de neoadyuvancia tras el tratamiento y que dicho valor es significativamente mayor que en el registrado por pacientes adyuvantes y metastásicas tras el tratamiento con quimioterapia. El porcentaje de linfocitos sin embargo, disminuyó tras la quimioterapia en pacientes neoadyuvantes y adyuvantes, pero el valor registrado por pacientes neoadyuvantes fue significativamente menor que el observado en pacientes metastásicas tras el tratamiento. Los niveles de monocitos aumentaron tanto en pacientes neoadyuvantes como adyuvantes tras el tratamiento y fueron menores en las pacientes neoadyuvantes y adyuvantes con respecto a las metastásicas antes de comenzar el primer ciclo de quimioterapia. Por último, se observó una significativa disminución de los eosinófilos tras la quimioterapia en pacientes neoadyuvantes y adyuvantes, siendo estos valores menores que los registrados por pacientes metastásicas en el mismo periodo.

Tabla 10. *Parámetros bioquímicos en pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas.*

Marcadores	NEO1	NEO2	ADY1	ADY2	MET1	MET2
<b>Bioquímica</b>						
Glucosa (mg/dl)	105,1±4,94	119±8,83	97,9±1,93	102,8±2,64	103,7±3,93	99,7±3,14
Urea (mg/dl)	31,5±1,56	31,7±1,31	32,9±1,6	32±1,41	30,4±2,93	35,7±1,42
Creatinina (mg/dl)	0,82±0,04	0,82±0,03	0,77±0,03	0,77±0,02	0,81±0,05	0,78±0,02
Ácido úrico (mg/dl)	4,46±0,27	4,61±0,31 <sup>b</sup>	4,14±0,22	3,74±0,2 <sup>a</sup>	3,71±0,27	3,66±0,19 <sup>a</sup>
Colesterol (mg/dl)	229,5±7,68	232,4±8,14 <sup>ab</sup>	219,2±7,93	242,9±6,13 <sup>ab</sup>	210,9±10,61	208,5±6,67 <sup>a</sup>
HDL (mg/dl)	59,1±2,19	55,14±2,23	62,6±2,48	59,8±2,37	58±2,76	56,63±2,09
LDL (mg/dl)	143,82±7,42	147,8±8,48 <sup>ab</sup>	138,42±7,75	156,8±6,38 <sup>b</sup>	131,6±10,3	129,4±5,78 <sup>a</sup>
Colesterol/HDL	4,08±0,22	4,4±0,21	3,45±0,17	4,23±0,2 <sup>*</sup>	3,74±0,23	3,82±0,17
Triglicéridos (mg/dl)	127,5±15,4	145,9±12,52	94±4,51	115,7±10,1 <sup>*</sup>	124,2±12,46	124±12,5
Proteínas (g/dl)	7,42±0,09	7,08±0,07 <sup>*</sup>	7,25±0,08	7,09±0,1	7,27±0,15	7,12±0,09
BT (mg/dl)	0,57±0,05	0,48±0,03	0,58±0,05	0,74±0,22	0,54±0,05	0,53±0,04
BC (mg/dl)	0,1±0,01 <sup>a</sup>	0,08±0,01	0,16±0,02 <sup>b</sup>	0,11±0,01	0,1±0,02 <sup>a</sup>	0,11±0,01
Hierro (mM)	85,8±6,4	62,4±4,42 <sup>*</sup>	78,5±5,59	64,1±3,51 <sup>*</sup>	78±6,26	72,1±7,02
<b>Enzimas</b>						
ASAT (UI/L)	19,6±1,43 <sup>a</sup>	27,1±2,19 <sup>*</sup>	18,5±1,02 <sup>a</sup>	28,1±2,24 <sup>*</sup>	26,4±2,18 <sup>b</sup>	29,7±2,4
ALAT (UI/L)	19,3±1,93	32,8±3,79 <sup>*</sup>	18,1±1,26	35,3±4,74 <sup>*</sup>	26,2±4,22	30,9±2,9
GGT (UI/L)	35,8±10,49 <sup>a</sup>	43,2±6,45 <sup>*</sup>	33,3±5,2 <sup>a</sup>	50,5±13,4 <sup>*</sup>	50,3±9,58 <sup>b</sup>	52,7±13,4
PA (UI/L)	79,8±10 <sup>a</sup>	98,5±8,6 <sup>*ab</sup>	76,2±3,02 <sup>a</sup>	85,6±4,5 <sup>a</sup>	113,1±16,1 <sup>b</sup>	107,4±5,9 <sup>b</sup>
LDH (UI/L)	416,9±32,6 <sup>b</sup>	525,9±32,4 <sup>*b</sup>	299,5±22,6 <sup>a</sup>	420,5±45,2 <sup>*a</sup>	476,4±41,2 <sup>b</sup>	585,4±59,2 <sup>b</sup>
<b>Electrolitos</b>						
Sodio (mM)	140,5±0,48	140±0,52	141,1±0,38	141±0,45	140,5±0,47	140,7±0,64
Potasio (mM)	4,6±0,09	4,36±0,06	4,29±0,09	4,31±0,08	4,35±0,12	4,5±0,1
Cloruros (mM)	104,1±0,73	104,7±0,58	104,6±0,56	106±0,69	105,7±1,67	105,1±1,01
Calcio (mM)	9,79±0,07 <sup>b</sup>	9,67±0,08	9,31±0,23 <sup>a</sup>	10,9±1,22	9,56±0,11 <sup>ab</sup>	9,52±0,1
<b>Hemograma</b>						
Hemoglobina (g/dl)	13,73±0,27	12,3±0,22	13,6±0,18	12,6±0,22	13±0,21	12,4±0,19
Hematocrito (%)	41,5±0,61	36,6±0,65 <sup>*</sup>	39,2±1,44	37,1±0,59	38,4±0,83	37,1±0,57
Hematies (10 <sup>12</sup> /L)	4,75±0,05 <sup>b</sup>	4,03±0,08 <sup>*</sup>	4,6±0,06 <sup>a</sup>	4,09±0,08 <sup>*</sup>	4,31±0,1 <sup>a</sup>	4,12±0,09
Leucocitos (10 <sup>9</sup> /L)	10,1±3,1	12,2±3,26 <sup>b</sup>	10,1±3,06	9,83±3,26 <sup>*a</sup>	7,45±1,01	6,12±0,46 <sup>*a</sup>
Neutrófilos (%)	64,8±1,65	73,6±1,87 <sup>*b</sup>	60,4±1,66	64,5±3,23 <sup>a</sup>	59±3,13	62,1±1,97 <sup>a</sup>
Linfocitos (%)	26,4±1,52	17,4±1,44 <sup>*a</sup>	30,2±1,7	21,9±1,66 <sup>*ab</sup>	28,3±2,09	26,6±1,69 <sup>b</sup>
Monocitos (%)	4,36±0,33 <sup>a</sup>	5,59±0,42 <sup>*</sup>	5,07±0,28 <sup>a</sup>	13,9±7,58 <sup>*</sup>	7,18±1,44 <sup>b</sup>	6,74±0,47
Basófilos (%)	0,75±0,2	0,57±0,09	0,98±0,34	0,63±0,07	0,89±0,27	0,72±0,09
Eosinófilos (%)	1,97±0,35	1,17±0,19 <sup>*a</sup>	1,92±0,28	1,17±0,24 <sup>*a</sup>	1,98±0,3	1,7±0,22 <sup>b</sup>
Linfocitos activados (%)	1,78±0,15	1,75±0,18	1,73±0,12	1,98±0,25	3,13±0,91	2,33±0,2
Plaquetas (10 <sup>9</sup> /L)	269,1±11,5	299,2±20,2	293,8±21,1	290,8±15,3	271,8±17	267±13,7

Los resultados representan la media ± EEM de cada grupo (n= 30) antes y después del tratamiento con quimioterapia. Las abreviaturas de la tabla tienen el siguiente significado: NEO1= grupo de neoadyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia; NEO2= grupo de neoadyuvancia después del tratamiento con quimioterapia; ADY1= grupo de adyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia; ADY2= grupo de adyuvancia después del tratamiento con quimioterapia; MET1= grupo de metástasis antes del tratamiento con quimioterapia; MET2= grupo de metástasis después del tratamiento con quimioterapia; HDL= *high density lipoprotein*; LDL= *low density lipoprotein*; BT= bilirrubina total; BC= bilirrubina conjugada; ASAT= aspartato amino transferasa; ALAT= alanina amino transferasa; GGT= gamma glutamil transferasa; PA= fosfatasa alcalina; LDH= lactato deshidrogenasa. Las diferencias estadísticas debidas a la quimioterapia para un mismo grupo experimental (p<0,05) aparecen indicadas por el símbolo \*. Las diferencias estadísticas entre los distintos grupos experimentales y para cada periodo (antes y después del tratamiento) (p<0,05) aparecen indicadas en el gráfico con letras a y b, de tal forma que las medias que no comparten letras superscritas son estadísticamente diferentes.

## I.2 Variables histopatológicas

### I.2.1 Caracterización del tipo histológico y análisis inmunohistoquímico de las muestras de tejido tumoral

Todos los casos de este estudio fueron revisados por un patólogo experto para dar lugar a una base de datos cuyos resultados se muestran en las Tablas 11 y 12. Los resultados del estudio inmunohistoquímico y los datos de expresión de los marcadores RE, RP, Ki67 y Her2 recogidos de las historias clínicas de las pacientes neoadyuvantes, así como el tipo histológico del carcinoma de cada paciente fueron coincidentes, por lo que nos remitimos a la Tabla 9.

### I.2.2 Análisis morfológico de las biopsias de tejido mamario antes y después del tratamiento

El corte del tejido ultracongelado y su evaluación microscópica permitió determinar tanto el porcentaje de células neoplásicas presentes en el conjunto del tumor en las biopsias previas y posteriores al tratamiento con quimioterapia, como la presencia de otros elementos celulares que podrían influir en los resultados del análisis de expresión génica. Estos datos se encuentran recogidos en la Tabla 13.

Tabla 11. *Cuantificación de los elementos celulares y tisulares de las biopsias previas a la quimioterapia.*

Biopsias previas a la QT	Tumor				%Tejido sano	% Fibrosis	% Células inflamatorias
	%	%C.I	%C.I.D.	% Necrosis			
N1/1	25	100	0	0	1	71	3
N2/1	95	100	0	0	4	1	0
N3/1	35	0	100	40	0	50	15
N4/1	22	100	0	0	10	40	22
N5/1	52,5	100	0	0	0	60	7,5
N5D/1	55	100	0	5	0	40	5
N6/1	42,5	100	0	0	0	56,5	1
N8/1	16	100	0	0	0	79	5
N9/1	40	100	0	0	0	55	5
N10/1	55	100	0	0	0	40	5
N11/1	5	100	0	0	0	90	5
N14/1	40	95	5	0	5	45	10
N16/1	20	100	0	0	5	70	5
N17/1	12	100	0	0	1	84	3
N18/1	60	100	0	0	0	20	20
N19/1	50	100	0	0	0	30	20
N21/1	40	60	40	40	2	53	5
N22/1	60	100	0	0	0	25	15
N24/1	45	30	70	0	0	25	30

N25/1	48	100	0	0	2	47	5
N26/1	35	100	0	0	0	55	10
N27/1	40	39	1	0	0	40	20
N28/1	40	100	0	0	2,5	52,5	30
N29/1	35	25	10	0	0	60	5
N30/1	40	0	0	20	5	40	5
N32/1	35	100	0	0	1	60	5
N33/1	32,5	100	0	0	0	62,5	5
N34/1	40	30	10	40	0	45	15
N35/1	28	100	0	0	2	60	10
N37/1	43,3	100	0	0	0,66	52,33	2,66
N40/1	32,5	100	0	0	0	60	7,5
N41/1	25	100	0	0	10	53	12
N43/1	10	100	0	0	5	75	10
N45/1	70	100	0	0	4	84	2
N46/1	80	100	0	0	5	10	5

QT= quimioterapia, C.I.= componente infiltrante, C.I.D.= componente intraductal

Tabla 12. Cuantificación de los elementos celulares y tisulares de las biopsias tras la quimioterapia.

Biopsias posteriores a la QT	Tumor				% Tejido sano	% Fibrosis	%Células inflamatorias
	%	%C.I	%C.I.D.	% Necrosis			
N1/2	70	100	0	0	0	25	5
N2/2	35	80	20	3	0	60	5
N3/2	5	0	100	0	0	85	10
N4/2	50	20	80	40	5	40	5
N5I/2	50	100	0	0	0	45	5
N5D/2	80	100	0	0	0	15	5
N6/2	35	90	10	0	15	45	5
N8/2	8	100	0	0	1	88	3
N9/2	45	100	0	0	0	50	5
N10/2	0	?	?	0	10	85	5
N11/2	70	100	0	0	1	24	5
N14/2	12	80	20	0	2	81	5
N16/2	0	100	0	0	5	70	5
N17/2	10	90	10	0	0	83	7
N18/2	22,5	100	0	0	0	71,5	6
N19/2	0	0	0	0	3	77	20
N21/2	45	75	25	5	1	49	5
N22/2	0	100	0	0	0	30	5
N24/2	10	0	100	0	10	65	15
N25/2	75	100	0	0	0	20	5
N26/2	30	70	30	0	1	64	5
N27/2	20	100	20	0	1	76	3
N28/2	32	100	0	0	7	54	7
N29/2	10	0	100	0	4	84	2
N30/2	34	100	0	0	0	33	33
N32/2	0	0	0	0	20	67,5	7,5
N33/2	8	100	0	0	2	75	17
N34/2	25	65	35	40	1	70	5

N35/2	20	50	50	5	2	73	5
N37/2	50	40	10	0	2	43	5
N40/2	0	0	0	0	0	85	15
N41/2	30	0	100	0	0	60	10
N43/2	5	0	100	0	30	60	5
N45/2	75	95	5	0	0	8	9
N46/2	0	0	0	0	25	70	5

QT= quimioterapia, C.I.= componente infiltrante, C.I.D.= componente intraductal

Tabla 13. Porcentaje de células neoplásicas respecto del total de elementos celulares en las biopsias previas y posteriores al tratamiento

<i>Muestras</i>	<i>%células neoplásicas en el tumor antes de la quimioterapia</i>	<i>%células neoplásicas en el tumor después de la quimioterapia</i>
N1	86	93
N2	96	88
N3	70	15
N4	38	83
N5I	91	91
N5D	91,5	94
N6	98	64
N8	76	67
N9	89	90
N10	92	0
N11	50	92
N14	73	63
N16	67	67
N17	75	59
N18	75	79
N19	71	0
N21	85	88
N22	80	93
N24	60	48
N25	87	94
N26	78	83
N27	67	83
N28	84	70
N29	88	63
N30	80	51
N32	85	0
N33	83	30
N34	73	81
N35	70	74
N37	87,66	88
N40	82	0
N41	53	75
N43	40	13

---

N45	88	89
N46	89	0

---

En la Tabla 13 se puede observar que en general el porcentaje de células neoplásicas en las biopsias previas al tratamiento es del 70-80%. Solamente las muestras N4/1, N11/1, N41/1 y N43/1 presentan valores inferiores al 60%. Incluimos estas muestras en el análisis basándonos en la relación tejido tumoral/tejido sano, que en todos los casos fue al menos del doble. En cuanto a los demás elementos celulares que podrían influir en el análisis genómico, decidimos no excluir ninguna muestra en base a su contenido en células inflamatorias, ya que el microambiente tumoral y los procesos inflamatorios son decisivos en la respuesta al tratamiento.

## II. Análisis del balance oxidativo

### II.1 Daño oxidativo en el ADN de linfocitos de sangre periférica

Los resultados obtenidos tras llevar a cabo el ensayo de Comet alcalino muestran que las pacientes del grupo N sufrieron un aumento significativo del daño tras el tratamiento con quimioterapia en relación al daño detectado antes de dicho tratamiento. El daño oxidativo experimentado por el grupo N tras el tratamiento es equiparable al registrado por el grupo A y el grupo M antes y después del tratamiento, pues en estos dos grupos de pacientes no se observó un aumento significativo del daño tras la quimioterapia. La comparación entre grupos revela niveles de daño similares entre los grupos A y M, tanto previos como posteriores al tratamiento y una significativa disminución del daño oxidativo registrado por las pacientes del grupo N en relación al observado en las pacientes de los grupos A y M antes del tratamiento.

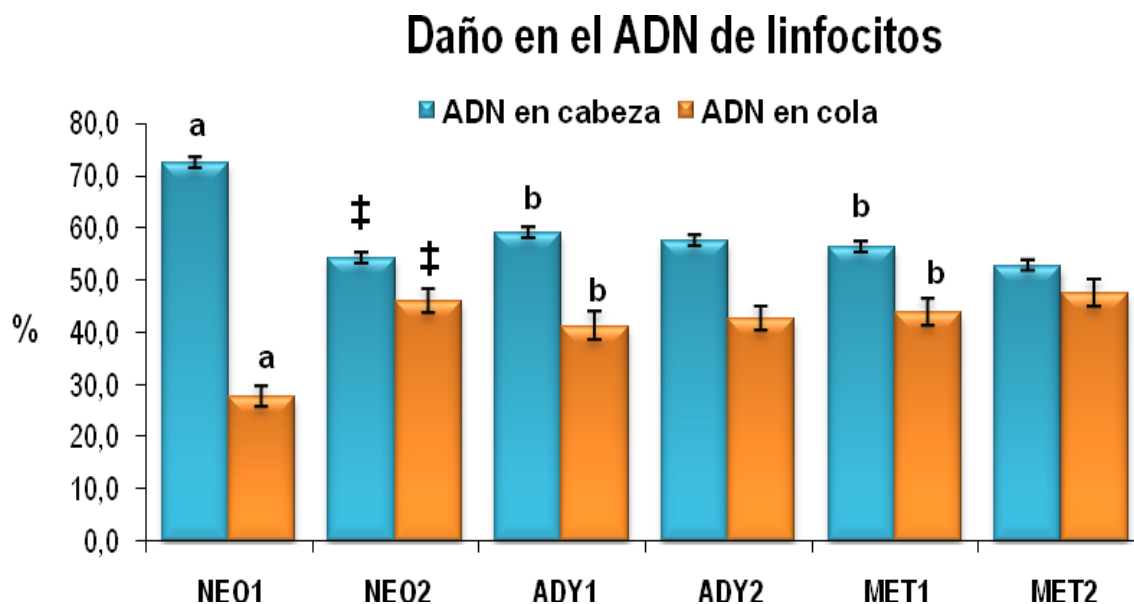


Figura32. Daño oxidativo en ADN de linfocitos de sangre periférica de pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas. Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (n= 30) antes y después del tratamiento con quimioterapia. Las abreviaturas del gráfico tienen el siguiente significado: NEO1= grupo de neoadyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia; NEO2= grupo de neoadyuvancia después del tratamiento con quimioterapia; ADY1= grupo de adyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia; ADY2= grupo de adyuvancia después del tratamiento con quimioterapia; MET1= grupo de metástasis antes del tratamiento con quimioterapia; MET2= grupo de metástasis después del tratamiento con quimioterapia. Las diferencias estadísticas debidas a la quimioterapia para un mismo grupo experimental ( $p < 0,001$ ) aparecen indicadas por el símbolo ‡. Las diferencias estadísticas entre los distintos grupos experimentales y para cada periodo (antes y después del tratamiento) ( $p < 0,05$ ) aparecen indicadas en el gráfico con letras a y b, de tal forma que las medias que no comparten letras superscritas son estadísticamente diferentes.

## II.2 Actividad de las enzimas reparadoras del ADN

No se observaron diferencias entre los distintos grupos experimentales ni diferencias intragrupo entre muestras previas y posteriores al tratamiento con quimioterapia en la actividad del enzima RPA. En cuanto al enzima KU86, observamos una disminución significativa de la actividad del enzima tras el tratamiento en los grupos de pacientes neoadyuvantes y metastásicas y un aumento significativo de la actividad del enzima en el grupo de adyuvancia, al comparar los niveles de actividad de KU86 previos y posteriores al tratamiento. La comparación de la actividad entre los grupos experimentales puso de manifiesto diferencias estadísticamente significativas en la actividad de KU68 previa a la administración de quimioterápicos, siendo ésta mayor en el grupo de metástasis en relación a los grupos de adyuvancia y neoadyuvancia, intermedia en el grupo de neoadyuvancia y menor en el grupo de adyuvancia con respecto a los otros dos grupos. Los niveles de actividad de KU86 tras el tratamiento fueron muy similares entre el grupo de adyuvancia y el de metástasis.

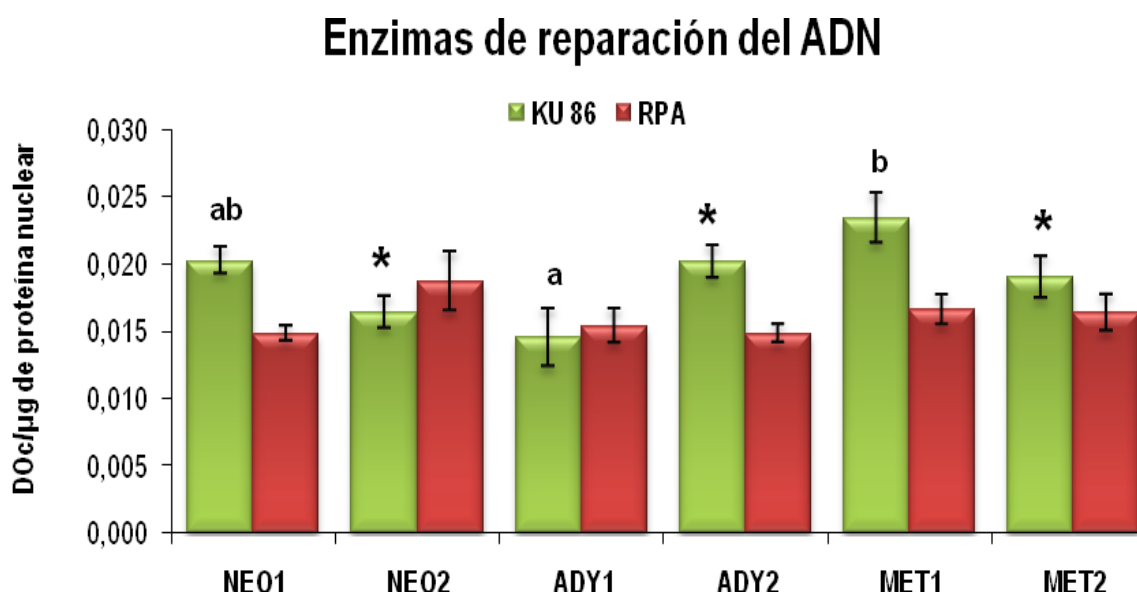


Figura 33. Actividad de las enzimas KU86 y RPA en pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas. Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (n= 15) antes y después del tratamiento con quimioterapia. Las abreviaturas del gráfico tienen el siguiente significado: NE01= grupo de neoadyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia; NE02= grupo de neoadyuvancia después del tratamiento con quimioterapia; ADY1= grupo de adyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia; ADY2= grupo de adyuvancia después del tratamiento con quimioterapia; MET1= grupo de metástasis antes del tratamiento con quimioterapia; MET2= grupo de metástasis después del tratamiento con quimioterapia. Las diferencias estadísticas debidas a la quimioterapia para un mismo grupo experimental ( $p < 0,05$ ) aparecen indicadas por el símbolo \*. Las diferencias estadísticas entre los distintos grupos experimentales y para cada periodo (antes y después del tratamiento) ( $p < 0,05$ ) aparecen indicadas en el gráfico con letras a y b, de tal forma que las medias que no comparten letras superscritas son estadísticamente diferentes.



### II.3 Contenido de proteínas carbonilo en plasma

El análisis de la concentración de proteínas carbonilo en el plasma de las pacientes de los tres grupos experimentales, mostró un aumento estadísticamente significativo de ésta en el grupo de neoadyuvancia tras el tratamiento con quimioterapia. En los grupos de adyuvancia y metástasis las diferencias entre las condiciones previas y posteriores al tratamiento no fueron significativas. Al comparar el contenido de proteínas carbonilo en plasma entre grupos, observamos que la concentración es significativamente menor en el grupo de neoadyuvancia previo al tratamiento en relación a los grupos de adyuvancia y metástasis previos al tratamiento.

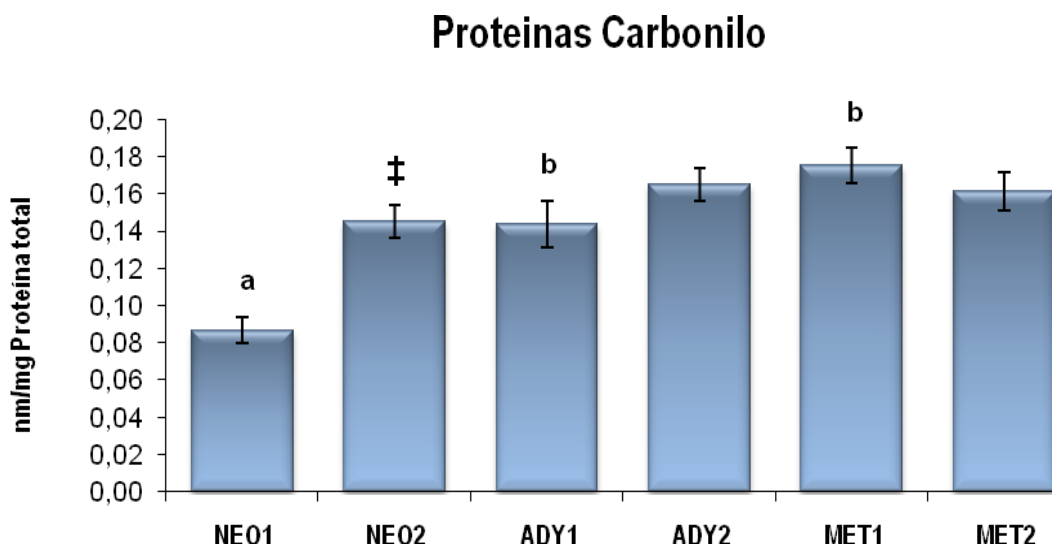


Figura 34. *Concentración de proteínas carbonilo en el plasma de pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas.* Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (n= 30) antes y después del tratamiento con quimioterapia. Las abreviaturas del gráfico tienen el siguiente significado: NEO1= grupo de neoadyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia; NEO2= grupo de neoadyuvancia después del tratamiento con quimioterapia; ADY1= grupo de adyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia; ADY2= grupo de adyuvancia después del tratamiento con quimioterapia; MET1= grupo de metástasis antes del tratamiento con quimioterapia; MET2= grupo de metástasis después del tratamiento con quimioterapia. Las diferencias estadísticas debidas a la quimioterapia para un mismo grupo experimental ( $p < 0,001$ ) aparecen indicadas por el símbolo ‡. Las diferencias estadísticas entre los distintos grupos experimentales y para cada periodo (antes y después del tratamiento) ( $p < 0,05$ ) aparecen indicadas en el gráfico con letras a y b, de tal forma que las medias que no comparten letras superscritas son estadísticamente diferentes.

### II.4 Análisis de la concentración de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La concentración en plasma de TBARS es una estimación aproximada de la concentración de malondialdehído presente en sangre y un procedimiento indirecto para cuantificar el proceso de peroxidación lipídica. El análisis de TBARS reveló un significativo aumento de la peroxidación

lipídica en pacientes adyuvantes tras el tratamiento. El análisis entre grupos mostró que la concentración de TBARS fue menor en las pacientes adyuvantes respecto de las pacientes neoadyuvantes y metastásicas antes del tratamiento con quimioterapia.

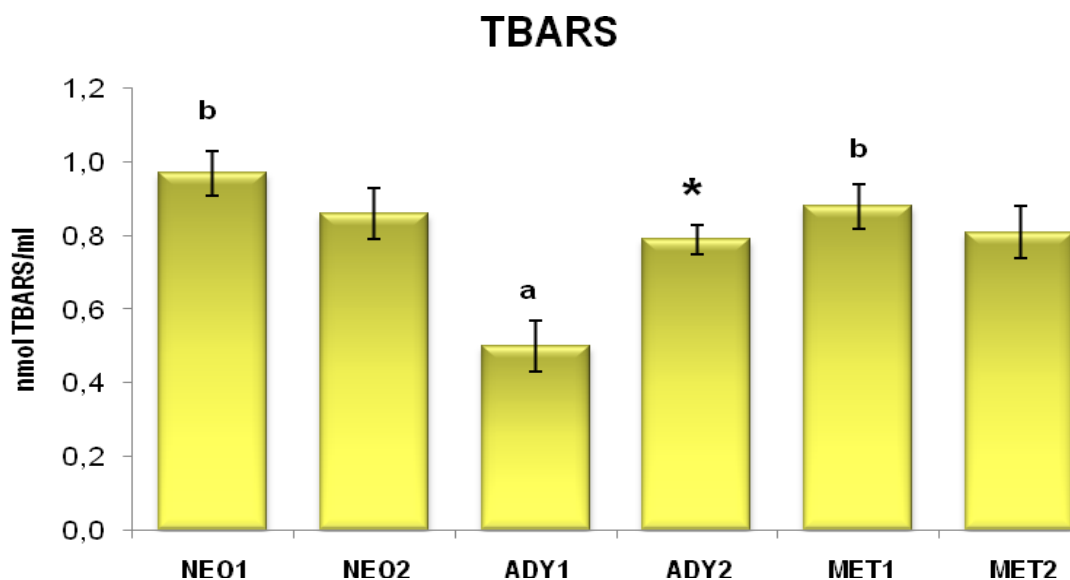


Figura35. *Concentración de TBARS en el plasma de pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas.* Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (n= 30) antes y después del tratamiento con quimioterapia. Las abreviaturas del gráfico tienen el siguiente significado: NEO1= grupo de neoadyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia; NEO2= grupo de neoadyuvancia después del tratamiento con quimioterapia; ADY1= grupo de adyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia; ADY2= grupo de adyuvancia después del tratamiento con quimioterapia; MET1= grupo de metástasis antes del tratamiento con quimioterapia; MET2= grupo de metástasis después del tratamiento con quimioterapia. Las diferencias estadísticas debidas a la quimioterapia para un mismo grupo experimental ( $p < 0,05$ ) aparecen indicadas por el símbolo \*. Las diferencias estadísticas entre los distintos grupos experimentales y para cada periodo (antes y después del tratamiento) ( $p < 0,05$ ) aparecen indicadas en el gráfico con letras a y b, de tal forma que las medias que no comparten letras superscritas son estadísticamente diferentes.

## II.5 Capacidad antioxidante total del plasma

La capacidad antioxidante total del plasma de pacientes neoadyuvantes fue significativamente menor tras el tratamiento. En el caso de las pacientes adyuvantes y metastásicas se observó un aumento significativo de la capacidad antioxidante tras el tratamiento con quimioterapia. La comparación entre grupos mostró que la capacidad antioxidante total del plasma fue significativamente mayor en pacientes adyuvantes y metastásicas tras el tratamiento en comparación con los valores registrados por las pacientes neoadyuvantes al finalizar el tratamiento con quimioterapia.

### Capacidad antioxidante total del plasma

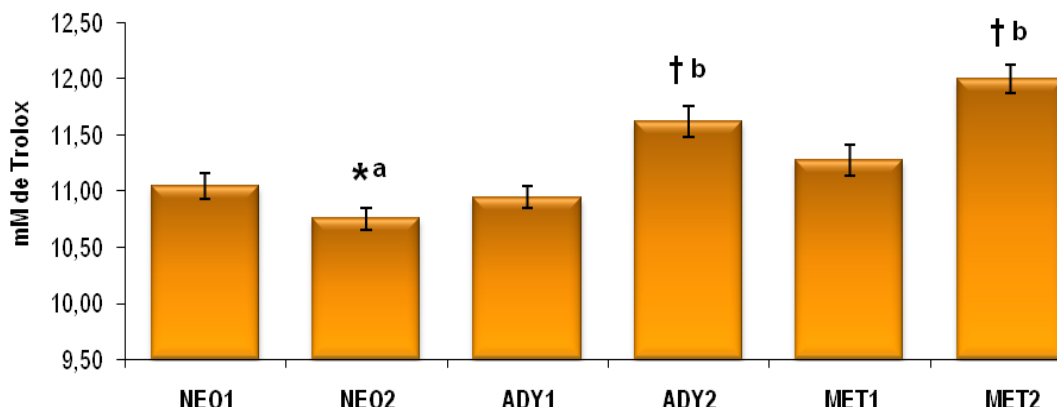


Figura 36. *Capacidad antioxidante total del plasma de pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas.* Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (n= 30) antes y después del tratamiento con quimioterapia. Las abreviaturas del gráfico tienen el siguiente significado: NEO1= grupo de neoadyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia; NEO2= grupo de neoadyuvancia después del tratamiento con quimioterapia; ADY1= grupo de adyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia; ADY2= grupo de adyuvancia después del tratamiento con quimioterapia; MET1= grupo de metástasis antes del tratamiento con quimioterapia; MET2= grupo de metástasis después del tratamiento con quimioterapia. Las diferencias estadísticas debidas a la quimioterapia para un mismo grupo experimental aparecen indicadas por los símbolos \* ( $p < 0,05$ ) y † ( $p < 0,01$ ). Las diferencias estadísticas entre los distintos grupos experimentales y para cada periodo (antes y después del tratamiento) ( $p < 0,05$ ) aparecen indicadas en el gráfico con letras a y b, de tal forma que las medias que no comparten letras superscritas son estadísticamente diferentes.

### II.6 Concentración de vitaminas liposolubles en plasma sanguíneo

Los resultados mostraron un aumento significativo de la concentración de retinol en el plasma de las pacientes del grupo de neoadyuvancia y una disminución significativa de la concentración de esta vitamina en el grupo de metástasis, en ambos casos tras el tratamiento con quimioterapia. En el grupo de pacientes adyuvantes no se registraron cambios en la concentración del retinol al comparar los resultados previos y posteriores al tratamiento. La comparación entre grupos reveló diferencias significativas entre la concentración de retinol de los grupos de neoadyuvancia y metástasis, siendo intermedia entre ambos la del grupo de adyuvancia.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de tocoferol ni entre las muestras previas y posteriores al tratamiento con quimioterapia, ni entre los tres grupos experimentales.

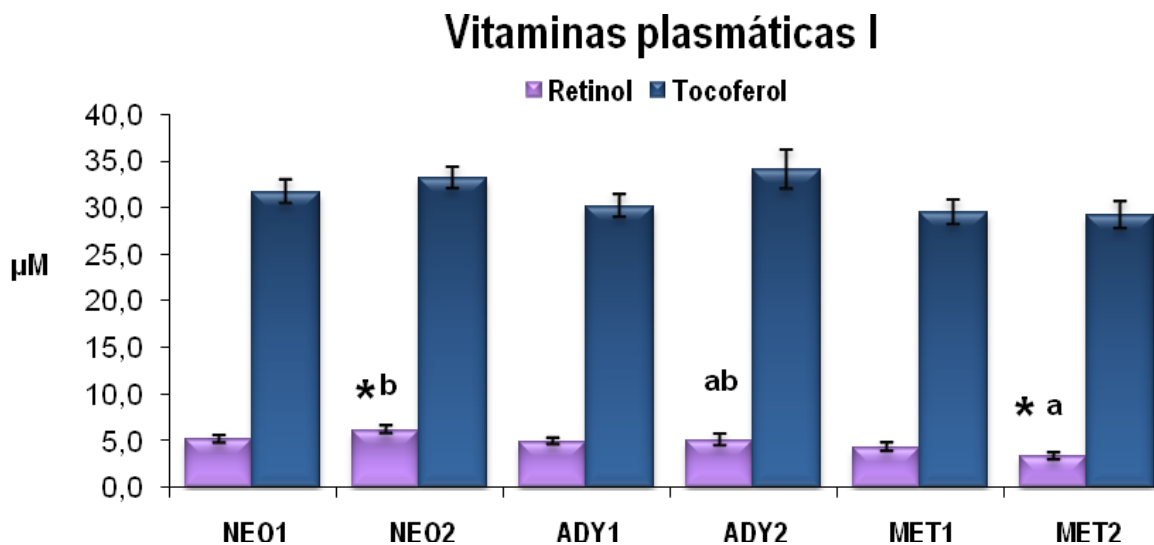


Figura 37. Concentración de retinol y tocoferol en el plasma de pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas. Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (n= 30) antes y después del tratamiento con quimioterapia. Las abreviaturas del gráfico tienen el siguiente significado: NEO1= grupo de neoadyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia; NEO2= grupo de neoadyuvancia después del tratamiento con quimioterapia; ADY1= grupo de adyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia; ADY2= grupo de adyuvancia después del tratamiento con quimioterapia; MET1= grupo de metástasis antes del tratamiento con quimioterapia; MET2= grupo de metástasis después del tratamiento con quimioterapia. Las diferencias estadísticas para un mismo grupo experimental ( $p < 0,05$ ) aparecen indicadas por el símbolo \*. Las diferencias estadísticas entre los distintos grupos experimentales y para cada periodo (antes y después del tratamiento) ( $p < 0,05$ ) aparecen indicadas en el gráfico con letras a y b, de tal forma que las medias que no comparten letras superscritas son estadísticamente diferentes.

En cuanto al contenido de coenzima Q10 en el plasma de las pacientes de los tres grupos experimentales, observamos que la concentración de coenzima Q10 disminuye en pacientes neoadyuvantes, mientras que en el grupo de adyuvancia aumenta y en el de metástasis permanece sin cambios, en todos los casos tras el tratamiento. La comparación entre grupos muestra que, antes de comenzar el tratamiento con quimioterapia, la concentración de coenzima Q10 total son significativamente menores en las pacientes del grupo de adyuvancia en relación a las del grupo de neoadyuvancia.

## Vitaminas plasmáticas II

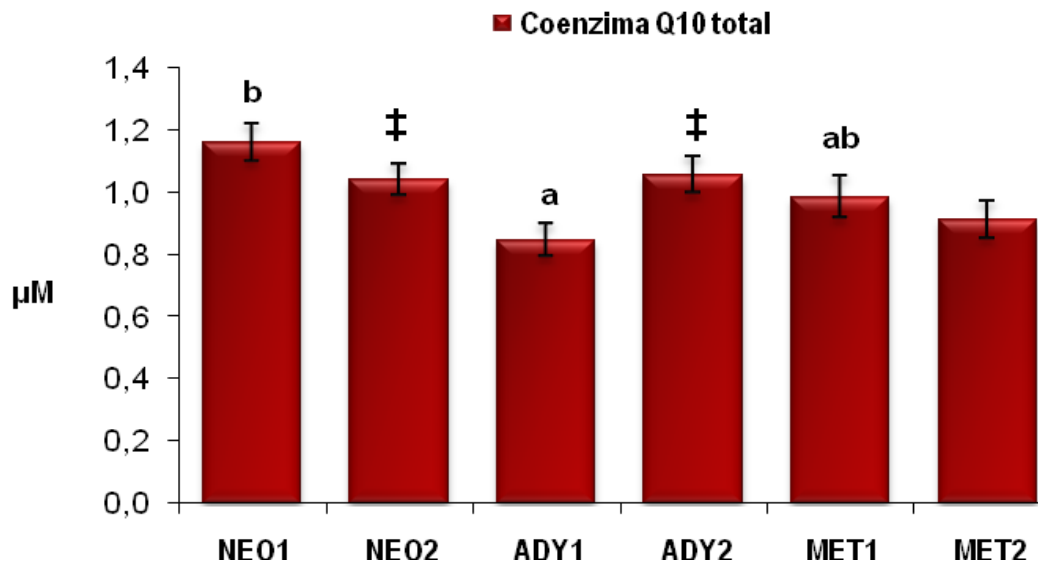


Figura38. Concentración de Coenzima Q10 total en el plasma de pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas. Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (n= 30) antes y después del tratamiento con quimioterapia. Las abreviaturas del gráfico tienen el siguiente significado: NEO1= grupo de neoadyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia; NEO2= grupo de neoadyuvancia después del tratamiento con quimioterapia; ADY1= grupo de adyuvancia antes del tratamiento con quimioterapia; ADY2= grupo de adyuvancia después del tratamiento con quimioterapia; MET1= grupo de metástasis antes del tratamiento con quimioterapia; MET2= grupo de metástasis después del tratamiento con quimioterapia. Las diferencias estadísticas debidas a la quimioterapia para un mismo grupo experimental ( $p < 0,05$ ) aparecen indicadas por el símbolo \*. Las diferencias estadísticas entre los distintos grupos experimentales y para cada periodo (antes y después del tratamiento) ( $p < 0,05$ ) aparecen indicadas en el gráfico con letras a y b, de tal forma que las medias que no comparten letras superscritas son estadísticamente diferentes.

## III Análisis de la expresión génica

### III.1 Extracción de ARN total

Como ya se indicó previamente, tras el procesamiento de las muestras de tejido mamario, se midió la concentración y pureza del ARN extraído así como se evaluó la integridad del mismo mediante la visualización de las bandas resultantes tras una electroforesis en gel de agarosa (Figura 39) o mediante el valor del parámetro RIN obtenido tras el análisis con el autoanalizador Agilent 2001 Bioanalyzer (Figura 40).

La cantidad y pureza del ARN total extraído se muestra en la Tabla 14. Tal y como aparece en esta tabla, algunas de las muestras fueron descartadas para el análisis genómico ya que no fue posible obtener cantidad suficiente de ARN. Además, se descartaron otras dos muestras, a pesar de tener cantidad suficiente de ARN, puesto que se había descartado su muestra pareada. Las muestras que no siguieron el análisis aparecen señaladas en rojo en la Tabla 14.

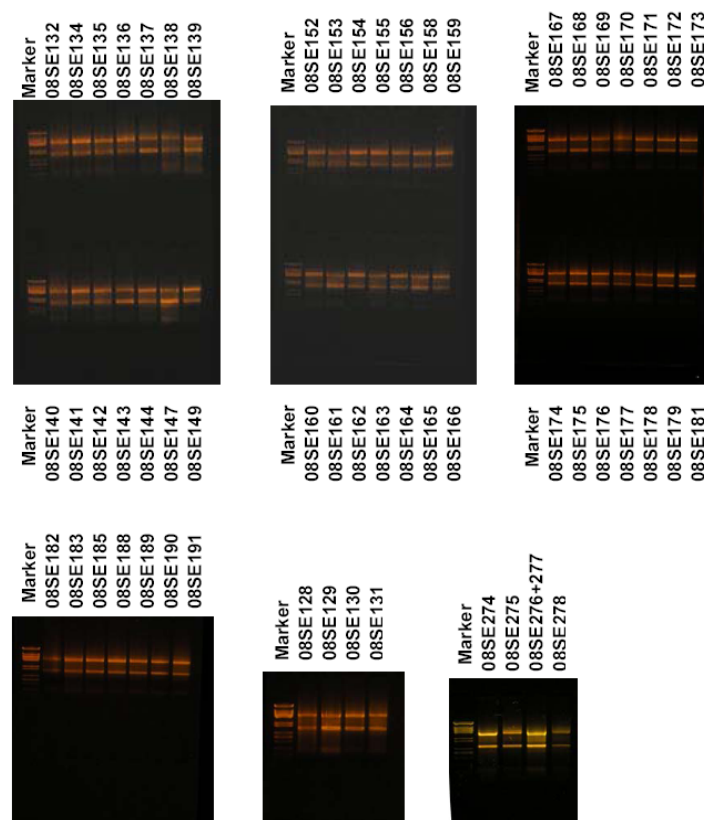


Figura 39. Visualización de los ARNs extraídos por electroforesis en gel de agarosa

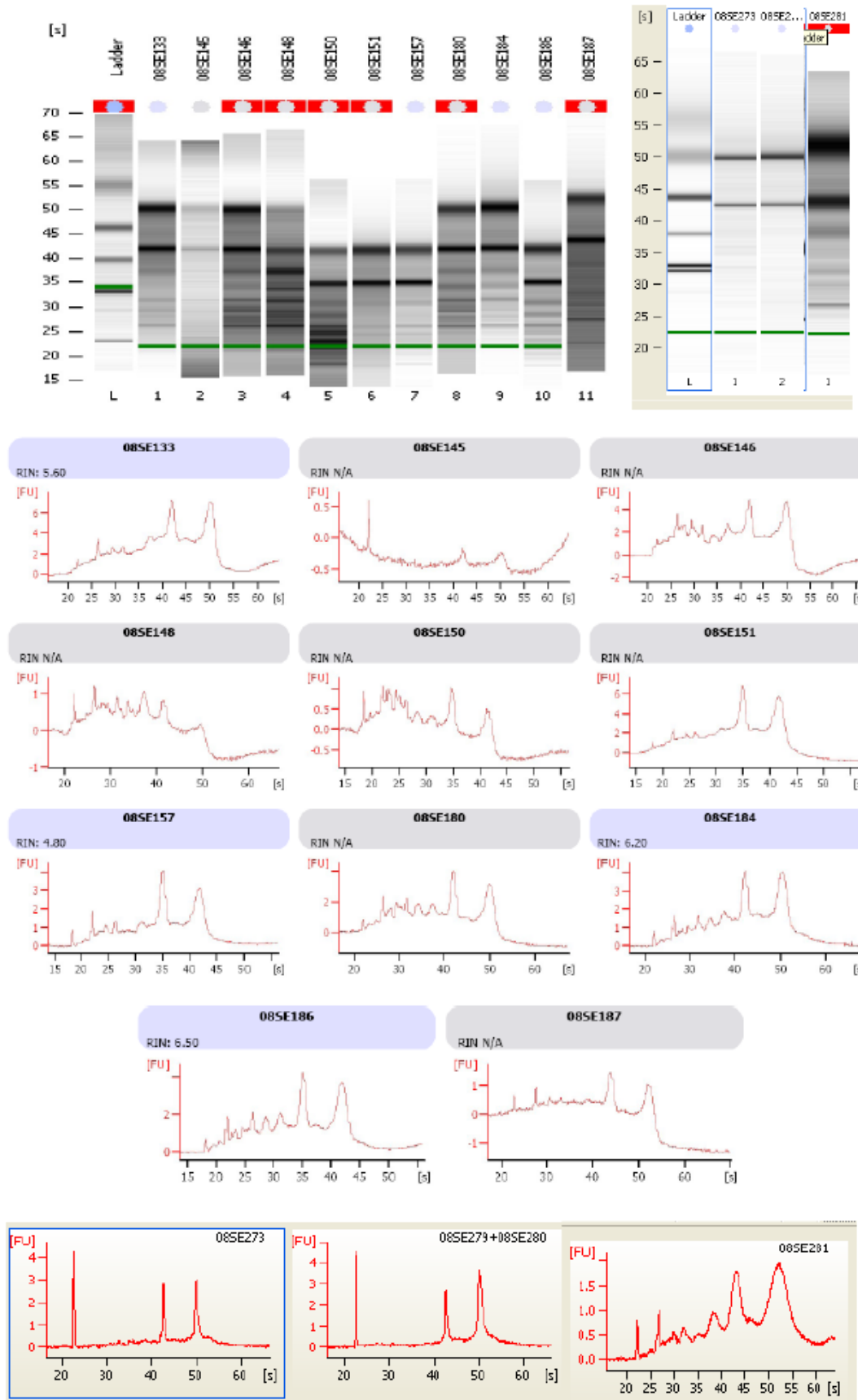


Figura 40. Comprobación en el Bioanalyzer de algunos de los ARNs purificados.

Tabla 14. Medida de la pureza y concentración del ARN total extraído

Muestra	[ARN] ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Pureza ( $A_{260/280}$ )	$\mu\text{g total}$	Muestra	[ ] ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Pureza ( $A_{260/280}$ )	$\mu\text{g total}$
08SE128	0,149	2,09	4,48	08SE164	0,244	2,05	7,33
08SE129	1,634	2,08	49,03	08SE165	0,715	2,08	21,44
08SE130	0,099	2,1	2,98	08SE166	0,084	2,05	2,53
08SE131	0,058	2,18	1,73	08SE167	0,206	2,05	6,18
08SE132	0,214	2,06	6,43	08SE168	0,147	2,04	4,41
08SE133	0,037	1,98	1,12	08SE169	0,201	2,06	6,04
08SE134	0,408	2,05	12,24	08SE170	0,063	2,07	1,88
08SE135	0,126	2,06	3,78	08SE171	0,200	2,07	5,99
08SE136	0,101	2,06	3,03	08SE172	0,094	2,07	2,82
08SE137	0,170	2,04	5,10	08SE173	0,275	2,06	8,24
08SE138	0,152	2,02	4,57	08SE174	0,074	2,09	2,23
08SE139	0,725	2,08	21,75	08SE175	0,600	2,06	17,99
08SE140	0,062	2	1,86	08SE176	0,445	2,03	13,36
08SE141	0,073	2	2,20	08SE177	0,107	2,06	3,22
08SE142	0,063	2,01	1,89	08SE178	0,126	2,04	3,78
08SE143	0,247	2,04	7,41	08SE179	0,231	2,05	6,92
08SE144	0,523	2,05	15,70	08SE180	0,040	2,08	1,19
<b>08SE145</b>	<b>0</b>	<b>0,53</b>	<b>0</b>	08SE181	0,247	2,05	7,42
08SE146	0,044	2,02	1,31	08SE182	0,057	2,05	1,71
08SE147	1,241	2,07	37,23	08SE183	0,294	2,07	8,81
<b>08SE148</b>	<b>0,014</b>	<b>1,97</b>	<b>0,42</b>	08SE184	0,045	2,01	1,34
<b>08SE149</b>	<b>0,184</b>	<b>2,03</b>	<b>5,53</b>	08SE185	0,236	2,01	7,08
<b>08SE150</b>	<b>0,012</b>	<b>1,89</b>	<b>0,35</b>	08SE186	0,044	1,98	1,31
<b>08SE151</b>	<b>0,042</b>	<b>2,08</b>	<b>1,26</b>	<b>08SE187</b>	<b>0,010</b>	<b>1,78</b>	<b>0,29</b>
08SE152	0,080	2,1	2,41	08SE188	0,097	2,07	2,92
08SE153	0,132	2,02	3,97	08SE189	0,243	2,05	7,28
08SE154	0,397	2,02	11,90	08SE190	0,640	2,07	19,20
08SE155	0,216	2,04	6,48	08SE191	0,076	2,01	2,28
08SE156	0,249	2,03	7,47	08SE273	0,037	1,95	1,11
08SE157	0,036	2,04	1,08	08SE274	1,205	2,11	36,15
08SE158	0,501	2,08	15,02	08SE275	0,850	2,10	25,50
08SE159	0,195	2,06	5,84	08SE276+277	1,720	2,09	51,60
08SE160	0,408	2,05	12,23	08SE278	0,414	2,04	12,43
08SE161	0,723	2,11	21,69	08SE279+280	0,032	1,80	0,95
08SE162	0,055	2,04	1,66	<b>08SE281</b>	<b>0,011</b>	<b>1,55</b>	<b>0,34</b>
08SE163	0,339	2,06	10,16				

### III.2 Síntesis y fragmentación de ARNc biotinilado. Preparación de las mezclas de hibridación

Tras la síntesis de ARNc marcado con biotina, tal y como se indica en el apartado II.9.3.2 de esta Tesis, se llevó a cabo la cuantificación y evaluación de la integridad del mismo, siguiendo un protocolo idéntico al utilizado en el caso del ARN total. En la Tabla 15 se muestran los resultados de este proceso.



En algunas de las muestras no se obtuvo cantidad suficiente de ARNc para hibridar con el chip, por lo que se repitió la síntesis a partir de 1,5µg de ARN, cuando había esa cantidad disponible. En algunos de los casos, incluso en la segunda síntesis no se obtuvo cantidad suficiente de ARNc de tal forma que al seleccionar las muestras de ARNc a fragmentar para preparar las mezclas de hibridación, se unió el ARNc de dos síntesis en el caso de las tres muestras señaladas en azul en la Tabla 15.

Tabla 15. *Medida de la concentración y pureza de los ARNc tras la purificación*

<i>muestra</i>	<i>µg/µl</i>	<i>260/280</i>	<i>µg total</i>	<i>muestra</i>	<i>µg/µl</i>	<i>260/280</i>	<i>µg total</i>
08SE128	1,26	2,06	22,94	08SE167	1,32	2,12	22,76
08SE129	1,06	2,03	18,61	08SE168	0,93	2,07	16,67
08SE130	1,03	2,06	18,57	08SE169	1,07	2,06	18,26
08SE131	0,21	2,06	2,99	08SE170	1,88	2,06	30,96
08SE131	0,42	2,04	6,96	08SE171	1,22	2,04	19,74
08SE132	1,09	2,09	19,71	08SE172	1,69	2,11	29,42
08SE133	0,62	2,03	10,78	08SE173	0,71	2,09	11,78
08SE134	2,23	2,07	41,37	08SE174	0,60	2,16	9,80
08SE135	1,25	2,08	20,25	08SE174	0,86	2,03	14,43
08SE136	0,94	2,01	16,39	08SE175	0,58	2,14	9,44
08SE137	0,94	2,00	15,92	08SE175	2125,00	1,96	38,88
08SE138	0,59	2,00	9,62	08SE176	0,78	2,13	13,82
08SE138	0,46	1,99	8,20	08SE177	0,64	2,10	11,16
08SE138	1274,00	2,09	23,99	08SE178	0,96	2,05	15,32
08SE139	1,12	2,01	20,28	08SE179	1,15	2,05	18,55
08SE140	0,94	2,02	16,86	08SE180	0,96	2,05	15,32
08SE141	1,48	2,08	25,64	08SE181	1,33	2,07	21,61
08SE142	1,49	2,10	25,82	08SE182	0,23	2,05	3,14
08SE143	0,28	2,00	4,04	08SE182	0,71	2,05	12,47
08SE143	1983,00	2,09	36,18	08SE183	1,18	2,06	19,06
08SE144	1,77	2,11	30,86	08SE184	0,55	2,07	9,45
08SE146	0,74	1,98	12,69	08SE184	0,32	2,05	4,80
08SE147	1,61	2,07	29,59	08SE185	0,59	2,07	10,21
08SE152	1,16	2,09	21,04	08SE186	1,32	2,09	22,76
08SE153	0,72	1,99	12,68	08SE188	0,73	2,07	12,87
08SE154	1,62	2,09	28,16	08SE189	0,57	2,09	10,40
08SE155	1,41	2,11	24,38	08SE190	0,36	2,03	5,48
08SE156	1,12	2,07	19,16	08SE190	2969,00	2,07	54,90
08SE157	0,76	2,09	12,68	08SE191	0,54	2,10	9,26
08SE158	0,98	2,10	16,64	08SE191	0,18	1,97	1,97
08SE159	1,25	2,11	22,75	08SE273	0,65	2,11	10,70
08SE160	1,05	2,08	17,90	08SE274	0,77	2,13	13,63
08SE161	1,08	2,07	18,44	08SE275	0,62	2,07	10,16
08SE162	1,10	2,06	18,80	08SE276+08SE277	0,37	2,00	6,03
08SE163	1,33	2,12	22,94	08SE276+08SE277	2661,00	2,07	49,06
08SE164	1,22	2,04	19,74	08SE278	0,90	2,09	17,00
08SE165	1,36	2,04	24,84	08SE279+08SE280	0,62	2,12	10,16
08SE166	0,94	2,08	15,92				

Tras la obtención de los ARNc biotinilados, se llevó a cabo su fragmentación para preparar las mezclas de hibridación con los chips. Como en los casos anteriores la eficiencia de este proceso fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa, mostrando las imágenes representadas en la Figura 41.

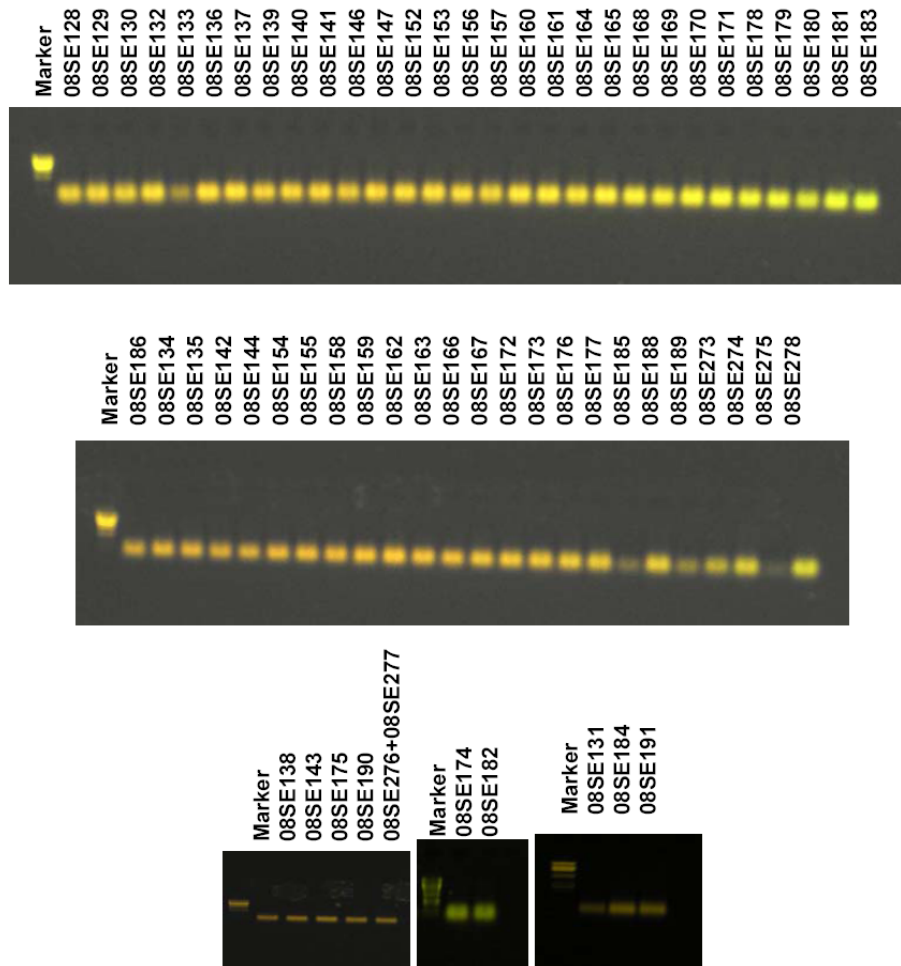


Figura41. Visualización de los ARNc fragmentados por electroforesis en gel de agarosa

### III.3 Análisis de los controles de calidad

#### III.3.1 Control de calidad de los procesos de hibridación y escaneado

Tras la hibridación y escaneado de los microarrays, se procedió a la inspección visual de las imágenes obtenidas para evaluar la calidad general del experimento. La visualización de estas imágenes dio muestra de la buena calidad tanto de las hibridaciones llevadas a cabo como de los procesos anteriores pues correspondieron con fondos oscuros y señales de hibridación brillantes.

Una vez observadas las imágenes de cada chip, se llevó a cabo la evaluación de la calidad de las mezclas de hibridación mediante el análisis de los controles spike y la relación 3'/5' de los genes domésticos. Los resultados del análisis de calidad se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Valores de los parámetros de calidad para cada uno de los chips analizados

Muestra	Spike control BioB	GAPDH (3'/5')	Factor de escalado (TGT=100)	%P	Muestra	Spike control BioB	GAPDH (3'/5')	Factor de escalado (TGT=100)	%P
08SE128	P	1,19	1,250	47,8	08SE165	P	2,07	1,336	45,0
08SE129	P	1,04	1,138	45,6	08SE166	P	2,54	1,297	47,6
08SE130	P	2,57	1,197	48,2	08SE167	P	1,84	1,192	49,4
08SE131	P	1,65	1,036	48,2	08SE168	P	1,99	1,143	44,9
08SE132	P	2,15	1,282	44,8	08SE169	P	1,67	0,922	48,7
08SE133	P	2,13	1,150	47,3	08SE170	P	1,55	0,719	48
08SE134	P	1,81	1,331	44,2	08SE171	P	1,80	0,762	49
08SE135	P	2,88	1,183	45,9	08SE172	P	1,57	1,111	47,2
08SE136	P	1,48	1,299	45,2	08SE173	P	2,97	1,324	46,2
08SE137	P	1,60	1,421	41,1	08SE174	P	1,29	1,005	48,1
08SE138	P	1,73	1,613	42,6	08SE175	P	1,31	1,054	46,6
08SE139	P	1,86	1,054	47,5	08SE176	P	1,80	0,941	46,6
08SE140	P	2,39	1,599	44,3	08SE177	P	1,81	0,735	50,2
08SE141	P	1,74	1,082	49,3	08SE178	P	1,70	1,142	43,4
08SE142	P	2	1,366	45,7	08SE179	P	1,85	0,691	50
08SE143	P	2,22	1,551	38,3	08SE180	P	2,37	1,415	45,5
08SE144	P	1,47	1,034	46,8	08SE181	P	2,17	0,974	49,5
08SE146	P	1,96	1,341	47,0	08SE182	P	1,96	0,932	50
08SE147	P	1,50	1,101	46,0	08SE183	P	2,34	0,820	52,3
08SE152	P	1,97	1,571	45,8	08SE184	P	1,93	0,674	51
08SE153	P	1,68	1,221	47,3	08SE185	P	2,35	1,317	44,4
08SE154	P	1,70	1,216	46,7	08SE186	P	1,53	0,764	49,5
08SE155	P	2,00	1,378	45,0	08SE188	P	2,30	1,065	48,6
08SE156	P	1,92	1,282	46,3	08SE189	P	4,24	1,646	44
08SE157	P	2,63	1,659	46,8	08SE190	P	1,73	1,163	42,9
08SE158	P	1,68	1,444	43,0	08SE191	P	1,83	0,699	52,2
08SE159	P	2,11	1,400	45,1	08SE273	P	2,00	1,294	47,7
08SE160	P	1,13	1,302	42,1	08SE274	P	1,24	1,034	44,9
08SE161	P	1,47	1,284	44,6	08SE275	P	1,62	1,346	40,5
08SE162	P	1,92	0,998	47,5	08SE276 + 08SE277	P	1,29	0,978	47,6
08SE163	P	1,76	1,146	48,1	08SE278	P	1,40	1,127	48,5
08SE164	P	1,99	1,471	41,9	08SE279 + 08SE280	P	1,77	0,841	50,3

Observadas las imágenes de cada uno de los arrays hibridados y teniendo en cuenta los criterios de calidad (presencia de controles spike y relaciones 3'/5' de los genes *housekeeping*), los microarrays hibridados superaron los criterios de calidad establecidos. Únicamente una de las muestras presenta un valor de relación 3'/5' para la GAPDH superior al recomendado de 3.

### III.3.2 Control de calidad de los datos derivados de los microarrays Human Genome U133Plus2.0.

Los parámetros estudiados en relación a la calidad de los microarrays fueron  $P\ call\ %$  para evaluar la calidad de la muestra y *Array Outlier* y las gráficas NUSE para la identificación de *outliers*, es decir, muestras cuyos datos son significativamente diferentes al resto frente al análisis que se desea realizar restando consistencia al conjunto de todos los datos.

Los resultados de este análisis se encuentran resumidos en la Tabla 16 y tal como es posible observar en ella los valores  $P\ call\ %$  fueron aceptables para todas las muestras, sin embargo, el análisis de los parámetros *Array Outlier* y las gráficas NUSE identificaron algunas de las muestras como *outliers*: 08SE131, 08SE184 y 08SE191. Estas muestras habían presentado problemas durante el procesamiento, ya que el rendimiento en la síntesis de ARNc fue muy bajo y en los tres casos se decidió unir el ARNc procedente de dos síntesis para la preparación de la mezcla de hibridación. A la vista del elevado porcentaje de *Array Outlier* obtenido para estas muestras se prevé que la variabilidad ajena a efectos biológicos introducida por las mismas en el análisis puede ser mayor que la información que aporten. Por lo tanto se decidió eliminar dichas muestras del análisis.

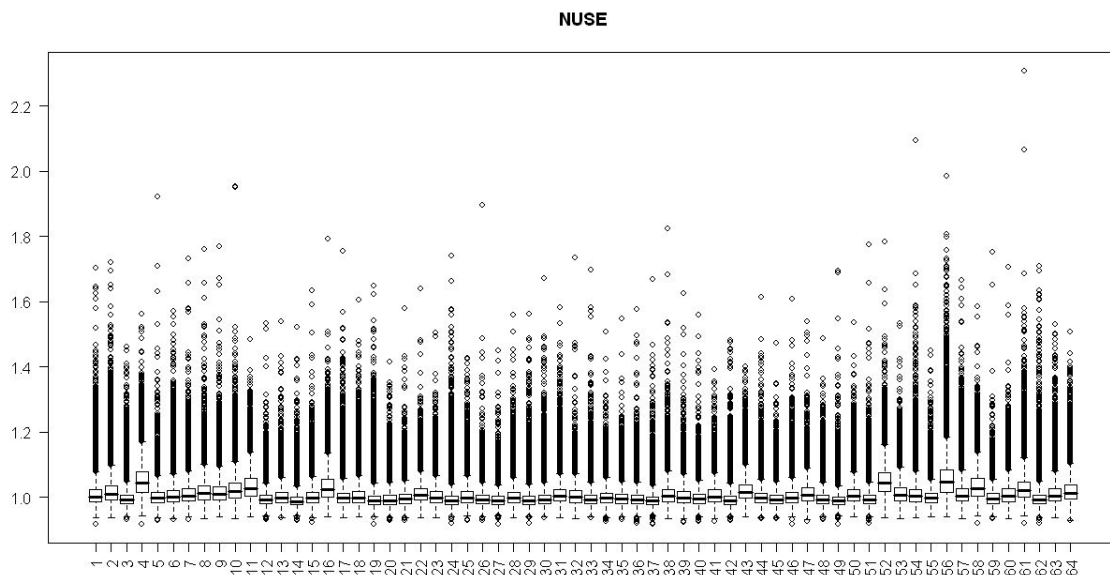


Figura 42. Control de calidad tras ajustar el modelo lineal. Gráficas NUSE representando el error estándar de cada sonda en cada chip en cada uno de los experimentos. Las muestras 08SE131, 08SE184 y 08SE191, representadas por los números 4, 52 y 56 en el diagrama de cajas presentan valores NUSE superiores a los recomendados

Por último y como se ha indicado previamente, el último procedimiento previo al análisis de datos consistió en escalar los datos obtenidos de cada microarray con el fin de minimizar la influencia de factores de tipo metodológico. Los factores de escalado aplicados a cada muestra de este experimento estuvieron dentro de los límites establecidos por Affymetrix indicando la posibilidad de realizar comparaciones entre microarrays y aportando fiabilidad a los resultados.

Tabla 17. *Valores en porcentaje del parámetro indicador de la calidad de los datos en los microarrays*

Muestra	% P call	% Array outlier	Muestra	% P call	% Array outlier
08SE128	47,8	2,111	08SE165	45	0,512
08SE129	45,6	3,232	08SE166	47,6	0,422
08SE130	48,2	0,785	08SE167	49,4	0,395
<b>08SE131</b>	<b>48,2</b>	<b>7,349</b>	08SE168	44,9	0,536
08SE132	44,8	0,984	08SE169	48,7	0,697
08SE133	47,3	1,558	08SE170	48	2,27
08SE134	44,2	1,081	08SE171	49	0,893
08SE135	45,9	2,401	08SE172	47,2	0,455
08SE136	45,2	1,438	08SE173	46,2	0,803
08SE137	41,1	1,58	08SE174	48,1	0,805
08SE138	42,6	3,435	08SE175	46,6	2,237
08SE139	47,5	0,32	08SE176	46,6	1,353
08SE140	44,3	0,274	08SE177	50,2	2,081
08SE141	49,3	0,47	08SE178	43,4	0,927
08SE142	45,7	0,81	08SE179	50	2,323
08SE143	38,3	4,154	08SE180	45,5	0,549
08SE144	46,8	1,476	08SE181	49,5	0,362
08SE146	47	1,337	08SE182	50,6	1,648
08SE147	46	1,024	08SE183	52,3	0,739
08SE152	45,8	0,419	<b>08SE184</b>	<b>51</b>	<b>14,908</b>
08SE153	47,3	0,651	08SE185	44,4	1,086
08SE154	46,7	0,646	08SE186	49,5	2,003
08SE155	45	0,975	08SE188	48,6	0,671
08SE156	46,3	0,702	08SE189	44	3,779
08SE157	46,8	0,662	08SE190	42,9	1,589
08SE158	43	0,3	<b>08SE191</b>	<b>52,2</b>	<b>10,678</b>
08SE159	45,1	0,143	08SE273	47,7	0,607
08SE160	42,1	0,728	08SE274	44,9	1,944
08SE161	44,6	0,505	08SE275	40,5	2,471
08SE162	47,5	1,567	08SE276/77	47,6	1,156
08SE163	48,1	1,699	08SE278	48,5	1,542
08SE164	41,9	0,647	08SE279/80	50,3	5,242

Por lo tanto, durante los procesos de extracción de ARN total de las biopsias tumorales, síntesis y fragmentación del ARNc biotinilado, así como de el procesamiento y control de calidad de los datos derivados del análisis con microarrays, se fueron descartando una serie de muestras por razones metodológicas. La eliminación de estas muestras modificó ligeramente el diseño muestral planteado, quedando para el análisis de expresión génica 56 muestras pareadas, 4 muestras correspondientes a biopsias previas al tratamiento con quimioterapia y 1 muestra correspondientes a biopsias posteriores al tratamiento con quimioterapia. Los códigos originales y los códigos para el análisis genómico de las biopsias que completaron el análisis de expresión génica se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. *Códigos originales y códigos para análisis genómico de las biopsias que completaron el análisis de expresión génica*

Código original	Código para análisis genómico	Código original	Código para análisis genómico
N1/1	08SE128	N26/1	08SE166
N1/2	08SE129	N26/2	08SE167
N2/1	08SE130	N27/1	08SE168
N3/1	08SE132	N27/2	08SE169
N3/2	08SE133	N28/1	08SE170
N/5/1	08SE134	N28/2	08SE171
N/5/2	08SE135	N29/1	08SE172
N5D/1	08SE136	N29/2	08SE173
N5D/2	08SE137	N30/1	08SE174
N6/1	08SE138	N30/2	08SE175
N6/2	08SE139	N32/1	08SE176
N8/1	08SE140	N32/2	08SE177
N8/2	08SE141	N33/1	08SE178
N9/1	08SE142	N33/2	08SE179
N9/2	08SE143	N34/1	08SE180
N10/1	08SE144	N34/2	08SE181
N11/1	08SE146	N35/1	08SE182
N11/2	08SE147	N35/2	08SE183
N17/1	08SE152	N37/2	08SE185
N17/2	08SE153	N40/1	08SE186
N18/1	08SE154	N41/1	08SE188
N18/2	08SE155	N41/2	08SE189
N19/1	08SE156	N46/1	08SE190
N19/2	08SE157	N4/1	08SE273
N21/1	08SE158	N4/2	08SE274
N21/2	08SE159	N45/1	08SE275
N22/1	08SE160	N45/2	08SE276
N22/2	08SE161	N45/2	08SE277
N24/1	08SE162	N43/1	08SE278
N24/2	08SE163	N43/2	08SE279
N25/1	08SE164	N43/2	08SE280
N25/2	08SE165		

### III.4 Normalización y filtrado de los datos de los microarrays

Una vez llevados a cabo los controles de calidad y eliminados aquellos datos que potencialmente distorsionarían los resultados del análisis bioinformático, se llevó a cabo el proceso de normalización y filtrado de los datos.

El primer filtrado de los datos, realizado para eliminar las secuencias control y aquellas con señal de hibridación cercanas al fondo, seleccionó 16737 secuencias de las 54675 secuencias estudiadas. Un segundo filtrado tras la normalización de los datos dio lugar a un listado de 9940 secuencias informativas que conformaron la lista de trabajo.

### III.5 Análisis de la influencia de variables biológicas y no biológicas sobre los resultados de los microarrays

Además de la variable Periodo definida en base a nuestros intereses analíticos, existen otras variables, tanto biológicas como no biológicas, que podrían afectar a los resultados enmascarando o dificultando la identificación de diferencias producto de los fenómenos biológicos que se deseaban estudiar. Una de las principales variables biológicas que afectan a este tipo de experimento por su diseño es el hecho de que se dispone de dos muestras por cada paciente (variable Parejas). Entre las variables no biológicas que podrían afectar los resultados es necesario controlar el parámetro día de escaneo o *Scan date*, dado que no fue posible llevar cabo el análisis de todas las muestras en un mismo ensayo por el gran número de las mismas.

Por lo tanto y de manera previa a cualquier tipo de análisis estadístico, se llevó a cabo un análisis de la influencia de todas estas variables sobre los resultados. Dicho análisis permitió por una parte evaluar el efecto sobre los resultados de aquellas variables que se desean estudiar y por otra, tomar medidas correctoras para minimizar el efecto enmascaramiento que variables ajenas a nuestros intereses científicos podrían ejercer sobre los resultados. De este modo conseguimos que las diferencias observadas entre las muestras correspondieran principalmente a la variable Periodo.

En la Figura 43 se puede observar que las mayores diferencias entre los datos obtenidos de cada muestra corresponden a la variable Periodo, seguida de la variable Parejas. El efecto de la variable *Scan date*, aún siendo el de menor magnitud es considerable, por lo que se aplicaron herramientas estadísticas que permitieron controlar la variabilidad introducida por este factor, tal y

como se detalla en el apartado VIII.4.3.1 de esta Tesis. En la última barra del gráfico se indica el error no controlable asociado a este experimento.

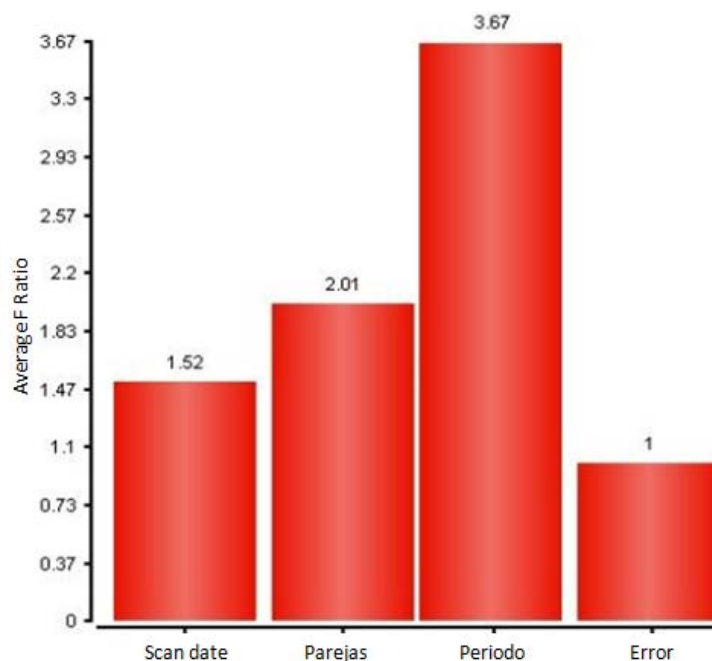


Figura 43. Fuentes de variación causantes de las diferencias entre las muestras en base a la media del estadístico F.

### III.6 Análisis estadístico

Mediante la aplicación de test estadísticos se obtuvieron listas de secuencias que corresponden a las diferencias de expresión génica entre las condiciones que se compararon. Las listas de secuencias obtenidas aparecen en la Tabla 19 que además, resume el resultado del análisis estadístico.

Tabla 19. Resumen del resultado del análisis estadístico

Comparación	Test de corrección múltiple	Nº Secuencias Significativas	Falsos positivos
Periodo Final vs. Inicial	no	3326	497
Periodo Final vs. Inicial	FDR	1808	90,4
Periodo Final vs. Inicial	Bonferroni	65	0,05

FDR= False Discovery Rate

Especialmente llamativos fueron los resultados del test de corrección múltiple de *Bonferroni*, debido a que este test es altamente restrictivo y minimiza la presencia de falsos positivos. La Tabla 20 muestra la lista de genes Final vs Inicial, obtenida tras la aplicación del test de corrección múltiple de *Bonferroni*. En ella se puede observar el valor p asociado a cada secuencia tras la



regresión lineal y los test de corrección múltiple FDR y *Bonferroni*, seguidos del valor FC que representa el cambio de expresión de cada secuencia en relación a la línea base considerada en la comparación.

Tabla 20. Lista de genes Final vs Inicial, obtenida tras la aplicación del test de corrección múltiple de Bonferroni

AFFY ID	Nombre del gen	Símbolo del gen (UniGene)	Valor p (Final vs. Inicial)	Bonferroni. Valor p (Final vs. Inicial)	FDR. Valor p (Final vs. Inicial)	FC (Final vs. Inicial)
227209_at	Contactin 1	CNTN1	2,16E-08	0,0002148	0,00012446	-2,73998
228750_at	Transcribed locus	---	2,50E-08	0,00024893	0,00012446	-5,31614
205226_at	platelet-derived growth factor receptor-like	PDGFRL	8,58E-08	0,00085271	0,00012808	-2,44452
204749_at	nucleosome assembly protein 1-like 3	NAP1L3	1,07E-07	0,00106731	0,00012808	-2,5979
219304_s_at	platelet derived growth factor D	PDGFD	1,19E-07	0,00118699	0,00012808	-2,47087
219779_at	zinc finger homeobox 4	ZFHX4	1,38E-07	0,00137216	0,00012808	-2,28599
201694_s_at	early growth response 1	EGR1	1,43E-07	0,00142338	0,00012808	-3,32085
214321_at	nephroblastoma overexpressed gene	NOV	1,46E-07	0,00144675	0,00012808	-3,33679
218730_s_at	osteoglycin	OGN	1,47E-07	0,00145993	0,00012808	-4,34352
204051_s_at	secreted frizzled-related protein 4	SFRP4	1,54E-07	0,00152836	0,00012808	-3,75937
226538_at	Mannosidase, alpha, class 2A, member 1	MAN2A1	1,54E-07	0,00152848	0,00012808	-1,37054
202994_s_at	fibulin 1	FBLN1	1,61E-07	0,00159841	0,00012808	-3,07057
210102_at	loss of heterozygosity, 11, chromosomal region 2, gene A	LOH11CR2 A	1,91E-07	0,00189508	0,00012808	-1,57861
204359_at	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	FLRT2	1,92E-07	0,00190595	0,00012808	-3,69542
201041_s_at	dual specificity phosphatase 1	DUSP1	1,93E-07	0,00192122	0,00012808	-3,72945
204797_s_at	echinoderm microtubule associated protein like 1	EML1	2,10E-07	0,00208889	0,00012814	-1,65215
210764_s_at	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	CYR61	2,40E-07	0,00238832	0,00012814	-4,65884
1598_g_at	growth arrest-specific 6	GAS6	2,46E-07	0,00244952	0,00012814	-1,77547
1552289_a_a t	cartilage intermediate layer protein 2	CILP2	2,66E-07	0,00264886	0,00012814	-2,97854
202995_s_at	fibulin 1	FBLN1	2,68E-07	0,00266352	0,00012814	-3,63798
204052_s_at	secreted frizzled-related protein 4	SFRP4	2,79E-07	0,00277324	0,00012814	-3,79333
213993_at	spondin 1, extracellular matrix	SPON1	3,04E-07	0,00301975	0,00012814	-2,85407

	protein					
222722_at	osteoglycin	OGN	3,09E-07	0,00306971	0,00012814	-4,42838
204457_s_at	growth arrest-specific 1	GAS1	3,09E-07	0,00307532	0,00012814	-2,49752
236361_at	UDP-N-acetyl-alpha- D- galactosamine:polype ptide N- acetylgalactosaminyltr ansferase	GALNTL2	3,67E-07	0,00364759	0,0001459	-2,45128
202177_at	growth arrest-specific 6	GAS6	3,94E-07	0,00391723	0,0001495	-1,95287
219628_at	zinc finger, matrin type 3	ZMAT3	4,06E-07	0,00403645	0,0001495	-1,96759
201289_at	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	CYR61	4,42E-07	0,00439729	0,00015705	-3,69293
212670_at	elastin (supravalvular aortic stenosis, Williams-Beuren syndrome)	ELN	4,72E-07	0,00469104	0,00016176	-2,95438
1554007_at	CDNA clone IMAGE:5303689	---	5,09E-07	0,00505853	0,00016862	-2,16721
203884_s_at	RAB11 family interacting protein 2 (class I)	RAB11FIP2	5,28E-07	0,00524894	0,00016932	-1,40706
213994_s_at	spondin 1, extracellular matrix protein	SPON1	6,61E-07	0,0065725	0,00020539	-2,83318
225871_at	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 2	STEAP2	6,83E-07	0,00678533	0,00020562	-2,13988
205880_at	protein kinase D1	PRKD1	7,06E-07	0,00701634	0,00020636	-2,02661
225725_at	CDNA clone IMAGE:5261213	---	7,30E-07	0,00725772	0,00020736	-1,87481
204472_at	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	GEM	8,70E-07	0,00865131	0,00023481	-2,68147
227404_s_at	Early growth response 1	EGR1	8,74E-07	0,00868799	0,00023481	-3,89088
227221_at	CDNA clone IMAGE:5261213	---	9,28E-07	0,00922199	0,000235	-1,71563
227620_at	---	---	9,44E-07	0,00938248	0,000235	-1,64053
228109_at	Ras protein-specific guanine nucleotide- releasing factor 2	RASGRF2	9,66E-07	0,00960666	0,000235	-2,06216
228396_at	protein kinase, cGMP- dependent, type I	PRKG1	9,69E-07	0,00963514	0,000235	-1,76529
212865_s_at	collagen, type XIV, alpha 1 (undulin)	COL14A1	1,01E-06	0,00999944	0,00023808	-3,57203
209436_at	spondin 1, extracellular matrix protein	SPON1	1,30E-06	0,0128952	0,00029989	-2,46483
226522_at	podocan	PODN	1,39E-06	0,0137785	0,00031315	-1,93665
201787_at	fibulin 1	FBLN1	1,51E-06	0,0150154	0,00033368	-2,40659
227719_at	---	---	1,65E-06	0,0164003	0,00035653	-2,42699
243864_at	coiled-coil domain containing 80	CCDC80	1,76E-06	0,0174462	0,0003712	-2,9816

223235_s_at	SPARC related modular calcium binding 2	SMOC2	1,86E-06	0,0185218	0,00038587	-2,18388
203794_at	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)	CDC42BPA	2,00E-06	0,0198818	0,00040492	-1,45802
209189_at	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	FOS	2,04E-06	0,0202462	0,00040492	-6,57593
212667_at	suppressor of cytokine signaling 5 Transcribed locus	SOCS5	2,42E-06	0,024051	0,00046171	-1,61098
226932_at	collagen, type I, alpha 1	---	2,46E-06	0,0244706	0,00046171	-1,93173
217430_x_at	spermatogenesis associated 18 homolog (rat)	COL1A1	2,82E-06	0,0279861	0,00051826	-2,18803
229331_at	Nedd4 family interacting protein 1	SPATA18	3,02E-06	0,0300625	0,00054234	-2,1614
222423_at	hemectin 1	NDFIP1	3,06E-06	0,0304418	0,00054234	-1,48207
235944_at	suppressor of cytokine signaling 5	HMCN1	3,11E-06	0,0309136	0,00054234	-2,32914
208127_s_at	CDNA FLJ44429 fis, clone UTERU2015653	SOCS5	3,19E-06	0,0317073	0,00054668	-1,60624
227061_at	protocadherin 7	---	3,41E-06	0,0338457	0,00057366	-3,35518
228640_at	mannosidase, alpha, class 2A, member 1	PCDH7	3,48E-06	0,0345477	0,00057579	-2,35056
205105_at	purine-rich element binding protein A	MAN2A1	3,86E-06	0,0383403	0,00062069	-1,32745
204020_at	PR domain containing 6	PURA	3,87E-06	0,0384826	0,00062069	-1,40121
230311_s_at	Transcribed locus, moderately similar to XP_947146.1	PRDM6	4,11E-06	0,0408996	0,00064898	-1,44695
222288_at	PREDICTED: similar to piwi-	---	4,19E-06	0,0416578	0,00064898	-2,39995
204021_s_at	purine-rich element binding protein A	PURA	4,24E-06	0,0421837	0,00064898	-1,34598

FDR= False Discovery Rate; FC= Fold Change

### III.7 Análisis de PCA y Clúster jerárquico no supervisado

En primer lugar se llevó a cabo el análisis de PCA y clúster jerárquico de la lista de trabajo de 9940 secuencias. Este tipo de análisis se denomina no supervisado pues se realiza sobre una lista de secuencias sobre la que no se ha efectuado ninguna prueba estadística y es el producto de la normalización y filtrado de los resultados derivados de los microarrays.

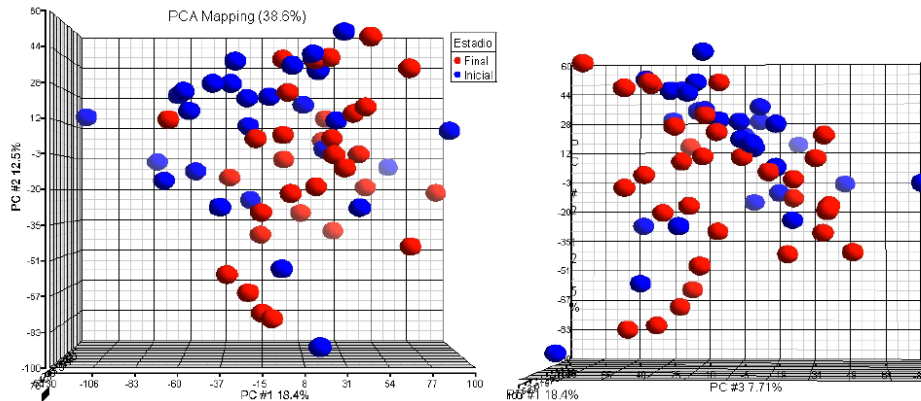


Figura 44. *Dos visiones de PCA no supervisado. Columna izquierda Primera visión de PCA. Columna derecha Visión girada 90° a la izquierda sobre el eje vertical (eje z; componente 3) realizadas a partir de la lista de trabajo (9940 secuencias). En las dos imágenes las muestras están coloreadas según el periodo. Porcentaje de variabilidad: 18.4% (eje 1); 12.5% (eje 2); 7.71% (eje 3)*

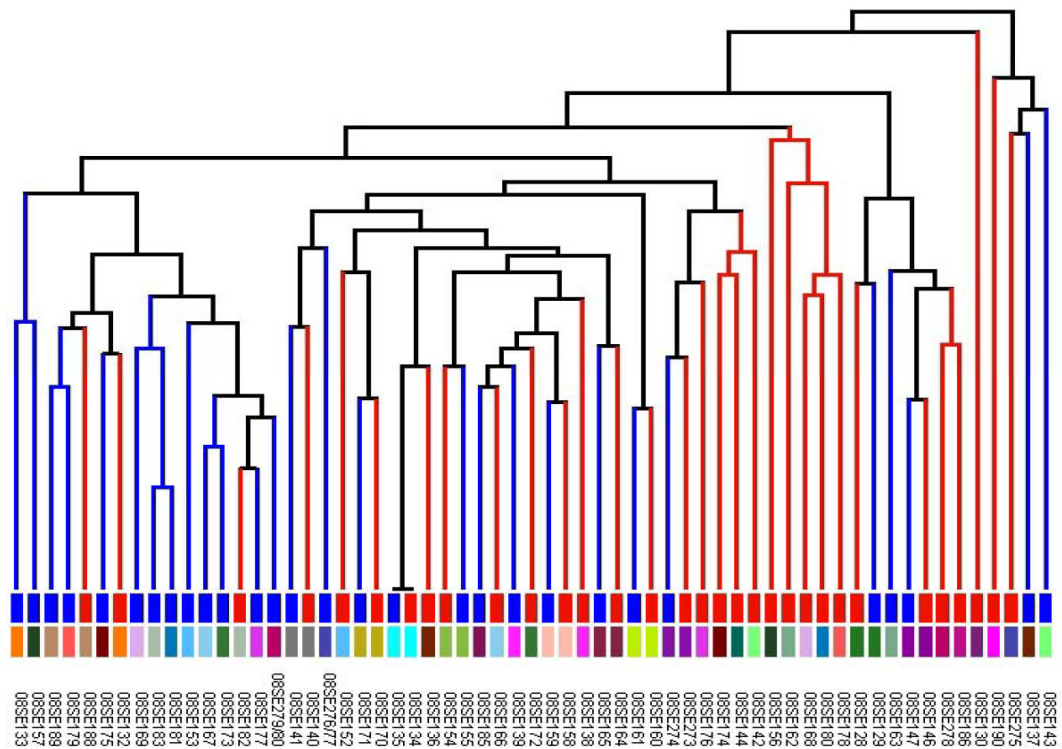


Figura 45. *Cluster jerárquico no supervisado de muestras realizado a partir de la lista de trabajo (9940 secuencias). Cada muestra está marcada por un color que representa el periodo y el emparejamiento*

Se observa en el clúster que algunas muestras se agrupan junto con su muestra emparejada. Por otra parte en el PCA no existe una separación clara de las muestras de acuerdo con el periodo.

### III.8 Análisis de PCA y Clúster jerárquico supervisado

Tras el análisis estadístico de los resultados y la obtención de las listas de secuencias producto de la comparación entre condiciones, se llevaron a cabo análisis de PCA y clúster jerárquico supervisado.

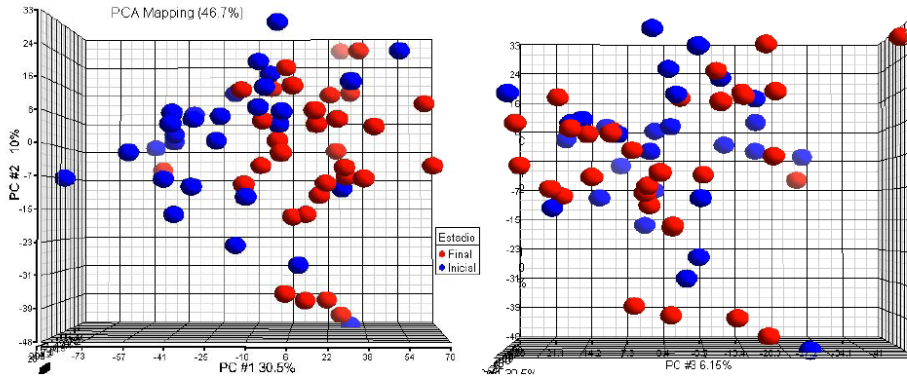


Figura 46. *Dos visiones de PCA supervisado.* Columna izquierda Primera visión de PCA. Columna derecha Visión girada 90° a la izquierda sobre el eje vertical (eje z; componente 3) realizadas a partir de la lista de secuencias  $p < 0.05$  Periodo Final vs Inicial (3326 secuencias). En las dos imágenes las muestras están coloreadas según el periodo. Porcentaje de variabilidad: 30.5% (eje 1), 10% (eje 2); 6.15% (eje 3)

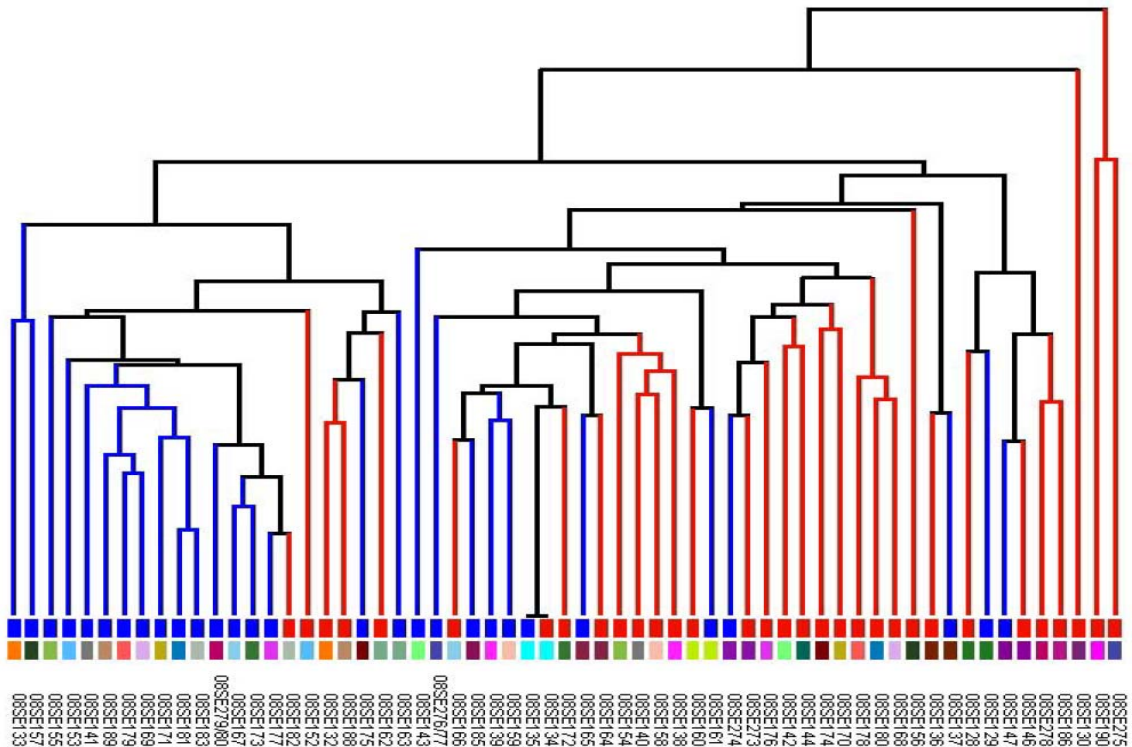


Figura 47. *Cluster jerárquico supervisado de muestras y genes realizado a partir de la lista de secuencias  $p < 0.05$  Final vs Inicial (3326 secuencias).* Cada muestra está marcada por un color que representa el periodo y el emparejamiento.



### III.9 Análisis funcional *Functional enrichment*

La interpretación biológica de los datos obtenidos mediante el estudio de expresión génica, requiere un análisis funcional de las proteínas que codifican los genes diferencialmente expresados. Para ello utilizamos herramientas bioinformáticas que permiten la traslación de los datos de expresión génica en información biológica. En este caso empleamos los programas DAVID y Panther (ver apartados,,,de Material y Métodos).

#### III.9.1 Análisis con el programa Panther

Este programa realizó 3 tipos de clasificaciones de la lista Final vs Inicial de 65 genes. Las clasificaciones fueron establecidas según rutas, procesos biológicos y funciones moleculares. En las tablas se representan las categorías que obtuvieron un valor  $p \leq 0,05$  para la correlación entre un determinado gen y la categoría en que lo clasifica el programa. Es importante destacar que tras eliminar las secuencias expresadas no conocidas y las sondas para un mismo gen, Panther reconoció 48 genes de la lista Final vs Inicial. En la clasificación según rutas encontramos genes significativamente correlacionados con la respuesta al estrés oxidativo, la angiogénesis y la ruta de señalización mediada por PDGF. En la clasificación según procesos biológicos encontramos genes relacionados con la remodelación de la matriz extracelular y las cascadas de señalización intracelular mediadas por quinasas. Por último, en la clasificación según rutas encontramos genes relacionados con el desarrollo embrionario, la neurogénesis, la transducción de señales, el control del ciclo celular, la replicación del ADN y la adhesión celular.

Tabla 21. *Clasificación en rutas según el programa Panther.*

<i>Pathways</i>	NCBI: <i>H. sapiens</i> genes (REF)	FinalvsInicial
Unclassified	22436	33
Oxidative stress response	69	2
Angiogenesis	229	3
PDGF signaling pathway	189	2

La primera columna de números representa los genes incluidos en la base de datos NCBI para cada categoría y la segunda son los genes de nuestra lista de resultados que el programa clasificó en cada categoría

Tabla 22. Clasificación en funciones moleculares según el programa Panther.

<i>Molecular Function</i>	NCBI: <i>H. sapiens</i> genes (REF)	FinalvsInicial
Extracellular matrix	384	9
Extracellular matrix structural protein	87	4
Growth factor	125	3
Kinase inhibitor	43	2
Protein kinase	529	5
Signaling molecule	795	6
Cell adhesion molecule	395	4
Molecular function unclassified	10934	12
Kinase	684	5
Tyrosine protein kinase receptor	77	2
Other signaling molecule	259	3
Protein kinase receptor	104	2
Extracellular matrix glycoprotein	111	2
Non-receptor serine/threonine protein kinase	303	3
Protein phosphatase	145	2
Single-stranded DNA-binding protein	23	1
Kinase modulator	175	2

La primera columna de números representa los genes incluidos en la base de datos NCBI para cada categoría y la segunda son los genes de nuestra lista de resultados que el programa clasificó en cada categoría

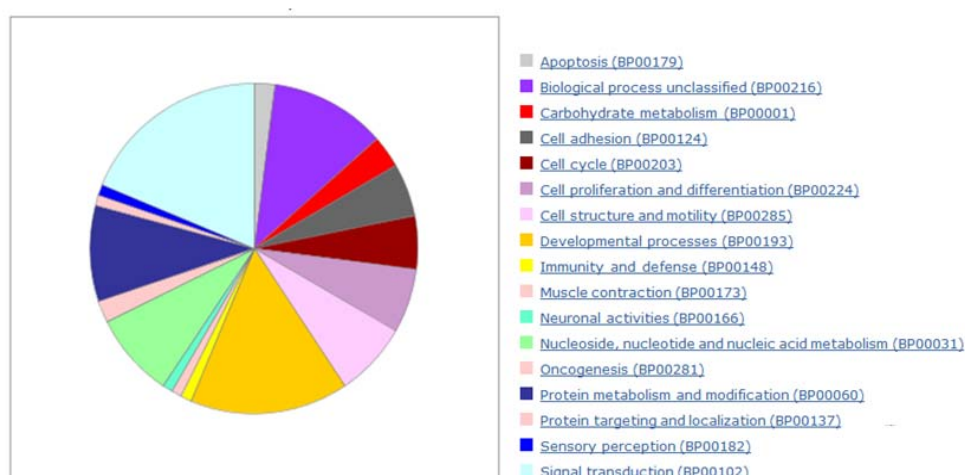


Figura 48. Procesos biológicos más representativo en que el programa Panther clasificó los genes de nuestra lista de resultados. En este grafico aparecen las correlaciones significativas y no significativas. Entre paréntesis el código NCBI para cada categoría funcional.



Tabla 23. *Clasificación en procesos biológicos según el programa Panther.*

<i>Biological Process</i>	<i>NCBI: H. sapiens genes (REF)</i>	<i>FinalvsInicial56</i>
Developmental processes	2152	15
Signal transduction	3406	18
Receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	211	5
Mesoderm development	551	6
Cell surface receptor mediated signal transduction	1638	10
Protein modification	1157	8
Protein phosphorylation	660	6
Biological process unclassified	11321	11
Skeletal development	123	3
Cell structure and motility	1148	7
Cell adhesion	622	5
Cell communication	1213	7
Cell cycle control	418	4
Cell structure	687	5
Ectoderm development	692	5
Cell proliferation and differentiation	1028	6
Neurogenesis	587	4
DNA replication	155	2
Cell cycle	1009	5
Ligand-mediated signaling	421	3

La primera columna de números representa los genes incluidos en la base de datos NCBI para cada categoría y la segunda son los genes de nuestra lista de resultados que el programa clasificó en cada categoría

### III.9.2 Análisis con el programa DAVID

Las tablas 24 y 25 muestran las clasificaciones significativas de los genes de nuestra lista de resultados en las categorías correspondientes a función molecular y proceso biológico según la base de datos GO identificadas por el programa DAVID. Sorprendentemente, el programa no fue capaz de asociar ninguno de estos genes a las rutas del KEGG. Como es posible observar el programa DAVID establece clasificaciones en categorías funcionales relacionadas con la matriz extracelular, el desarrollo embrionario, el crecimiento celular y la regulación de procesos celulares.

Tabla 24. *Clasificación en función molecular según el programa David*

<i>Molecular Function</i>	<i>Count</i>	<i>%</i>	<i>P-Value</i>
proteinaceous extracellular matrix	13	24,5	4,0E-11
extracellular matrix	13	24,5	4,9E-11
extracellular region part	14	26,4	7,8E-8
extracellular region	17	32,1	9,2E-8
extracellular matrix part	6	11,3	1,1E-5
basement membrane	4	7,5	8,8E-4
transport vesicle	3	5,7	1,1E-2

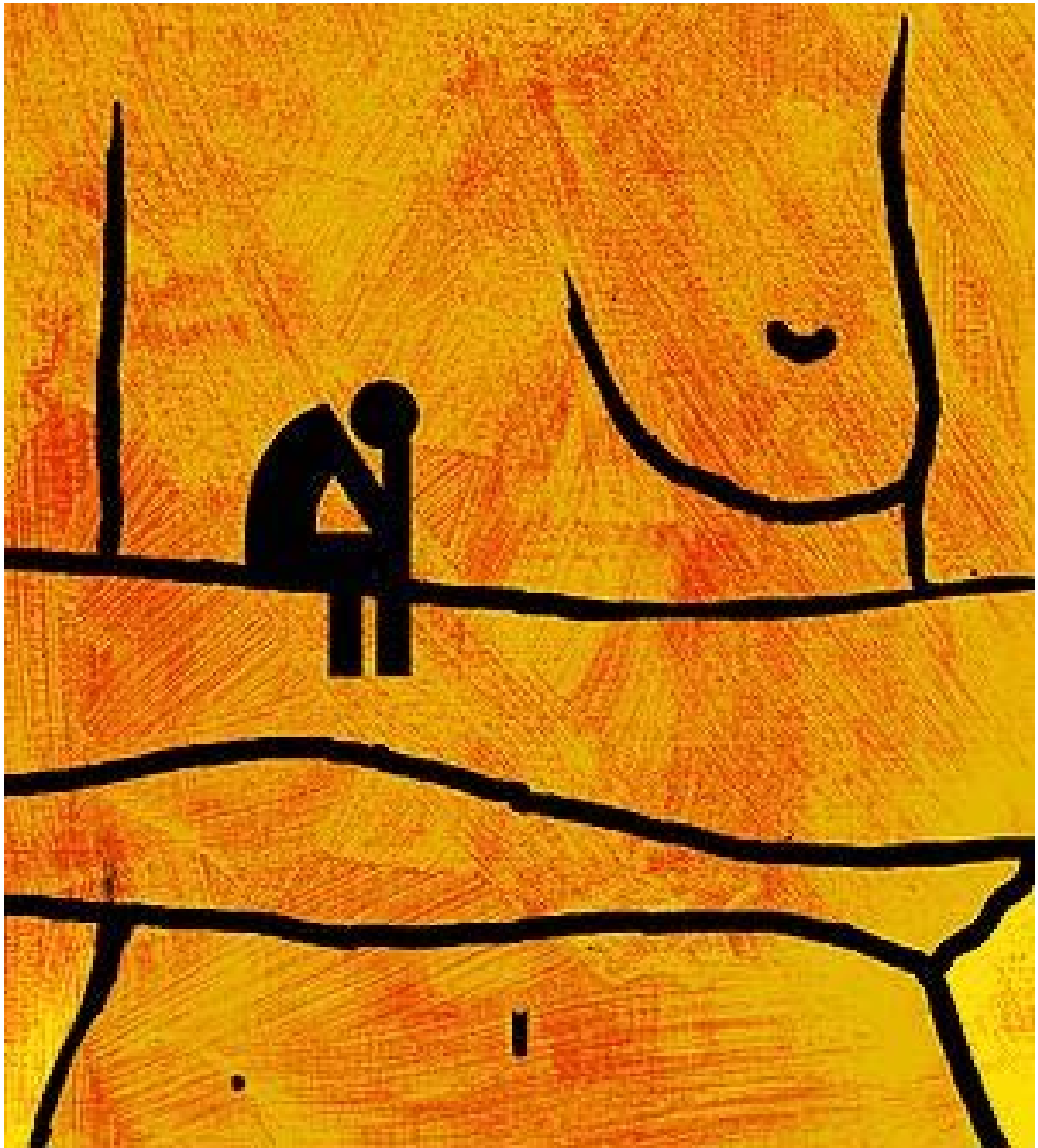
La primera columna de números representa los genes incluidos cada categoría, la segunda es el porcentaje son los genes de nuestra lista de resultados que el programa clasificó en cada categoría respecto del total y la tercera representa la significación de la clasificación dada por el valor p.

Tabla 25. *Clasificación en procesos biológicos según el programa David*

<i>Biological Process</i>	<i>Count</i>	<i>%</i>	<i>P-Value</i>
regulation of cell growth	5	9,4	5,0E-4
cell growth	5	9,4	1,1E-3
regulation of cell size	5	9,4	1,2E-3
regulation of growth	5	9,4	1,4E-3
developmental process	17	32,1	2,1E-3
cell adhesion	8	15,1	2,2E-3
biological adhesion	8	15,1	2,2E-3
anatomical structure development	13	24,5	3,5E-3
growth	5	9,4	5,1E-3
multicellular organismal development	13	24,5	7,1E-3
cell proliferation	7	13,2	1,1E-2
system development	10	18,9	2,1E-2
multicellular organismal process	16	30,2	2,2E-2
organ development	8	15,1	3,1E-2
cellular structure morphogenesis	5	9,4	3,1E-2
cell morphogenesis	5	9,4	3,1E-2
regulation of cellular process	17	32,1	4,3E-2

La primera columna de números representa los genes incluidos cada categoría, la segunda es el porcentaje son los genes de nuestra lista de resultados que el programa clasificó en cada categoría respecto del total y la tercera representa la significación de la clasificación dada por el valor p.





# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

### Características clínicas y bioquímicas de la población de estudio

Las características clínicas de las pacientes de los tres grupos experimentales se correlacionan con los datos epidemiológicos e histológicos registrados en la bibliografía acerca de esta enfermedad. En primer lugar, es posible observar que la mayoría de las pacientes poseen una edad comprendida entre los 40 y los 60 años. Aunque el aumento del riesgo del cáncer de mama es máximo entre los 50 y 65 años de edad, las curvas de incidencia muestran un aumento significativo en la proporción de casos diagnosticados a partir de los 40 años (Ferlay y cols., 2004). El riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria es mayor en pacientes premenopáusicas, sin embargo los datos de incidencia muestran que la mayoría de los carcinomas de mama son diagnosticados tras la menopausia, tal y como indican nuestros datos.

En cuanto a la caracterización de los tumores, los resultados obtenidos corresponden con los porcentajes de distribución descritos en el cáncer de mama (Rhodes y cols., 2000; Tavassoéli y cols, 2003). De este modo, el tipo histológico predominante es el carcinoma ductal infiltrante, con una moderada representación del cacinoma lobulillar infiltrante y una mínima presencia de los carcinomas mixtos e inflamatorios. El tamaño tumoral se correlaciona con los grupos de tratamiento, mostrando valores mayores en neoadyuvancia que en adyuvancia, y los datos acerca de la cirugía muestran que la quimioterapia neoadyuvante permite realizar un tratamiento quirúrgico conservador.

Los marcadores inmunohistoquímicos muestran que los carcinomas incluidos en este estudio presentan características histológicas coincidentes con las descritas para el cáncer de mama. De este modo, el 70-80% de los casos sobre-expresan RE, el 60-75% sobre-expresan RP en los grupos de neadyuvancia y adyuvancia, mientras que en el de metástasis desciende hasta un 40%. El receptor del factor de crecimiento Her2 fue positivo en el 16-30%, excepto en el caso de las pacientes metastásicas, en las que dicho porcentaje se elevó ligeramente hasta un 36,7%. Estos valores están dentro del rango descrito para cada marcador en el cáncer de mama, excepto en el caso del RP y Her2 en el grupo de metástasis, donde el número de casos positivos es inferior al habitual en un caso y superior en el otro. A pesar de que las diferencias no son acusadas, esta ligera variación podría responder a la agresividad clínica de los tumores

metastásicos, ya que tanto los carcinomas mamarios que no sobre-expresan receptores hormonales, como los que sobre-expresan Her2 tienden a expresar un fenotipo más agresivo coincidente con una mayor propensión a metastatizar.

Los resultados del análisis de los parámetros bioquímicos muestran que la quimioterapia no influencia significativamente el metabolismo, el balance electrolítico o el contenido celular de la sangre pues, si bien observamos diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales y/o las distintas condiciones analizadas, el significado clínico o biológico de las mismas tan sólo sugiere algunas tendencias (Bartolomé, 2000).

De este modo observamos que la función renal no se vio modificada por efecto de la quimioterapia, ya que los niveles séricos de ácido úrico, creatinina y urea permanecen dentro del rango considerado como no patológico para mujeres adultas. Estos resultados indican que la quimioterapia no indujo el catabolismo proteico o el de las bases nitrogenadas, hecho que se correlaciona con los niveles registrados de proteínas totales en sangre ya que fueron normales en todos los casos. En cuanto a los lípidos, los valores de colesterol total registrados en todos los grupos se encuentran cerca del límite superior normal. El grupo de adyuvancia presentó un incremento significativo de la concentración de colesterol total tras la quimioterapia, aunque dicho valor no superó el límite de 250 mg/dl a partir del cual se sospecha alguna patología. En cualquier caso, los niveles ligeramente elevados de colesterol total y sus fracciones, son comunes en la población de estudio ya que corresponde a mujeres mayoritariamente post-menopáusicas en las que una disminución de la síntesis de estradiol provoca el aumento de la concentración de lípidos circulantes. Algunos investigadores sugieren que, si la quimioterapia induce en cierta medida el aumento de la concentración de lípidos en sangre, lo hace a través de un mecanismo indirecto que implica la supresión de la función ovárica, pues la amenorrea post-quimioterapia es un efecto frecuentemente observado en pacientes oncológicos (Kailajarvi y cols., 2000; Saarto y cols., 1996). Por último, se observó que la concentración de triglicéridos se elevaba tras la quimioterapia en el grupo de pacientes adyuvantes. Es muy probable que tal alteración no esté relacionada en absoluto con la quimioterapia ni la enfermedad de las pacientes, ya que este parámetro se encuentra extraordinariamente influenciado por la dieta.

La función hepato-biliar y el metabolismo muscular y óseo no se vieron afectados por el tratamiento con quimioterapia a la luz de los resultados obtenidos para las concentraciones de

bilirrubina, total y conjugada, y las concentraciones enzimáticas que compusieron la batería de pruebas que analiza esta función orgánica. Tan sólo es posible observar una ligera tendencia que muestra que los niveles de las transaminasas ASAT y ALAT, la transferasa GGT y LDH aumentan en los grupos de neoadyuvancia y adyuvancia tras la quimioterapia, mientras los niveles de PA tan sólo aumentan tras la quimioterapia en el grupo de neoadyuvancia. De nuevo, aunque existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos para los valores numéricos de estos parámetros, el significado clínico de tales cambios es escaso, ya que siempre se mantuvieron por debajo del límite superior normal.

La concentración de iones en sangre confirma que la función renal de las pacientes es normal. La disminución en la concentración de hierro en pacientes neoadyuvantes y adyuvantes tras la quimioterapia, está en consonancia con la disminución en la concentración de hematíes observada en los mismos grupos y condición, aún sin llegar a niveles patológicos en ningún caso. El análisis de los componentes celulares de la serie roja y la serie blanca confirma que la quimioterapia no ocasiona lisis celular. En este sentido es muy llamativa la estabilidad de los niveles de leucocitos, concretamente de los niveles de neutrófilos, de las pacientes tras la quimioterapia, pues la actividad neutropénica de los citostáticos es un efecto adverso bien conocido. Es muy probable que la tendencia observada, sobre todo en pacientes neoadyuvantes, hacia la leucocitosis y la neutrofilia sea la consecuencia del tratamiento de estas pacientes con unidades formadoras de colonias, cuya finalidad es asegurar la continuidad del tratamiento reduciendo la neutropenia secundaria a la quimioterapia.

En general, la estabilidad de los parámetros bioquímicos en todos los grupos de tratamiento, antes y después de la quimioterapia, muestra que el tratamiento con citostáticos no induce alteraciones severas en el metabolismo y la homeostasis. En todo caso, puede que la quimioterapia induzca cambios transitorios rápidamente compensados por el organismo, tal y como sugiere la ausencia de variaciones en la mayoría de parámetros bioquímicos analizados en el grupo de metástasis. Por tanto, la mejora del tratamiento antineoplásico y el tratamiento concomitante con agentes antieméticos y de efecto neutrofilico, junto con los cambios nutricionales y de estilo de vida frecuentemente observados en pacientes oncológicos tras el diagnóstico, explica el reducido impacto de la quimioterapia sobre el perfil bioquímico de las pacientes cáncer de mama.



El tratamiento del cáncer de mama aumenta el estrés oxidativo a nivel sistémico e induce la activación de los mecanismos de defensa antioxidante

Uno de los objetivos de este estudio fue establecer la influencia del tratamiento con quimioterapia sobre el estado oxidativo de pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metástasicas, abarcando así todos los grupos de tratamiento posibles en el cáncer de mama. Tal y como se ha detallado en el apartado II.6 de esta Tesis, los radicales libres ejercen una importante influencia sobre el proceso carcinogénico en una gran variedad de células epiteliales, entre ellas las de la mama, sin embargo no son tan numerosos los trabajos que evalúan tanto el impacto del estrés oxidativo generado por el tratamiento del cáncer de mama, como la influencia de éste en el curso clínico de las pacientes. Nuestros resultados ofrecen una nueva perspectiva de la interrelación entre el estado oxidativo de las pacientes en tratamiento y la evolución de su tumor. En primer lugar, destaca la distribución de los niveles de daño oxidativo en el ADN entre los grupos experimentales. Dicho parámetro aumentó de forma significativa sólo en el grupo de neoadyuvancia tras el tratamiento con citostáticos. La inducción de daño en el ADN de los linfocitos de sangre periférica de mujeres con cáncer de mama, con respecto a mujeres sanas y su aumento al someter a las pacientes al tratamiento con quimioterapia, son efectos bien documentados (Kopjar y cols., 2006; Nadin SB y cols., 2006; Blasiak y cols., 2004; Sánchez-Suárez y cols., 2008; Sánchez y cols., 2004). Los resultados de los trabajos al respecto sugieren que el crecimiento tumoral induce un cierto nivel de estrés oxidativo cuyos efectos se ven potenciados por la quimioterapia a la vez que aumentan el riesgo de desarrollar una segunda neoplasia, como la leucemia mieloide aguda, diagnosticada con relativa frecuencia en pacientes que han sido tratadas con antraciclinas (Kopjar y cols., 2006; Blasiak y cols., 2004; Bernard-Marty y cols., 2003). La mayoría de estos trabajos estiman el daño oxidativo tras tres ciclos de quimioterapia como máximo, sin embargo nuestro estudio ofrece un análisis más completo de las consecuencias a medio plazo del tratamiento del cáncer de mama, ya que evalúa el daño oxidativo en el ADN tras el tratamiento completo con quimioterapia y en distintos grupos terapéuticos. El hecho de que los niveles de daño en el ADN tan sólo variaran significativamente en el grupo de neoadyuvancia tras la quimioterapia, sugiere que la secuencia en que se administra el tratamiento sistémico y quirúrgico ejerce una notable influencia sobre este marcador. En términos terapéuticos, la mayor diferencia entre pacientes neoadyuvantes y adyuvantes es que éstas últimas fueron sometidas a cirugía de forma previa al tratamiento con quimioterapia, por tanto, la ausencia de diferencias del daño oxidativo en el ADN observada en el

grupo de adyuvancia sugiere que la cirugía indujo un nivel de daño capaz de estimular las defensas antioxidantes y los mecanismos de reparación del ADN, contrarrestando el aumento del daño hasta llegar a unos niveles que parecen sostenidos a lo largo del tiempo; de hecho, la producción de radicales libres durante el proceso de cicatrización por parte de macrófagos y neutrófilos es un mecanismo biológico conocido (Schafer y Werner, 2008). Esta hipótesis se ve reforzada por la ausencia de diferencias en el daño de pacientes metastásicas y la obtención de niveles de daño en el ADN comparables a los registrados por el grupo de adyuvancia, aunque en general, las pacientes metastásicas fueron sometidas a más ciclos de quimioterapia e intervenciones clínicas más agresivas. Además del daño oxidativo en el ADN, nuestros resultados muestran el aumento del contenido en proteínas carbonilo del plasma en el grupo de neoadyuvancia. La concentración de proteínas carbonilo aumenta específicamente en el grupo de neoadyuvancia tras el tratamiento con quimioterapia, manteniendo niveles similares en los grupos de adyuvancia y metástasis antes y después del tratamiento, y comparables a los del grupo de neoadyuvancia tras la quimioterapia. Este resultado de nuevo sugiere que la cirugía induce la producción de radicales libres, generando cierto estrés oxidativo al que se suma el provocado por la administración de quimioterápicos hasta alcanzar un nivel a partir del cual subsiguientes intervenciones clínicas no generan ningún aumento del estrés oxidativo, tal y como indica la ausencia de diferencias entre los grupos de adyuvancia y metástasis.

La peroxidación lipídica medida indirectamente como la concentración de TBARS en plasma no varió significativamente por efecto de la quimioterapia en pacientes neoadyuvantes y metastásicas. Nuestros datos contrastan con los obtenidos por otros estudios en pacientes de cáncer de mama tratadas con quimioterapia, en los que se registra un aumento de TBARS en plasma tras el tratamiento. Éste fue el resultado obtenido en el grupo de adyuvancia, que si bien alcanzó niveles de TBARS tras la quimioterapia comparables a los del resto de pacientes, presentó una concentración mucho menor antes del tratamiento con quimioterapia (Look y Musch, 1994). El aumento de la concentración de TBARS en pacientes con cáncer de mama respecto de controles sanos está bien documentado (Rajneesh y cols., 2008; Kumaraguruparan y cols., 2005), sin embargo la modificación de este marcador por efecto de la quimioterapia en distintos grupos de tratamiento no ha sido bien estudiado. Las diferencias entre los niveles de TBARS entre pacientes sanas y pacientes con cáncer de mama son bastante más amplias que las obtenidas entre pacientes antes y después de la quimioterapia (Look y Musch, 1994) por lo que, teniendo en cuenta la escasa sensibilidad de esta técnica, es muy probable que las

diferencias inducidas por la quimioterapia en la concentración de TBARS de las pacientes neoadyuvantes no hayan sido detectadas por este método. En el caso de las pacientes adyuvantes, la activación de las defensas antioxidantes tras la cirugía podría ser la causa de la disminución de los niveles de TBARS de forma previa a la administración de los quimioterápicos, evidenciando el efecto del tratamiento sistémico sobre el incremento de la peroxidación lipídica. En cuanto a las pacientes metastásicas, la ausencia de diferencias en los niveles de TBARS en sangre indicaría el agotamiento de las defensas antioxidantes frente a intervenciones clínicas más agresivas. En cualquier caso, la elección de una metodología más sensible permitiría la detección de diferencias, seguramente inducidas por la quimioterapia pero inadvertidas a causa de las características del procedimiento experimental.

Como se ha comentado anteriormente, las diferencias observadas entre el nivel de daño en el ADN y la concentración de proteínas carbonilo de pacientes neoadyuvantes y el de pacientes adyuvantes y metastásicas, podrían ser debidas a la activación de las defensas antioxidantes y los mecanismos de reparación del ADN; concretamente, nuestros resultados muestran que la actividad de las enzimas reparadoras del ADN, se correlaciona con el nivel de daño en el ADN de las pacientes de distintos grupos, indicando que la ausencia de diferencias antes y después de la quimioterapia en las pacientes adyuvantes y metastásicas se debe, al menos en parte, a la activación de las enzimas reparadoras del ADN en estos grupos. Dicha activación queda claramente reflejada en los resultados obtenidos en pacientes del grupo de adyuvancia, mientras que observamos una disminución de la actividad de KU86 en el grupo de metástasis tras el tratamiento. El nivel de actividad del enzima KU86 en pacientes metastásicas tras el tratamiento es comparable al de pacientes adyuvantes y significativamente superior al del resto de grupos antes del tratamiento, lo que lleva a pensar que este enzima había sido inducido con anterioridad a causa de intervenciones clínicas previas y comienza a perder efectividad. Es especialmente interesante que el enzima significativamente activado tras la quimioterapia sea KU86, pues este enzima cataliza la reparación de roturas en las dos hebras del ADN, siendo este daño producido por la actividad de agentes quimioterápicos como la adriamicina (Kurz y cols., 2004). En la bibliografía acerca de la actividad de enzimas reparadoras del ADN y la administración de quimioterápicos, es posible encontrar trabajos cuyos resultados muestran que la eficacia de la actividad de dichas enzimas, disminuye tras el tratamiento (Jaloszynski y cols., 1997; Blasiak y cols., 2004; Nadin y cols., 2006). Según el diseño de estos estudios, el análisis del daño en el ADN y la actividad de las enzimas de reparación es efectuado poco tiempo

después de la exposición de las células a la quimioterapia; es posible que el efecto acumulativo y dependiente del tiempo de exposición que observamos en nuestros resultados, quede enmascarado en estos estudios por la ausencia de seguimiento de las células; de hecho, los resultados obtenidos en trabajos previos se correlacionan bien con los encontrados en nuestro grupo de neoadyuvancia y se corresponderían con los efectos a corto plazo de la quimioterapia sobre el daño y la reparación del ADN. Por otra parte, la capacidad antioxidante total del plasma se encuentra específica y significativamente aumentada en las pacientes de los grupos de adyuvancia y metástasis, indicando la activación de este mecanismo de defensa frente a los radicales libres en ambos grupos y su contribución a la estabilización de los niveles de daño en el ADN de estas pacientes.

En cuanto a la concentración en el plasma sanguíneo de micronutrientes de conocido efecto antioxidante, como las vitaminas liposolubles retinol y tocoferol, mucho se ha publicado sobre los posibles efectos beneficiosos de los suplementos dietéticos con este tipo de vitaminas, en el tratamiento de los pacientes con cáncer; sin embargo, no existen tantos datos relativos al efecto de la quimioterapia sobre la concentración plasmática de estos micronutrientes con capacidad antioxidante. En 1992 Potischman y colaboradores publicaron un trabajo sobre los cambios inducidos por el tratamiento del cáncer de mama en los niveles plasmáticos de determinados lípidos y vitaminas, entre ellas el retinol y el tocoferol (Potischman y cols., 1992). Los resultados mostraron un significativo aumento de la concentración plasmática de retinol en pacientes sometidas a cirugía y pacientes tratadas quirúrgicamente y con quimioterápicos. Sin embargo, los niveles de  $\alpha$ -tocopherol tan sólo mostraron aumentos significativos en el grupo de pacientes sometidas a cirugía y quimioterapia. Teniendo en cuenta que la segunda muestra de sangre fue tomada tan sólo 4 meses después del diagnóstico, estos datos reflejarían la movilización al torrente sanguíneo de las reservas de antioxidantes del hígado y los tejidos en respuesta al estrés oxidativo generado principalmente por la cirugía. Nuestros resultados analizan el efecto a una exposición prolongada en el tiempo y muestran datos compatibles con la movilización de las reservas de retinol tras la quimioterapia en el grupo de neoadyuvancia, sin embargo, la concentración de retinol en plasma tiende a ser igual en el grupo de adyuvancia antes y después de la quimioterapia y a disminuir en el grupo de metástasis tras la quimioterapia. Estos datos indicarían el progresivo agotamiento de la reserva o a la ineficiencia del sistema de transporte de defensas antioxidantes no enzimáticas frente a una elevada demanda durante un periodo prolongado (Biesalski y Nohr, 2004), sobre todo teniendo en cuenta que la principal vía

de incorporación de esta vitamina es la ingesta y que no se llevó a cabo ninguna intervención nutricional en las pacientes de este estudio.

Otra molécula antioxidante implicada en el mecanismo de detoxificación de radicales libres es el coenzima Q10. Estudios con animales muestran que los niveles plasmáticos de coenzima Q10 disminuyen tras el tratamiento con quimioterápicos como la adriamicina y que éstos son también menores en personas enfermas comparadas con sujetos sanos, aunque igualmente se han publicado trabajos en los que no se han observado cambios en la concentración de coenzima Q10 plasmático durante el tratamiento con adriamicina. Pese a la controversia existente, es muy probable que los niveles de coenzima Q10 aumenten en plasma como respuesta al estrés oxidativo, pues diversos estudios muestran que la administración exógena de coenzima Q10 ejerce un efecto protector sobre la actividad enzimática de la cadena respiratoria mitocondrial, una de las principales dianas celulares de la adriamicina y causa de la cardiotoxicidad provocada por ésta (Quiles y cols., 2002). Nuestros resultados muestran que la concentración plasmática de coenzima Q10 disminuye significativamente en pacientes neoadyuvantes, mientras que en pacientes adyuvantes aumenta y en pacientes metastásicas disminuye de forma no significativa tras el tratamiento con quimioterapia. Estos datos sugieren que la quimioterapia administrada en secuencia neoadyuvante induce la actividad antioxidante del coenzima Q10 y por tanto su concentración disminuye en sangre. Considerando que el coenzima Q10 es de síntesis endógena, el aumento de la concentración de este coenzima tras la quimioterapia en pacientes adyuvantes, podría deberse a un efecto inductor del estrés oxidativo generado por el proceso de cicatrización tras la cirugía y de forma previa al tratamiento sistémico. La disminución no significativa de la concentración plasmática de coenzima Q10 tras la quimioterapia, reflejaría el progresivo agotamiento de las defensas antioxidantes en pacientes sometidas a las agresiones derivadas del tratamiento durante un tiempo prolongado.

La relación entre el daño oxidativo generado por el tratamiento del cáncer de mama y la activación de las defensas antioxidantes en los distintos grupos experimentales, nos lleva a pensar en las posibles consecuencias de la exposición al estrés oxidativo sobre la evolución clínica de las pacientes. Los datos sugieren que las pacientes adyuvantes se encuentran sometidas a un elevado nivel de estrés oxidativo durante más tiempo que las pacientes neoadyuvantes, pues los marcadores de daño en ADN y proteínas muestran que, si bien las pacientes neoadyuvantes alcanzan picos de estrés oxidativo más elevados que el resto de

grupos, las adyuvantes mantienen un nivel de estrés oxidativo que no parece ser modificado por la quimioterapia. Este hecho indicaría que el estímulo que origina el daño oxidativo es previo a la administración de quimioterápicos y que dicho daño es sostenido a lo largo de las intervenciones clínicas que forman parte del tratamiento de este grupo de pacientes. La importancia de esta exposición al estrés oxidativo viene dada por la magnitud del daño que ocasiona, que en el caso del daño en el ADN es especialmente llamativo ya que se ha observado que el porcentaje medio de ADN en la cola de linfocitos del plasma sanguíneo, analizados mediante ensayo *comet* de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama previo a cualquier intervención clínica, es aproximadamente del 9,7-11,2% (Bhatti y cols., 2008), un valor muy inferior al registrado en nuestro grupo de adyuvancia en muestras previas y posteriores al tratamiento con quimioterapia. La exposición de las células al estrés oxidativo es un evento promotor de la carcinogénesis y la expresión de un fenotipo clínicamente agresivo, ya que participa a múltiples niveles en la transformación celular y modula las vías de transducción de señales que promueven la progresión de la enfermedad. Si bien la inducción de un alto nivel de estrés oxidativo forma parte del mecanismo de acción de ciertos fármacos antineoplásicos (Fang y cols., 2007; Schimmel y cols., 2004), el mantenimiento de un nivel de estrés oxidativo alto pero no lo suficientemente elevado para inducir la muerte celular por apoptosis, es una de las situaciones fisiológicas selectivamente promovida por las células transformadas, ya que tal y como se explica detalladamente en el apartado II.6 de esta Tesis, induce una inestabilidad genómica que activa la expresión de genes que permiten la adaptación al microambiente tumoral y la resistencia a los fármacos antineoplásicos. Nuestros resultados sugieren que es éste el escenario molecular en que se encuentran principalmente las pacientes adyuvantes de nuestro estudio, ya que parecen haber alcanzado un nivel de estrés oxidativo que es mantenido a causa de la activación de las defensas antioxidantes, cuya intervención no es suficiente para eliminar dicho estrés, pero sí para establecer una tasa constante a lo largo del tratamiento lo bastante elevada para promover la selección de clones más adaptados y agresivos. Este nivel de saturación del estado oxidativo es corroborado por los resultados obtenidos en el grupo de metástasis, ya que en este grupo de pacientes el daño en el ADN y la modificación proteica así como la activación de las defensas antioxidantes, alcanzaron niveles equivalentes a los registrados por las pacientes del grupo de adyuvancia y siempre en ambos casos, menores que los del grupo de neoadyuvancia. De nuestra base de datos clínicos fue posible extraer un dato retrospectivo que se añade a esta hipótesis, ya que 9 de las 14 pacientes que recibieron tratamiento con quimioterapia previa al desarrollo de metástasis distantes lo hicieron en secuencia adyuvante, esto significa que

aproximadamente el 64,3% de las pacientes cuya enfermedad progresó tras un tratamiento farmacológico sistémico fueron tratadas con quimioterapia tras la cirugía, mientras que el 35,7% de las mismas fueron tratadas con quimioterapia en secuencia neoadyuvante.

Si bien se ha observado que en general la terapia neoadyuvante no ofrece ventajas en términos de supervivencia comparada con el efecto que a este nivel ejerce la quimioterapia adyuvante (Bear y cols., 2006), recientes estudios han mostrado una tendencia cercana a la significación a favor de la quimioterapia neoadyuvante en mujeres menores de 50 años y en cuanto a la supervivencia general y la supervivencia libre de enfermedad (Rastogi y cols., 2008). Dicha tendencia podría corresponderse, al menos en parte y entre otras causas, con una duración de exposición al estrés oxidativo más restringida, relacionada con la inhibición de la expresión de un fenotipo agresivo, la reducción de la morbilidad del tratamiento y sus efectos adversos a largo plazo.

Los resultados del análisis de estrés oxidativo y las consideraciones éticas aplicadas al diseño de este proyecto, fueron los criterios empleados para la selección del grupo de neoadyuvancia como población de estudio en el análisis de perfiles de expresión génica. Por una parte, las pacientes neoadyuvantes presentaron las mayores variaciones en los parámetros de daño oxidativo observadas tras el tratamiento y por otra, la secuencia del tratamiento neoadyuvante permite obtener muestras de tejido tumoral previas y posteriores a la administración de los quimioterápicos, sin someter a las pacientes a intervenciones clínicas adicionales. Además, ya que la quimioterapia es el primer tratamiento antineoplásico aplicado en el grupo de neoadyuvancia, la selección de estas pacientes permite observar la influencia del estrés oxidativo sobre la expresión génica, evitando las posibles interferencias ocasionadas por otro tipo de tratamiento. Tras el análisis comparativo de los datos de expresión génica en biopsias tumorales diagnósticas y piezas quirúrgicas, fue posible identificar un grupo de 49 genes diferencialmente expresados por efecto del tratamiento con antraciclinas y taxanos. El análisis funcional de estos genes, revela la influencia de los quimioterápicos sobre rutas de transducción de señales intracelulares que son esenciales para el desarrollo y progresión de enfermedades neoplásicas.

El estrés oxidativo podría limitar la eficacia del tratamiento con quimioterapia induciendo la actividad de proteínas relacionadas con la respuesta al estrés oxidativo, la angiogénesis y la remodelación de la matriz extracelular.

El análisis de enriquecimiento funcional llevado a cabo con el programa Panther, destaca las rutas moleculares moduladas por el estrés oxidativo. La importancia de los genes clasificados en estas categorías funcionales viene dada por la significación de la correlación entre los genes analizados y la ruta molecular asociada, que en el caso de las rutas “Respuesta al estrés oxidativo”, “Angiogénesis” y “Señalización mediada por PDGF”, es alta. Los genes clasificados dentro de cada una de estas rutas moleculares, codifican proteínas que afectan notablemente a la supervivencia, la capacidad invasiva y la migración de células transformadas.

Entre ellos destaca el gen de MKP1 (*MAPK phosphatase 1*) (Zhou y cols., 2006). MKP1 pertenece a una familia de fosfatasa de especificidad dual que desfosforilan residuos de cisteína y treonina en sus proteínas diana y por tanto, afecta a rutas de transducción de señales como la mediada por MAPKs. Las MAPKs pueden ser clasificadas en tres grupos según la respuesta celular que activan: JNK, p38 y ERKs. Se cree que las dos primeras activan preferentemente cascadas de señalización conducentes a la muerte celular por apoptosis y las últimas activan la proliferación celular, sin embargo, el resultado biológico de la señal mediada por estas quinasas depende de múltiples factores como la duración del estímulo o el balance entre la expresión de genes pro- y anti-apoptóticos. Un elevado nivel de estrés oxidativo activa la cascada de señalización pro-apoptótica mediada por la MAPKs p38 y JNK. Por otra parte, estudios recientes muestran la preferencia de MKP-1 por p38 y JNK, a las que inactiva en respuesta al estrés oxidativo favoreciendo la supervivencia celular (Zhou y cols., 2006, Small y cols., 2004). Por tanto nos encontramos ante un claro ejemplo del efecto dual derivado del estrés oxidativo, cuya influencia sobre el control de las funciones celulares es un proceso dosis-dependiente y multifactorial, tal y como se ha comentado en el apartado II.6 de esta Tesis.

Según nuestros datos, otra de las rutas moleculares significativamente afectada por el tratamiento con quimioterapia es la mediada por PKD1 (*protein kinase D 1*) (Ha y cols., 2008). PKD1 es una serín/treonín quinasa perteneciente a la familia AGC de quinasas dependientes de calcio/calmodulina. PKD1 es activada en respuesta a distintos estímulos entre los que destaca el estrés oxidativo. Las rutas de señalización intracelular que activan PKD1 también son diversas y



entre ellas encontramos las mediadas por factores de crecimiento, como PDGF, análogos del diaciglicerol, ésteres carcinogénicos y receptores de células T y células B. Todos estos agentes activan PKD1 a través de la PKC, otro miembro de la familia AGC. Por último, las proteínas G activan PKD1 en el aparato de golgi. Entre las funciones biológicas de PKD1 destaca la inducción de la proliferación celular mediada por la activación de la quinasa regulada por ERKs y la inhibición de la señal apoptótica inducida por JNK, la estimulación de la señal transformante mediada por el oncogén Ras, la inhibición mediada por PDGF de la señal iniciada por EGF (Bagowsky y cols., 1999, Van Lint y cols., 2002), el control del tráfico de vesículas en ruta a la membrana plasmática desde el aparato de golgi o la inhibición de la apoptosis mediada por TNF $\alpha$ . En el caso concreto de las neoplasias mamarias, se ha observado que PKD1 es capaz de asociarse con moléculas de unión a la actina y proteínas de adhesión, formando unos complejos proteicos que activan la formación de unas estructuras conocidas como invadopodios. Los invadopodios son regiones modificadas de la membrana plasmática donde se concentra la actividad de degradación proteolítica de la matriz extracelular en las células mamarias invasivas. Además, existen datos que sugieren que PKD1 es requerida para la adhesión de las células invasivas al colágeno de la matriz extracelular y que dicha actividad es regulada por la translocación de PKD1 a la membrana plasmática de las células neoplásicas. Especialmente interesante resulta el hecho de que dicha translocación es mediada por ácidos grasos polinsaturados (Van Lint y cols., 2002). La relación funcional de la PDK1 con la angiogénesis se establece mediante la regulación positiva que PDGF y VEGF llevan a cabo sobre su actividad (Van Lint y cols., 2002; Ha y cols., 2008). En resumen, PKD1 es una proteína que favorece la expresión de un fenotipo altamente agresivo en células neoplásicas.

La relación funcional entre PDK1 y PDGF indicaría que la quimioterapia ejerce su influencia en la expresión de genes con funciones biológicas coordinadas. De hecho, nuestros resultados muestran que la expresión del PDGF tipo D se encuentra significativamente reprimida tras el tratamiento. PDGF engloba a cuatro tipos de factores de crecimiento, PDGFA, PDGFB, PDGFC y PDGFD, que se unen específicamente a dos tipos de receptores conocidos como PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$ . Los PDGFs llevan a cabo importantes funciones en el desarrollo embrionario y el mantenimiento de tejidos, sin embargo, el estudio de estos factores de crecimiento en situaciones patológicas ha revelado el importante rol que ejercen en enfermedades de tipo proliferativo, como el cáncer (Reigstad y cols., 2005). Concretamente, la sobre-expresión de PDGFD ha sido relacionada con la estimulación de la invasión celular y la

angiogénesis, sin embargo el mecanismo por el que lleva a cabo esta función es desconocido. Recientemente se ha publicado un trabajo que sugiere que la represión de PDGFD favorece la inactivación de Notch-1 y la capacidad de unión de NF- $\kappa$ B al ADN, lo que resulta en la inhibición de la expresión de genes como VEGF o MMP9 y la expresión de un fenotipo no invasivo y de menor capacidad angiogénica (Wang y cols., 2007). Como muchos otros factores de crecimiento vasculares, la expresión y actividad de PDGFD se encuentra modulada por la concentración de radicales libres. Se ha observado que el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta la expresión de PDGFD mediada por los factores de transcripción Sp1 y Ets-1 (Liu y cols., 2006).

Clasificado funcionalmente dentro de la ruta molecular angiogénica y relacionado con la señalización de PDGF, encontramos entre nuestros resultados un gen de reconocida actividad carcinogénica. El protooncogén *c-fos* (*c-fos murine retroviral oncogene homolog*) pertenece a la familia de factores de transcripción Fos. La dimerización de los factores de transcripción Fos y Jun da lugar al complejo AP-1 implicado en la carcinogénesis mamaria (Milde-Langosch, 2005). Además de participar en la oncogénesis del cáncer de mama, estudios in vitro han permitido correlacionar positivamente la sobre-expresión de *c-fos* con la transcripción de genes que codifican proteínas involucradas en la progresión de la enfermedad. Tales genes incluyen metalo-proteasas, como MMP9 o el sistema activador del plasminógeno uPAR/PAI, que participan en la remodelación de la matriz extracelular facilitando la invasión del tejido adyacente (Milde-Langosch y cols., 2004). Por otra parte, estudios con animales muestran que *c-fos* induce la adquisición de una morfología elongada en células de adenocarcinomas murinos y estudios clínicos muestran que existe una correlación positiva entre la sobre-expresión de *c-fos* y la afectación de los ganglios axilares de pacientes con cáncer de mama (Milde-Langosch, 2005; Milde-Langosch y cols., 2004). Recientemente Bieche y colaboradores publicaron un trabajo en el que muestran que *c-fos* se haya específicamente sobre-expresado en neoplasias mamarias de tipo inflamatorio, conocidas por su gran agresividad e invasividad (Bieche y cols., 2004). La relación de *c-fos* con factores de crecimiento pro-angiogénicos como VEGF o PDGF es un hecho resaltado en numerosas publicaciones científicas. Por una parte *c-fos* estimula la expresión de VEGF (McColl y cols., 2004; Marconcini y cols., 1999) y por otra, PDGF regula la actividad de AP-1 induciendo la expresión y transactivación *c-fos* mediada por ERKs (Monje y cols., 2003). Tanto la conocida sensibilidad de AP-1 al estrés oxidativo (Brown y Bicknell, 2001), como la activación de esta proteína por acción de un factor de crecimiento positivamente regulado por los

radicales libres, ponen de manifiesto la influencia del estrés oxidativo sobre la actividad del proto-oncogen c-fos.

Los resultados de nuestro estudio de expresión génica muestran que la quimioterapia reprime la expresión de MKP-1, PDK1, PDGFD y c-fos. Dado que todos estos genes contribuyen a la expresión de un fenotipo tumoral agresivo, resulta coherente que el tratamiento antineoplásico limite su transcripción. Llegados a este punto, parece necesario reflexionar acerca de la interacción entre la modulación de la expresión génica en células neoplásicas y la modificación en el balance oxidativo de pacientes en tratamiento con quimioterapia. La producción de radicales libres a causa del metabolismo de agentes citostáticos, como las antraciclinas, es un hecho bien documentado en términos de actividad antineoplásica y cardiotoxicidad, (Quiles y cols., 2002; Conklin, 2004). En general, todos los citostáticos inducen la formación de radicales libres como evento secundario a su actividad pro-apoptótica. Antraciclinas y taxanos activan la liberación del citocromo c de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, que es la señal que activa la caspasa 9 y da lugar a la muerte celular por la vía intrínseca. La liberación del citocromo c desvía el transporte electrónico a través de la cadena respiratoria y origina que los electrones sean transferidos directamente desde el complejo I y el ubiquinol al oxígeno, dando lugar a la formación de  $O_2^{\cdot-}$ . Además, el sistema citocromo monoxigenasa P450 hepático genera una elevada cantidad de ERO durante el proceso de detoxificación de una amplia variedad de compuestos químicos, entre ellos los fármacos antineoplásicos. Sin embargo, poco se sabe acerca del efecto y las consecuencias de la exposición al estrés oxidativo sobre el resultado clínico y la progresión de pacientes oncológicos en tratamiento. Small y colaboradores publicaron recientemente un trabajo que muestra que la inducción de MKP-1 está relacionada con la quimiorresistencia a drogas como antraciclinas, taxanos e inhibidores del proteasoma, mediante la inactivación de la ruta pro-apoptótica mediada por JNK (Small y cols., 2007, Small y cols., 2004). Por tanto, es posible que los quimioterápicos inhiban la expresión de MKP-1 como parte de su actividad pro-apoptótica, pero el estrés oxidativo asociado a su metabolismo podría disminuir la eficacia de este efecto modulando positivamente la actividad del enzima MKP-1 expresado. La misma hipótesis puede ser aplicada al resto de genes analizados en este bloque, ya que su actividad es inducida por los radicales libres. La activación de MKP-1, PDK1, PDGFD y c-fos se sumaría a otros eventos colaterales indeseados, entre los que podríamos citar la inhibición de la cascada de caspasas o

---

la alteración de la progresión del ciclo celular (Conklin, 2004), que justificarían la interferencia de los radicales libres en el tratamiento con quimioterapia.

En conexión con este grupo de genes relacionados con el estrés oxidativo, cabe destacar la expresión diferencial mediada por la quimioterapia de un gen conocido como PDGFRL (*PDGF receptor like*). La función biológica de este gen es aún desconocida en gran medida, pero se sabe que codifica una proteína de secuencia muy similar al dominio extracelular del receptor de PDGF. Su represión ha sido observada en una amplia mayoría de tumores mamarios y se encuentra la región cromosómica 8p22, en la que algunos estudios sugieren la existencia de un gen supresor de tumores en el cáncer de mama (Seitz y cols., 2006). Xu y colaboradores, han publicado recientemente los resultados de un análisis bioinformático que integra los datos de 32 estudios de expresión génica y compara el perfil transcripcional de muestras tumorales con el de tejido sano. Esta aproximación identificó una red molecular de 52 genes co-expresados en una significativa proporción de los tumores mamarios analizados. Además, se identificó como principal función biológica de esta red molecular la supresión tumoral mediada por la inhibición de la actividad de las proteínas de la familia del PDGF. Los autores definen como eje central de la red molecular a PDGFRL (Xu y cols., 2007). Dada la escasez de datos acerca de este gen y su actividad, resulta difícil establecer una relación entre valores de expresión diferencial asociados a cualquier condición. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con quimioterapia reprime la expresión de PDGFRL, lo que no se correlaciona con su posible función supresora de tumores. Se requieren estudios adicionales que clarifiquen la función de esta novedosa proteína y su interacción con los demás elementos de la superfamilia del PDGF. En cualquier caso, la red molecular fue obtenida en función de la co-expresión de los genes seleccionados, es decir todos los genes estuvieron o bien reprimidos o bien sobre-expresados por parejas conformando la red, lo que indica la existencia de un vínculo funcional entre ellos. Nuestros resultados muestran que los 49 genes seleccionados tras el análisis diferencial de expresión se encuentran significativamente reprimidos tras la quimioterapia, sugiriendo una función coordinada, si no entre todos ellos, al menos sí dentro del mismo grupo funcional. De hecho, algunos de los genes identificados como parte de la red molecular de Xu y colaboradores aparecen en nuestra lista de genes diferencialmente expresados por efecto del tratamiento con quimioterapia. Entre ellos podemos encontrar genes relacionados con el metabolismo de la matriz extracelular como el que codifica SPOND1 (*spondin F* o *spondin 1*), SPARC1 (*secreted protein acidic and rich in cystein*) y FBLN1 (*fibulin 1*).

SPOND1 es la proteína prototípica de una familia de moléculas cuya principal misión es la de estimular la proliferación de las CMLs (células musculares lisas) de las paredes de los vasos sanguíneos. El gen de la SPOND-1 se encuentra significativamente sobre-expresado en carcinomas ováricos, siendo este un tejido de intensa actividad angiogénica (Pyle-Chenault y cols., 2005). Esta proteína media la motilidad de los axones neuronales durante el desarrollo del sistema nervioso, función biológica que comparte con otra proteína conocida como NRP1 (neuropilina 1) (Tzarfati-Majar y cols., 2000; He y Tessier-Lavigne, 1997). Además NRP1 es un receptor de membrana capaz de unirse a VEGF-A165, co-activando la señal iniciada por KDR/VEGFR2 y así modular positivamente la capacidad invasiva de las células y la angiogénesis. Se ha observado que la secreción de PDGF por parte de células de mama transformadas induce la motilidad de las CMLs vasculares mediante la regulación positiva de NRP1 favoreciendo la angiogénesis (Banerjee y cols., 2006). La analogía funcional de estas dos proteínas en el sistema nervioso sugiere que ambas proteínas podrían tener una función similar en el sistema vascular.

SPARC es una glicoproteína secretada que confiere a las células una alta capacidad de adhesión a la matriz extracelular potenciando la migración. Su sobre-expresión ha sido ligada a una mala prognosis en el cáncer de mama y significativamente correlacionada con una baja supervivencia general (Watkins y cols., 2005). Su expresión parece estimulada por c-jun, por lo que es muy posible que la regulación positiva de SPARC1 sea uno de los mecanismos por los que este oncogén contribuya a la invasividad y motilidad celular (Briggs y cols., 2002). Sin embargo la relación de SPARC con la angiogénesis es controvertida, ya que se le atribuyen tanto efectos angiosupresores como pro-angiogénicos en función de las modificaciones post-traduccionales que sufra la proteína que codifica. Se ha observado que el fragmento (K)GHK de SPARC derivado de la actividad proteolítica de metalo-proteasas de la matriz y de la plasmina, activa la angiogénesis in vivo mediante el aumento de la proliferación y la remodelación de la matriz extracelular, mientras que la proteína SPARC intacta inhibe la ruta molecular iniciada por VEGF, para aumentar la permeabilidad de la barrera endotelial y estimular la extravasación de las células tumorales y la metástasis (Kato y cols., 2001). Por otra parte se ha observado que SPARC es capaz de unirse directamente al receptor  $\beta$  de PDGF bloqueando la unión de sus ligandos (Raines y cols., 1992). Dada la actividad dual de SPARC en la angiogénesis según las distintas formas proteolíticas que se observan en la matriz extracelular y la negativa relación de la expresión de SPARC con la supervivencia en pacientes de cáncer de mama, es probable que la represión de la señalización mediada por PDGF forme parte del efecto estimulador de la

invasión celular, tal y como ocurre tras la interacción de SPARC con VEGF. En cualquier caso, existen precedentes que muestran la inhibición transitoria de la actividad de PDGF tras una señal mitogénica, con el objetivo de evitar una señal aberrante que impida la progresión del ciclo celular (Varizi y Faller, 1995). En relación a SPARC, encontramos entre nuestros resultados el gen que codifica SMOC2 (*SPARC related modular calcium binding 2*) (Vannahme y cols., 2003). La expresión de SMOC2 ha sido fundamentalmente relacionada con el crecimiento de células endoteliales y la angiogénesis en cooperación con factores de crecimiento pro-angiogénicos como FGF o VEGF. SMOC2 parece inducir su actividad mitogénica aumentando la sensibilidad de las células quiescentes a factores de crecimiento externos como VEGF y PDGF (Rocnik y cols., 2006).

FBLN1 es una glicoproteína de la matriz extracelular que se asocia a microfibras y elementos de la membrana basal de los epitelios. La FBLN1 actúa inhibiendo la dispersión y motilidad celular mediante su asociación en lugares de adhesión focal con proteínas como la fibronectina (Twai y cols., 2001). Su aparente papel antineoplásico queda ensombrecido por el hecho de que se sobre-expresa en multitud de tumores sólidos (Greene y cols., 2003; Bardin y cols., 2005) y porque lleva a cabo una importante labor en la quimiorresistencia a drogas como las antracínicas. FBLN1 promueve la supervivencia tumoral probablemente mediante su interacción con la fibronectina, favoreciendo la activación de señales antiapoptóticas mediadas por la quinasa FAK y la activación dependiente de integrinas de la vía Akt/mTOR y p27kip1 (Pupa y cols., 2007). Además, entre nuestros resultados podemos encontrar un gen que codifica una proteína estructuralmente relacionada con la fibronectina y conocida como FLRT2 (*fibronectin leucine rich transmembrane protein 2*). Esta proteína pertenece a un grupo de receptores transmembrana con un dominio fibronectina, capaz de interactuar con receptores de FGF y activar la señalización iniciada por este factor de crecimiento (Haines y cols., 2006), lo que frecuentemente desemboca en la activación de la angiogénesis.

La quimioterapia reprime la expresión de otros dos genes que codifican proteínas ricas en repeticiones de leucina y relacionados con el metabolismo de la matriz extracelular. Se trata de las proteínas PODN (*podocan*) y OGN (*osteoglycin*). PODN pertenece a la familia de proteínas con repeticiones pequeñas de leucina –SLR (*small leucine rich*)- implicadas en el control del crecimiento celular, la deposición del colágeno y la regulación de citoquinas y factores de crecimiento. Se encuentra en el citoplasma celular o bien en el sobrenadante de cultivos

celulares, lo que indica que es secretada al medio extracelular donde se une a las fibras de colágeno tipo I. Estudios *in vitro* con líneas celulares de riñón y ovario muestran que la sobreexpresión de PODN se relaciona con el aumento en la expresión del inhibidor del ciclo celular p21 y una ligera represión de la GTPasa Rho A, lo que sugiere que PODN tiene un papel antiproliferativo y supresor de la migración celular (Shimizu-Hirota y cols., 2004). Sin embargo, experimentos en CMLs vasculares muestran que la expresión de PODN es inducida por la angiotensina II, una proteína que activa la angiogénesis y promueve la resistencia al tratamiento con antraciclinas mediante la activación de la ruta molecular mediada por la quinasa Akt (Shimizu-Hirota y cols., 2004; Zao y cols., 2008). Parece pues, que el papel de PODN es dependiente del tipo celular en que se expresa. Se requieren estudios adicionales que esclarezcan el papel de este gen en células neoplásicas y su relación con la capacidad invasiva de las células tumorales. Por otra parte, la función biológica de OGN es también desconocida en gran medida. La caracterización de la región promotora de OGN ha revelado que su expresión se encuentra modulada positivamente por p53. Este hecho, junto con la represión de OGN en adenomas colónicos sugiere que OGN posee un papel antagonista en el desarrollo del cáncer (Tasheva y cols., 2001). Sin embargo, al igual que en el caso de PODN, la expresión de OGN en CMLs vasculares ha sido correlacionada con la remodelación de la matriz extracelular asociada a la angiogénesis (Shanahan y cols., 1997).

Como PODN, muchas de las proteínas de la matriz extracelular se asocian a estructuras fibrilares como COL1 (colágeno tipo 1). Los resultados de nuestro estudio muestran que la quimioterapia modula la expresión del gen que codifica COL1A1 (cadena pro- $\alpha$  del COL1). Este tipo de colágeno y concretamente algunos productos de su metabolismo, han sido relacionados con la progresión del cáncer de mama. COL1 promueve la actividad sinérgica de EGF e IGF-I en la proliferación de células mamarias de embriones de rata y la proliferación en líneas celulares de cáncer de mama tratadas con estrógenos (Haslam y cols., 2003). Por otra parte, se ha observado que el fragmento C3, producto de la proteólisis del procolágeno tipo 1, es un potente quimioatrayente para células de carcinoma mamario y células endoteliales. Además induce la expresión de VEGF mediante la activación de la ruta molecular de p38 y PKC, la activación de MMP2 y MMP9 en células tumorales y el receptor de la citoquina CXCL12 (CXCR4). VEGF y el sistema CXCR4/CXCL12 están coordinados en un bucle paracrino por el que se activan recíprocamente, pues la expresión de VEGF A-165 en presencia de NRP-1 y KDR/VEGFR2 promueve la motilidad celular vía activación de CXCR4, que a su vez incrementa la expresión de

VEGF A-165. La sobre-expresión concomitante de CXCR4, VEGF y MMP-9 es un factor pronóstico negativo en el cáncer de mama (Palmieri y cols., 2008). C3 corresponde al extremo COOH terminal del procolágeno tipo 1, que está formado por dos cadenas pro- $\alpha$ 1 y una cadena pro- $\beta$ 1. La represión de la expresión de la COL1A1 tras la quimioterapia, sugiere que la capacidad angiogénica de C3 reside en las cadenas pro- $\alpha$ 1. Por otra parte, nuestros resultados muestran la represión de un gen que modula el reciclaje de los receptores de membrana CXCR, como CXCR2 y CXCR4. La activación de receptores de citoquinas está frecuentemente mediada por la internalización de estas moléculas en vesículas endocíticas, que bien siguen la ruta transcitótica y son reintegradas a la membrana plasmática o bien, son degradadas en función de la concentración extracelular de ligandos. Este tráfico molecular representa uno de los mecanismos de regulación de la señalización mediada por citoquinas y está controlado por proteínas como la codificada por el gen RAB11-FIP2 -*RAB11 family interacting protein 2 (Class I)*-. RAB11-FIP2 se asocia con la GTPasa tipo Rab11a y la miosina Vb en las vesículas endocíticas y regula la internalización de los receptores de citoquinas. Concretamente se ha comprobado que mutaciones en el gen de RAB11-FIP2 retarda el tráfico de los receptores de citoquinas y reduce la motilidad celular inducida por la activación de CXCR2 y CXCR4 (Fan y cols., 2004), por lo que RAB11-FIP2 estaría implicada en la modulación positiva de las señales mediadas por la activación de CXCR2 y CXCR4.

De especial interés es la relación del gen de COL1A1 con el de PDGF en tumores dérmicos, en el que una translocación recíproca da lugar a un transcrito de fusión que es traducido a una proteína aberrante capaz de estimular a PDGFR $\beta$  (Takahira y cols., 2007). Hasta el momento no se ha identificado tal relación en el cáncer de mama, sin embargo, dada la estrecha relación de COL1A1 con otros factores pro-angiogénicos como VEGF y la constante correlación de los genes reprimidos por la quimioterapia con PDGF, sería interesante investigar este tipo de mutaciones cromosómicas en el cáncer de mama. El gen del colágeno tipo XIV (COL14) también se encuentra significativamente modulado por efecto de la quimioterapia en nuestras muestras. COL14 es una proteína que se asocia frecuentemente a las fibras de COL1, sugiriendo que participa en la organización de las fibras. Suele estar ausente en el estroma tumoral (Ruehl y cols., 2005), aunque su expresión es selectivamente activada en la membrana basal de capilares en crecimiento, lo que sugiere que está implicado en la angiogénesis (Tomte y cols., 2004).



Por último, en el bloque de genes relacionados con el metabolismo de la matriz extracelular, la quimioterapia modula negativamente la expresión de HMNC1 (*hemicentin 1*), ELN (*elastin*) y SSPN (*sarcospan*).

HMNC1 es una proteína de la matriz extracelular presente en las inmediaciones de los epitelios sobre todo de tejidos sometidos a un elevado estrés mecánico y particularmente en regiones cercanas al endotelio y CMLs vasculares. Un reciente estudio en nematodos ha demostrado que la FBLN1 requiere para su ensamblaje la presencia de HMNC1 (Muriel y cols., 2005), por lo que esta proteína podría contribuir a la quimiorresistencia a las antraciclinas mediada por la FBLN1.

ELN es una proteína profusamente expresada en la pared de los vasos sanguíneos y un factor quimioatrayente que induce la motilidad de las células tumorales, especialmente de aquellas con capacidad de invadir el pulmón. La señalización motogénica mediada por la elastina soluble o los péptidos derivados de su proteólisis, requiere la activación de la PKC, PLC y proteínas G. Se ha propuesto que los productos proteolíticos de la elastina activan por esta vía la expresión de MMPs, que a su vez catalizan la proteólisis de elastina soluble aumentando la capacidad invasiva de las células tumorales y estableciendo un mecanismo de regulación positiva por retroalimentación (Lapis y Timar, 2002).

SSPN es uno de los componentes del subcomplejo sarcoglicano-sarcospan que forma parte del complejo distrofina-glicoproteína que une el citoesqueleto a la matriz extracelular. Aunque se describió por primera vez en el músculo esquelético estos complejos aparecen igualmente en la musculatura lisa y por ello son de gran importancia en el mantenimiento de la estructura de los vasos sanguíneos. Inesperadamente, se ha observado la expresión de SSPN en las células endoteliales de capilares y arteriolas, donde además se asocia con la caveolina-1 (Ramírez-Sánchez y cols., 2005). Este hallazgo es de especial relevancia, pues la sobreexpresión de caveolina-1 ha sido correlacionada con el fenotipo basal (*basal-like*) del cáncer de mama, un tipo de carcinoma clínicamente muy agresivo, indiferenciado y potencialmente metastásico (Savage y cols., 2007). La co-localización de estas dos moléculas en las células CMLs y células endoteliales de los vasos sanguíneos sugieren una relación funcional que muy probablemente influya en el proceso de invasión y metástasis tumoral.

Tradicionalmente el estudio del cáncer ha sido abordado desde un punto de vista reduccionista, limitando los agentes causales a la expresión anómala de genes críticos en el desarrollo oncológico. Actualmente sin embargo, sabemos que el comportamiento celular no está regulado por una serie de comandos lineales, si no que está determinado por redes moleculares cuyos elementos interaccionan para dar lugar a refuerzos positivos y negativos. Dichos elementos no sólo son proteínas codificadas por el genoma de las células transformadas, pues otros muchos tipos celulares presentes en el microambiente tumoral modulan el comportamiento del carcinoma. Tal relación es el producto de una compleja red de interacciones entre las células tumorales y las células del estroma peritumoral, que se intensifica tras la carcinogénesis en respuesta a la presión adaptativa originada por la escasez de nutrientes y oxígeno de la lesión tumoral en crecimiento. En esta situación las células neoplásicas activan la expresión de genes que les confieren un fenotipo invasivo, aumentan su motilidad y promueven la angiogénesis. Los tumores mamarios tratados en secuencia neoadyuvante poseen un tamaño medio de 2 cm cuando son diagnosticados, por lo que es factible que hayan iniciado el programa transcripcional que activa la invasión tumoral, tal y como muestran algunos estudios recientes (van't Veer y cols., 2002, Weigelt y cols., 2003). Los resultados de nuestro estudio, muestran que la quimioterapia reprime la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la matriz extracelular y asociados a la invasión tumoral, la quimiorresistencia y la angiogénesis. Gran parte de estos genes se relacionan directa o indirectamente con los factores de crecimiento PDGF y VEGF, lo que confirma la conocida interrelación entre la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis como mecanismo promotor de la metástasis. Sin embargo el estrés oxidativo generado, tanto por el crecimiento tumoral y la hipoxia como por la actividad de los quimioterápicos, crea un ambiente altamente oxidativo que contrarresta la quiescencia estromal inducida por la quimioterapia, pues los radicales libres estimulan la actividad de los factores de crecimiento angiogénicos que a su vez incrementan la producción de radicales libres, creando un bucle de regulación positiva que disminuye la eficacia del tratamiento antineoplásico. La función biológica de los genes de nuestra lista de resultados describe un escenario molecular que representa tales interacciones. Una reciente revisión de las evidencias científicas al respecto, destaca el papel del enzima NOX (NADPH oxidasa) en la activación del fenotipo angiogénico y su relación con las rutas moleculares mediadas por PDGF y VEGF, la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la matriz extracelular y la angiogénesis. NOX es una proteína transmembrana que genera radicales libres para amplificar la señal mediada por VEGFR2/KDR en células endoteliales. De esta forma PDGF induciría en células tumorales la

expresión y liberación al medio extracelular de VEGF, que se uniría al receptor VEGFR2/KDR en células endoteliales activando una señal amplificada por NOX que induce la permeabilidad, la proliferación y migración celular y la expresión de proteínas remodeladoras de la matriz extracelular (Ushio-Fukai y Nakamura, 2008). De hecho, nuestros resultados muestran la represión de un gen que codifica una proteína de elevada homología estructural con NOX: el gen STEAP (*six-transmembrane epithelial antigen of the prostate*) (Ohgami y cols., 2006). STEAP es una proteína transmembrana de múltiple paso, frecuentemente sobre-expresada en el cáncer de próstata, que se localiza en el aparato de golgi y en la membrana plasmática (Sánchez-Pulido y cols., 2004). La represión de la expresión de este gen en nuestras muestras y el resto de genes descritos hasta ahora, refuerzan la idea de que las células tumorales activan una red molecular centrada en la actividad de factores de crecimiento pro-angiogénicos sobre la que incide la quimioterapia. Sin embargo, la sensibilidad de dichos factores de crecimiento a los radicales libres comprometería la efectividad del tratamiento.

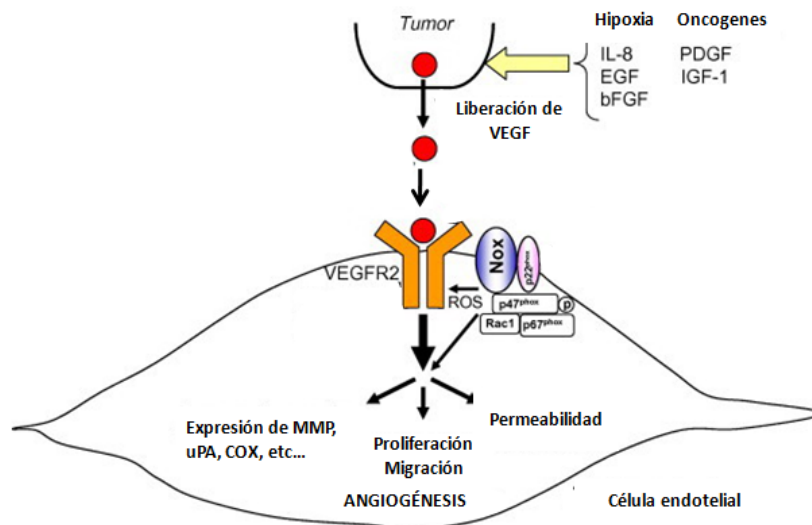


Figura 49. Esquema de los mecanismos moleculares por los que PDGF y otros factores proangiogénicos tumorales, inducen la activación de las células endoteliales a través de la cascada de señalización mediada por VEGF.

El resto de genes de la lista de resultados fueron clasificados dentro de categorías funcionales relativas al crecimiento y mantenimiento de la forma celular, al control de procesos biológicos y desarrollo embrionario. Aún así, al analizar la información bibliográfica disponible pudimos comprobar que gran parte de los genes incluidos en este bloque llevan a cabo funciones biológicas relacionadas con la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis.

Entre estos genes encontramos los que codifican MRCK (*myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase*) y RASGRF2 (*Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 2*), ambos relacionados con la ruta molecular mediada por las GTPasas Rho. Las GTPasas Rho y concretamente Rac1 y Cdc42, están implicadas en la activación de la motilidad celular, la resistencia a la apoptosis y la angiogénesis. MRCK, es un efector de la GTPasa Rho conocida como Cdc42. La activación de Cdc42 incrementa la contractibilidad de las células mediante la fosforilación de la cadena ligera de la miosina II catalizada por MRCK. Esta ruta molecular es específicamente activada por las células de tumores que expresan un fenotipo invasivo, ya que las dota de movilidad (Wilkinson y cols., 2005). Un reciente estudio muestra que las células de carcinomas epiteliales inducen la expresión de genes involucrados en la remodelación de la matriz celular en fibroblastos del estroma tumoral. Los fibroblastos son el tipo celular que lidera el proceso invasivo y al que siguen las células epiteliales transformadas. Ambos tipos celulares poseen distintos requerimientos en cuanto a la expresión de integrinas y proteínas Rho para invadir el estroma adyacente. Se ha observado que los fibroblastos tumorales sobre-expresan las integrinas  $\alpha 3$  y  $\alpha 5$ , GTPasas Rho y sus efectores ROCK, así como MMPs. Experimentos con pequeños ARN interferentes muestran que estas proteínas son indispensables en el proceso de invasión. Por otra parte, el bloqueo de la expresión de Cdc42 o MRCK en células epiteliales transformadas inhibe su capacidad invasiva. Este y otros trabajos discuten la tradicional hipótesis que sostiene que las células tumorales de origen epitelial seleccionan la expresión de un fenotipo mesenquimal que les permite invadir el tejido adyacente y metastatizar. Un número creciente de experimentos apoyan la idea de que las células tumorales inducen cambios de expresión génica en células mesenquimales, como los fibroblastos, en lugar de inhibir la expresión de marcadores típicamente epiteliales en favor de la expresión de genes mesenquimales. Este fenómeno da lugar a la sobre-expresión de factores secretados al medio extracelular que remodelan la matriz y abren un camino en el estroma que permite la migración celular (Gaggioli y cols., 2007). Por otra parte, RASGRF2 cataliza la activación del oncogén Ras mediante la transferencia de GTP (guanosín-trinucleótido fosfato), lo que da lugar a la activación de ERK1 mediada por la entrada de calcio en la célula. Las células que sobre-expresan RASGRF2 adquieren un fenotipo transformado y crecen descontroladamente con un mínimo de contacto intercelular (Fam y cols., 1997). RASGRF2 es también capaz de transferir GTP a la GTPasa Rac1 activándola (Fan y cols., 1998). Las consecuencias de la activación de Rac-1 en células tumorales son bien conocidas. Entre ellas destacan la activación de un fenotipo invasivo por aumento de la motilidad celular, estimulación

de la formación de invadopodios, la migración ameboide en células que sobre-expresan Ras y la regulación positiva de MMPs (Prieto-Sánchez y cols., 2007). Por último Rac-1 se une directamente al dominio intracelular de NOX activando la producción de radicales libres que amplifica la señal de VEGF (Ushio-Fukai y Nakamura, 2008).

Los programas de anotación funcional Panther y David no clasificaron en ninguna categoría funcional a varios genes de nuestra lista de resultados, sin embargo, tras la revisión de la información bibliográfica disponible, pudimos comprobar que algunos de ellos están relacionados con la remodelación de la matriz extracelular, la angiogénesis y el desarrollo embrionario, lo que pone de manifiesto su importancia en este estudio.

Entre ellos, se encuentra el gen de la proteína GEM (*GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle*), su relación biológica con Ras y las GTPasas Rho. GEM inhibe la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje presentes en la membrana celular y participa en la remodelación del citoesqueleto inhibiendo la señal de GTPasas tipo Rho (Kelly, 2005). La remodelación del citoesqueleto mediada por GEM da lugar a la inhibición de la retracción en neuronas y a la inhibición de la adhesión focal en fibroblastos (Ward y cols., 2002). La actividad de esta enzima antagoniza la inducción de la motilidad celular señalizada por las GTPasas Rho en favor de la estimulación de otro tipo de migración celular independiente de las adhesiones focales, la migración ameboide. De este modo, activa la formación de protusiones en células endoteliales y fibroblastos inmortalizados y regula positivamente la capacidad invasiva de las células (Mahalakshmi y cols., 2007). La represión de la expresión de MRCK, RASGRF y GEM sugiere la importancia de la cascada de señalización molecular en que se integran estas proteínas durante la progresión del cáncer de mama.

La actividad biológica de la PKG (*protein kinase G*) está íntimamente ligada a la angiogénesis y el control de la presión sanguínea. PKG es un enzima dependiente de GMPc cuya expresión determina el fenotipo de las CMLs de los vasos sanguíneos en el sistema circulatorio. El aumento de la concentración de GMPc es la señal molecular requerida para activar a PKG. El GMPc es sintetizado por ciclasas citoplasmáticas que son activadas en respuesta a un aumento intracelular de la concentración de NO<sup>•</sup>. Radicales libres como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activan a las óxido nítrico sintasas y por tanto, indirectamente refuerzan la activación de PKG. Los diferentes trabajos acerca de la función biológica de PKG muestran resultados discordantes,

sugiriendo que su sobre-expresión da lugar tanto a señales antiproliferativas como a mitogénicas (Lincoln y cols., 2006). Algunos investigadores argumentan que estas discrepancias son debidas a artefactos inducidos por la manipulación *in vitro* de líneas celulares de CMLs vasculares (Komalavilas y cols., 1999) y otros sostienen que el efecto de la expresión de PKG depende del procesamiento post-traducciona l de la proteína (Sigiura y cols., 2008). Aunque se han publicado numerosos estudios al respecto, la función biológica del eje GMPc-PKG es aún incierta. Estudios con CMLs adultas y fenotipo contráctil (en las que la expresión de PKG es detectable), han mostrado que GMPc activa, vía PKG, la transducción de señales mediada por MAPKs que finalmente promueve la expresión de c-fos. Además, parece que PDGF contribuye a la activación de las MAPKs mediada por PKG (Lincoln y cols., 2006). Por otra parte, la angiogénesis tumoral induce la formación de vasos sanguíneos de estructura generalmente anómala que causa periodos de hipoxia seguidos de re-perfusión. La re-perfusión es facilitada por el aumento de la concentración de NO pues induce la vasodilatación mediada por PKG, sin embargo, este proceso lleva asociado la generación de ERO, lo que refuerza aún más el proceso angiogénico (Brown y Bicknell, 2001).

La expresión de SSG1 (*steroids sensitive gene 1*) parece estar correlacionada con el metabolismo hormonal de los tumores mamarios y la angiogénesis, dos procesos cruciales en el desarrollo del cáncer de mama. La expresión de SSG1 está mediada por los estrógenos, un agente carcinogénico e inductor de la progresión en el cáncer de mama. La sobre-expresión de SSG1 ha sido detectada de forma específica en las células mioepiteliales de los ductos mamarios y en las células endoteliales de los vasos que irrigan la glándula mamaria, lo que indicaría que SSG1 es expresado por células no epiteliales en respuesta a la producción de estrógenos por parte de células epiteliales. La sobre-expresión de SSG1 está relacionada con la carcinogénesis y la angiogénesis en tumores mamarios (Marcantonio y cols., 2001).

Por último, dentro de este grupo de genes no clasificados por los programas de anotación funcional encontramos el que codifica la proteína EMAP (*echinoderm microtubule-associated protein*) es una proteína abundante en el embrión del erizo de mar que se une con alta afinidad a los microtúbulos originando estructuras ligeramente más largas. El análisis de su secuencia revela sitios de fosforilación adecuados a la catálisis de quinasas como PKC, MAPKs o quinasas dependientes de AMPc (adenosín monofosfato cíclico). La expresión de este gen en las tres capas embrionarias indica que debe llevar a cabo un papel fundamental en el desarrollo

embrionario regulando la división celular. Se ha comprobado que EMAP pertenece a una familia de proteínas muy conservadas desde los nematodos hasta los humanos. De hecho, la proteína EMAP-1 se ha relacionado con el síndrome de Usher, un trastorno genético que afecta a los órganos sensoriales y afecta a todo el encéfalo (Lepley y cols., 1999).

Volviendo a los genes clasificados en este bloque por los programas Panther y David, observamos que la quimioterapia reprime la expresión del gen que codifica el factor EGR1 (*early growth response 1*). EGR1 es un factor de transcripción con capacidad de unirse a regiones promotoras de diversos genes regulando positivamente su expresión. La expresión de EGR1 es rápidamente activada en respuesta a numerosos estímulos como el daño mecánico, la radiación, citoquinas y factores de crecimiento favoreciendo el crecimiento tumoral y la invasión. EGR1 ha sido relacionado con la multirresistencia a drogas, la respuesta a terapia antiestrogénica y el crecimiento tumoral (Mitchell y cols., 2004). En cuanto a la invasión tumoral y la angiogénesis, diversos trabajos han mostrado que EGR1 activa la expresión de genes cruciales para estos procesos. Concretamente, activa la expresión del gen de la heparanasa, enzima implicada en procesos de remodelación de la matriz extracelular y de elevada actividad en células metastásicas y células endoteliales en proliferación. Las cadenas de heparán-sulfato producto de la actividad catalítica de la heparanasa, se unen a factores de crecimiento y citoquinas que facilitan la angiogénesis, la metástasis y la cicatrización (de Mestre y cols., 2005). De hecho, en cuanto a la angiogénesis, se ha comprobado que PDGF y VEGF activan la expresión de TF (factor tisular) mediante la inducción EGR1 en CMLs de los vasos sanguíneos. TF es un receptor de la superficie celular que inicia procesos trombóticos asociados a la aterosclerosis y el cáncer (Kamimura y cols., 2004). Clásicamente, la activación de TF es un proceso mediado por la ruta molecular iniciada por NF- $\kappa$ B, sin embargo, se ha observado que los efectores que activan la expresión de TF mediada por EGR1 corresponde a fosfolípidos oxidados de la membrana de células endoteliales (Bochkov y cols., 2002). Por tanto cabe la posibilidad de que EGR1 sea un mediador de los efectos pro-angiogénicos de productos celulares derivados de la exposición al estrés oxidativo.

En nuestra lista de resultados aparecen otros factores de transcripción cuyo papel en la respuesta a la quimioterapia y su relación con el estrés oxidativo no ha sido aún descrito, pero están relacionados con el desarrollo embrionario. Entre ellos se encuentra ZHF4 (*zinc finger-homeodomain 4*), que es abundantemente expresado en células progenitoras del sistema

nervioso y se cree que juega un papel central en la diferenciación de células musculares y nerviosas durante el desarrollo embrionario (Nogami y cols., 2005). El otro factor de transcripción es codificado por el gen PUR $\alpha$  (*purine-rich element binding protein  $\alpha$* ). PUR $\alpha$  es un factor de transcripción que se une a regiones próximas al origen de replicación y secuencias codificadoras de genes eucariotas y está implicada en el control de la replicación y la transcripción génica. Ha sido relacionado con el control de la expresión de multitud de genes relacionados con el desarrollo del sistema nervioso, pero también con el control negativo de la expresión de genes como la  $\alpha$ -actina vascular en fibroblastos y mioblastos inmaduros. También ha sido relacionado con la detención del ciclo celular mediante su interacción con la forma hipofosforilada de RB y E2F-1 en la transición entre las fases G1/S del ciclo celular y su interacción con la ciclina A y CDK2 (*cyclin dependent kinase 2*) en la fase G2 (Gallia y cols., 2000). Por otra parte, algunos estudios han mostrado que PUR $\alpha$  activa la expresión de genes oncogénicos como PDGF (Zhang y cols., 2004) y se coordina con HIF-1 para activar la expresión de la integrina  $\beta$ 2 en hipoxia, una situación a la que se exponen frecuentemente los tumores en rápido crecimiento (Kong y cols., 2007). Por tanto, aunque los estudios iniciales sobre la función biológica de PUR $\alpha$  le atribuyeron una función antioncogénica, estudios más recientes sugieren que el rol de PUR $\alpha$  en el desarrollo de la enfermedad neoplásica debe ser más complejo y dependiente del microambiente tumoral.

En relación a la respuesta inflamatoria, la quimioterapia parece reprimir la expresión de SOCS5 (*suppressor of cytokine signaling 5*). Aunque varios trabajos sugieren que esta proteína posee un rol antineoplásico, pues señala la ubiquitinación de EGFR, otros muestran que la sobre-expresión de los genes SOCS en el cáncer de mama protege a las células tumorales frente a las citoquinas pro-inflamatorias. Este mecanismo protector parece mediado por la represión de la ruta molecular mediada por STAT1/STAT5. Un reciente trabajo ha mostrado que la expresión de SOCS5 en CMLs vasculares, mediada por STAT3 e iniciada por la IL-9, forma parte del mecanismo de cicatrización de vasos sanguíneos sometidos a algún tipo de traumatismo, contribuyendo al restablecimiento de su funcionalidad (Tian y cols., 2008).



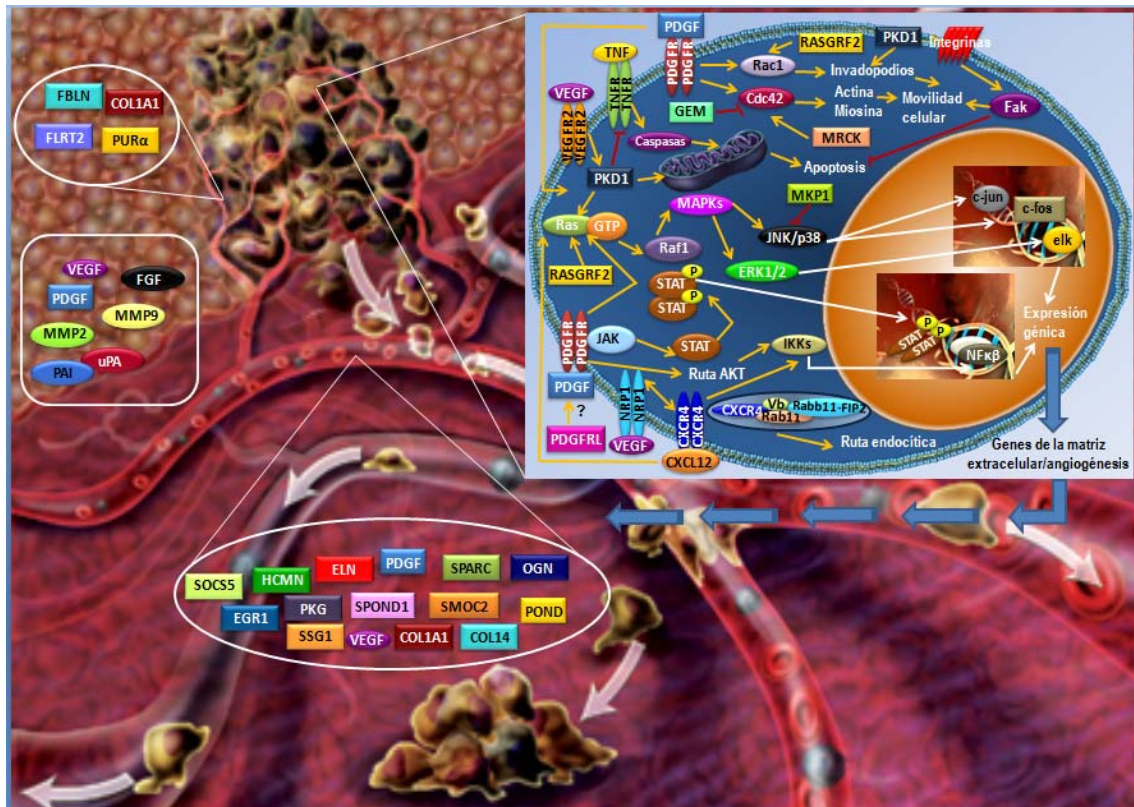


Figura 50. Esquema de la localización y rutas celulares en las que intervienen genes relacionados con la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis, cuya expresión se haya negativamente modulada por la quimioterapia

La trascendencia clínica de estos resultados radica en que proporcionan un mejor conocimiento de la biología molecular de los tumores en respuesta a la quimioterapia, lo que haría posible el desarrollo de nuevas terapias dirigidas o la mejora de las existentes. Este tipo de aproximación al estudio de las vías de transducción de señales constituye el paso previo al desarrollo de nuevos fármacos clasificados dentro de lo que actualmente es conocido como terapia biológica, pues esta estrategia terapéutica consiste en la modulación de la actividad de moléculas cruciales en el desarrollo de la enfermedad oncológica, una de las más exitosas en el tratamiento del cáncer de mama tal y como indican las tasas de supervivencia derivadas del tratamiento con el anticuerpo monoclonal Trastuzumab. Nuestros resultados confirman la relevancia de factores de crecimiento pro-angiogénicos como nuevas dianas terapéuticas en el cáncer de mama, que han sido la base para el desarrollo de fármacos cuya efectividad está siendo evaluada en distintos tumores. Entre ellos destacan el anticuerpo monoclonal anti-VEGF, Bevacizumab, o las pequeñas moléculas inhibidoras de los dominios tirosín-quinasa de receptores como PDGFR, VEGFR c-kit y otros, como el malato de Sunitinib o el Sorafenib. Además, nuestros resultados añadirían a estas nuevas dianas terapéuticas un conjunto de moléculas relacionadas con PDGF y VEGF e implicadas en los procesos de remodelación de la

matriz extracelular, cuya inactivación podría mejorar la respuesta al tratamiento de las pacientes en combinación con la quimioterapia, pues la quiescencia estromal inducida por el bloqueo de estas moléculas aislaría el tumor e impediría su dispersión permitiendo un mejor control de la enfermedad. Esta intervención junto con el desarrollo de terapias que reduzcan el estrés oxidativo, inherente al tumor e inducido por la quimioterapia, por debajo del umbral que estimula la inestabilidad genómica de las células tumorales y la activación de señales de crecimiento, mejorarían el resultado clínico y limitarían la toxicidad asociada al mismo.

### El estrés oxidativo secundario a la quimioterapia podría favorecer la activación de las rutas moleculares de células madre tumorales y la resistencia a fármacos

La importancia de la correlación entre el cáncer y el desarrollo embrionario radica en que las neoplasias son el resultado de la ruptura de las reglas fundamentales que establecen cómo se disponen las células en los tejidos, los tejidos en los órganos y los órganos en el organismo. Desde este punto de vista, el cáncer podría ser definido como una alteración del desarrollo (Ingber, 2008). Tal correlación es especialmente interesante en el caso del cáncer de mama, ya que las células epiteliales del tejido mamario no alcanzan su máximo grado de diferenciación hasta la lactancia (Russo y cols., 2005). De hecho el desarrollo embrionario de la glándula mamaria se detiene hasta la pubertad, donde el incremento de hormonas esteroideas estimula el crecimiento ductal. Posteriormente, durante la gestación, la mama sufre una serie de cambios estructurales inducidos hormonalmente, que dan lugar a células luminales secretoras que expresan el máximo grado de diferenciación. Tras la lactancia, el epitelio mamario involucre y adquiere una estructura similar al de las glándulas de mujeres nulíparas. La consecución de ciclos proliferativos, de diferenciación e involución en cada embarazo, sustenta la idea de que estos cambios en el desarrollo son mediados por células madre adultas (*Stem cells*) presentes en el epitelio de la mama, cuya misión es el mantenimiento del tejido de acuerdo con los requerimientos fisiológicos en cada momento. La teoría de las células madre tumorales o células madre del cáncer, sostiene que los tumores alojan un pequeño número de células de fenotipo indiferenciado que inician la carcinogénesis. Estas células corresponden con células madre adultas o células progenitoras tempranas, que sufren mutaciones y dan lugar a células transformadas con mayor facilidad, dado su escaso grado de diferenciación y elevado potencial mitogénico. Esta teoría plantea profundos dilemas en cuanto a la efectividad del esquema actual del tratamiento del cáncer de mama, pues los quimioterápicos empleados no eliminan la

progenie derivada de las células madre tumorales, resultando en una recidiva más o menos cercana en el tiempo, tal y como se observa en la práctica clínica actual (Molyneux y cols., 2007). El desarrollo de técnicas de aislamiento celular altamente eficientes, ha permitido el estudio y la caracterización de las células madre del tejido mamario. Las células madre adultas del tejido mamario expresan los marcadores CD29<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> o CD49F<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> y son capaces de reconstruir una mama funcional por sí mismas, sin embargo las células madre tumorales expresan específicamente receptores de superficie CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> y son capaces de dar lugar a una lesión tumoral cuando son transplantadas en el tejido mamario (Kakarala y Wicha, 2008). Durante el desarrollo mamario normal, las células madre dan lugar a los distintos tipos celulares presentes en la mama: epiteliales, mioepiteliales y luminales. La teoría de las células madre del cáncer asume que éstas generan subtipos celulares con un grado de diferenciación incompleto, que en cierto modo se correlaciona con los subtipos moleculares de cáncer de mama descritos por Sorlie y colaboradores. Las células de tumores tipo basal expresan un fenotipo muy similar al de las células madre (CD44<sup>+</sup> y citoqueratinas 5/6), por tanto presentarían el fenotipo más indiferenciado. Se sabe que este tipo de tumores son clínicamente muy agresivos y dan lugar a recidivas y metástasis con alta frecuencia (Charafe-Jauffret y cols., 2008). El creciente interés por las células madre tumorales, ha motivado el estudio de las ruta moleculares implicadas en cascadas de señalización oncogénicas en este tipo de células. Los resultados de diferentes estudios muestran que las rutas moleculares mediadas por Wnt (*wingless type*), Notch y Hedgehog, son las predominantemente activadas en las células madre tumorales (Kakarala y Wicha, 2008; Molyneux y cols., 2007; Mimeault y cols., 2007).

Nuestros resultados muestran que la quimioterapia reprime la expresión de genes relacionados con algunas de estas rutas moleculares. Concretamente, la expresión de SFRP4 (*secreted frizzled related protein 4*) se haya negativamente modulada por la quimioterapia. SFRP4 participa la regulación de la ruta de Wnt. La ruta de señalización molecular mediada por Wnt modula la proliferación, la morfogénesis, la migración celular y la apoptosis. Consiste en una familia de 20 glicoproteínas secretadas ricas en cisteína, que se distribuyen en la ruta de señalización Wnt canónica, mediada por la  $\beta$ -catenina, y no canónica, independiente de  $\beta$ -catenina. Las proteínas Wnt se unen a receptores transmembrana tipo Fz (*frizzled*) y activan la expresión de genes como los de la ciclina D1 y c-myc, la actividad de la telomerasa e inhiben las rutas pro-apoptóticas de p53 y p16/RB, favoreciendo el crecimiento y la supervivencia celular. Además se ha observado el aumento de la población de células madre en tejidos mamaros tras

la activación de Wnt (Collu y Brennan, 2007). Sin embargo, la represión de la expresión de algunos miembros de la familia de proteínas Wnt, como Wnt5a, se ha correlacionado con un aumento de la motilidad celular y una menor supervivencia libre de enfermedad en el cáncer de mama. Por ello, la influencia de las proteínas Wnt sobre la carcinogénesis y la evolución de la enfermedad neoplásica debe ser dependiente del tipo de proteína Wnt activada y su interacción con los moduladores funcionales de las proteínas Wnt en el medio extracelular. Las SFRPs presentan homología con los receptores Fz y modulan la ruta molecular mediada por Wnt según una cinética bifásica (Turashvili y cols., 2006). De este modo, una baja concentración de SFRPs activa la proteína Wnt con la que interacciona, pero conforme la concentración de SFRPs aumenta se observan efectos inhibitorios sobre la ruta de Wnt. Algunos investigadores sugieren que este efecto dual es producto de la unión de SFRPs a distintos dominios de Wnt, de tal forma que si SFRP se une al dominio amino-terminal rico en cisteína, la proteína Wnt queda inhibida. De hecho se ha observado que algunas SFRPs activan la ruta molecular de Wnt en líneas celulares de cáncer de mama (Polakis, 2000). La regulación negativa de la expresión del gen SFRP4 por efecto de la quimioterapia, podría favorecer la limitación en la concentración de la proteína que codifica, hasta el nivel adecuado para la activación de esta ruta molecular en las células madre tumorales. Por otra parte, SFRP4 es uno de los genes de la red molecular de PDGFRL descrita por Xu y colaboradores. Además la ruta molecular de Wnt parece estar regulada por otras proteínas ricas en cisteína descritas en el trabajo de Xu y colaboradores y presentes en nuestra lista de genes modulados por la quimioterapia. Tales genes corresponden con CYR61 (*cysteine-rich angiogenic inducer 61*) y el gen NOV (*nephroblastoma overexpressed*). Ambos pertenecen a la familia CNN de reguladores angiogénicos y factores de crecimiento.

CYR61 o CNN1 está involucrado en la proliferación, supervivencia celular, la activación de la angiogénesis mediada por VEGF y resistencia al tratamiento con taxanos en el cáncer de mama mediante su unión a integrinas  $\alpha\beta 3$  (Tsai y cols., 2002), proceso mediante el cual también activa la vía canónica de Wnt (Turashvili y cols., 2006; Leu y cols., 2002; Menendez y cols., 2005). Como integrante de la misma familia de proteínas, NOV lleva a cabo funciones similares mediante un mecanismo molecular parecido, pues la señal iniciada por NOV implica también la activación de integrinas. NOV favorece la supervivencia, la adhesión a la matriz extracelular y la motilidad celular pues ejerce un efecto quimioatrayente sobre las células endoteliales, por tanto es un potente factor pro-angiogénico (Lin y cols., 2003; Lin y cols., 2005).

En relación a la red molecular descrita por Xu y colaboradores, encontramos entre nuestros resultados una última coincidencia: el gen que codifica la proteína GAS1 (*growth arrest specific 1*). GAS1 fue inicialmente identificada como una proteína anclada a la membrana plasmática con capacidad de detener la progresión del ciclo celular en experimentos *in vitro*. Posteriores trabajos demostraron que GAS1 es un potente activador de la ruta molecular mediada por el factor HH (*Hedgehog*), una proteína esencial en el desarrollo embrionario, que ha sido relacionada con el desarrollo del cáncer de mama y su progresión (Martinelli y Fan, 2007; Hatsell y Frost, 2007). El patrón de activación de HH mediado por GAS1 recuerda a la regulación de la vía Wnt llevada a cabo por SFRP4, pues GAS1 ejerce su máxima influencia inductora sobre HH a bajas concentraciones, de hecho el propio HH regula negativamente la expresión de GAS1 con el objetivo de amplificar la señal molecular que emite (Martinelli y Fan, 2007). De este modo la represión de la expresión de GAS1 a causa del tratamiento con quimioterapia, lejos de inactivar la cascada de señalización iniciada por HH, podría estimularla. Por otra parte, se ha observado que VEGF y VE-cadherina estimulan la expresión de GAS1 para evitar la apoptosis de células endoteliales mediante la ruta molecular mediada por PI3K. Otro gen de la familia GAS, GAS6, lleva a cabo la misma función que GAS1 activando también la ruta molecular de PI3K. La actividad antiapoptótica de GAS6 parece mediada por la inhibición de factores de transcripción *forkhead* y factores pro-apoptóticos como p27(kip1) (Ganopolsky y cols., 2008). El solapamiento de las dos rutas moleculares en las que están involucradas los genes GAS, indicaría un mecanismo de acción y actividad biológica redundantes.

Estudios recientes, muestran un aumento en la proporción de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> en tras el tratamiento con quimioterapia en secuencia neoadyuvante en pacientes con cáncer de mama. La represión de la expresión de SFRP4 y GAS1 por efecto del tratamiento con quimioterapia, podría ser uno de los mecanismos moleculares por los que los citostáticos activan la proliferación de las células madre tumorales y una de las causas que explicarían la ausencia de correlación entre la regresión tumoral y la supervivencia (Kakarala y Wicha, 2008). Además de las rutas moleculares mediadas por Wnt, HH y Notch, un reciente trabajo resalta la importancia de cascadas de señalización molecular, como la iniciada por PDGF, EGF o los transportadores de multirresistencia a drogas ABC, en la inducción del crecimiento, supervivencia y migración de las células madre tumorales. La activación de estos receptores de membrana estimularía la interacción entre los elementos de estas rutas moleculares induciendo la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo de la matriz extracelular, factores de crecimiento angiogénicos,

ciclinas, citoquinas, inhibidores de la apoptosis y toda una serie de moléculas implicadas en la estimulación de la carcinogénesis y la metástasis tumoral (Mimeault y cols., 2007). Puesto que el diseño de nuestro estudio compara muestras tumorales pareadas pertenecientes a la misma paciente, es muy posible que no observemos diferencias de expresión en estos genes tras el tratamiento, sencillamente porque la activación del programa transcripcional de las células madre tumorales haya sido iniciado con anterioridad al diagnóstico. Sin embargo la represión de la expresión tras la quimioterapia de genes situados aguas abajo de las cascadas de señalización, presumiblemente iniciadas por las células madre tumorales, indicaría en primer lugar la participación de estas células indiferenciadas en la carcinogénesis y progresión tumoral y en segundo lugar, sugeriría la limitada eficacia del tratamiento con adriamicina y taxanos para eliminar estas células, especialmente si tenemos en cuenta que muchos de los genes descritos en este trabajo son expresados por tipos celulares característicos del estroma tumoral, posiblemente tras la inducción de las células madre tumorales. Este efecto sería tanto más pronunciado cuanto más indiferenciado sea el fenotipo de la célula madre que origina el tumor, tal y como se observa en el caso de los carcinomas tipo basal, conocidos por su potencial metastásico y frecuentes recidivas tras el tratamiento con quimioterapia.

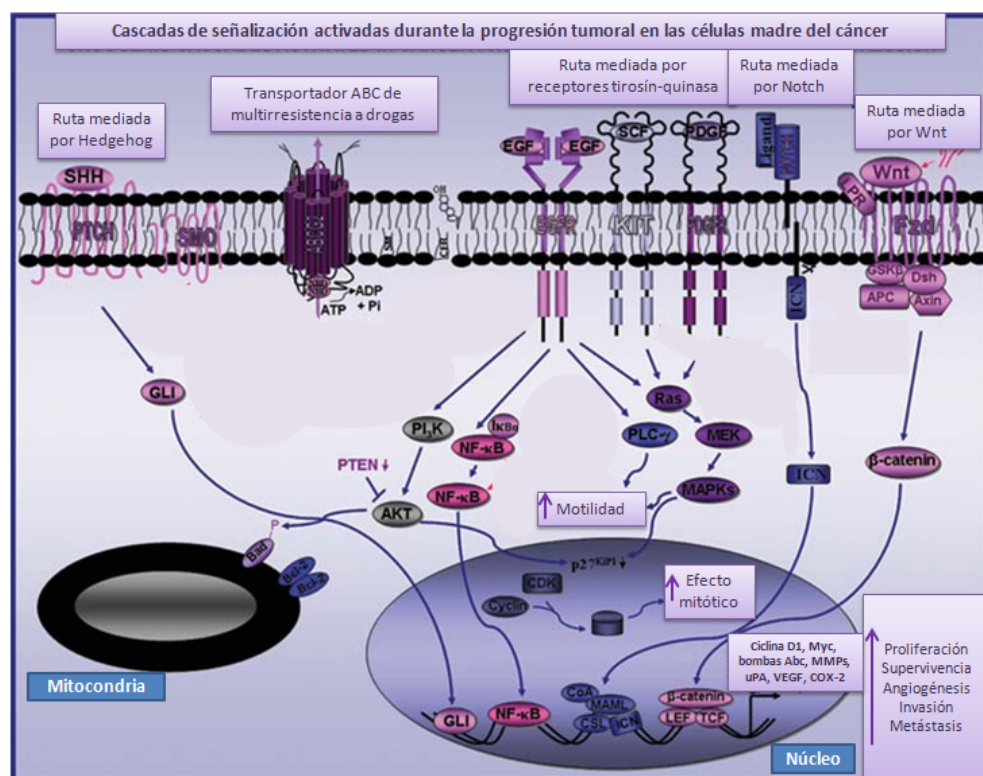


Figura 51. Esquema de las cascadas de señalización oncogénica implicadas en el crecimiento, supervivencia, invasión y resistencia a fármacos de las células madre tumorales.

En esta misma línea encontramos la represión del gen que codifica Smad8B, una proteína relacionada con la ruta molecular mediada por TGF- $\beta$ . Ésta es una de las rutas clásicamente implicadas en el desarrollo embrionario, la oncogénesis y la progresión tumoral. La familia de citoquinas TGF- $\beta$ , se compone de dos subfamilias: la subfamilia TGF- $\beta$ /activina/nodal y la subfamilia de la BMP/GDF/MIS (*bone morphogenic protein /growth and differentiation factor /mullerian inhibitor substance*). Por otra parte, existen tres tipos de proteínas Smad: Smad reguladas por receptores (R-Smad), Smad co-mediador (co-Smad) y Smad inhibidoras (I-Smad). Las proteínas Smad son fosforiladas por receptores serina/treonina quinasa tipo I tras la unión de citoquinas TGF- $\beta$ . Una vez activadas las proteínas Smad interactúan con co-Smad (Smad4) y formando dímeros que se translocan al núcleo celular y regulan la transcripción génica. Smad2 y Smad3 responden a la señal iniciada por la subfamilia TGF- $\beta$ /activina/nodal, mientras Smad1, Smad5 y Smad8 responden a la subfamilia BMP/GDF/MIS (Shi y Massagué, 2003). Smad8B o Smad9 es una variante de Smad8 obtenida por *splicing* alternativo, que parece tener un efecto inhibitorio específico sobre la actividad de Smad8 (Nishita y cols., 1999). La pérdida de expresión de Smad8 en una significativa proporción de los tumores mamarios (hasta el 31%), sugiere la actividad supresora de tumores llevada a cabo por esta proteína (Chang y cols., 2004) y por tanto, la actividad promotora del cáncer de Smad8B. Aún así, dada la dualidad funcional de TGF- $\beta$  en el cáncer, sería necesario analizar qué tipo celular en las muestras de nuestro estudio reprime el gen que codifica Smad8B, ya que la expresión de TGF- $\beta$  y las proteínas Smad está relacionada con la inhibición del crecimiento en células tumorales, pero su regulación al alza en células estromales se haya relacionada con la activación de la invasión y la angiogénesis. Una vez más, la interrelación entre células tumorales y células del estroma tumoral determina el tipo de respuesta a una estimulación génica concreta.

Smad8B es uno de los genes descritos en este estudio que indican la interrelación entre las células transformadas y las células del estroma peritumoral. Un reciente trabajo de revisión recoge los datos publicados acerca de esta relación, señalando la influencia del microambiente tumoral sobre el comportamiento de las células madre del cáncer (Mimeault y cols., 2007). Entre las proteínas estromales que influyen, por un mecanismo autocrino o paracrino, la invasión tumoral y la metástasis destacan las MMPs, uPA/PAI, CXCR4 o VEGF. Estos factores contribuyen a la movilización de células inmaduras derivadas de la médula ósea que son atraídas hacia las inmediaciones de las lesiones tumorales primarias o secundarias. Tal tipo celular corresponde con células endoteliales progenitoras que son específicamente reclutadas



para participar en la angiogénesis y pueden ser caracterizadas por la expresión de marcadores como VEGFR-2/KDR o CXCR4. Entre nuestros resultados, observamos que la quimioterapia reprime la expresión de genes relacionados con la regulación de la actividad biológica de VEGFR-2/KDR y CXCR4, como SPOND1, STEAP ó COL1A1, pero además observamos la represión de un gen que conecta la proliferación de CMLs y células endoteliales de los vasos sanguíneos con el desarrollo del sistema vascular. El gen que codifica la proteína PRDM6 (*PR domain containing 6*) se ha relacionado con el mantenimiento del fenotipo proliferativo e indiferenciado de CMLs de vasos sanguíneos en formación (Davis y cols., 2006). De hecho, un reciente estudio demuestra que PRDM6 modula *in vivo* el crecimiento y la apoptosis de líneas celulares progenitoras de células vasculares, potenciando la formación de CMLs sobre la génesis de células epiteliales (Wu y cols., 2008). La represión de este gen, como la de la mayoría de los genes diferencialmente expresados en nuestras muestras, refuerza la hipótesis de que la quimioterapia incide principalmente sobre células cuyo programa transcripcional se haya modulado por la influencia paracrina de las células madre tumorales.

Dada la recurrente correlación de PDGF con los genes expresados diferencialmente por efecto de la quimioterapia, no es sorprendente que esta familia de factores de crecimiento angiogénicos y sus receptores se halle relacionada con la biología de las células madre tumorales. De hecho, en nuestros resultados observamos la represión de la expresión de PDGFD y su relación con otro importante mediador de las cascadas de señalización propias de las células madre tumorales, los receptores tipo Notch. Considerando que una gran parte de los genes descritos en este trabajo están relacionados con procesos estimuladores de la angiogénesis, el aumento de la concentración de radicales libres favorecería la señal pro-angiogénica y contribuiría al mantenimiento del fenotipo transformado, induciendo nuevas mutaciones génicas en las células madre del cáncer alojadas en el tumor primario o diseminadas a través del torrente sanguíneo.

Un reciente trabajo publicado por Heffron y colaboradores, muestra que la capacidad oncogénica de las células madre tumorales está regulada por la expresión de genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo y la angiogénesis (Heffron y cols., 2007). Estas conclusiones fueron extraídas tras el análisis comparativo de la expresión de células madre embrionarias de testículo y células madre transformadas procedentes de un teratocarcinoma, que es un tumor frecuente en los testículos compuesto de células madre indiferenciadas y tejido



adulto. Los resultados de este estudio sugieren que las células madre transformadas activan la expresión de genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo y la angiogénesis y muestran que éstas, pueden ser diferenciadas de células madre sanas en función de la activación de un programa transcripcional que promueve la expresión de moléculas relacionadas con la matriz extracelular, factores de transcripción y factores de crecimiento angiogénicos. La correlación entre moléculas que regulan el metabolismo de la matriz extracelular, la angiogénesis, el estrés oxidativo y las células madre establece la misma conexión entre este tipo celular indiferenciado y los genes diferencialmente expresados en respuesta a la quimioterapia en nuestro estudio, lo que lleva a pensar que el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas específicamente a bloquear la actividad de las células madre del cáncer, junto con terapias encaminadas a inhibir los cambios en la matriz extracelular y la angiogénesis operados por algunos de los genes obtenidos como resultado en este trabajo, incidiría en primer lugar sobre el origen de la neoplasia y en segundo lugar, sobre los mecanismos derivados de la influencia de las células madre transformadas sobre otros tipos celulares, responsables del desarrollo y dispersión tumoral. Esta doble aproximación al tratamiento del tumor permitiría reducir el riesgo de recidivas, al bloquear el tipo celular con capacidad para originar una lesión tumoral y prevendría las metástasis y supervivencia tumoral al inhibir los mecanismos moleculares conducentes a tal proceso, mejorando el resultado clínico final de las pacientes.

El análisis funcional de los genes descritos, sugiere una correlación entre los mecanismos moleculares de respuesta a la quimioterapia en el cáncer de mama y los procesos que dirigen el desarrollo del sistema nervioso. Esta relación está reforzada por la presencia de algunos genes implicados en la progresión de tumores del sistema nervioso, establecimiento de conexiones interneuronales y supervivencia neuronal.

Entre ellos encontramos el gen GALNT13 (*UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13*) que codifica una glicosil-transferasa implicada en la O-glicosilación de mucinas cuya sobre-expresión de haya asociada a la progresión de tumores del sistema nervioso como el neuroblastoma. Una de las principales dianas de las células metastásicas del neuroblastoma es la médula ósea, desde donde alcanzan otros órganos optimizando el proceso de diseminación tumoral. Los niveles de expresión de GALNT13 en muestras de médula ósea de pacientes diagnosticados de neuroblastoma comparados con los detectados en muestras de pacientes sanos, revelaron la importancia de este gen en el proceso

metastásico y su potencial utilidad como marcador para detectar micrometástasis de forma previa a las manifestaciones clínicas de la progresión tumoral (Beroi y cols., 2007). La detección de células tumorales en muestras de sangre periférica o de médula ósea, mediante el empleo de marcadores moleculares propios de células transformadas, es un procedimiento para la detección precoz de la diseminación tumoral. Dicho proceso se conoce como detección de la enfermedad mínima residual y su utilidad clínica está siendo investigada con gran interés en los últimos años. Esta aproximación también ha sido aplicada al estudio del cáncer de mama, para lo que se ha empleado en análisis de citoqueratinas propias de células epiteliales (Benoy y cols., 2006). La represión mediada por la quimioterapia de este gen en nuestras muestras, sugiere su implicación en la respuesta al tratamiento y la progresión del cáncer de mama y señala su utilidad como posible marcador para la detección de enfermedad mínima residual en este grupo de pacientes.

La proteína NDFIP1 (*nedd 4 family interacting protein 1*) posee tres dominios transmembrana y se localiza en el aparato de golgi y en vesículas derivadas del aparato de golgi. Nedd 4 pertenece a la familia E3-ubiquitin-proteín ligasas implicadas en el control del reciclaje proteico y el tráfico de proteínas. Diversos estudios sugieren que NDFIP1 actúa como adaptador de Nedd 4 favoreciendo la unión con sus ligandos. La actividad de NDFIP1 no se limita a las ligasas Nedd 4, sino que NDFIP1 parece interactuar con otras E3-ligasas de la misma familia, como Itch. Recientes estudios muestran resultados dispares acerca del resultado de tal interacción, pues mientras unos muestran que la interacción de NDFIP1 con Itch promueve la actividad de ésta última (Oliver y cols., 2006), otros muestran que la inhibe (Oberst y cols., 2007). Teniendo en cuenta que Itch media la proteólisis de mediadores de la apoptosis como p73 $\alpha$  y c-Jun, un aumento de la actividad de esta ligasa podría potenciar la resistencia a citostáticos inductores de apoptosis. Aunque los resultados derivados de estos estudios son contradictorios, parece que NDFIP1 y Nedd 4 poseen una función agonista que posibilita la supervivencia de neuronas tras un traumatismo cerebral (Putz y cols., 2008), lo que sugiere la actividad antiapoptótica de la interacción entre NDFIP1 y las E3-ubiquitin-proteín ligasas.

El gen MB20 codifica una proteína de alta homología con la proteína MB20. Esta proteína participa en el desarrollo embrionario del encéfalo modulando la disponibilidad de histonas durante la replicación del del ADN neuronal (Shen y cols., 2001). La expresión de los genes de la protocadherina 7 y la contactina 1 es estimulada en durante el desarrollo del tejido nervioso,

especialmente durante el establecimiento de las redes nerviosas. Las protocadherinas son una familia de proteínas de adhesión frecuentes en células del sistema nervioso central. Las protocadherinas poseen dominios de unión al calcio que al ser activados estimulan sus propiedades adhesivas. Hasta ahora no se ha descrito ninguna relación entre el cáncer de mama y la PCDH7 (protocadherina 7). La represión de la expresión de este gen tras la quimioterapia sugiere que podría estar relacionada con la remodelación de la matriz celular durante la invasión celular, ya que parece modular las propiedades adhesivas de los fibroblastos en otros tejidos (Morishita y Yagi, 2007). Es necesario el estudio de la expresión de este gen y la función de la proteína que codifica en el tejido tumoral mamario, para establecer la influencia de la represión del gen de la PCDH7 en el tratamiento con quimioterapia del cáncer de mama. Por otra parte, la contactina 1 es una proteína de adhesión que participa en el establecimiento de conexiones interneuronales durante el desarrollo del sistema nervioso (Berglund y Ranscht, 1994). Un reciente estudio, llevado a cabo con tejido tumoral de diverso origen, entre ellos carcinomas mamaros, muestra que la angiogénesis mediada por VEGF-C y su receptor VEGFR-3 o flt-4 requiere la sobre-expresión del gen de la contactina-1. La sobre-expresión de VEGF-C y VEGFR-3 ha sido positivamente correlacionada con una menor supervivencia en pacientes de cáncer por su efecto estimulador de la invasión y la angiogénesis. El eje VEGF-C/VEGFR-3 modula la capacidad invasiva de los tumores mediante la activación de la expresión de la contactina-1 a través de la ruta de señalización molecular Src-p38-C/EBP (Su y cols., 2006).

La expresión de este grupo de genes y su relación con la angiogénesis en el cáncer de mama y el desarrollo embrionario del sistema nervioso, ejemplifica la conexión existente entre estos procesos. Dicha relación encuentra su origen en las primeras etapas del desarrollo embrionario humano, ya que las glándulas mamarias y las células que conformaran el sistema nervioso central y periférico derivan de la misma capa germinal, el ectodermo. En ambos casos el ectodermo sufre cambios en respuesta a la influencia inductora del mesénquima subyacente (Moore y Persaud, 1999). Por tanto, es posible establecer un paralelismo funcional entre la interacción ectodermo/mesodermo durante el desarrollo embrionario y la interacción epitelio/estroma durante la oncogénesis y la progresión tumoral. La hipótesis de las células madre tumorales como origen del cáncer, da sentido a la expresión de genes relacionados con el desarrollo del sistema nervioso en el cáncer de mama, pues la presencia de células cuyo perfil transcripcional recuerda el programado durante el desarrollo embrionario, es compatible con la expresión de un fenotipo indiferenciado

## Futuras líneas de investigación y perspectivas en el tratamiento del cáncer de mama

El análisis de marcadores de estrés oxidativo en los tres grupos experimentales incluidos en este estudio, sugiere que la cirugía da lugar a un pico en la producción de radicales libres frente al que el organismo reacciona movilizándolo las defensas antioxidantes, hasta llegar a un nivel en el que nuevas fuentes de radicales libres no modifican el nivel de estrés oxidativo alcanzado. Para corroborar este resultado y establecer la influencia de las modificaciones en el balance oxidativo sobre el resultado terapéutico de las pacientes con cáncer de mama, sería necesario analizar el estado de los marcadores de daño oxidativo y las defensas antioxidantes en muestras de sangre extraídas antes y después de la cirugía y la administración del tratamiento sistémico en pacientes neoadyuvantes y adyuvantes, con el fin de monitorizar los cambios inducidos por cada intervención clínica en el curso del tratamiento. Aunque son numerosos los estudios que muestran que la concentración de radicales libres es muy elevada en el tumor, el análisis de la expresión de marcadores relacionados con el estrés oxidativo en el tejido tumoral, corroboraría los datos obtenidos a nivel sistémico. Por otra parte, la correlación entre la tasa de recidivas y metástasis de las pacientes incluidas en el grupo de neoadyuvancia y el incremento del estrés oxidativo observado tras la quimioterapia, proporcionaría una estimación de la influencia del estrés oxidativo sobre la efectividad del tratamiento. Para evaluar estos parámetros serán necesarios al menos 2 años de seguimiento ampliable hasta 5 años tras el diagnóstico.

Los avances tecnológicos de los últimos años, han permitido el análisis y la comparación del perfil transcripcional de células correspondientes a distintas condiciones. Esta aproximación fue la empleada en el diseño de nuestro estudio, para identificar aquellos genes cuya expresión se halla modulada por el tratamiento con citostáticos y evaluar el impacto del estrés oxidativo sobre la actividad de las proteínas que codifican, durante el tratamiento del cáncer de mama. Los resultados de este estudio muestran que la quimioterapia reprime la expresión de un grupo de genes cuya función biológica se halla relacionada con procesos encaminados a favorecer la migración de las células tumorales. Sin embargo en nuestra lista de resultados, también encontramos un número reducido de genes, en algunos casos de reciente caracterización, cuya función biológica no ha sido relacionada con el cáncer de mama ni la respuesta a quimioterápicos. Entre estos genes se encuentra el que codifica el factor de transcripción Wig-1 (Varmeh-Ziaie y cols., 2001), identificado recientemente y de función desconocida, el gen BCSC-

1, cuya capacidad supresora de tumores está en estudio (Martin y cols., 2003) o el gen SPATA18 (spermatogenesis associated 18 homolog), cuya delección ha sido relacionada con la distrofia muscular hereditaria (Kaindl y cols., 2005). La significativa represión de la expresión de estos genes tras la quimioterapia, abre una nueva línea de estudio sobre la función de las proteínas que codifican en la respuesta al tratamiento del cáncer de mama. Por otra parte, aunque el programa David clasifica funcionalmente el gen de la proteína CILP2 (*cartilage intermediate layer protein 2*) dentro del grupo de genes relacionados con el metabolismo de la matriz celular, su expresión aún no se ha relacionado con el cáncer de mama, de hecho tan sólo se ha descrito en relación a este gen, un polimorfismo asociado al metabolismo de la LDL y la concentración de triglicéridos en plasma (Kathiresan y cols., 2008). La significativa represión de la expresión del gen que codifica CILP2 tras la quimioterapia, podría establecer nuevas correlaciones funcionales entre el tratamiento del cáncer de mama y el metabolismo lipídico, cuya influencia en el desarrollo de una neoplasia mamaria está documentada (ver apartado 1.2.9 de esta Tesis).

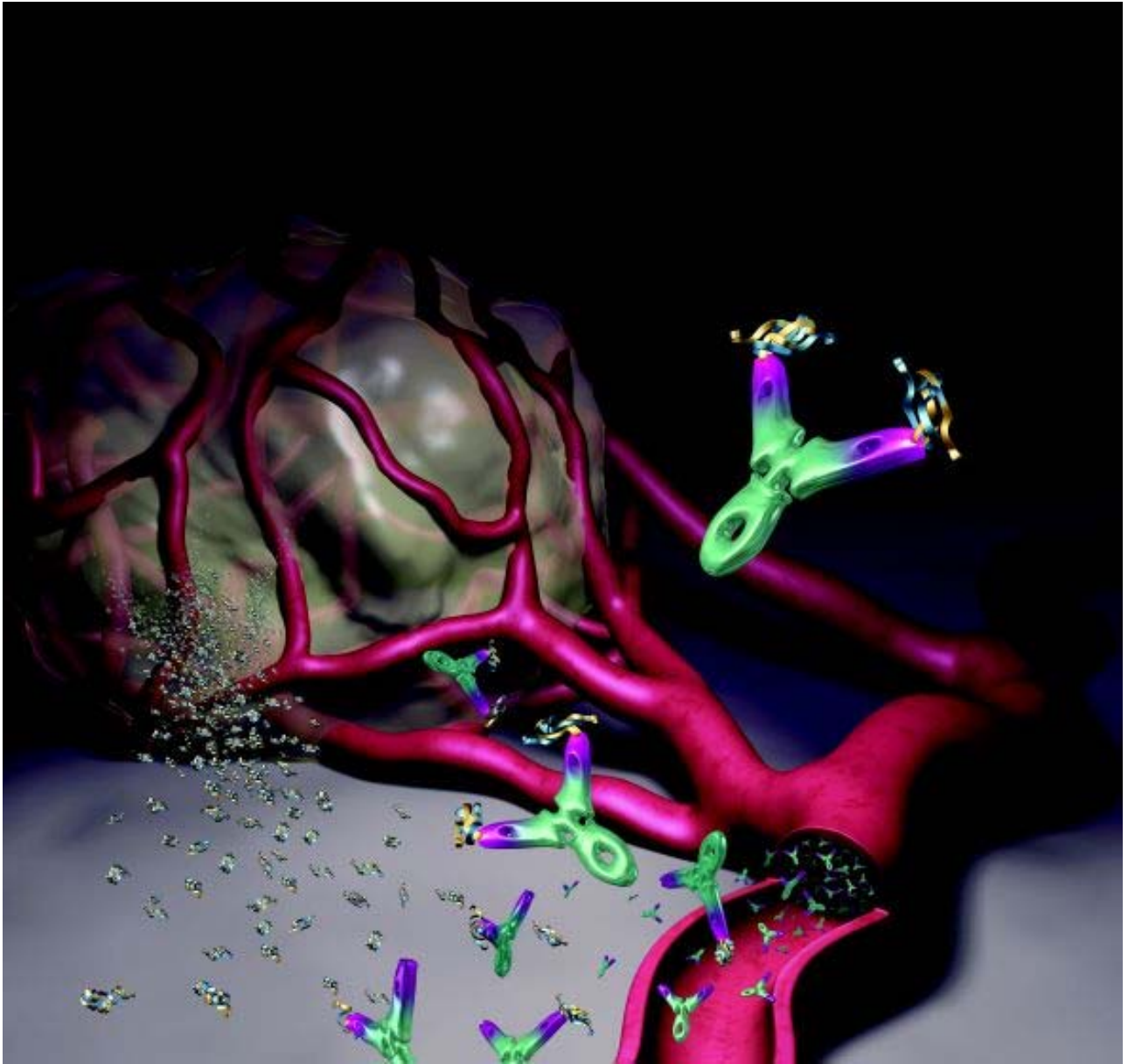
En cualquier caso, éste como todos los estudios realizados empleando la tecnología de microarrays, requiere ser validado mediante el empleo de una técnica alternativa como la RT-PCR. Tras la confirmación de los datos de expresión, lo indicado sería abordar el estudio proteómico de las muestras tumorales. Dado que el test estadístico empleado en la selección de genes diferencialmente expresados por efecto de la quimioterapia, es altamente restrictivo, sospechamos que la mayoría de los genes descritos en este trabajo serán validados mediante la aplicación de otras técnicas, ya estén orientadas al análisis transcriptómico o proteómico. Aun partiendo de esta premisa, la validación de los datos de expresión mediante RT-PCR es indispensable. Sin embargo, el estudio proteómico es más flexible y permite orientar el diseño del análisis hacia intereses concretos. De este modo, sería particularmente interesante evaluar la expresión de la familia de proteínas PDGF así como sus efectores en respuesta al tratamiento con quimioterapia y correlacionar el grado de activación de la ruta molecular iniciada por PDGF con el nivel de estrés oxidativo tumoral y sistémico. Por otra parte, la aplicación de técnicas de selección celular, como la microdissección con láser, permitiría la evaluación de la expresión de los genes descritos en este trabajo en tipos celulares concretos, facilitando el análisis de la interacción y los mecanismos de inducción de las células madre tumorales sobre las células del epitelio mamario y las células del estroma tumoral. Un estudio profundo de la expresión y función de este conjunto de genes permitiría desarrollar nuevos fármacos dirigidos hacia el control de la

---

enfermedad o mejorar la efectividad de fármacos en desarrollo, cuya actividad se centra en el bloqueo de factores de crecimiento pro-angiogénicos, aportando una visión más amplia al proceso molecular que desemboca en la dispersión tumoral y la metástasis, mejorando nuestra comprensión de dichos procesos y consecuentemente permitiendo el desarrollo de estrategias terapéuticas más eficaces y menos tóxicas.

Los recientes avances en el estudio de las células madre tumorales, permiten el aislamiento y estudio de sus propiedades biológicas. Las células madre tumorales son genéticamente distintas a las células madre normales implicadas en el mantenimiento de la glándula mamaria. Tales diferencias genéticas deben ser estudiadas como potenciales dianas terapéuticas, especialmente en el caso de los tumores del tipo basal, cuyas características moleculares son similares a las de las células madre tumorales. Nuestro estudio pone de manifiesto que la quimioterapia modula la expresión de dos genes relacionados con la activación de las rutas moleculares iniciadas por Wnt y HH, ejerciendo posiblemente un efecto agonista sobre la transducción de señales que favorece la inducción de la expresión de gran parte de los genes descritos en este trabajo. El desarrollo de fármacos capaces de bloquear la actividad de SFRP4 o las proteínas GAS, así como otras proteínas implicadas en las cascadas de señalización selectivamente activadas en las células madre tumorales, suponen una prometedora alternativa terapéutica, sobre todo en el caso de carcinomas mamarios altamente indiferenciados y clínicamente agresivos. Tal y como ha sido comentado en apartados anteriores de la discusión de esta Tesis, el desarrollo de este tipo de estrategia terapéutica junto con el de fármacos capaces de inhibir la actividad de moléculas relacionadas con el metabolismo de la matriz extracelular y la angiogénesis, incidiría sobre los dos procesos fundamentales implicados en la evolución de la enfermedad tras el tratamiento: el desarrollo de nuevas lesiones mamarias y la migración celular y metástasis. Junto con todo ello, la evaluación y el desarrollo de estrategias de control del estrés oxidativo, contribuiría a aumentar la efectividad del tratamiento y minimizar los efectos tóxicos del mismo. Por tanto, el estudio de la actividad de las proteínas codificadas por los genes obtenidos como resultado en este trabajo, abren una nueva línea de investigación de gran interés en el tratamiento del cáncer de mama, que permitiría desarrollar nuevos fármacos antineoplásicos o mejorar los existentes.





**CONCLUSIONES**





## CONCLUSIONES

1. El análisis de los marcadores de estrés oxidativo mostró que el tratamiento del cáncer de mama induce la concentración de radicales libres, hasta alcanzar un nivel de daño en la célula que activa las defensas antioxidantes y las enzimas reparadoras del ADN. La activación de estos sistemas de defensa y reparación, mantuvo elevados niveles de estrés oxidativo que no fueron modificados a lo largo de sucesivas intervenciones clínicas.
2. El análisis del perfil transcripcional de muestras de cáncer de mama previas y posteriores al tratamiento con antraciclinas y taxanos, mostró la represión de la expresión de un grupo de genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo, la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis. La activación de estos procesos es de crucial importancia en la progresión de la enfermedad neoplásica y por ello, la quimioterapia inhibe la transcripción de genes que codifican proteínas implicadas en las cascadas de señalización conducentes a la metástasis, sin embargo, el estudio funcional de estos genes reveló que su actividad se halla positivamente modulada por el estrés oxidativo.
3. La caracterización funcional de los genes identificados en el análisis genómico, mostró que las proteínas pertenecientes a la superfamilia del factor de crecimiento pro-angiogénico PDGF, desempeñan un papel central en la regulación de la actividad de los genes cuya expresión es negativamente modulada por la quimioterapia. La relación entre el aumento en la concentración de radicales libres y la inducción de la expresión y actividad de este y otros factores de crecimiento frecuentemente correlacionado con los genes de nuestra lista de resultados, como VEGF, confirmó la conocida conexión entre el estrés oxidativo, la angiogénesis y la remodelación de la matriz extracelular.
4. La quimioterapia promueve la destrucción de células epiteliales, estromales y vasculares cuyo programa transcripcional se halla inducido por las células madre tumorales, ya que incide sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la matriz extracelular y la angiogénesis. La ausencia en nuestra lista de resultados de genes característicos de las rutas moleculares de células madre tumorales, indicó que la quimioterapia no modifica la capacidad mitogénica ni la viabilidad de este tipo celular.

5. La implicación de las células madre tumorales en el origen y desarrollo de los carcinomas mamarios, fue corroborada por la presencia en nuestra lista de resultados de genes relacionados con la angiogénesis y el metabolismo de la matriz extracelular durante el desarrollo embrionario y la evolución de tumores del sistema nervioso. Esta relación corresponde a la expresión de un fenotipo indiferenciado, que rememora el programa transcripcional embrionario, muy similar entre células nerviosas y epiteliales ya que derivan de la misma capa germinal.



# **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- Aebi H. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology* 150: 121-127 (1984).
- Agencia de evaluación de Tecnologías Sanitarias. Ministerio de Sanidad y Consumo. Uso de la Mamografía y de la Citología de Papanicolaou para la Detección Precoz del Cáncer de Mama y de Cérvix Uterino en España. Informe de evaluación N°34 (2002).
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell*, 4rd Edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York (2002).
- Alonso A, Benavides MM, Blanco I, Brunet J, García-Foncillas J, Mayordomo JI, Perez P, Urioste M. *Cancer Hereditario*. Sociedad Española de Oncología Médica. Dispublic (2006).
- Anderson E. The role of oestrogens and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Research* 4:197-201 (2002).
- Andrecheck ER, Muller WJ. Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Tyrosine-mediated signal transduction in transgenic mouse models of human breast. *Breast Cancer Research* 2:211-216 (2000).
- Ayers M, Symmans WF, Stec J, Damokosh AI, Clark E, Hess K, Lecoche M, Metivier J, Booser D, Ibrahim N, Valero V, Royce M, Arun B, Whitman G, Ross J, Sneige N, Hortobagyi GN, Pusztai L. Gene Expression Profiles Predict Complete Pathologic Response to Neoadjuvant Paclitaxel and Fluorouracil, Doxorubicin, and Cyclophosphamide Chemotherapy in Breast Cancer. Ayers M., Symmans W.F., et al. *Journal of Clinical Oncology* 22(12):2284-2293 (2004).
- Bagowski CP, Stein-Gerlach M, Choidas A, Ullrich A. Cell-type specific phosphorylation of threonines T645 and T669 by PKD defines the signal capacity of EGF receptor. *The EMBO Journal* 18(20):5567-5576 (1999).
- Bahskarapillai B, Mathew A. Dietary Fat and Risk of Breast Cancer. *World Journal of Surgical Oncology* 3:45-52 (2005).
- Banerjee S, Sengupta K, Dhar K, Mehta S, D'Amore PA, Dhar G, Banerjee SK. Breast cancer cells secreted platelet-derived growth factor-induced motility of vascular smooth muscle cells is mediated through neuropilin-1. *Molecular Carcinogenesis* 45(11):871-880 (2006).
- Bardin A, Moll F, Margueron R, Delfour C, Chu ML, Maudelonde T, Cavailles V, Pujol P. Transcriptional and posttranscriptional regulation of fibulin-1 by estrogens leads to differential induction of messenger ribonucleic acid variants in ovarian and breast cancer cells. *Endocrinology* 146(2):760-768 (2005).
- Barrett T, Troup DB, Wilhite SE, Ledoux P, Rudnev D, Evangelista C, Kim IF, Soboleva A, Tomashevsky M, Edgar R. NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles--database and tools update. *Nucleic Acids Research* 35:D760-D765 (2006).
- Bartolomé A. *Manual de Diagnóstico y Laboratorio*. Aventis Pharma. AB Diagnóstika (2000).
- Battistini B, Picard S, Borgeat P, Sirois P. Measurements of prostanoids, leukotrienes, and isoprostanes by enzyme immunoassays. *Methods in Molecular Biology* 105:201-207 (1998).
- Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48:1-9 (1999).
- Bear HD, Anderson S, Smith RE, Geyer CE Jr, Mamounas EP, Fisher B, Brown AM, Robidoux A, Margolese R, Kahlenberg MS, Paik S, Soran A, Wickerham DL, Wolmark N. Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *Journal of Clinical Oncology* 24(13):2019-2027 (2006).
- Benoy IH., Elst H., et al. Real-time RT-PCR detection of disseminated tumour cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison with circulating tumour cells in patients with breast cancer. *British Journal of Cancer* 94:672-680 (2006).

- Berg WA, Gutierrez L, NessAiver MS, Carter WB, Bhargavan M, Lewis RS, Loffe OB. Diagnostic Accuracy of Mammography, Clinical Examination, US, and MR Imaging in Preoperative Assessment of Breast Cancer. *Radiology* 233:830-849 (2004).
- Berglund EO, Ranscht B. Molecular cloning and in situ localization of the human contactin gene (CNTN1) on chromosome 12q11-q12. *Genomics*. 21(3):571-582 (1994).
- Bergman M, Thompson LU, Dabrosin C. Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis, and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts in vivo. *Flaxseed and Its Lignans Clinical Cancer Research* 13(3):1061-1067 (2007).
- Bernard-Marty C, Mano M, Paesmans M, Accettura C, Munoz-Bermeo R, Richard T, Kleiber K, Cardoso F, Lobelle JP, Larsimont D, Piccart MJ, Di Leo A. Second malignancies following adjuvant chemotherapy: 6-year results from a Belgian randomized study comparing cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil (CMF) with an anthracycline-based regimen in adjuvant treatment of node-positive breast cancer patients. *Annals of Oncology* 14(5):693-698 (2003).
- Berois N, Blanc E, Ripoché H, Mergui X, Trajtenberg F, Cantais S, Barrois M, Dessen P, Kågedal B, Bénard J, Osinaga E, Raguénez G. ppGalNAc-T13: a new molecular marker of bone marrow involvement in neuroblastoma. *Clinical Chemistry* 52(9):1701-1712 (2006).
- Berrino F, De Angelis R, Sant M, Rosso S, Bielska-Lasota M, Coebergh JW, Santaquilani M; EUROCARE Working group. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EUROCARE-4 study. *Lancet Oncology* 8(9):773-783 (2007).
- Bhatti P, Sigurdson AJ, Thomas CB, Iwan A, Alexander BH, Kampa D, Bowen L, Doody MM, Jones IM. No evidence for differences in DNA damage assessed before and after a cancer diagnosis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 17(4):990-994 (2008).
- Biaglow JE, Miller RA. The Thioredoxin Reductase/Thioredoxin System. *Mutation Cancer Biology & Therapy* 4(1):6-13 (2005).
- Bièreche I, Tozlu S, Girault I, Lidereau R. Identification of a three-gene expression signature of poor-prognosis breast carcinoma. *Molecular Cancer* 3:37-47 (2004).
- Bieche I., Lerebours F., et al. Molecular Profiling of Inflammatory Breast Cancer: Identification of a Poor-prognosis Gene Expression Signature. *Clinical Cancer Research* 10: 6789-6795 (2004).
- Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Rykala J, Kolacinska A, Morawiec Z, Drzewoski J, Zdrozny M. Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutation Research* 4;554(1-2):139-148 (2004).
- Blue Cross and Blue Shield Association. Technology Evaluation Center. Gene Expression Profiling for Managing Breast Cancer Treatment. *Assessment Program* 20(5): 1-31 (2005).
- Bochkov VN, Mechtcheriakova D, Lucerna M, Huber J, Malli R, Graier WF, Hofer E, Binder BR, Leitinger N. Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/EGR-1 and Ca(++)/NFAT. *Blood* 99(1):199-206 (2002).
- Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Annals of Oncology* 16:481-488 (2005).
- Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nature genetics* 29:365-371 (2001).
- Brigelius-Flohe R. Glutathione peroxidises and redox-regulated transcription factors. *Biological Chemistry* 387:1329-1335 (2006).

- Briggs J, Chamboredon S, Castellazzi M, Kerry JA, Bos TJ. Transcriptional upregulation of SPARC, in response to c-Jun overexpression, contributes to increased motility and invasion of MCF7 breast cancer cells. *Oncogene* 21(46):7077-7091 (2002).
- Brown NS & Bicknell R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. *Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. Breast Cancer Res* 3:323-327 (2001)
- Browne RW, Armstrong D. Simultaneous determination of serum retinol, tocopherols, and carotenoids by HPLC. *Methods in Molecular Biology* 108:269-275 (1998).
- Brügger B, Erben G, Sandhoff R, Wieland FT, Lehmann WD. Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy Sciences USA* 94(6):2339-2344 (1997).
- Bryant HE, Brasher PMA. Risks and probabilities of breast cancer: short-term versus lifetime probabilities. *Canadian Medical Association Journal* 150(2):211-216 (1994).
- Buss IH, Winterbourn CC. Protein carbonyl measurement by ELISA. *Methods in Molecular Biology* 186:123-128 (2002).
- Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, d'Assignies MS, Bergh J, Lidereau R, Ellis P, Harris A, Bogaerts J, Therasse P, Floore A, Amakrane M, Piette F, Rutgers E, Sotiriou C, Cardoso F, Piccart MJ; TRANSBIG Consortium. Validation and Clinical Utility as a 70-Genes Prognostic Signature for Women With Node-Negative Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 98 (17): 1183-1192 (2006).
- Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A. STAT Proteins: From Normal Control of Cellular Events to Tumorigenesis *Journal of Cellular Physiology* 197:157-168 (2003).
- Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, Godwin J, Gray R, Hicks C, James S, MacKinnon E, McGale P, McHugh T, Peto R, Taylor C, Wang Y. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Lancet* 366:2087-2106 (2005).
- Cobleigh MA, Bitterman P, Baker J, Cronin ML, Liu R, Borchik B, Tabesh JM, Walker MG, Shak S. Tumor gene expression predicts distant-free survival (DDFS) in breast cancer patients with 10 or more positive nodes: High throughput RT-PCR assay of paraffin-embedded tumor tissues. *Proceedings of the American Society for Clinical Oncology* 22:abstract 34165 (2003).
- Cobleigh MA, Tabesh B, Bitterman P, Baker J, Cronin M, Liu ML, Borchik R, Mosquera JM, Walker MG, Shak S. Tumor gene expression and prognosis in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes. *Clinical Cancer Research* 15;11(24 Pt 1):8623-8631 (2005).
- Coleman MP, Gatta G, Verdecchia A, Estève J, Storm H, Allemani C, Ciccolallo L, Santaquilani M, Berrino F, and the EUROCORE Working Group. EUROCORE-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20<sup>th</sup> century. *Annals of Oncology* 14(Supplement 5):v128-v149 (2003).
- Colozza M, Azambuja E, Personeni N, Lebrum F, Piccart MJ, Cardoso F. Achievements in Systemic Therapies in the Pre-genomic Era in Metastatic Breast. *The Oncologist* 12:253-270 (2007).
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast Cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without disease. *The Lancet* 360:187-195 (2002).



- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* 347(9017): 1713-1727 (1996).
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52 705 women with breast cancer and 108 411 women without breast cancer. *The Lancet* 350:1047-1059 (1997).
- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology* 26:249-261 (2004).
- Collu GM, Brennan K. Cooperation between Wnt and Notch signalling in human breast cancer. *Breast Cancer Research* 9(3):105 (2007).
- Conklin KA. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integrative Cancer Therapies* 3(4):294-300 (2004).
- Constantinou C, Papas A, Constantinou AI. Vitamin E and cancer: An insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs. *International Journal of Cancer* 123(4): 739-752 (2008).
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal* 17:1195-1214 (2003).
- Cortes-Funes H, Díaz Rubio E, García –Conde J. *Oncología Medica*. Nova Sidonia Oncología-Grupo Aula Médica, S.A. (1999).
- Coyle YM. The effect of environment on breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment* 84:273-288 (2004).
- Cronin M, Pho M, Dutta D, Stephans JC, Shak S, Kiefer MC, Esteban JM, Baker JB. Measurement of Gene Expression in Archival Paraffin-Embedded Tissues. *American Journal of Pathology* 164(1):35-42 (2004).
- Culter RG, Rodriguez H. Critical reviews of oxidative stress and aging. *Advances in basic Science, diagnostic and intervention*. Vol. 1. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. (Singapur) (2003).
- Chabottaux V, Noel A. Breast cancer Preoression: insights into multifaceted matrix metalloproteases. *Clinical and Experimental Metastasis* 24:647-656 (2007).
- Chandel NS, Simon MC. Reactive Oxygen Species generated at mitochondrial Complex III stabilize Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  during hypoxia. *J Biol Chem*. 275(33):25130-28130 (2000).
- Chang HY, Nuyten DS, Sneddon JB, Hastie T, Tibshirani R, Sørli T, Dai H, He YD, van't Veer LJ, Bartelink H, van de Rijn M, Brown PO, van de Vijver MJ. Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. *Proceedings in National Academy Sciences USA* 102(10):3738-3743 (2005).
- Chang HY, Sneddon JB, Alizadeh AA, Sood R, West RB, Montgomery K, Chi JT, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Gene Expression Signature of Fibroblast Serum Response Predicts Human Progression: Similarities between Tumors and Wounds. *PLoS Biology* 2 (2): 0206-0214 (2004).
- 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* 89(11):2145-2152 (2000).
- Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Elledge R, Mohsin S, Osborne CK, Chamness GC, Allred DC, O'Connell P. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *The Lancet* 362:362-369 (2003).

- Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Tham YL, Kalidas M, Elledge R, Mohsin S, Osborne CK, Chamness GC, Allred DC, Lewis MT, Wong H, O'Connell P. Patterns of resistance and incomplete response to docetaxel by gene expression profiling in breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* 23:1169-1177 (2005).
- Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology* 75(2):75-84 (2008).
- Chen J, Hui E, Ip T, Thompson LU. Dietary flaxseed enhances the inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (mcf-7) in nude mice. *Clinical Cancer Research* 10(3):7732-7711 (2004).
- Cheng KH, Ponte JF, Thiagalingam S. Elucidation of epigenetic inactivation of SMAD8 in cancer using targeted expressed gene display. *Cancer Research* 64(5):1639-1646 (2004).
- Cho E, Spiegelman D, Hunter DJ, Chen WY, Zhang SM, Colditz GA, Willett WC. Premenopausal intakes of vitamins A, C, and E, folate, and carotenoids, and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 12:713-720 (2003).
- Chu FF, Esworthy RS, Chu PG, Longmate JA, Huycke MM, Wilczynski S, Doroshow JH. Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. *Cancer Research* 64:962-968 (2004).
- Dai Q, Shu XO, Jin F, Gao YT, Ruan ZX, Zheng W. Consumption of animal foods, cooking methods, and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 11:801-808 (2002).
- Davis CA, Haberland M, Arnold MA, Sutherland LB, McDonald OG, Richardson JA, Childs G, Harris S, Owens GK, Olson EN. PRISM/PRDM6, a transcriptional repressor that promotes the proliferative gene program in smooth muscle cells. *Molecular and Cellular Biology* 26(7):2626-2636 (2006).
- Davis DL, Bradlow HL, Wolff M, Woodruff T, Hoel DG, Anton-Culver H. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environmental Health Perspectives* 101:372-377 (1993).
- Davis DL, Bradlow HL, Wolff M, Woodruff T, Hoel DG, Anton-Culver H. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environmental Health Perspectives* 101:372-377 (1993).
- de Mestre AM, Rao S, Hornby JR, Soe-Htwe T, Khachigian LM, Hulett MD. Early growth response gene 1 (EGR1) regulates heparanase gene transcription in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* 280(42):35136-35147 (2005).
- De Stefani E, Ronco A, Mendilaharsu M, Guidobono M, Deneo-Pellegrini H. Meat intake, heterocyclic amines, and risk of breast cancer: a case-control study in Uruguay. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 6:573-581 (1997).
- Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery *Genome Biology* 4(9): R60 (2003).
- Desmedt C, Piette F, Loi S, Wang Y, Lallemand F, Haibe-Kains B, Viale G, Delorenzi M, Zhang Y, d'Assignies MS, Bergh J, Lidereau R, Ellis P, Harris AL, Klijn JG, Foekens JA, Cardoso F, Piccart MJ, Buyse M, Sotiriou C; TRANSBIG Consortium. Strong time dependence of the 76-gene prognostic signature for node-negative breast cancer patients in the TRANSBIG multicenter independent validation series. *Clinical Cancer Research* 13(11):3207-3214 (2007).
- DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer. Principles & Practice of Oncology*. 7th Edition. Lippincott Williams & Wilkins Publishers (2005).
- Díaz-Rubio E, García-Conde J. *Oncología Clínica básica*. Aran Ediciones S.A. (2000).

- Donaldson MS. Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutrition Journal* 3:19-40 (2004).
- Droge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews* 82:47-95 (2002)
- Dumitrescu RG, Shields PG. The etiology of alcohol-induced breast cancer. *Alcohol* 35(3):213-225 (2005).
- Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *New England Journal of Medicine* 312(3):146-151 (1985).
- Duthie SJ. The comet assay: protective effects of dietary antioxidants against oxidative DNA damage measured using alkaline single cell gel electrophoresis. En: *Critical reviews of oxidative stress and aging: Advances in biological sciences, diagnostics and intervention* (Richard G Cutler & Henry Rodriguez) World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 309-323pp, Singapore (2003).
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365:1687-1717 (2005).
- Eccles SA, Welch D. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *The Lancet* 369: 1742-1757 (2007).
- Eliassen AH, Colditz GA, Rosner B, Willett WC, Hankinson SE. Adult weight change and risk of postmenopausal breast cancer. *JAMA* 296(2):193-201 (2006).
- Embarcing the complexity of genomic data for personalized medicine. West m, Ginsburg GS, Huang AT, Nevins JR. *Genome research* 16:559-566 (2006).
- Embriología Clínica. 6ª Edición. Moore KL, Persaud TVN. McGraw-Hill Interamericana (1999).
- Esteban J, Baker J, Cronin ML, Llamas MG, Walker MG, Mena r, Shak S. Tumor gene expression and prognosis in breast cancer: Multi-gene RT-PCR assay of paraffin-embedded tissue. *Proceedings of the American Society for Clinical Oncology* 22:abstract 3416 (2003).
- Esteva FJ, Sahin AA, Cristofanilli M, Coombes K, Lee SJ, Baker J, Cronin M, Walker M, Watson D, Shak S, Hortobagyi GN. Prognostic role of a multigene reverse transcriptase-PCR assay in patients with node-negative breast cancer not receiving adjuvant systemic therapy. *Cinical Cancer Research* 11(9):3315-3319 (2005).
- EUROCARE Working group. EUROCARE-3 Results. Disponible en <http://www.eurocare.it>
- Eyler CE, Rich JN. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology* 26(17):2839-2845 (2008).
- Fam NP, Fan WT, Wang Z, Zhang LJ, Chen H, Moran MF. Cloning and characterization of Ras-GRF2, a novel guanine nucleotide exchange factor for Ras. *Molecular Cell Biology* 17(3):1396-1406 (1997).
- Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DS, Nobel AB, van't Veer LJ, Perou CM. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 355: 560-569 (2006).
- Fan GH, Lapierre LA, Goldenring JR, Sai J, Richmond A. Rab11-family interacting protein 2 and myosin Vb are required for CXCR2 recycling and receptor-mediated chemotaxis. *Molecular Biology of the Cell* 15(5):2456-2469 (2004).
- Fan WT, Koch CA, de Hoog CL, Fam NP, Moran MF. The exchange factor Ras-GRF2 activates Ras-dependent and Rac-dependent mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Biology* 8(16):935-938 (1998).
- Fang J, Nakamura H, Iyer AK. Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *Journal of Drug Targeting*. 15(7-8):475-486 (2007).
- Fanning E, Klimovich V, Nager AR. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Reseach* 34(15):4126-4137 (2006).

- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the Cancer Incidence and Mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology* 18(3):581-592 (2007).
- Ferlay J, Bray F, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC Cancer Base No 5, version 2.0. Lyon, France. IARC Press (2004).
- Fernandez MF, Santa-Marina L, Ibarluzea JM, Exposito J, Aurrekoetxea JJ, Torne P, Laguna J, Rueda AI, Pedraza V, Olea N. Analysis of population characteristics related to the total effective xenoestrogen burden: a biomarker of xenoestrogen exposure in breast cancer. *European Journal of Cancer* 43(8):1290-1299 (2007).
- Fernandez PL, Jares P, Rey MJ, Campo E, Cardesa A. Cell cycle regulators and their abnormalities in breast cancer. *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology* 51:305-309 (1998).
- Feuer EJ, Wun LM, Boring CC, Flanders WD, Timmel MJ, Tong T. The lifetime risk of developing breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 85(11):892-897 (1993).
- Fidler IJ. Critical Factors in the Biology of Human Cancer Metastasis: Twenty-eight G.H.A Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Research* 50:6130-6138 (1990).
- Fitzgibbons PL, Henson DE, Hutter RVP. Benign Breast Changes and the Risk for Subsequent Breast Cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 122(12):1053-1055 (1998).
- Flohé, L., Wolfgang, A.G. Assays of glutathione. *Methods Enzymology* 105:114-121 (1984).
- Fortini P, Parlatini E, Sidorkina OM, Dogliotti E. The Type of DNA Glycosylase Determines the Base Excision Repair Pathway in Mammalian Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 274(21): 15230-15236 (1999).
- Fowke JH, Chung FL, Jin F, Qi D, Cai Q, Conaway C, Cheng JR, Shu XO, Gao YT, Zheng W. Urinary isothiocyanate levels, brassica, and human breast cancer. *Cancer Research* 63:3980-3986 (2003).
- Fridovich, I. "Superoxide dismutase". *Annu. Rev. Biochem.* 44: 147-159 (1975).
- Fry MJ. Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play?. *Breast Cancer Research* 3:304-312 (2001).
- Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, Sahai E. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nature Cell Biology* 9(12):1392-1400 (2007).
- Gallia GL, Johnson EM, Khalili K. Puralpha: a multifunctional single-stranded DNA- and RNA-binding protein. *Nucleic Acids Research* 28(17):3197-3205 (2000).
- Ganopoulosky JG, Abid R, Aird WC, Blostein MD. Gas6-Induced Signaling in Human Endothelial Cells is Mediated by FOXO1a. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (2008) [Epub ahead of print].
- Gao W, Nawaz Z. Role of steroid receptor coactivators and corepressors of progesterone receptors in breast cancer. *Breast Cancer Research* 4(5):182-186 (2002).
- Gayther SA, Pharoah PDP, Ponder BAJ. The genetics of Inherited Breast Cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 3(4): 365-375 (1998).
- Gene expression profiling spares early breast cancer patients from adjuvant therapy: derived and validated in two population-based cohorts. Pawitan Y., Bjohle J., et al. *Breast Cancer Research* 7:R953-R964 (2005).
- Genova ML, Pich MM, Biondi A, Bernacchia A, Falasca A, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G, Lenaz G. Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of Coenzyme Q as an antioxidant. *Experimental Biology Medicine* (Maywood) 228(5):506-513 (2003).
- Gianni L, Zambetti M, Clark K, Baker J, Cronin M, Wu J, Mariani G, Rodriguez J, Carcangiu M, Watson D, Valagussa P, Rouzier R, Symmans WF, Ross JS, Hortobagyi GN, Puztai L, Shak S. Gene Expression Profiles in Paraffin-Embedded Core Biopsy Tissue Predict

- Response to Chemotherapy in Women With Locally Advanced Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 23(29):7265-7277 (2005).
- Gilliland FD, Hunt WC, Baumgartner KB, Crumley D, Nicholson CS, Fetherolf J, Samet JM. Reproductive risk factors for breast cancer in Hispanic and non-Hispanic white women: the New Mexico Women's Health Study. *American Journal of epidemiology*. 148(7):683-692 (1998).
- Giovannucci E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: a review (United States). *Cancer Causes and Control* 16:83-95 (2005).
- Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast cancer 2005. *Annals of Oncology* 16: 1569-1583 (2005).
- Gong Y, Symmans WF, Pusztai L. Gene-expression microarrays provide new prognostic and predictive tests for breast cancer. *Pharmacogenomics* 8(10):1359-1368 (2007).
- Goodwin JF, Murphy B, Guillemette M. Direct measurement of serum iron and binding capacity. *Clinical Chemistry* 12(2):47-57 (1996).
- Gram IT, Braaten T, Terry PD, Sasco AJ, Adami HO, Lund E. Breast cancer risk among women who start smoking as teenagers. *Weiderpass E. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 14(1): 61-66 (2005).
- Grant WB, Gorham ED. Commentary: Time for public health action on vitamin D for cancer risk reduction. *International Journal of Epidemiology* 35:224-225 (2006).
- Greene LM, Twal WO, Duffy MJ, McDermott EW, Hill AD, O'Higgins NJ, McCann AH, Dervan PA, Argraves WS, Gallagher WM. Elevated expression and altered processing of fibulin-1 protein in human breast cancer. *British Journal of Cancer* 88(6):871-878 (2003).
- Greeny FL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. *AJCC Cancer Staging Manual* 6<sup>o</sup> Edition. New York, NY: Springer-Verlag (2002).
- Grizzi F, Di Ieva A, Russo C, Frezza EE, Cobos E, Muzzio PC, Chiriva-Internati M. Cancer initiation and progression: an unsimplifiable complexity. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 3:37-42 (2006).
- Gross L, Saparbaev MK, Laval J. Enzymology of the repair of the free radicals-induced DNA damage. *Oncogene* 21:8905-8925 (2002).
- Gruvberger-Saal SK, Cunliffe HE, Carr KM, Hedenfalk IA. Microarrays in breast cancer research and clinical practice--the future lies ahead. *Endocrine-Related Cancer* 13: 1017-1031 (2006).
- Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical Chemistry* 42(12):1819-1828 (1995).
- Ha CH, Wang W, Jhun BS, Wong C, Hausser A, Pfizenmaier K, McKinsey TA, Olson EN, Jin ZG. Protein kinase D-dependent phosphorylation and nuclear export of histone deacetylase 5 mediates vascular endothelial growth factor-induced gene expression and angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 283(21): 14590-14599 (2008).
- Habel LA, Shak S, Jacobs MK, Capra A, Alexander C, Pho M, Baker J, Walker M, Watson D, Hackett J, Blick NT, Greenberg D, Fehrenbacher L, Langholz B, Quesenberry CP. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Research*.8(3):R25 (2006).
- Haines BP, Wheldon LM, Summerbell D, Heath JK, Rigby PW. Regulated expression of FLRT genes implies a functional role in the regulation of FGF signalling during mouse development. *Developmental Biology* 297(1):14-25 (2006).
- Halliwell B, Gutteridge JMC. : Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy Sciences*; 899:136-147 (2000).
- Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?. *Archives of biochemistry and Biophysics* 476(2):107-112 (2008).

- Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 35(5):1147-1150 (2007)
- Halliwell B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide?. *Trends in Biochemical Sciences* 31(9):509-515 (2006).
- Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiology* 141:312-322 (2006).
- Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW Jr, Coates RJ, Liff JM, Talamini R, Chantarakul N, Koetsawang S, Rachawat D, Morabia A, Schuman L, Stewart W, Szklo M, Bain C, Schofield F, Siskind V, Band P, Coldman AJ, Gallagher RP, Hislop TG, Yang P, Kolonel LM, Nomura AM, Hu J, Johnson KC, Mao Y, De Sanjosé S, Lee N, Marchbanks P, Ory HW, Peterson HB, Wilson HG, Wingo PA, Ebeling K, Kunde D, Nishan P, Hopper JL, Colditz G, Gajalanski V, Martin N, Pardthaisong T, Silpisornkosol S, Theetranont C, Boosiri B, Chutivongse S, Jimakorn P, Virutamasen P, Wongsrichanalai C, Ewertz M, Adami HO, Bergkvist L, Magnusson C, Persson I, Chang-Claude J, Paul C, Skegg DC, Spears GF, Boyle P, Evstifeeva T, Daling JR, Hutchinson WB, Malone K, Noonan EA, Stanford JL, Thomas DB, Weiss NS, White E, Andrieu N, Brêmond A, Clavel F, Gairard B, Lansac J, Piana L, Renaud R, Izquierdo A, Viladiu P, Cuevas HR, Ontiveros P, Palet A, Salazar SB, Aristizabel N, Cuadros A, Tryggvadottir L, Tulinius H, Bachelot A, Lê MG, Peto J, Franceschi S, Lubin F, Modan B, Ron E, Wax Y, Friedman GD, Hiatt RA, Levi F, Bishop T, Kosmelj K, Primic-Zakelj M, Ravnihar B, Stare J, Beeson WL, Fraser G, Bullbrook RD, Cuzick J, Duffy SW, Fentiman IS, Hayward JL, Wang DY, McMichael AJ, McPherson K, Hanson RL, Leske MC, Mahoney MC, Nasca PC, Varma AO, Weinstein AL, Moller TR, Olsson H, Ranstam J, Goldbohm RA, van den Brandt PA, Apelo RA, Baens J, de la Cruz JR, Javier B, Lacaya LB, Ngelangel CA, La Vecchia C, Negri E, Marubini E, Ferraroni M, Gerber M, Richardson S, Segala C, Gatei D, Kenya P, Kungu A, Mati JG, Brinton LA, Hoover R, Schairer C, Spirtas R, Lee HP, Rookus MA, van Leeuwen FE, Schoenberg JA, McCredie M, Gammon MD, Clarke EA, Jones L, Neil A, Vessey M, Yeates D, Appleby P, Banks E, Beral V, Bull D, Crossley B, Goodill A, Green J, Hermon C, Key T, Langston N, Lewis C, Reeves G, Collins R, Doll R, Peto R, Mabuchi K, Preston D, Hannaford P, Kay C, Rosero-Bixby L, Gao YT, Jin F, Yuan JM, Wei HY, Yun T, Zhiheng C, Berry G, Cooper Booth J, Jelihovsky T, MacLennan R, Shearman R, Wang QS, Baines CJ, Miller AB, Wall C, Lund E, Stalsberg H, Shu XO, Zheng W, Katsouyanni K, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Dabancens A, Martinez L, Molina R, Salas O, Alexander FE, Anderson K, Folsom AR, Hulka BS, Bernstein L, Enger S, Haile RW, Paganini-Hill A, Pike MC, Ross RK, Ursin G, Yu MC, Longnecker MP, Newcomb P, Bergkvist L, Kalache A, Farley TM, Holck S, Meirik O. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Alcohol, tobacco and breast cancer. Collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Journal of Cancer* 87(11):1234-1245 (2002).
- Hamelers IHL, Steenbergh PH. Interactions between estrogens and insulin-like growth factor signalling pathways in human breast tumor cells. *Endocrine-Related Cancer* 10:331-345 (2003).
- Hankinson SE, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE. A prospective study of oral contraceptive use risk of breast cancer (Nurses' Health Study, United States). *Cancer Causes and Control* 8: 65-72 (1997).
- Hans K. Biesalski and Donatus Nohr. New Aspects in Vitamin A Metabolism: the Role of Retinyl Esters as Systemic and Local Sources for Retinol in Mucous Epithelia. *The Journal of Nutrition* 134: 3453S-3457S (2004).
- Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, Lingle WL, Degnim AC, Ghosh K, Vierkant RA, Maloney SD, Pankratz VS, Hillman DW, Suman VJ, Johnson J, Blake C, Tlsty T, Vachon CM, Melton LJ,

- Visscher DW. Benign Breast Disease and the Risk of Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 353(3):229-235 (1985).
- Haslam SZ, Woodward TL. Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-cell-stromal-cell interactions and steroid hormone action in normal and cancerous mammary gland. *Breast Cancer Research* 5(4):208-215 (2003).
- Hatsell S, Frost AR. Hedgehog signaling in mammary gland development and breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 12(2-3):163-173 (2007).
- He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 22;90(4):739-751 (1997).
- Heffron CC, Gallagher MF, Guenther S, Sherlock J, Henfrey R, Martin C, Sheils O, O'Leary JJ. Global mRNA analysis to determine a transcriptome profile of cancer stemness in a mouse model. *Anticancer Research* 27(3A):1319-1324 (2007).
- Heinecke JW, Hsu FF, Crowley JR, Hazen SL, Leeuwenburgh C, Mueller DM, Rasmussen JE, Turk J. Detecting oxidative modification of biomolecules with isotope dilution mass spectrometry: sensitive and quantitative assays for oxidized amino acids in proteins and tissues. *Methods in Enzymology* 300:124-144 (1994).
- Helbich TH, Matzek W, Fuchsjäger MH. Stereotactic and ultrasound-guided breast biopsy. *European Radiology* 14:383-393 (2004).
- Henderson IC, Berry DA, Demetri GD, Cirincione CT, Goldstein LJ, Martino S, Ingle JN, Cooper MR, Hayes DF, Tkaczuk KH, Fleming G, Holland JF, Duggan DB, Carpenter JT, Frei E 3rd, Schilsky RL, Wood WC, Muss HB, Norton L. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 21(6):976-983 (2003).
- Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN. Individualization of Neoadjuvant Therapy for Breast Cancer According to Molecular Tumor Characteristics. *Nature Clinical Practice Oncology* 2(12):598-599 (2005).
- Hess KR, Anderson K, Symmans WF, Valero V, Ibrahim N, Mejia JA, Booser D, Theriault RL, Buzdar AU, Dempsey PJ, Rouzier R, Sneige N, Ross JS, Vidaurre T, Gómez HL, Hortobagyi GN, Pusztai L. Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 24(26):4236-4244 (2006).
- Hofmann W, Schlag PM. BRCA1 and BRCA2- breast cancer susceptibility genes. *Journal of Cancer research and Clinical Oncology* 126:487-496 (2000).
- Hofseth LJ, Saito S, Hussain SP, Espey MG, Miranda KM, Araki Y, Jhappan C, Higashimoto Y, He P, Linke SP, Quezado MM, Zurer I, Rotter V, Wink DA, Appella E, Harris CC. Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. *Proceedings in National Academy Sciences USA* 100(1):143-148 (2003).
- Holmes MD, Liu S, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ, Willett WC. Dietary carbohydrates, fiber, and breast cancer risk. *American Journal of Epidemiology* 159(8):732-739 (2004).
- Holmgren A and Björnstedt M: Thioredoxin and Thioredoxin Reductase. *Methods in Enzymology* 252: 199-208 (1995).
- Hopfner KP, Putnam CD, Tainer JA. DNA double-strand break repair from head to tail. *Current Opinion in Structural Biology* 12:115-122 (2002).
- Hsu TC, Young MR, Cmarik J, Colburn NH. Activator protein 1 (AP-1)- and nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicina* 28(9):1338-1348 (2000).
- Huang Z, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hankinson SE. Waist circumference, waist: hip ratio, and risk of breast cancer in the Nurses' Health Study. *American Journal of Epidemiology* 150(12): 1316-1324 (1999).

- Humprey LL, Helfand M, Chan BKS, Woolf SH. Breast Cancer Screening: A Summary of the Evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of Internal Medicine* 137(5):E347-E367 (2002).
- Huveneers S, Truong H, Danen HJ. Integrins: signaling, disease, and therapy. *International Journal of Radiation Biology* 83(11):743-751 (2007).
- Hwang E, Bowen PE. DNA damage, a Biomarker of Carcinogenesis: Its Measurement and Modulation by Diet and Environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47:27-50 (2007).
- Hwang RF, Krishnamurthy S, Hunt KK, Mirza N, Ames FC, Feig B, Kuerer HM, Singletary SE, Babiera G, Meric F, Akins JS, Neely J, Ross MI. Clinicopathologic factors predicting involvement of nonsentinel axillary nodes in women with breast cancer. *Annals of Surgical Oncology* 10(3):248-254 (2003).
- Ibarluzea JM, Fernández MF, Santa-Marina L, Olea-Serrano MF, Rivas AM, Aurrekoetxea J, Expósito J, Lorenzo M, Torné P, Villalobos M, Pedraza V, Sasco AJ, Olea N. Breast cancer risk and the combined effect of environmental estrogens. *Cancer Causes & Control* 15:591-600 (2004).
- Inagaki K, Haraguchi H. Determination of rare earth elements in human blood serum by inductively coupled plasma mass spectrometry after chelating resin preconcentration. *Analyst* 125(1):191-196 (2000).
- Ingber DE. Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment?. *Seminars in Cancer Biology* 18(5):356-364 (2008).
- Ishii K, Zhen LX, Wang DH, Funamori Y, Ogawa K, Taketa K. Prevention of mammary tumorigenesis in acatalasemic mice by vitamin E supplementation. *Japanese Journal of Cancer Prevention:Gann* 87(7):680-684 (1996).
- Iwao K, Matoba R, Ueno N, Ando A, Miyoshi Y, Matsubara K, Noguchi S, Kato K. Molecular classification of primary breast tumors possessing distinct prognostic properties.. *Human Molecular Genetics* 11(2): 199-206 (2002).
- Iwao-Koizumi K, Matoba R, Ueno N, Kim SJ, Ando A, Miyoshi Y, Maeda E, Noguchi S, Kato K. Prediction of Docetaxel Response in Human Breast Cancer by gene Expression Profiling. *Journal of Clinical Oncology* 23 (3): 422-431 (2005).
- Jahanzeb M. Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-positive breast cancer. *Clinical Cancer Research* 8(4):324-333 (2008).
- Jałoszyński P, Kujawski M, Czub-Swierczek M, Markowska J, Szyfter K. Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. *Mutation Research* 385(3):223-33 (1997).
- Kaelin WG Jr. ROS: really involved in oxygen sensing. *Cell Metabolism*. 1(6):357-358 (2005).
- Kailajarvi M, Ahokoski O, Virtanen A, Salminen E, Irjala K. Alterations in Laboratory Test Results during Adjuvant Breast Cancer Treatment. *Clinical Chemistry Laboratory Medicine* 38(5):443-451 (2000).
- Kaindl AM, Jakubiczka S, Lücke T, Bartsch O, Weis J, Stoltenburg-Didinger G, Aksu F, Oexle K, Koehler K, Huebner A. Homozygous microdeletion of chromosome 4q11-q12 causes severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E with joint hyperlaxity and contractures. *Human Mutation* 26(3):279-280 (2005).
- Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *Journal of Clinical Oncology* 26(17):2813-2820 (2008).
- Kamimura M, Bea F, Akizawa T, Katus HA, Kreuzer J, Viedt C. Platelet-Derived Growth Factor Induces Tissue Factor Expression in Vascular Smooth Muscle Cells via Activation of Egr-1. *Hypertension* 44:944-951 (2004).
- Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burt NP, Rieder MJ, Cooper GM, Roos C, Voight BF, Havulinna AS, Wahlstrand B, Hedner T, Corella D, Tai ES, Ordovas JM, Berglund G,



- Vartiainen E, Jousilahti P, Hedblad B, Taskinen MR, Newton-Cheh C, Salomaa V, Peltonen L, Groop L, Altshuler DM, Orho-Melander M. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nature Genetics* 40(2):189-197 (2008).
- Kato Y, Lewalle JM, Baba Y, Tsukuda M, Sakai N, Baba M, Kobayashi K, Koshika S, Nagashima Y, Frankenne F, Noël A, Foidart JM, Hata RI. Induction of SPARC by VEGF in human vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287(2):422-426 (2001).
- Kelly K. The RGK family: a regulatory tail of small GTP-binding proteins. *Trends in Cell Biology* 15(12):640-3 (2005).
- Kettle AJ. Detection of 3-chlorotyrosine in proteins exposed to neutrophil oxidants. *Methods in Enzymology* 300:111-120 (1999).
- Kim HY, Wang TC, Ma YC. Liquid chromatography/mass spectrometry of phospholipids using electrospray ionization. *Analytical Chemistry* 66(22):3977-3982 (1994).
- Kim SJ, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Nakamura H, Yodoi J, Kato K, Noguchi S. High Thioredoxin Expression is Associated with Resistance to Docetaxel in Primary Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 11(23): 8425-8430 (2005).
- Kimbrow KS., Simons JW. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* 13:739-749 (2006).
- Kinsey GR, McHowat J, Beckett CS, Schnellmann RG. Identification of calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in mitochondria and its role in mitochondrial oxidative stress. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 292:F853-F860 (2007).
- Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences* 32(1):44-50 (2006).
- Klaunig JE, Kamendulis LM. The Role of Oxidative stress in Carcinogenesis. *Annual Review in Pharmacology and Toxicology* 44:239-267 (2004).
- Knudson AG. Mutation and Cancer. *Statistical study of retinoblastoma. Procedures in Natural Academy Sciences USA* 86(4):820-823 (1971).
- Knuston D, Steiner E. Screening for breast Cancer: Current recommendations and future directions. *American Family Physician* (2007). Disponible en <http://www.aafp.org/afp>
- Kojo K, Pukkala E, Auvinen A. Breast cancer risk among Finnish cabin attendants: a nested case-control study. *Occupational and Environmental Medicine* 62:488-493 (2005).
- Komalavilas P, Shah PK, Jo H, Lincoln TM. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in contractile vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 274(48):34301-34309 (1999).
- Kong T, Scully M, Shelley CS, Colgan SP. Identification of Pur alpha as a new hypoxia response factor responsible for coordinated induction of the beta 2 integrin family. *Journal of Immunology* 179(3):1934-1941 (2007).
- Kopjar N, Milas I, Garaj-Vrhovac V, Gamulin M. Alkaline comet assay study with breast cancer patients: evaluation of baseline and chemotherapy-induced DNA damage in non-target cells. *Clinical and Experimental Medicine*. 6(4):177-190 (2006).
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27(2-3):95-125 (2006).
- Kumaraguruparan R, Kabalimoorthy J, Nagini S. Correlation of tissue lipid peroxidation and antioxidants with clinical stage and menopausal status in patients with adenocarcinoma of the breast. *Clinical Biochemistry* 38(2):154-158 (2005).
- Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. p53 and breast cancer, an update. *American Endocrine-Related Cancer* 13:293-325 (2006).

- Lacroix M, Toillon R-A, Leclercq G. Stable 'portrait' of breast tumors during progression: data from biology, pathology and genetics. *Endocrine Related Cancer* 11: 497-522 (2004).
- Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, van Gils CH, Khaw KT, Tehard B, Berrino F, Tjønneland A, Bigaard J, Olsen A, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Nagel G, Boeing H, Trichopoulos D, Economou G, Bellos G, Palli D, Tumino R, Panico S, Sacerdote C, Krogh V, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Lund E, Ardanaz E, Amiano P, Pera G, Quirós JR, Martínez C, Tormo MJ, Wirfält E, Berglund G, Hallmans G, Key TJ, Reeves G, Bingham S, Norat T, Biessy C, Kaaks R, Riboli E. Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *A. International Journal of Cancer* 111(5):762-771 (2004).
- Lahmann PH, Schulz M, Hoffmann K, Boeing H, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Key TJ, Allen NE, Khaw KT, Bingham S, Berglund G, Wirfält E, Berrino F, Krogh V, Trichopoulou A, Lagiou P, Trichopoulos D, Kaaks R, Riboli E. Long-term weight change and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *British Journal of Cancer* 93(5):582-589 (2005).
- Laidlaw IJ, Clarke RB, Howell A, Owen AW, Potten CS, Anderson E. The Proliferation of Normal Human Breast Cancer Tissue Implanted into Athimic Nude Mice Is Stimulated by Estrogen but Not Progesterone. *Endocrinology* 136:164-171 (1995).
- Lapis K, Tímár J. Role of elastin-matrix interactions in tumor progression. *Seminars in Cancer Biology* 12(3):209-217 (2002).
- Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Folate and Risk of Breast Cancer: A Meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 99(1):64-76 (2003).
- Lattime EC, Gerson S. Gene Therapy of Cancer. *Seminars in Oncology*. Vol 32. nº 6 (2005).
- Laurent A, Nicco C, Chéreau C, Goulvestre C, Alexandre J, Alves A, Lévy E, Goldwasser F, Panis Y, Soubrane O, Weill B, Batteux F. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Research* 65(3):948-956 (2005).
- Lawson HW, Henson R, Bobo JK, Kaeser MK. Implementing recommendations for the Early Detection of Breast and Cervical Cancer Among Low-Income Women. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* 49 (RR2): 37-55 (2000).
- Lepley DM, Palange JM, Suprenant KA. Sequence and expression patterns of a human EMAP-related protein-2 (HuEMAP-2). *Gene* 237(2):343-349 (1999).
- Leu SJ, Lam SC, Lau LF. Pro-angiogenic activities of CYR61 (CCN1) mediated through integrins  $\alpha$ v $\beta$ 3 and  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 277(48):46248-46255 (2002).
- Levi F, Bosetti C, Lucchini F, Negri E, Vecchia C. Monitoring the decrease in breast cancer mortality in Europe. *European Journal of Cancer Prevention* 14(6):497-502 (2005).
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186:464-478 (1990).
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 233:346-357 (1994).
- Lewis DFV, Ioannides C, Parke DV. Cytochromes P450 and Species Differences in Xenobiotic Metabolism and Activation of Carcinogen. *Environmental Health Perspectives* 106(10):633-641 (1998).
- Lim JH, Lee ES, et al. Ras-dependent induction of HIF-1 $\alpha$ 785 via the Raf/MEK/ERK pathway: a novel mechanism of Ras-mediated tumor promotion. *Oncogene* 23:9427-9431 (2004).
- Lin CG, Chen CC, Leu SJ, Grzeszkiewicz TM, Lau LF. Integrin-dependent functions of the angiogenic inducer NOV (CCN3): implication in wound healing. *Journal of Biological Chemistry* 280(9):8229-8237 (2005).

- Lin CG, Leu SJ, Chen N, Tebeau CM, Lin SX, Yeung CY, Lau LF. CCN3 (NOV) is a novel angiogenic regulator of the CCN protein family. *Journal of Biological Chemistry* 278(26):24200-24208 (2003).
- Lincoln TM, Wu X, Sellak H, Dey N, Choi CS. Regulation of vascular smooth muscle cell phenotype by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. *Front Biosciences* 11:356-367 (2006).
- Liochev SI, Fridovich I. The effects of superoxide dismutase on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation.. *Free Radical Biology and Medicine* 42:1465-1469 (2007).
- Liu MY, Eyries M, Zhang C, Santiago FS, Khachigian LM. Inducible platelet-derived growth factor D-chain expression by angiotensin II and hydrogen peroxide involves transcriptional regulation by Ets-1 and Sp1. *Blood* 107(6):2322-2329 (2006).
- Look MP, Musch E. Lipid peroxides in the polychemotherapy of cancer patients. *Chemotherapy* 40(1):8-15 (1994).
- López M, Mallorquín P, Vega M. Microarrays y Biochips de ADN. Informe de Vigilancia Tecnológica. *Genoma España* (2002). (Disponible en <http://www.gen-es.org>)
- Luini A, Gatti G, Zurrida S, Talakhadze N, Brenelli F, Gilardi D, Paganelli G, Orecchia R, Cassano E, Viale G, Sangalli C, Ballardini B, dos Santos GR, Veronesi U. The evolution of the conservative approach to breast cancer. *Breast* 16(2):120-129 (2007).
- Mackay HJ, Twelves CJ. Protein kinase C: a target for anticancer drugs?. *Endocrine-Related Cancer* 10:389-396 (2003).
- Mahalakshmi RN, Ng MY, Guo K, Qi Z, Hunziker W, Béguin P. Nuclear localization of endogenous RGK proteins and modulation of cell shape remodeling by regulated nuclear transport. *Traffic* 8(9):1164-1178 (2007).
- Mamounas EP, Bryant J, Lembersky B, Fehrenbacher L, Sedlacek SM, Fisher B, Wickerham DL, Yothers G, Soran A, Wolmark N Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28. *Journal of Clinical Oncology* 23(16):3686-3696 (2005).
- Marcantonio D, Chalifour LE, Alaoui-Jamali MA, Alpert L, Huynh HT. Cloning and characterization of a novel gene that is regulated by estrogen and is associated with mammary gland carcinogenesis. *Endocrinology* 42(6):2409-2418 (2001).
- Marconcini L, Marchio S, Morbidelli L, Cartocci E, Albini A, Ziche M, Bussolino F, Oliviero S. c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy Sciences USA* 96(17):9671-9676 (1999).
- Margolis KL, Mucci L, Braaten T, Kumle M, Trolle Lagerros Y, Adami HO, Lund E, Weiderpass E. Physical activity in different periods of life and the risk of breast cancer: the Norwegian-Swedish Women's Lifestyle and Health cohort study *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 14(1): 27-32 (2005).
- Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage . *Carcinogenesis* 21(3):361-370 (2000).
- Martin ES, Cesari R, Pentimalli F, Yoder K, Fishel R, Himmelstein AL, Martin SE, Godwin AK, Negrini M, Croce CM. The BCSC-1 locus at chromosome 11q23-q24 is a candidate tumor suppressor gene. *Proceedings of the National Academy Sciences USA* 100(20):11517-11522 (2003).
- Martin M, Pienkowski T, Mackey J, Pawlicki M, Guastalla JP, Weaver C, Tomiak E, Al-Tweigeri T, Chap L, Juhos E, Guevin R, Howell A, Fornander T, Hainsworth J, Coleman R, Vinholes J, Modiano M, Pinter T, Tang SC, Colwell B, Prady C, Provencher L, Walde D, Rodriguez-Lescure A, Hugh J, Loret C, Rupin M, Blitz S, Jacobs P, Murawsky M, Riva A, Vogel C; Breast Cancer International Research Group 001 Investigators. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 352(22):2302-2313 (2005).

- Martin M. Documentos de consenso en Oncología. Cancer de mama. Vol I. Nova Sidonia –Grupo Aula Médica (2005).
- Martinelli DC, Fan CM. Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling. *Genes and Development* 21(10):1231-1243 (2007).
- Martínez J. Función e importancia de la Bioinformática en el desarrollo de las ciencias, especialmente en Biotecnología y Medicina Molecular. *Ciencia y Trabajo* 22:159-163 (2006).
- Matthias Schäfer, Sabine Werner. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacological Research* (2008) [Epub ahead of print].
- McCullough ML, Stevens VL, Diver WR, Feigelson HS, Rodriguez C, Bostick RM, Thun MJ, Calle EE. Vitamin D pathway gene polymorphisms, diet, and risk of postmenopausal breast cancer: a nested case-control study. *Breast Cancer Research* 9(1):R9-R15 (2007).
- McPherson K, Stell CM, Dixon JM. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *British Journal of Medicine* 321:624-628 (2000).
- McTiernan A, Kooperberg C, White E, Wilcox S, Coates R, Adams-Campbell LL, Woods N, Ockene J. Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study. *Women's Health Initiative Cohort Study. JAMA* 290(10):1331-1336 (2003).
- Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, Teng PK, Griggs DW, Lupu R. A novel CYR61-triggered 'CYR61-alpha v beta3 integrin loop' regulates breast cancer cell survival and chemosensitivity through activation of ERK1/ERK2 MAPK signaling pathway. *Oncogene* 24(5):761-779 (2005).
- Michels KB, Ekblom A. Caloric Restriction and Incidence of Breast Cancer. *JAMA* 291:1226-1230 (2004)
- Michels KB, Mohllajee AP, Roset-Bahmanyar E, Beehler GP, Moysich KB. Diet and breast Cancer. A review of the Observational Studies. *Journal of the National Cancer Institute* 94:1301-1311 (2002).
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, Tran T, McClure M, Frye C, Hattier T, Phelps R, Haugen-Strano A, Katcher H, Yakumo K, Gholami Z, Shaffer D, Stone S, Bayer S, Wray C, Bogden R, Dayananth P, Ward, Tonin P, Narod S, Bristow PK, Norris FH, Helvering L, Morrison P, Rosteck P, Lai M, Barrett JC, Lewis C, Neuhausen S, Cannon-Albright L, Goldgar D, Wiseman R, Kamb A, Skolnick MH. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266:66-71 (1994).
- Milde-Langosch K, Röder H, Andritzky B, Aslan B, Hemminger G, Brinkmann A, Bamberger CM, Löning T, Bamberger AM. The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. *Breast Cancer Research Treatment* 86(2):139-152 (2004).
- Milde-Langosch K. The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *European Journal of Cancer* 41(16):2449-2461 (2005).
- Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, Batra SK. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11(5):981-1011 (2007).
- Minn AJ, Kang Y, Serganova I, Gupta GP, Giri DD, Doubrovin M, Ponomarev V, Gerald WL, Blasberg R, Massagué J. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *The Journal of Clinical Investigation* 115 (1):44-55 (2005).

- Mitchell A, Dass CR, Sun LQ, Khachigian LM. Inhibition of human breast carcinoma proliferation, migration, chemoinvasion and solid tumour growth by DNazymes targeting the zinc finger transcription factor EGR-1. *Nucleic Acids Research* 32(10):3065-3069 (2004).
- Modlich O, Prisack HB, Munnes M, Audretsch W, Bojar H. Predictors of primary breast cancers responsiveness to preoperative Epirubicin/Cyclophosphamide-based chemotherapy: translation of microarray data into clinically useful predictive signitures. *Journal of Translational Medicine* 3:32 (2005).
- Mohan AK, Hauptmann M, Linet MS, Ron E, Lubin JH, Freedman DM, Alexander BH, Boice JD Jr, Doody MM, Matanoski GM. Breast cancer mortality among female radiologic technologists in the United States. *Journal of the National Cancer Institute* 94(12): 943-948 (2002).
- Molyneux G, Regan J, Smalley MJ. Mammary stem cells and breast cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64(24):3248-3260 (2007).
- Monje P, Marinissen MJ, Gutkind JS. Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor. *Molecular Cell Biology* 23(19):7030-7043 (2003).
- Mooreman PG, Terry PD. Consumption of dairy products and the risk of breast cancer: a review of the literature. *American Journal of Nutrition* 80:5-14 (2004).
- Morimoto LM, White E, Chen Z, Chlebowski RT, Hays J, Kuller L, Lopez AM, Manson J, Margolis KL, Muti PC, Stefanick ML, McTiernan A. Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). *Cancer causes and control* 13: 741-751 (2002).
- Morrow JD, Chen Y, Brame CJ, Yang J, Sanchez SC, Xu J, Zackert WE, Awad JA, Roberts LJ. The isoprostanes: unique prostaglandin-like products of free-radical-initiated lipid peroxidation. *Drug Metabolism Reviews* 31(1):117-139 (1999).
- Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ 2nd. A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism *Proceedings of the National Academy Sciences USA* 87(23):9383-9387 (1990).
- Muraoka-Cook RS, Dumont N, Arteaga CL. Dual Role of Transforming Growth Factor  $\beta$  in Mammary Tumorigenesis and Metastatic Progression. *Clinical Cancer Research* 11:937s-943s (2005).
- Murphy N, Millar E, Lee CS. Gene expression profiling in breast cancer: towards individualising patient management. *Pathology* 37(4):271-277 (2005).
- Nadin SB, Vargas-Roig LM, Drago G, Ibarra J, Ciocca DR. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and cancer patients: a pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. *Cancer Letters* 28;239(1):84-97 (2006).
- Nagai H, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H. Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 40(1):1-6 (2007).
- Nashatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ, Sledge GW. Constitutive Activation of NF- $\kappa$ B during Progression of Breast Cancer to Hormone-Independent Growth. *Molecular and Cellular Biology* 17(7):3629-3639 (1997).
- Naumov GN, Bender E, Zurakowski D, Kang SY, Sampson D, Flynn E, Watnick RS, Straume O, Akslen LA, Folkman J, Almog N. A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *Journal of the National Cancer Institute* 98(5):316-325 (2006).
- Navarro SA, Jain M, Howe GR, Miller AB, Rohan TE. Energy balance and breast cancer risk: a prospective cohort study. *Breast Cancer Research and Treatment* 97:97-106 (2006).

- Neumann CA, Krause DS, Carman CV, Das S, Dubey DP, Abraham JL, Bronson RT, Fujiwara Y, Orkin SH, Van Etten RA. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* 424: 561-565 (2003).
- Nishita M, Ueno N, Shibuya H. Smad8B, a Smad8 splice variant lacking the SSXS site that inhibits Smad8-mediated signalling. *Genes to Cells* 4(10):583-591 (1999).
- Nogami S, Ishii Y, Kawaguchi M, Sakata N, Oya T, Takagawa K, Kanamori M, Sabit H, Obata T, Kimura T, Sasahara M. ZFH4 protein is expressed in many neurons of developing rat brain. *The Journal of Comparative Neurology* 482(1):33-49 (2005).
- Norton L. Conceptual and practical Implications of breast Tissue Geometry: Toward a More Effective, Less Toxic Therapy. *The Oncologist* 10:370-381 (2005).
- Oberst A, Malatesta M, Aqeilan RI, Rossi M, Salomoni P, Murillas R, Sharma P, Kuehn MR, Oren M, Croce CM, Bernassola F, Melino G. The Nedd4-binding partner 1 (N4BP1) protein is an inhibitor of the E3 ligase Itch. *Proceedings of the National Academy Sciences USA* 104(27):11280-11285 (2007).
- Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of Overweight and Obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA* 295(13):1549-1555 (2006).
- Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood* 108(4): 1388-1394 (2006).
- Oliveira AM, Ross JS, Fletcher JA. Tumor Suppressors Genes in Breast Cancer. The Gatekeepers and the Caretakers. *American Journal of Clinical Pathology* 124(suppl.1):S16-S28 (2005).
- Oliver PM, Cao X, Worthen GS, Shi P, Briones N, MacLeod M, White J, Kirby P, Kappler J, Marrack P, Yang B. Ndfip1 protein promotes the function of itch ubiquitin ligase to prevent T cell activation and T helper 2 cell-mediated inflammation. *Immunity* 25(6):929-940 (2006).
- Östling O, and Johanson K. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemistry Biophysical Research Community* 123:291-298 (1984).
- Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 351:2817-2826 (2004).
- Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner R, Walker M, Watson T, Park T, Wolmark N. Multi-gene RT-PCR assay for predicting recurrence in NSABP studies B-20 and B-14. *Breast Cancer research and Treatment* 82: A16 (2003).
- Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Joo H, Baker J, Cronin M, Watson D, Bryant J, Constantino J, Wolmark N. Expression of 21 genes in the Recurrence Score assay and prediction of clinical benefit from tamoxifen in NSABP study B-14 and chemotherapy in NSABP study B-20. *Journal of Clinical Oncology* 23: 65 (2005).
- Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, Cronin M, Baehner FL, Watson D, Bryant J, Costantino JP, Geyer CE Jr, Wickerham DL, Wolmark N. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 24(23):1-12 (2006).
- Palmieri D, Astigiano S, Barbieri O, Ferrari N, Marchisio S, Ulivi V, Volta C, Manduca P. Procollagen I COOH-terminal fragment induces VEGF-A and CXCR4 expression in breast carcinoma cells. *Experimental Cell Research* 314(11-12):2289-2298 (2008).
- Parkin DM, Fernández LMG. Use of Statistics to Assess the Global Burden of Breast Cancer. *The Breast Journal* 12 (Suppl.1): S70-S80 (2006).
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Storm H. Cancer Incidence in Five Continents vols. I-VIII. IARC Cancer Base n° 6. Lyon, France: IARC Press (2005). Disponible en <http://www-dep.iarc.fr>

- Pawitan Y, Bjöhle J, Amler L, Borg AL, Egyhazi S, Hall P, Han X, Holmberg L, Huang F, Klaar S, Liu ET, Miller L, Nordgren H, Ploner A, Sandelin K, Shaw PM, Smeds J, Skoog L, Wedrén S, Bergh J. Gene expression profiling spares early breast cancer patients from adjuvant therapy: derived and validated in two population-based cohorts. *Breast Cancer Research* 7:R953-R964 (2005).
- Peng XH, Karna P, Cao Z, Jiang BH, Zhou M, Yang L. Cross-talk between Epidermal Growth Factor Receptor and Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating Survivin gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 281(36):25903-25914 (2006).
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslén LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-752 (2000).
- Physical activity in different periods of life and the risk of breast cancer: the Norwegian-Swedish Women's Lifestyle and Health cohort study. Margolis KL, Mucci L, Braaten T, Kumle M, Trolle Lagerros Y, Adami HO, Lund E, Weiderpass E. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 14(1): 27-32 (2005).
- Piccini-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Láng I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Suto T, Gøtzsche V, Ward C, Strähle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine* 353(16):1659-1672 (2005).
- Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Development* 14(15):1837-1851 (2000).
- Pollán M, Ramis R, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Gómez D, Lope V, García-Pérez J, Carrasco JM, García-Mendizábal MJ, López-Abente G. Municipal distribution of breast cancer mortality among women in Spain. *BCM Cancer* 7:78-92 (2007).
- Potischman N, Byers T, Houghton L, Root M, Nemoto T, Campbell TC. Effects of breast cancer treatments on plasma nutrient levels: implications for epidemiological studies. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 1(7):555-559 (1992).
- Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signalling. *Endocrine-Related Cancer* 7:165-197 (2000).
- Prentice RL, Caan B, Chlebowski RT, Patterson R, Kuller LH, Ockene JK, Margolis KL, Limacher MC, Manson JE, Parker LM, Paskett E, Phillips L, Robbins J, Rossouw JE, Sarto GE, Shikany JM, Stefanick ML, Thomson CA, Van Horn L, Vitamins MZ, Wactawski-Wende J, Wallace RB, Wassertheil-Smoller S, Whitlock E, Yano K, Adams-Campbell L, Anderson GL, Assaf AR, Beresford SA, Black HR, Brunner RL, Brzyski RG, Ford L, Gass M, Hays J, Heber D, Heiss G, Hendrix SL, Hsia J, Hubbell FA, Jackson RD, Johnson KC, Kotchen JM, LaCroix AZ, Lane DS, Langer RD, Lasser NL, Henderson MM. Low-fat dietary pattern and risk of invasive breast cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA* 295(6):629-642 (2006).
- Prieto-Sánchez RM, Bustelo XR. GTPasas de la familia Rho/Rac. Participación en procesos biológicos y patologías. *Biojournal* 4:1-14 (2006).
- Prout K. Nuevas pruebas que podrían algún día predecir la respuesta a la quimioterapia y la presencia de enfermedad metastásica en pacientes con cáncer de mama. *OncoLog* 49(3):1-4 (2004).
- Pupa SM, Giuffré S, Castiglioni F, Bertola L, Cantú M, Bongarzone I, Baldassari P, Mortarini R, Argraves WS, Anichini A, Menard S, Tagliabue E. Regulation of breast cancer response to chemotherapy by fibulin-1. *Cancer Research* 67(9):4271-4277 (2007).

- Putz U, Howitt J, Lackovic J, Foot N, Kumar S, Silke J, Tan SS. Nedd4-family interacting protein 1 (Ndfip1) is required for the exosomal secretion of Nedd4-family proteins. *Journal of Biological Chemistry* (2008) [Epub ahead of print].
- Pyle-Chenault RA, Stolk JA, Molesh DA, Boyle-Harlan D, McNeill PD, Repasky EA, Jiang Z, Fanger GR, Xu J. VSGP/F-spondin: a new ovarian cancer marker. *Tumour Biology* 26(5):245-257 (2005).
- Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J, Ramírez-Tortosa MC. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 180 79-95 (2002).
- Raines EW, Lane TF, Iruela-Arispe ML, Ross R, Sage EH. The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proceedings of the National Academy Sciences USA* 89(4):1281-1285 (1992).
- Rajneesh CP, Manimaran A, Sasikala KR, Adaikappan P. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. *Singapore Med J.* 49(8):640-643 (2008).
- Ramaswamy S., Golub TR. Microarrays in Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology* 20:1932-1941 (2001).
- Ramírez-Sánchez I, Rosas-Vargas H, Ceballos-Reyes G, Salamanca F, Coral-Vázquez RM. Expression analysis of the SG-SSPN complex in smooth muscle and endothelial cells of human umbilical cord vessels. *Journal of Vascular Research* 42(1):1-7 (2005).
- Ramon JM, Escriba JM, Casas I, Iglesias C, Gavalda L, Torras G, Oromi J. Age at first full-term pregnancy, lactation and parity and risk of breast cancer: a cesa-control study in Spain. *European Journal of Epidemiology* 12(5):449-453 (1996).
- Rao AK, Ziegler YS, McLeod IX, Yates JR, Nardulli AM. Effects of Cu/Zn Seroxide Dismutase (SOD1) on Estrogen Responsiveness and Oxidative Stress in Human Breast Cancer Cells. *Molecular Endocrinology* 22(5):1113-1124 (2008).
- Rao MS, Reddy JK. An Overview of Peroxisome Proliferator-Induced Hepatocarcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* 93:205-209 (1991).
- Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, Margolese RG, Hoehn JL, Vogel VG, Dakhil SR, Tamkus D, King KM, Pajon ER, Wright MJ, Robert J, Paik S, Mamounas EP, Wolmark N. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *Journal of Clinical Oncology* 26(5):778-785 (2008).
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9-10):1231-1237 (1999).
- Reigstad LJ, Varhaug JE, Lillehaug JR. Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growthfactors family. *FEBS Journal* 272:5723–5741 (2005).
- Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *Journal of Clinical Pathology* 59:225-231 (2006).
- Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Barnes DM, Miller KD. Frequency of oestrogen and progesterone receptor positivity by immunohistochemical analysis in 7016 breast carcinomas: correlation with patient age, assay sensitivity, threshold value, and mammographic screening. *Journal of Clinical Pathology* 53:688-696 (2000).
- Rocnik EF, Liu P, Sato K, Walsh K, Vaziri C. The novel SPARC family member SMOC-2 potentiates angiogenic growth factor activity. *Journal of Biological Chemistry* 281(32):22855-22864 (2006).
- Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, Hess KR, Stec J, Ayers M, Wagner P, Morandi P, Fan C, Rabiul I, Ross JS, Hortobagyi GN, Pusztai L.



- Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy. *Clinical Cancer Research* 11 (16): 5678-5685 (2006).
- Roy A, Sen S, Chakraborti AS. In Vitro Nonenzymatic Glycation Enhances the Role of Myoglobin as a source of Oxidative Stress. *Free Radical Research* 38(2):139-146 (2004).
- Ruehl M, Erben U, Schuppan D, Wagner C, Zeller A, Freise C, Al-Hasani H, Loesekann M, Notter M, Wittig BM, Zeitz M, Dieterich W, Somasundaram R. The elongated first fibronectin type III domain of collagen XIV is an inducer of quiescence and differentiation in fibroblasts and preadipocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 280(46):38537-38543 (2005).
- Russo IH, Russo J. Mammary Gland Neoplasia in Long-Term Rodent Studies. *Environmental Health Perspectives* 104(9):938-967 (1996).
- Russo IH. Cigarette smoking and risk of breast cancer in women. *The Lancet* 360:1044-1049 (1998).
- Russo J, Hu YF, Russo IH. Chapter 1: Developmental, Cellular, and Molecular Basis of Human Breast Cancer. *Journal of the national Cancer Institute Monographs* 27:17-37 (2000).
- Russo J, Moral R, Balogh GA, Mailo D Russo IH. The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Research* 7:131-142 (2005).
- Saarto T, Blomqvist C, Ehnholm C, Taskinen MR, Elomaa I. Effects of Chemotherapy-Induced Castration on Serum Lipids and Apolipoproteins in Premenopausal Women with Node-Positive Breast Cancer.
- Safe SH. Is There an Association between Exposure to Environmental Estrogens and Breast Cancer?. *Environmental Health Perspectives* 105(suppl.3):675-678 (1997).
- Sanchez-Pulido L, Rojas AM, Valencia A, Martinez-A C, Andrade MA. ACRATA: a novel electron transfer domain associated to apoptosis and cancer. *BMC Cancer* 4:98 (2004).
- Sánchez-Suárez P, Ostrosky-Wegman P, Gallegos-Hernández F, Peñarroja-Flores R, Toledo-García J, Bravo JL, Del Castillo ER, Benítez-Bribiesca L. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. *Mutat Res* 640(1-2):8-15 (2008).
- Sant M, Allemani C, Berrino F, Coleman MP, Aareleid T, Chaplain G, Coebergh JW, Colonna M, Crosignani P, Danzon A, Fderico M, Gafá L, Grosclaude P, Hédelin G, Macé-Lesech J, Martínez C, Moller H, Paci E, Raverdy N, Tretarre B, Williams E. Breast Carcinoma Survival in Europe and the United States. A Population-Based Study. European Concerted Action on Survival and Care of Cancer Patients (EUROCORE) Working Group. *Cancer* 100(4):715-722 (2004).
- Sanz Ortiz J. Introducción a la oncología clínica. Bases moleculares y terapia integral. 1ª edición. You & Us, SA, Madrid, España (2002).
- Savage K, Lambros MB, Robertson D, Jones RL, Jones C, Mackay A, James M, Hornick JL, Pereira EM, Milanezi F, Fletcher CD, Schmitt FC, Ashworth A, Reis-Filho JS. Caveolin 1 is overexpressed and amplified in a subset of basal-like and metaplastic breast carcinomas: a morphologic, ultrastructural, immunohistochemical, and in situ hybridization analysis. *Clinical Cancer Research* 13(1):90-101 (2007).
- Scully R. Role of BRCA gene dysfunction in breast and ovarian cancer predisposition. *Breast Cancer Research* 2:324-330 (2000).
- Schairer C, Lubin J, Toisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R. Menopausal Estrogen and Estrogen-Progestin Replacement Therapy and Breast Cancer Risk. *JAMA* 283:485-492 (2000).
- Schimmel KJM, Richel DJ, van den Brink RBA, Guchelaar HJ. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treatment Reviews* 30, 181-191 (2004).
- Schwartz GF, Veronesi U, Clough KB, Dixon JM, Fentiman IS, Heywang-Köbrunner SH, Holland R, Hughes KS, Margolese R, Olivetto IA, Palazzo JP, Solin LJ. Proceedings of the

- Consensus Conference on Breast Conservation, April 28 to May 1, 2005, Milan, Italy. Consensus Conference Committee. *Cancer* 107(2):242-250 (2006).
- Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology* 23(36):9408-9421 (2005).
- Seitz S, Korsching E, Weimer J, Jacobsen A, Arnold N, Meindl A, Arnold W, Gustavus D, Klebig C, Petersen I, Scherneck S. Genetic background of different cancer cell lines influences the gene set involved in chromosome 8 mediated breast tumor suppression. *Genes, Chromosomes and Cancer* 45(6):612-27 (2006).
- Sentman ML, Granström M, Jakobson H, Reaume A, Basu S, Marklund SL. Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry* 281(11):6904-6909 (2006).
- Shacter E, Williams JA, Hinson RM, Sentürker S, Lee YJ.. Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis. *Blood*; 96:307-313 (2000).
- Shanahan CM, Cary NRB, Osbourn JK, Weissberg PL. Identification of Osteoglycin as a Component of the Vascular Matrix. Differential Expression by Vascular Smooth Muscle Cells During Neointima Formation and in Atherosclerotic Plaques. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 17:2437-2447 (1997).
- Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113(6):685-700 (2003).
- Shimizu-Hirota R, Sasamura H, Kuroda M, Kobayashi E, Saruta T. Functional characterization of podocan, a member of a new class in the small leucine-rich repeat protein family. *FEBS Letters* 563(1-3):69-74 (2004).
- Shin I, Kim S, Song H, Kim HR, Moon A. H-Ras-specific Activation of Rac-MMK3/6-p38 pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 280(15):14675-14683 (2005).
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175:184-191 (1988).
- Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA* 286(17):2143-2151 (2001).
- Small GW, Shi YY, Edmund NA, Somasundaram S, Moore DT, Orlowski RZ. Evidence that mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by proteasome inhibitors plays an antiapoptotic role. *Molecular Pharmacology*. 66(6):1478-1490 (2004).
- Small GW, Shi YY, Higgins LS, Orlowski RZ. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is a mediator of breast cancer chemoresistance. *Cancer Research* 67(9):4459-4466 (2007).
- Smigal C, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Howe HL, Thun M. Trends in Breast Cancer by Race and Ethnicity: Update 2006. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 56:168-183 (2005).
- Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Howe GR, Marshall JR, Miller AB, Potter JD, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter DJ. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 279(7):535-540 (1998).
- Song JY, Lim JW, Kim H, Morio T, Kim KH. Oxidative stress induces nuclear loss of DNA repair proteins Ku70 and Ku80 and apoptosis in pancreatic acinar AR42J cells. *The Journal of Biological Chemistry* 19:36676-36687 (2003).
- Song RX, Santen RJ. Membrane Initiated Estrogen Signalling Breast Cancer. *Biology of Reproduction* 75:9-16 (2006).
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor

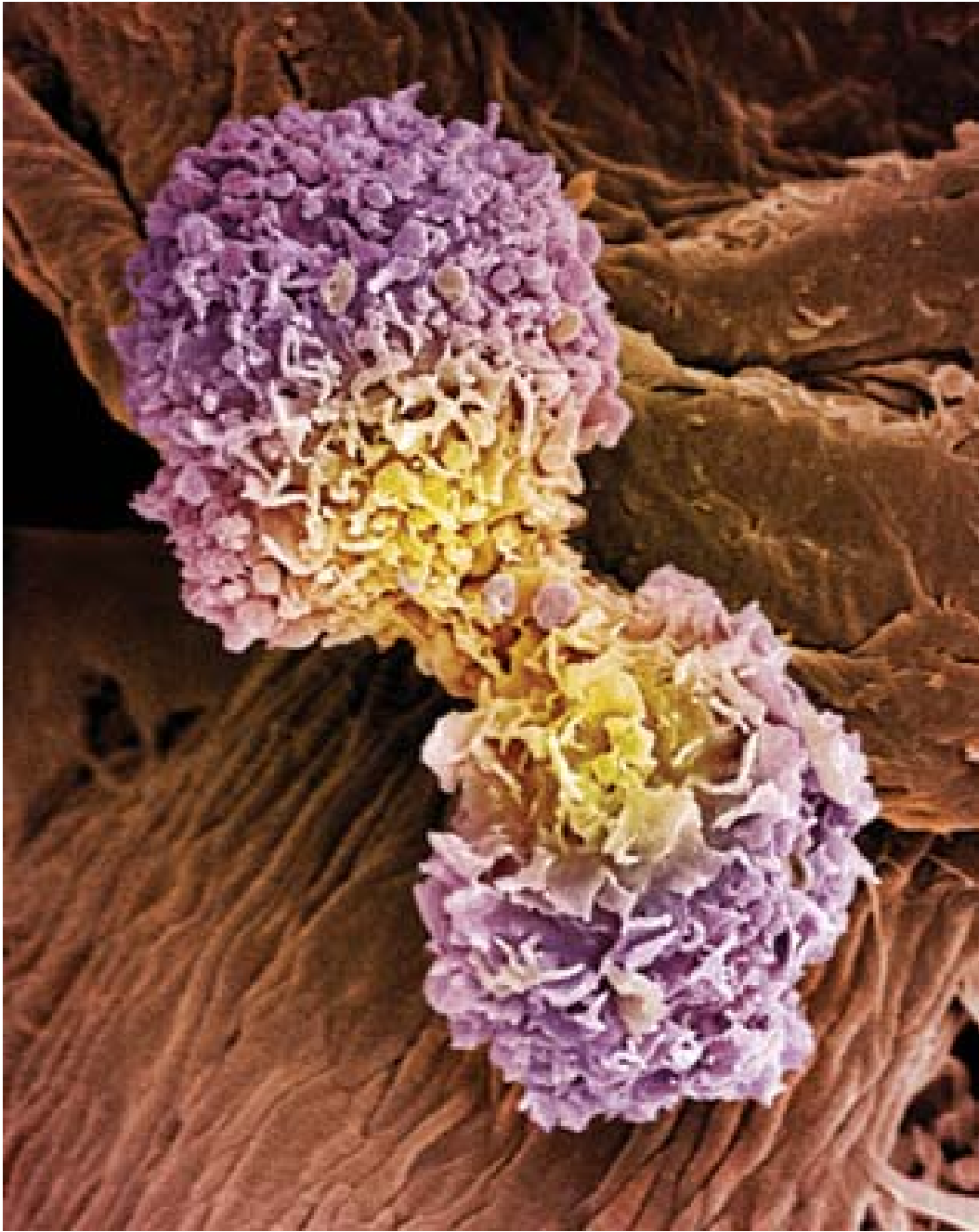
- subclasses with clinical implications. *Proceedings in National Academy Science USA* 98(19):10869-10874 (2001).
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings in Natural Academy Sciences USA* 100(14):8418-8423 (2003).
- Sparano JA. TAILORx: trial assigning individualized options for treatment (Rx). *Clinical Breast Cancer* 7(4):347-350 (2006).
- Sporn MB, Roberts AB. Role of Retinoids in Differentiation and Carcinogenesis. *Cancer Research* 43:3034-3040 (1983).
- Spry M, Scott T, Pierce H, D'Oracio JA. DNA repair pathways and hereditary cancer susceptibility syndromes. *Frontiers in Biosciences* 12:4191-4207 (2007).
- Su JL, Yang PC, Shih JY, Yang CY, Wei LH, Hsieh CY, Chou CH, Jeng YM, Wang MY, Chang KJ, Hung MC, Kuo ML. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer Cell* 9(3):209-223 (2006).
- Sugiura T, Nakanishi H, Roberts JD. Proteolytic Processing of cGMP-Dependent Protein Kinase I Mediates Nuclear cGMP Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research* 103:53-60 (2008).
- Sung J, Demple B. Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA. *FEBS Journal* 273: 1620-1629 (2006).
- Sutherland RL, Musgrove EA. Cyclin D1 and mammary carcinoma: new insights from transgenic mouse models. *Breast Cancer Research* 4:14-17 (2002).
- Tabar L, Vitak B, Chen HHT, Yen MF, Duffy SW, Smith RA. Beyond Randomized Controlled Trials. *Cancer* 91:1724-1731 (2001).
- Takahira T, Oda Y, Tamiya S, Higaki K, Yamamoto H, Kobayashi C, Izumi T, Tateishi N, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Detection of COL1A1-PDGFB fusion transcripts and PDGFB/PDGFRB mRNA expression in dermatofibrosarcoma protuberans. *Modern Pathology* 20(6):668-675 (2007).
- Tamimi RM, Hankinson SE, Campos H, Spiegelman D, Zhang S, Colditz GA, Willett WC, Hunter DJ. Plasma carotenoids, retinol, and tocopherols and risk of breast cancer. *American Journal of Epidemiology* 161(2):153-160 (2005).
- Tan-Chiu E, Yothers G, Romond E, Geyer CE Jr, Ewer M, Keefe D, Shannon RP, Swain SM, Brown A, Fehrenbacher L, Vogel VG, Seay TE, Rastogi P, Mamounas EP, Wolmark N, Bryant J. Assessment of cardiac dysfunction in a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel, with or without trastuzumab as adjuvant therapy in node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: NSABP B-31. *Journal of Clinical Oncology* 23(31):7811-9 (2005).
- Tasheva ES, Maki CG, Conrad AH, Conrad GW. Transcriptional activation of bovine mimecan by p53 through an intronic DNA-binding site. *Biochimica Biophysica Acta* 1517(3):333-338 (2001).
- Tavassoéli, F.A., Devilee, P. FGT WHO BLUE BOOK: Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC WHO Classification of Tumours, No 4. IARC Press Lyon (2003).
- Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, Diemer K, Muruganujan A, Narechania A. PANTHER: A Library of Protein Families and Subfamilies Indexed by Function. *Genome Research* 13:2129-2141 (2003).
- Thompson LU, Chen JM, Li T, Strasser-Weippl K, Goss PE. Dietary flaxseed alters tumor biological markers in postmenopausal breast cancer. *Clinical Cancer Research* 11(10):3828-3835 (2005).

- Tian Y, Sommerville LJ, Cuneo A, Kelemen SE, Autieri MV. Expression and suppressive effects of interleukin-19 on vascular smooth muscle cell pathophysiology and development of intimal hyperplasia. *American Journal of Pathology* 173(3):901-909 (2008).
- Tomte L, Geiser AS, Hansen A, Tesche F, Herken R, Miosge N. Collagen types XII and XIV are present in basement membrane zones during human embryonic development. *Journal of Molecular Histology* 35(8-9):803-810 (2004).
- Trosko JE, Chang CC, Upham BL, Tai MH. The role of human adult stem cells and cell-cell communication in cancer chemoprevention and chemotherapy strategies. *Mutation Research* 591:187-197 (2005).
- Tsai MS, Bogart DF, Castañeda JM, Li P, Lupu R. Cyr61 promotes breast tumorigenesis and cancer progression. *Oncogene* 21(53):8178-8185 (2002).
- Tudek B. Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers. *Molecular Aspects of Medicine* 28: 258-275 (2007).
- Turashvili G, Bouchal J, Burkadze G, Kolar Z. Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis. *Pathobiology* 73(5):213-223 (2006).
- Twal WO, Czirok A, Hegedus B, Knaak C, Chintalapudi MR, Okagawa H, Sugi Y, Argraves WS. Fibulin-1 suppression of fibronectin-regulated cell adhesion and motility. *Journal of Cell Science* 114(Pt 24):4587-4598 (2001).
- Tzarfati-Majar V, Burstyn-Cohen T, Klar A. F-spondin is a contact-repellent molecule for embryonic motor neurons. *Proceedings of the National Academy Sciences USA* 10;98(8):4722-4727 (2001).
- Ushio-Fukai M, Nakamura Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Letters* 266(1):37-52 (2008).
- Vainio H, Kaaks R, Bianchini F. Weight control and physical activity in cancer prevention: international evaluation of the evidence. *European Journal of Cancer Prevention* 11(suppl.2):S94-S100 (2002).
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Tesler J. Free radicals and antioxidant in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39:44-84 (2007).
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemo-Biological Interactions* 44:1-40 (2006).
- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine* 347 (25):1999-2009 (2002).
- van Gils CH, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Boshuizen HC, Lahmann PH, Clavel-Chapelon F, Thiébaud A, Kesse E, Sieri S, Palli D, Tumino R, Panico S, Vineis P, Gonzalez CA, Ardanaz E, Sánchez MJ, Amiano P, Navarro C, Quirós JR, Key TJ, Allen N, Khaw KT, Bingham SA, Psaltopoulou T, Koliva M, Trichopoulou A, Nagel G, Linseisen J, Boeing H, Berglund G, Wirfält E, Hallmans G, Lenner P, Overvad K, Tjønneland A, Olsen A, Lund E, Engeset D, Alsaker E, Norat T, Kaaks R, Slimani N, Riboli E. Consumption of vegetables and fruits and risk of breast cancer. *JAMA* 293(2):183-193 (2005).
- Van Kuijk FJGM, Thomas DW, Stephens RJ, Dratz EA. Gas chromatography-mass spectrometry assays for lipid peroxides. *Methods in Enzymology* 186:388-398 (1990)
- Van Lint J, Ryck A, Maeda Y, Vantus T, Sturany S, Malhotra V, Vandenheede JR, Seufferlein T. Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move. *Trends in Cell Biology* 12(4):193-200 (2002).
- van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards

- R, Friend SH. Gene Expression Profiling Predicts Clinical outcome of breast cancer. Van't Veer LJ., Dai H., et al. *Letters to Nature* 415 (31): 530-535 (2002).
- Vannahme C, Gösling S, Paulsson M, Maurer P, Hartmann U. Characterization of SMOC-2, a modular extracellular calcium-binding protein. *The Biochem Journal* 373(Pt 3):805-814 (2003).
- Vaziri C, Faller DV. Repression of platelet-derived growth factor beta-receptor expression by mitogenic growth factors and transforming oncogenes in murine 3T3 fibroblasts. *Molecular Cell Biology* 15(3):1244-53 (1995).
- Vega FM, Ridley AM. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Letters* 582:2093-2101 (2008).
- Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, Gatta G, Micheli A, Mangone L, Kunkler I; EUROCORE-4 Working Group. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EUROCORE-4 data. *Lancet Oncology* 8(9):784-796 (2007).
- Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. Breast Cancer. *The Lancet* 365:1727-1741 (2005).
- Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccoczi R, Luini A, Aguilar M, Marubini E. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *New England Journal of Medicine* 347(16):1227-1232 (2002).
- Viale G, Maiorano E, Pruneri G, Mastropasqua MG, Valentini S, Galimberti V, Zurrada S, Maisonneuve P, Paganelli G, Mazzarol G. Predicting the risk for additional axillary metastases in patients with breast carcinoma and positive sentinel lymph node biopsy. *Annals of Surgery* 241(2):319-325 (2005).
- Vogel VG, Bevers T. *Sudbury, Mass Handbook of Breast Cancer Risk-Assessment. Evidence based guidelines for Evaluation, Prevention, Counseling, and Treatment.* Jones & Bartlett Publishers (2003).
- Wakefield LM, Yang Y, Dukhanina O. Transforming growth factor- $\beta$  and breast cancer. Lessons learned from genetically altered mouse models. *Breast Cancer Research* 2:100-106 (2000).
- Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, Talantov D, Timmermans M, Meijer-van Gelder ME, Yu J, Jatkoa T, Berns EM, Atkins D, Foekens JA. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *The Lancet* 365:671-679 (2005).
- Wang Y, Ma Y, Lü B, Xu E, Huang Q, Lai M. Differential expression of mimecan and thioredoxin domain-containing protein 5 in colorectal adenoma and cancer: a proteomic study. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* 232(9):1152-1159 (2007).
- Wang Z, Kong D, Banerjee S, Li Y, Adsay NV, Abbruzzese J, Sarkar FH. Down-regulation of Platelet-Derived Growth Factor-D Inhibits Cell Growth and Angiogenesis through Inactivation of Notch-1 and Nuclear Factor- $\kappa\beta$  Signaling. *Cancer Research* 67(23):11377-11385 (2007).
- Ward Y, Yap SF, Ravichandran V, Matsumura F, Ito M, Spinelli B, Kelly K. The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway. *Journal of Cell Biology* 157(2):291-302 (2002).
- Watkins G, Douglas-Jones A, Bryce R, Mansel RE, Jiang WG. Increased levels of SPARC (osteonectin) in human breast cancer tissues and its association with clinical outcomes. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids* 72(4):267-272 (2005).
- WCRF (World Cancer Research Fund): American Institute for Cancer Research Expert Panel; Food, Nutrition, and Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC (1997).
- Wei C, Li J, Bumgarner RE. Sample size for detecting differentially expressed genes in microarray experiments. *BMC Genomics*. 8;5(1):87 (2004).

- Weigelt B, Glas AM, Wessels LF, Witteveen AT, Peterse JL, van't Veer LJ. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *PNAS* 100(26):15901-15905 (2003).
- Weigelt B, Hu Z, He X, Livasy C, Carey LA, Ewend MG, Glas AM, Perou CM, Van't Veer LJ. Molecular Portraits and 70-Gene Prognosis Signature Are Preserved throughout Metastatic Process of Breast Cancer. *Cancer Research* 65(20):9155-9158 (2005).
- Weiss RB, Woolf SH, Demakos E, Holland JF, Berry DA, Falkson G, Cirrincione CT, Robbins A, Bothun S, Henderson IC, Norton L. Natural history of more than 20 years of node-positive primary breast carcinoma treated with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil-based adjuvant chemotherapy: a study by the Cancer and Leukemia Group B. *Journal of Clinical Oncology* 21(9):1825-1835 (2003).
- Welch PL, King MC. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Human Molecular Genetics* 10(7):705-713 (2001).
- Wilhelm J, Pingoud A. Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem* 4:1120-1128 (2003).
- Wilkinson S, Paterson HF, Marshall CJ. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nature Cell Biology* 7(3):255-261 (2005).
- Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 265(5181):2088-2090 (1994).
- Worsham MJ, Abrams J, Raju U, Kapke A, Lu M, Cheng J, Mott D, Wolman SR. Breast Cancer Incidence in a Cohort of Women with Benign Breast Disease from a Multi-ethnic, Primary Health Care Population. *Breast Journal* 13(2):115-121 (2007).
- Wu AH, Wan P, Hankin J, Tseng CC, Yu MC, Pike MC. Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Carcinogenesis* 23(9):1491-1496 (2002).
- Wu Y, Ferguson JE 3rd, Wang H, Kelley R, Ren R, McDonough H, Meeker J, Charles PC, Wang H, Patterson C. PRDM6 is enriched in vascular precursors during development and inhibits endothelial cell proliferation, survival, and differentiation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 44(1):47-58 (2008).
- Wynder EL, Cohen LA, Muscat JE, Winters B, Dwyer JT, Blackburn G. Breast Cancer: Weighing the evidence for a Promoting Role of Dietary Fat. *Journal of the National Cancer Institute* 89(11): 766-775 (1997).
- Xing C, Imagawa W. Altered MAP kinase (ERK1,2) regulation in primary cultures of mammary tumor cells: elevated breast activity and sustained response to EGF. *Carcinogenesis* 20(7):1201-1208 (1999).
- Xu M, Kao MC, Nunez-Iglesias J, Nevins JR, West M, Zhou XJ. An integrative approach to characterize disease-specific pathways and their coordination: a case study in cancer. *BMC Genomics* 9 Suppl 1:S12 (2008).
- Yaffe M, Hendrix S, Pike M, Santen R, Eden J, Genazzani AR. Is mammographic density, as currently measured, a robust surrogate for breast cancer?. *Gynecological Endocrinology* 21(suppl.1):17-21 (2005).
- Yamasaki H. Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11(7):1051-1058 (1990).
- Yoshida K. Fibroblast cell shape and adhesion in vitro is altered by overexpression of the 7a and 7b isoforms of protocadherin 7, but not the 7c isoform. *Cellular and Molecular Biology Letters* 8(3):735-741 (2003).
- Yoshida Y, Saito Y, Jones LS, Shigeri Y. Chemical Reactivities and Physical Effects in Comparison between Tocopherols and Tocotrienols: Physiology Significance and Prospects as Antioxidants. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104(6):439-445 (2007).

- Zhang Q, Pedigo N, Shenoy S, Khalili K, Kaetzel DM. Puralpha activates PDGF-A gene transcription via interactions with a G-rich, single-stranded region of the promoter. *Gene* 348:25-32 (2005).
- Zhang SM, Lee IM, Manson JE, Cook NR, Willett WC, Buring JE. Alcohol consumption and breast cancer risk in the Women's Health Study. *American Journal of Epidemiology* 165(6): 667-676 (2007).
- Zhang SM, Willett WC, Selhub J, Hunter DJ, Giovannucci EL, Holmes MD, Colditz GA, Hankinson SE. Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, homocysteine, and risk of breast cancer. *Journal of the national Cancer Institute* 95(5):373-380 (2003).
- Zhao Y, Chen X, Cai L, Yang Y, Sui G, Wu J. Angiotensin II suppresses adriamycin-induced apoptosis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in human breast cancer cells. *Acta Biochimica and Biophysica Singapore (Shanghai)* 40(4):304-310 (2008).
- Zhou JY, Liu Y, Wu GS. The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in oxidative damage-induced cell death. *Cancer Research* 66(9):4888-4894 (2006).
- Zimmerman R, Cerutti P. Active oxygen acts as a promoter of transformation in mouse embryo C3H/10T1/2/C18 fibroblasts. *Procedures in National Academy Sciences USA* 81:2085-2087 (1984).



**ANEXO**





## ANEXO

### Anexo I

Criterios de estadificación del cáncer de mama del *American Joint Committee*  
- Greene FL, Morrow M, Balch C, Haller D, Fritz A, Fleming I. AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed., eds. New York: Springer; 2002.-

#### Tumor primario (T)

- TX: el tumor primario no se puede evaluar
- T0: no hay prueba de tumor primario
- Tis: carcinoma intraductal, carcinoma lobular in situ o enfermedad de Paget del pezón sin invasión del tejido de normal de la mama
  - Tis (DCIS): carcinoma ductal in situ
  - Tis (LCIS): carcinoma lobular in situ
  - Tis (Paget): enfermedad de Paget del pezón sin tumor. [Nota: la enfermedad de Paget relacionada con un tumor se clasifica según el tamaño del tumor.]
- T1: tumor no mayor de 2,0 cm en su mayor dimensión
  - T1mic: microinvación no mayor de 0,1 cm en su dimensión mayor
  - T1a: tumor mayor de 0,1 cm, pero no mayor de 0,5 cm en su dimensión mayor
  - T1b: tumor mayor de 0,5 cm, pero no mayor de 1,0 cm en su dimensión mayor
  - T1c: tumor mayor de 1,0 cm pero no mayor de 2,0 cm en su dimensión mayor
- T2: tumor mayor de 2,0 cm, pero no mayor de 5,0 cm en su dimensión mayor
- T3: tumor mayor de 5,0 cm en su dimensión mayor
- T4: tumor de cualquier tamaño con extensión directa a (a) la pared torácica o (b) la piel, solo como se describe a continuación:
  - T4a: extensión a la pared torácica, sin incluir el músculo pectoral
  - T4b: edema (incluso piel de naranja) o ulceración de la piel de la mama, o ganglios satélites de la piel limitados a la misma mama
  - T4c: ambos casos T4a y T4b
  - T4d: carcinoma inflamatorio

### Ganglios linfáticos regionales (N)

- NX: no se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales (por ejemplo, fueron extraídos previamente)
- N0: no hay metástasis a ganglio linfático regional
- N1: metástasis a ganglio(s) linfático(s) axilar(es) ipsilateral(es) móvil(es)
- N2: metástasis a ganglio(s) linfático(s) axilar(es) ipsilateral(es) fijo(s) entre sí o entretejido(s), o a ganglios mamarios internos ipsilaterales clínicamente aparentes\* en ausencia de metástasis clínicamente aparente en ganglio linfático
  - N2a: metástasis en ganglios linfáticos axilares ipsilaterales fijos entre sí (entretejidos) o a otras estructuras
  - N2b: metástasis solamente en ganglios mamarios internos ipsilaterales clínicamente aparentes\* en ausencia de metástasis clínicamente aparente de ganglios linfáticos
- N3: metástasis en ganglio(s) linfático(s) infraclavicular(es) ipsilateral(es), con compromiso de ganglio linfático axilar o sin este, o en ganglio(s) mamario(s) interno(s) ipsilateral(es) clínicamente aparentes\* en presencia de metástasis clínicamente aparente de ganglio linfático axilar clínicamente evidentes o metástasis en ganglio(s) linfático(s) supraclavicular(es) ipsilateral(es), con compromiso de ganglio linfático mamario axilar o interno, o sin este
  - N3a: metástasis en ganglio(s) linfático(s) infraclavicular(es) ipsilateral(es)
  - N3b: metástasis en ganglio(s) linfático(s) mamario(s) interno(s) ipsilaterale(s) y ganglio(s) linfático(s) axilar(es)
  - N3c: metástasis en ganglio(s) linfático(s) supraclavicular(es) ipsilateral(es)

\* Nota: clínicamente aparente se define como lo detectado mediante estudios de imaginología (excluyendo la linfoescintigrafía) o por medio de examen clínico, o si su aspecto patológico es marcadamente visible.

### Metástasis distantes (M)

- MX: no se puede evaluar la presencia de metástasis a distancia
- M0: no hay metástasis a distancia
- M1: metástasis a distancia

## Anexo II

### Criterios de inclusión.1

#### Categoría funcional del Grupo Oncológico Cooperativo del Este

- De Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group.. American Journal of Clinical Oncology 5:649-655 (1982).-

Clasificación	Descripción
0	Completamente activo, capaz de ejecutar todas las actividades igual que antes de la enfermedad y sin ninguna limitación.
1	Limitado para la actividad física agotadora pero capacitado para efectuar un trabajo ligero o sedentario, por ejemplo, tareas domésticas livianas o trabajo de oficina.
2	Ambulatorio y con capacidad de autonomía pero sin posibilidad de realizar ningún trabajo. Pasa levantado más de la mitad de las hoas del día.
3	Autonomía limitada, pues se encuentra confinado a la camao al sillón más de la mitad de las horas del día.
4	Totalmente incapacitado. No puede cuidar de sí mismo. Confinado a la cama o al sillón por completo

## Criterios de inclusión.2

### Criterios para la evaluación de la respuesta de los tumores sólidos (RECIST)

- Therasse 2000 Measuring the clinical response. What does it mean?. European Journal of Cancer 38(14):1817-23 (2002)-

#### Medición de las lesiones tumorales en condiciones basales:

- Lesiones medibles: Lesiones que pueden ser medidas con exactitud en una dimensión. Como mínimo el diámetro longitudinal máximo debe medir  $\geq 20$  mm con las técnicas convencionales.
- Lesiones no medibles: Cualquier otra lesión, incluidas las de pequeño tamaño (diámetro longitudinal máximo  $< 20$  mm con las técnicas convencionales o  $> 10$  mm con la TC helicoidal) y lesiones verdaderamente no medibles. Entre estas últimas se encuentran las siguientes: lesiones óseas, enfermedad leptomenígea, ascitis, derrame pleural o pericárdico, enfermedad inflamatoria de la mama, linfangitis cutánea o pulmonar, masas abdominales no confirmadas ni vigiladas mediante técnicas de imagen y lesiones quísticas.

#### Documentación de las lesiones diana y sin carácter diana en condiciones basales:

Todas las mediciones tumorales se anotarán en centímetros con una regla o calibre. Todas las elevaciones basales se analizarán lo más próximo posible al momento del inicio del tratamiento, pero nunca más de 28 días antes.

Diana: Toda lesión medible, hasta un máximo de 5 lesiones por órgano y 10 lesiones en total, representativa de todos los órganos afectados, será identificada como lesión diana y medida en condiciones basales. Las lesiones diana serán elegidas en función de su tamaño (lesiones con diámetro y longitud máximos), bien con técnicas de imagen o por exploración clínica. Si la enfermedad medible se limita a una lesión solitaria, su naturaleza neoplásica será confirmada mediante un examen citológico o histológico.

## Criterios de inclusión.3

Fórmula estándar de Cockcroft y Gault para el cálculo de la aclaramiento de creatinina (ACr)

Esta fórmula es utilizada para calcular el ACr sólo a partir de los datos del laboratorio del Hospital Médico-Quirúrgico del Complejo Hospitalario de Jaén.

- Si la concentración de creatinina sérica se mide en mg/ml:

$$\text{ACr (ml/min)} = \frac{(140-\text{edad}) \times \text{peso} \times 0,85^*}{72 \times \text{creatinina sérica (mg/ml)}}$$

- Si la concentración de creatinina sérica se mide en  $\mu\text{mol/l}$ :

$$\text{ACr (ml/min)} = \frac{(140-\text{edad}) \times \text{peso} \times 0,85^*}{72 \times \text{creatinina sérica (\mu mol/ml)}}$$

Edad en años

Peso en Kg

\* este factor sería 1 para hombres

Criterios de inclusión.4  
**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN DE TEJIDOS Y/O MUESTRAS  
BIOLÓGICAS PARA INVESTIGACIÓN**

Nº HISTORIA	Tfn		
Don/Doña		de	años de edad.
(Nombre y apellidos del paciente)			
con domicilio en	y D.N.I nº		
Don/Doña		de	años de edad.
(Nombre y apellidos)			
con domicilio en	y D.N.I nº		
en calidad de	de		
(Representante legal, familiar o allegado)	(Nombre y apellidos del paciente)		

## DECLARO

Que el DOCTOR/A DON/DOÑA (Nombre y apellidos del facultativo que proporciona la información) me propone un procedimiento consistente en DONAR, AL BANCO DE TUMORES, UNA MUESTRA DE SANGRE, TEJIDO Y/O CÉLULAS SOBRANTES Y UTILIZARLOS CON FINES DE INVESTIGACIÓN.

1. Se me ha explicado que el Hospital Universitario Médico-Quirúrgico de Jaén, dispone de un Banco de Tumores, con la finalidad de recoger, procesar y almacenar muestras de tejidos, células y/o fluidos humanos procedentes de pacientes con tumores. Estas muestras, constituyen una pieza clave en el desarrollo de la actividad asistencial, docente e investigadora del hospital, pero al mismo tiempo pueden servir para promocionar la investigación oncológica, entre hospitales y centros de investigación tanto de ámbito nacional como internacional, en temas tan diversos como la prevención, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer.  
Los proyecto de investigación, estudios docentes o de carácter científico y las investigaciones con dichas muestras de tejidos o fluidos pueden incluir el descubrimiento, testado o producción de fármacos y métodos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Dicho material puede ser apropiado para la realización de tests genéticos con el objetivo de determinar si el genotipo/fenotipo tiene alguna conexión con la enfermedad del cáncer.
2. Se me ha informado que durante la intervención diagnóstica/quirúrgica/terapéutica a la que he sido ó voy a ser sometido se tomarán muestras de mis tejidos y/o células para el correcto diagnóstico histopatológico de mi enfermedad. Se me propone la donación, al banco de Tumores, de una muestra de sangre, tejido y/o células sobrantes, sin que ello suponga ningún riesgo añadido para mi salud, para que sean utilizados con fines de investigación.
3. Se me ha manifestado que yo no recibiré ninguna compensación económica ni otros beneficios por donar mis tejidos y/o células excedentes, sin embargo si las investigaciones tuvieran éxito, podría ayudar en el futuro a pacientes que tienen la misma enfermedad que yo o padecen otras enfermedades similares.  
La donación de mis tejidos y/o células excedentes en ningún caso supondrá un riesgo añadido para mi salud.  
Las muestras de los tejidos y/o células no serán vendidos o distribuidos a terceros con fines comerciales.

4. También se me ha comunicado que las muestras de mis tejidos y/o células excedentes se conservarán en el Banco de Tumores durante el plazo establecido en la legislación y estarían disponibles para futuras investigaciones sobre el cáncer. Estas futuras investigaciones podrían incluir la realización de pruebas adicionales con mis muestras de tejidos y/o células.
5. Se me ha manifestado que la información sobre mis datos personales y de salud serán incorporados y tratados en una base de datos informatizada del Centro. Toda la información que se obtenga será tratada con carácter confidencial, cumpliendo con las garantías que establece la Ley de Protección de Datos de carácter Personal y la legislación sanitaria. Asimismo se me ha informado que tengo la posibilidad de ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición al tratamiento de datos de carácter personal, en los términos previstos en la normativa aplicable.  
La cesión a otros centros de investigación o a compañías farmacéuticas de mis muestras de tejidos y/o células excedentes o de la información contenida en las bases de datos vinculada a las mismas y a mi estado de salud, se realizarán mediante un procedimiento de disociación por el que se generará un código de identificación que impida que se me pueda identificar directa o indirectamente. No se transmitirá fuera del Centro ninguna información que pueda identificarme personalmente.  
Si en cualquier momento decidiera revocar el consentimiento que ahora presto, la parte de las muestras de tejidos y/o células que no se hayan utilizado en la investigación, será destruida y no será utilizada en ninguna investigación después de la fecha en que haya retirado mi consentimiento, si bien, los datos obtenidos de mis muestras hasta ese momento seguirán formando parte de la investigación.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.

Comprendo que mi donación es voluntaria, y que puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que repercuta en mis cuidados médicos.

Por ello, manifiesto que estoy satisfecho con la información recibida.

Y en tales condiciones

## CONSIENTO

en DONAR MIS TEJIDOS Y/O CÉLULAS EXCEDENTES PARA INVESTIGACIÓN

En

(Lugar y fecha)

Fdo: El/la Médico

Fdo: El Paciente



## Anexo III

### ÍNDICE DE FIGURAS

Página

- Figura 1. *Mapas de incidencia y mortalidad del cáncer de mama a nivel mundial.*
- Figura 2. *Secuencia de imágenes que ilustran la transformación oncogénica y esquema de los principales eventos que la acompañan*
- Figura 3. *Esquema de la ruta de señalización intracelular activada por el RE*
- Figura 4. *Esquema de la cascada de señalización intracelular activada por los factores de crecimiento de la familia EGF*
- Figura 5. *Proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular y su interacción con los genes supresores de tumores*
- Figura 6. *A) Carcinoma lobulillar in situ de mama; B) Carcinoma ductal in situ de mama*
- Figura 7. *A) Carcinoma ductal infiltrante; B) Carcinoma lobulillar infiltrante; C) Carcinoma ductal infiltrante mucinoso; D) Enfermedad de Paget*
- Figura 8. *Riesgo de recurrencia en 15 años tras el diagnóstico de cáncer de mama*
- Figura 9. *Resumen de los principales radicales libres en los sistemas biológicos*
- Figura 10. *Esquema del mecanismo de reparación por escisión de bases nitrogenadas de fragmento corto y largo.*
- Figura 11. *Magnitud del efecto carcinogénico frente a la concentración de radicales libres durante los tres estadios de la carcinogénesis.*
- Figura 12. *Principales rutas de transducción de señales activadas por los factores de crecimiento celulares, citoquinas e interleuquinas.*
- Figura 13. *Esquema del análisis con microarrays de ADNc.*
- Figura 14. *Etapas del análisis con microarrays de oligonucleótidos.*
- Figura 15. *Fases exponencial y de meseta durante el transcurso de una reacción de PCR con diluciones seriadas de una misma muestra.*
- Figura 16. *Esquema de una reacción TaqMan*
- Figura 17. *Perfiles de expresión génica de 78 carcinomas mamarios, 3 tumores benignos y 4 muestras de tejido mamario normal.*
- Figura 18. *Clasificación de los tumores de mal y buen pronóstico tras el análisis supervisado.*
- Figura 19. *Análisis Kaplan-Meier de la probabilidad de 151 pacientes de permanecer libres de metástasis con respecto al tiempo según las estimaciones de la firma de Ámsterdam (A), los criterios de St. Gallen (B) y los criterios del NIH (C).*
- Figura 20. *Integración de las firmas genéticas de Ámsterdam y Wound response.*
- Figura 21. *Agrupamiento jerárquico de los genes correlacionado con la respuesta al docetaxel.*
- Figura 22. *(A) Relación entre el valor del algoritmo RS y el riesgo de recurrencia de la enfermedad en 10 años. (B) Probabilidad de permanecer libre de enfermedad a lo largo del tiempo para los tres grupos de riesgo descritos por el algoritmo RS.*
- Figura 23. *Esquema de recogida de muestras biológicas y distribución de las participantes en los grupos experimentales y el grupo control.*
- Figura 24. *Esquema de la recogida de muestras de tejido y su procesamiento según el tipo de análisis a realizar. QT, quimioterapia; AP, anatomopatológico; IHQ, inmunohistoquímica.*
- Figura 25. *Pieza quirúrgica durante el examen intraoperatorio*
- Figura 26. *Material necesario para la obtención de preparaciones histológicas a partir de muestras de tejido mamario incluidas en bloques de parafina.*
- Figura 27. *Microscopio óptico para el análisis histopatológico de las muestras de tejido mamario*
- Figura 28. *Batería de soluciones para la tinción hematoxilina-eosina*
- Figura 29. *Esquema del protocolo empleado en la técnica de comet alcalino*
- Figura 30. *Ejemplo de la clasificación de una lista de genes efectuada por PANTHER según proceso biológico*
- Figura 31. *Ejemplo de la clasificación de una lista de genes efectuada por DAVID*
- Figura 32. *Daño oxidativo en ADN de linfocitos de sangre periférica de pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas.*
- Figura 33. *Actividad de los enzimas KU86 y RPA en pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas.*
- Figura 34. *Concentración de proteínas carbonilo en el plasma de pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y*

*metastásicas*

Figura 35. *Concentración de TBARS en el plasma de pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas*

Figura 36. *Capacidad antioxidante total del plasma de pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas.*

Figura 37. *Concentración de retinol y tocoferol en el plasma de pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas.*

Figura 38. *Concentración de Coenzima Q10 total en el plasma de pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas.*

Figura 39. *Visualización de los ARNs extraídos por electroforesis en gel de agarosa*

Figura 40. *Comprobación en el Bioanalyzer de algunos de los ARNs purificados.*

Figura 41. *Visualización de los ARNs fragmentados por electroforesis en gel de agarosa*

Figura 42. *Control de calidad tras ajustar el modelo lineal. Gráficas NUSE representando el error estándar de cada sonda en cada chip en cada uno de los experimentos.*

Figura 43. *Fuentes de variación causantes de las diferencias entre las muestras en base a la media del estadístico F.*

Figura 44. *Dos visiones de PCA no supervisado*

Figura 45. *Cluster jerárquico no supervisado de muestras realizado a partir de la lista de trabajo (9940 secuencias).*

Figura 46. *Dos visiones de PCA supervisado.*

Figura 47. *Cluster jerárquico supervisado de muestras y genes realizado a partir de la lista de secuencias  $p < 0.05$  Final vs Inicial (3326 secuencias)*

Figura 48. *Procesos biológicos más representativo en que el programa Panther clasificó los genes de nuestra lista de resultados.*

Figura 49. *Esquema de los mecanismos moleculares por los que PDGF y otros factores proangiogénicos tumorales, inducen la activación de las células endoteliales a través de de la cascada de señalización mediada por VEGF.*

Figura 50. *Esquema de la localización y rutas celulares en las que intervienen genes relacionados con la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis, cuya expresión se haya negativamente modulada por la quimioterapia*

Figura 51. *Esquema de las cascadas de señalización oncogénica implicadas en el crecimiento, supervivencia, invasión y resistencia a fármacos de las células madre tumorales.*

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. *Principales factores de riesgo asociados al desarrollo de un carcinoma de mama*

Tabla 2. *Características terapéuticas de los grupos experimentales N, A y M.*

Tabla 3. *Parámetros clínicos y bioquímicos analizados en pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas.*

Tabla 4. *Curva estándar de BSA para la cuantificación de proteínas nucleares*

Tabla 5. *Curva estándar de TROLOX para la determinación de la capacidad antioxidante total del plasma*

Tabla 6. *Códigos clínicos y códigos genómicos para cada muestra*

Tabla 7. *Significado de los sufijos de los códigos de las sondas*

Tabla 8. *Descripción de las muestras utilizadas en el análisis.*

Tabla 9. *Características clínicas de la población de estudio al diagnóstico*

Tabla 10. *Parámetros bioquímicos en pacientes neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas.*

Tabla 11. *Cuantificación de los elementos celulares y tisulares de las biopsias previas al tratamiento con quimioterapia.*

Tabla 12. *Cuantificación de los elementos celulares y tisulares de las biopsias posteriores al tratamiento con quimioterapia.*

Tabla 13. *Porcentaje de células neoplásicas respecto del total de elementos celulares en las biopsias previas y posteriores al tratamiento*

Tabla 14. *Medida de la pureza y concentración del ARN total extraído*

Tabla 15. *Medida de la concentración y pureza de los ARNs tras la purificación*

Tabla 16. *Valores de los parámetros de calidad para cada uno de los chips analizados*

Tabla 17. *Valores en porcentaje del parámetro indicador de la calidad de los datos en los microarrays*

Tabla 18. *Códigos originales y códigos para análisis genómico de las biopsias que completaron el*

Página

*análisis de expresión génica*

Tabla 19. *Resumen del resultado del análisis estadístico*

Tabla 20. *Lista de genes Final vs Inicial, obtenida tras la aplicación del test de corrección múltiple de "Bonferroni".*

Tabla 21. *Clasificación en rutas según el programa Panther.*

Tabla 22. *Clasificación en funciones moleculares según el programa Panther.*

Tabla 23. *Clasificación en procesos biológicos según el programa Panther.*

Tabla 24. *Clasificación en función molecular según el programa David*

Tabla 25. *Clasificación en procesos biológicos según el programa David*