



UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

**Evaluación del potencial terapéutico
antitumoral de nuevos merosesquiterpenos
sintéticos**

Esther Carrasco Pardo

Granada 2014

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Esther Carrasco Pardo
ISBN: 978-84-9125-004-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/39511>

La doctoranda Esther Carrasco Pardo y los directores de la tesis Fernando Rodríguez Serrano, Pablo Juan Álvarez Aránega y Antonia Aránega garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 24 de Octubre de 2014

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.: Fernando Rodríguez Serrano

Fdo.: Esther Carrasco Pardo

Fdo.: Pablo Juan Álvarez Aránega

Fdo.: Antonia Aránega Jiménez

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes **revistas** científicas:

- Carrasco E, Álvarez PJ, Melguizo C, Prados J, Álvarez-Manzaneda E, Chahboun R, Messouri I, Vázquez-Vázquez MI, Aránega A, Rodríguez-Serrano F. Novel merosesquiterpene exerts a potent antitumor activity against breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. European Journal of Medicinal Chemistry. 2014, 79, 1-12. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.03.071.
- Carrasco E, Álvarez PJ, Prados J, Melguizo C, Rama AR, Aránega A, Rodríguez-Serrano F. Cancer stem cells and their implication in breast cancer. European Journal of Clinical Investigation. 2014, 44, 678-687. DOI: 10.1111/eci.12276.
- Carrasco E, Garrido JM, Álvarez PJ, Álvarez-Manzaneda E, Chahboun R, Messouri I, Melguizo C, Aránega A, Rodríguez-Serrano F. Meroxest improves the prognosis of immunocompetent C57BL/6 mice with allografts of E0771 mouse breast tumor cells. Archives of Medical Science. 2014. Accepted. DOI: 10.5114/aoms.2014.45442.

Y han sido presentados en las siguientes **reuniones** científicas:

- Rodríguez-Serrano F, Carrasco E, García-Cazorla Y, Prados J.C., Álvarez P, Chahboun R, Vélez C, Ortiz R, Álvarez-Manzaneda E, Aránega A. Novel marine sponge-related merosesquiterpenes exert a potent antitumor effect *in vitro* and *in vivo* mediated by cell cycle blockage, oxidative stress and apoptosis. XXVI Congreso de la Sociedad Anatómica Española (Fuerteventura, España). Septiembre, 2013.
- Carrasco E, Leiva MC, Álvarez-Manzaneda E, Chahboun R, Messouri I, Cabeza L, Álvarez P, Rama A, Rodríguez-Serrano F. Nuevos merosesquiterpenos ejercen una potente actividad antitumoral frente células de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo* mediante inducción de estrés oxidativo, bloqueo del ciclo celular y apoptosis. I Congreso Multidisciplinar Jóvenes Investigadores (Granada, España). Febrero, 2014.

**A mis padres,
hermana y
abuelos**

Agradecimientos

Son tantas las personas que me han ayudado y apoyado tanto laboral como personalmente durante todos estos años que llegados a este punto me faltan palabras para expresar mi agradecimiento.

Quiero comenzar dando las gracias a mis directores de tesis. A la doctora Aránega por haberme abierto las puertas de su laboratorio y permitido hacer esta tesis bajo su dirección, por su amabilidad y confianza en mí. Al doctor Rodríguez-Serrano, gracias por haberme permitido trabajar a su lado en este bonito proyecto, y por su dedicación, gran ayuda y apoyo a pesar de las dificultades. Y al doctor Álvarez por el apoyo recibido durante la realización de este trabajo.

Al grupo de Química Orgánica de la Universidad de Granada, y de una forma especial a los profesores Enrique Álvarez-Manzaneda y Rachid Chahboun, así como a Ibtissam Messouri, cuya colaboración ha sido fundamental para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, gracias por vuestra ayuda y consejos durante todos estos años. Gracias por los buenos momentos vividos dentro y fuera del laboratorio, y por ese buen ambiente de trabajo, porque trabajar con una sonrisa siempre lo hace todo más fácil.

A Maribel, mi predecesora en este trabajo, gracias por dejarme continuar con él, sé lo duro que fue para ti.

A mis “niños de máster”, gracias por vuestra ayuda, y sobre todo por todos esos buenos momentos que hacían el trabajo mucho más ameno y divertido.

A aquellos que empezaron siendo compañeros de laboratorio, y que han terminado siendo grandes amigos. Gracias y mil veces gracias, por vuestra ayuda cuando compartíamos trabajo, pero sobre todo por vuestro apoyo en los malos momentos,

porque me hicisteis sentir que no estaba sola y porque sin vosotros esto hubiera sido mucho más difícil de llevar. Gracias.

A mis antiguas compañeras de piso y amigas de Granada, porque a vuestro lado comenzó todo. Gracias por tantas horas de estudio, risas y diversión. Gracias por vuestra amistad.

A mis amigos de Huércal, los de toda la vida, porque a pesar de la distancia siempre estáis ahí. Gracias por todos los buenos momentos vividos, y por todos los que nos quedan por vivir.

A mi familia, los Pardos, gracias por ser una familia tan bonita, por estar siempre ahí, tanto en los buenos como en los malos momentos. No sabéis lo orgullosa que estoy de teneros a todos y cada uno de vosotros en mi vida. Gracias por tantos buenos momentos, por lo feliz que me hacéis sentir cuando estamos juntos y por ser únicos. Me vais a permitir que nombre al primo Jose Luis, porque además de por todo lo anterior tengo que darle las gracias por su ayuda en esta tesis, porque como ya sabéis es un artista. Un recuerdo especial para mis abuelos, porque como decía mi hermana, disfrutaban de nuestros logros como si fueran suyos, y por eso hoy sé que haya donde estén se sentirán felices y orgullosos.

A mis padres, gracias por vuestro amor y apoyo incondicional siempre. Porque sé que en algunos momentos de estos años lo habéis pasado mal y habéis hecho todo lo que ha estado en vuestras manos y más para ayudarme y no permitir que me rindiera. Gracias porque sin vosotros hoy no estaría aquí. Esta tesis es tan vuestra como mía.

A mi hermana, gracias nena por compartir esta vida en Granada conmigo, por no dejarme sola y estar ahí siempre que te he necesitado. Gracias por tu alegría y por aguantar mis manías, sobre todo estos últimos meses. Y gracias también a Joaquín, porque él también ha tenido que sufrirme, y lo que le queda...

A Jose, porque tú eres el que más ha sufrido mis nervios y agobios y siempre has estado ahí dispuesto a escucharme y animarme. Gracias por tu apoyo, cariño y comprensión. Gracias por todos estos años.

En definitiva, gracias a todos, los que de una manera u otra han estado a mi lado durante todo este tiempo, porque sin todos vosotros esto no hubiera sido posible.

“Si al franquear una montaña en la dirección de una estrella, el viajero se deja absorber demasiado por los problemas de la escalada, se arriesga a olvidar cual es la estrella que lo guía.”

Antoine de Saint-Exupery

INDICE

GLOSARIO	1
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	9
1. ESTRUCTURA Y BIOLOGÍA DEL TEJIDO MAMARIO	11
1.1. Anatomía de la Mama.....	11
1.2. Histología de la mama	12
1.3. Desarrollo y modificaciones de la mama	14
1.3.1. Modificaciones durante el ciclo menstrual.....	15
1.3.2. Modificaciones durante embarazo y lactancia.....	15
1.3.3. Involución postmenopáusica	16
2. CÁNCER	17
2.1. Definición.....	17
2.2. Características generales	17
2.3. Progresión tumoral	23
2.4. Genética del cáncer.....	25
2.4.1. Proto-oncogenes.....	25
2.4.2. Genes supresores de tumores.....	28
2.4.3. Genes reparadores del ADN.....	31
2.4.4. Susceptibilidad genética al cáncer	31
2.5. Modelos sobre el origen del cáncer	32
2.5.1. Modelo de evolución clonal.....	33
2.5.2. Modelo de las células madre tumorales	34
2.6. Tipos de tumores.....	35
2.6.1. Cáncer de pulmón.....	36
2.6.2. Cáncer de colon.....	39
3. CÁNCER DE MAMA	41
3.1. Incidencia, prevalencia y mortalidad.....	41
3.2. Etiología y factores de riesgo.....	43
3.2.1. Edad y sexo	44
3.2.2. Factores genéticos y familiares.....	44
3.2.3. Factores hormonales y reproductivos	45
3.2.4. Factores ambientales.....	46
3.2.5. Patología benigna de la mama.....	48
3.2.6. Antecedentes personales de cáncer	48
3.3. Diagnóstico.....	49
3.4. Pronóstico.....	50
3.4.1. Factores clinicopatológicos	51
3.4.2. Factores moleculares.....	52
3.5. Clasificación del cáncer de mama	55
3.6. Tratamiento	57
4. CÉLULAS MADRE TUMORALES	60

4.1. Características generales	62
4.2. Aislamiento y caracterización	67
4.3. Marcadores específicos de células madre tumorales de mama	68
5. CICLO CELULAR	70
5.1. Definición.....	70
5.2. Fases del ciclo celular	71
5.3. Regulación del ciclo celular	72
5.3.1. Quinasas dependientes de ciclina (CDKs)	73
5.3.2. Ciclinas	76
5.3.3. Inhibidores de CDKs	78
5.4. Ciclo celular y cáncer.....	80
6. APOPTOSIS.....	81
6.1. Definición.....	81
6.2. Mecanismos moleculares de la apoptosis	82
6.3. Apoptosis en células tumorales	84
7. ESTRÉS OXIDATIVO.....	87
7.1. Definición.....	87
7.2. Radicales libres	87
7.3. Antioxidantes	88
7.4. Daño oxidativo en las estructuras celulares.....	90
7.5. Estrés oxidativo y cáncer.....	91
8. COMPUESTOS NATURALES Y SUS DERIVADOS CON PROPIEDADES ANTITUMORALES.....	93
8.1. Compuestos naturales de origen vegetal.....	94
8.2. Compuestos naturales aislados de microorganismos.....	96
8.3. Compuestos naturales de origen marino	98
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	101
RESULTADOS.....	105
PAPER 1. Novel merosesquiterpene exerts a potent antitumor activity against breast cancer cells <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>.....	107
PAPER 2. Meroxest improves the prognosis of immunocompetent C57BL/6 mice with allografts of E0771 mouse breast tumor cells.	143
PAPER 3. Cancer stem cells and their implication in breast cancer	163
DISCUSIÓN.....	189
CONCLUSIONES.....	211
BIBLIOGRAFÍA.....	215

GLOSARIO

-
- 4-HNE: Trans-4-hidroxi-2-noenal
 - 5-Fu: 5-Fluorouracilo
 - ADN: Ácido desoxirribonucleico
 - ALDH: Aldehído Deshidrogenasa
 - ARN: Ácido ribonucleico
 - ATRA: Ácido trans-retinoico
 - BCSC: Células madre tumorales de mama, del inglés “breast cancer stem cells”
 - BER: Vía de reparación de errores por escisión de bases
 - BODIPY: Boron-dipirrometano
 - CA4P: Combretastatina A4 fosfatada
 - CC: National Institutes of Health Clinical Center
 - CDK: Quinasa dependiente de ciclinas, del inglés “cyclin-dependent kinase”
 - CKI: Inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas, del inglés, “cyclin-dependent kinase inhibitor”
 - CSC: Células madre tumorales, del inglés “cancer stem cells”
 - DEAB: Dietil amino benzoaldehído
 - DHh: Desert Hedgehog
 - DISC: Complejo de la señal inductora de muerte
 - EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
 - EGF: Factor de crecimiento epidérmico, del inglés “epidermal growth factor”
 - EGFR: Receptor de EGF
 - ER: Receptor de estrógenos
 - EMT: Transición epitelio-mesenquimal, del inglés “epithelial-mesenchymal transition”
 - FDA: Food and Drug Administration: Agencia de Alimentos y Medicamentos
 - HER2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2
 - Hh: Hedgehog
 - HIF-1: Factor inducible por hipoxia, del inglés “hypoxia-inducible factor 1”
 - IC₅₀: Concentración inhibitoria 50, del inglés “inhibitory concentration 50”

-
- IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo1, del inglés “insulin-like growth factor-1”
 - Ihh: Indian Hedgehog
 - LMA: Leucemia linfocítica aguda
 - MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos, del inglés “mitogen activated protein kinase”
 - MDA: malondialdehidos
 - MET: Transición mesenquimal-epitelial, del inglés “mesenchymal-epithelial transition”
 - NAC: N-acetil cisteína
 - NER: Vía de reparación de errores por escisión de nucleótidos
 - Nrp1: Neuropilin-1
 - OMS: Organización Mundial de la Salud
 - PAF: Poliposis adenomatosa familiar
 - PARP: Poli (ADP-ribosa) polimerasa
 - PBS: Tampón fosfato salino, del inglés “phosphate-buffered saline”
 - PR: Receptor de progesterona
 - Pth1: Receptor transmembrana Patched1
 - RNS: Especies reactivas de nitrógeno, del inglés “reactive nitrogen species”
 - ROS: Especies reactivas de oxígeno, del inglés “reactive oxygen species”
 - SHh: Sonic Hedgehog
 - Smo: Proteína transmembrana smoothed
 - TGF β : Factor de crecimiento transformante β , del inglés “transforming growth factor”
 - TI: Índice terapéutico, del inglés “therapeutic index”
 - TNF: Factor de necrosis tumoral, del inglés “tumor necrosis factor”
 - TNF α : Factor de necrosis tumoral α
 - TNFR1: Receptor del factor de necrosis tumoral 1
 - VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés “vascular endothelial growth factor”

RESUMEN

Durante miles de años se han utilizado compuestos naturales y sus derivados como fuente de agentes terapéuticos contra todo tipo de enfermedades. Por lo que no es de extrañar que hayan servido también como agentes antitumorales, y de hecho, muchos de ellos se encuentran actualmente dentro del repertorio estándar de quimioterapia. Debido a ello, el objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar las propiedades antitumorales, tanto *in vitro* como *in vivo* de una nueva familia de merosesquiterpenos sintéticos derivados del ácido trans-comúnico, muy abundante en *Cupressus sempervirens*.

Estos compuestos demostraron una potente actividad citotóxica frente líneas celulares humanas de cáncer de mama, colon y pulmón; destacando el compuesto 13 o meroxest, con una gran actividad y especificidad frente a la línea de cáncer de mama ER⁺ MCF-7. La actividad antitumoral de meroxest estuvo mediada por producción de estrés oxidativo, bloqueo del ciclo celular en las fases G₀-G₁ e inducción de apoptosis. Además parece inhibir la transición epitelio-mesenquimal, un fenómeno asociado con metástasis y mal pronóstico.

Los buenos resultados obtenidos *in vitro* nos motivaron a analizar el efecto de meroxest *in vivo*, lo que nos permitió demostrar que nuestro compuesto inhibe de forma muy importante el desarrollo de tumores en ratones C57BL/6 con aloinjertos de células murinas de cáncer de mama ER⁺ E0771.

Tras ello caracterizamos los tumores desde el punto de vista histopatológico y además analizamos el efecto de meroxest sobre el pronóstico de la enfermedad. Los tumores presentaron una cápsula bien definida que encierra una masa formada por las células tumorales, donde la zona central se corresponde con una región necrótica con abundante infiltración leucocitaria. Además, aparecen con frecuencia tumores con diseminación hacia los tejidos circundantes. El tratamiento con meroxest indujo cambios en la estructura de los tumores, disminuyendo el grado de infiltración leucocitaria, y reduciendo significativamente la expresión de los marcadores pronóstico Ki67 y VEGF.

En la actualidad, la teoría de las células madre tumorales (CSCs) sobre el origen del cáncer es la más aceptada. Las CSCs son células tumorales con capacidad de auto-renovación y diferenciación implicadas en el origen y progresión del cáncer y parecen ser responsables de la metástasis, las recaídas y de los fallos en el tratamiento. Además, su presencia se asocia con mal pronóstico. En consecuencia, estas células presentan importantes implicaciones clínicas, por lo que conocer los mecanismos que controlan su actividad nos permitiría desarrollar nuevas pruebas diagnósticas y terapias más efectivas, mejorando así el pronóstico de los pacientes.

Los tratamientos antitumorales actuales se dirigen contra la masa tumoral pero generalmente no eliminan a las CSCs, siendo necesarias terapias específicas frente a ellas. Por ello, son numerosos los autores que se encuentran investigando nuevas dianas con este fin. Además, es necesario el desarrollo de ensayos clínicos para poder aplicar este nuevo conocimiento en el ámbito terapéutico. Sin embargo, hasta la fecha, y en el caso concreto de CSCs de mama, existen pocos ensayos clínicos sobre terapias frente a ellas.

En conclusión, meroxest podría ser de gran utilidad en el tratamiento del cáncer de mama debido a la potente actividad antitumoral que presenta y a la mejora que produce en el pronóstico de la enfermedad. Por lo tanto, y debido a la importancia clínica que presentan las CSCs, sería de gran interés estudiar el efecto que produce meroxest sobre estas células.

INTRODUCCIÓN

1. ESTRUCTURA Y BIOLOGÍA DEL TEJIDO MAMARIO

1.1. Anatomía de la Mama

La glándula mamaria es un órgano ubicado en el pecho, formado por tejido epitelial, conjuntivo y graso, que se encarga de producir la leche materna, fluido necesario para la nutrición, desarrollo y protección del recién nacido. A diferencia de otros órganos, que adquieren un estado relativamente maduro durante el desarrollo embrionario, requiere un período más prolongado para alcanzar su completo desarrollo y maduración funcional, que en la mujer se alcanza en la pubertad y en relación con el embarazo y la lactancia. Por el contrario, en el hombre, al carecer de los estímulos biológicos necesarios, permanece durante toda la vida como un órgano rudimentario. En la mujer, las mamas sufren cambios importantes en su composición, arquitectura y funcionalidad a lo largo de las diferentes etapas de la vida: desarrollo fetal, nacimiento, infancia, pubertad, madurez, embarazo, lactancia y menopausia (Welsch, 2014; Hassiotou y Geddes, 2013).

Las mamas humanas se localizan en el tórax dentro de la región pectoral, entre la piel y el músculo pectoral mayor, apoyándose dos tercios aproximadamente de su superficie sobre él, y una tercera parte en el serrato mayor, y en la porción superior de los músculos oblicuos y recto del abdomen (Lemaine y Simmons, 2013).

La glándula mamaria de una mujer joven, completamente desarrollada, tiene forma de segmento de esfera, que se encuentra adaptada a la pared torácica a ambos lados de la región esternal y que se extiende verticalmente desde la segunda a la sexta costilla inclusive y horizontalmente desde el esternón a la línea axilar media (Hunt y cols., 2011). Presenta una prolongación axilar conocida como cola de Spence. En su porción más prominente se encuentra el pezón, una formación papilar de superficie irregular en cuyo vértice desembocan los conductos galactóforos. Alrededor del pezón aparece la areola, una zona cutánea de 3 a 5 cm

de diámetro, hiperpigmentada y de aspecto rugoso con múltiples glándulas sebáceas y sudoríparas apocrinas. En su periferia aparecen unas elevaciones nodulares llamadas tubérculos de Morgagni, formados por las aberturas de las glándulas de Montgomery (Lemaine y Simmons, 2013).

La forma, el contorno y el tamaño de los pechos varían significativamente entre unas mujeres y otras en función del volumen de tejido mamario, factores genéticos, estado nutricional y funcional o patológico. Además, los pechos de una mujer raramente son simétricos, suele ser uno más grande o más alto que el otro, e incluso tener una forma ligeramente diferente. En cuanto a la forma, tamaño y características del pezón aparecen también muchas variaciones entre mujeres. El pezón puede estar continuamente erecto o sólo cuando se estimula. Algunas mujeres también pueden presentar el pezón invertido, lo cual no es motivo de preocupación, a no ser que sea un cambio (Bellenir, 2009).

1.2. Histología de la mama

Las glándulas mamarias son glándulas tubuloalveolares ramificadas que derivan de la epidermis y que se ubican en el tejido celular subcutáneo. En términos generales no son más que una glándula cutánea modificada. Esta glándula exocrina es de secreción apocrina, y posee capacidad para responder a estímulos hormonales. Está constituida por tres componentes, que al corte y de fuera hacia dentro son: envoltura cutánea, tejido conjuntivo adiposo y tejido glandular o glándula mamaria propiamente dicha (Welsch, 2014).

Aunque cada mama se considera como una unidad secretora única, en realidad está compuesta por unos 15-25 lóbulos, cada uno de los cuales contiene una glándula independiente, separados entre sí por tejido conectivo interlobular denso y grasa. Si bien los lóbulos son unidades independientes no están finamente separadas, ya que presentan cierto entrecruzamiento. Cada uno de estos lóbulos tiene su propio conducto excretor, el conducto galactóforo, que desemboca en el

pezón. A nivel de la areola, este conducto se ensancha formando el seno lactífero, el cual sirve como reservorio de leche. Cada lóbulo se compone de numerosos lobulillos, los cuales están formados por tejido conectivo laxo intralobulillar y una ramificación del conducto galactóforo conocido como conducto terminal. Estos conductos, a su vez, se ramifican dando lugar a los conductillos intralobulares. Cada lobulillo con su correspondiente conducto terminal representa la unidad funcional de la mama o unidad ducto-lobulillar terminal. Sin embargo, la mayor parte de la masa mamaria está constituida por tejido adiposo (Welsch, 2014; Márquez y Ordi, 2012).

La pared de los conductos está recubierta por dos capas de epitelio celular. Una capa interior de células epiteliales cúbicas, algunas de las cuales, normalmente las del conducto terminal, tienen la capacidad de diferenciarse a células secretoras de leche (lactocitos) durante la lactancia. Y una capa basal o externa de células mioepiteliales contráctiles con propiedades de células del músculo liso. Esta capa basal podría contener células madre mamarias (Visvader, 2009).

La piel que recubre la mama, salvo en la areola y el pezón, es un tejido cutáneo normal, formado por epidermis, epitelio plano poliestratificado queratinizado, y dermis papilar y reticular, situado sobre un tejido conjuntivo denso irregular con vasos y nervios. En la areola y en el pezón, la piel es más delgada, formada por un epitelio plano estratificado que contiene papilas dérmicas muy altas, que dejan translucir la sangre capilar, lo que confiere un color rosado en la areola de niños y personas de tez clara. Con la pubertad y el embarazo esta piel se pigmenta, debido a la estimulación de los melanocitos producida sobre todo por los estrógenos. Tanto a nivel de la areola como del pezón aparece una importante musculatura lisa, cuya contracción produce la erección del pezón, lo que favorece la salida de la leche materna durante la lactancia (Welsch, 2014).

La mama que hemos definido aquí es una mama en reposo, de una mujer adulta en edad fértil, pero no embarazada ni lactante.

1.3. Desarrollo y modificaciones de la mama

La embriogénesis de la glándula mamaria comienza entre las 18 y 19 semanas de vida intrauterina y su diferenciación es un proceso gradual. El mayor crecimiento se produce durante la pubertad con la formación lobular, pero su completo desarrollo y diferenciación sólo ocurre al final del primer embarazo a término (Russo, 2014). Durante el periodo neonatal se produce la secreción láctea, fruto de la estimulación producida por la prolactina materna. Tras la lactancia se da una involución, volviendo la mama al estado de reposo, del cual puede salir si vuelve a quedar embarazada. El completo desarrollo de la mama durante la lactancia es crítico para que la cantidad y composición de la leche materna sea la apropiada. Además, este desarrollo parece proteger contra el cáncer de mama a largo plazo cuando ocurre a una edad inferior de los 30, y con un intervalo menor de 14 años entre la menarquía y el primer embarazo. Aunque aún no se conoce bien porque ocurre esto, parece ser que el embarazo y la lactancia producen cambios permanentes en la mama que ejercerían ese efecto protector (Hassiotou y Geddes, 2013).

Al inicio del desarrollo de la mama aparecen las líneas mamarias que en los humanos involucionan y quedan como un botón epitelial epidérmico profundo en la zona pectoral. Éste va creciendo y forma unos 20 botones secundarios que se canalizan y ramifican, representando cada uno de ellos el primordio de un lóbulo mamario. En el nacimiento la mama es rudimentaria y la mayoría de veces presenta una hipertrofia transitoria, debido a la influencia de las hormonas maternas que se resuelve en los primeros meses de vida. Durante la infancia el tejido mamario permanece en reposo, y en los varones queda así durante toda su vida, mientras que en las niñas al llegar a la pubertad sigue su desarrollo, apareciendo así el dimorfismo sexual (Colvin y Abdullatif, 2013; Welsch, 2014).

El desarrollo funcional de la mama ocurre durante la pubertad, y depende de la estimulación hormonal. Dentro de las hormonas implicadas en este proceso cabe

destacar los estrógenos, imprescindibles para el crecimiento y desarrollo del sistema ductal; la progesterona, necesaria para el crecimiento lobulillar y la prolactina, que se encuentra implicada en ambos procesos (Márquez y Ordi, 2012).

En la pubertad comienza el desarrollo mamario secundario o telarquia, impulsado por la ovulación y el establecimiento del ciclo menstrual. El aumento de tamaño del pecho se debe principalmente a un incremento del tejido adiposo dentro de la glándula, causado por los esteroides ováricos, los cuales también son responsables de la pigmentación de la areola y del pezón. Además se producen cambios epiteliales en los conductos existentes que permiten el desarrollo definitivo de los lóbulos mamarios. Este proceso comienza con la menarquía, y el desarrollo epitelial continúa gradualmente durante la adolescencia hasta los 35 años aproximadamente (Hassiotou y Geddes, 2013).

1.3.1. Modificaciones durante el ciclo menstrual

En la mama en reposo, se observan una serie de cambios cíclicos, orquestados por los cambios hormonales que ocurren a lo largo del ciclo menstrual. Durante la fase lútea del ciclo menstrual se da un aumento de tamaño, y durante el periodo premenstrual se da un aumento de sensibilidad, densidad y nodularidad. Entre las diferencias cíclicas encontramos la presencia de la actividad mitótica en las células epiteliales durante la fase proliferativa, apareciendo un estroma denso y luces colapsadas en los ductos, mientras que en la fase postovulatoria no hay actividad mitótica, y aparece un estroma edematoso y luces abiertas. El progresivo incremento de los estrógenos es, en parte, responsable del proceso de edematización (Márquez y Ordi, 2012).

1.3.2. Modificaciones durante embarazo y lactancia

Durante el embarazo la mama sufre una serie de cambios, aumentando su tamaño de una manera muy rápida, sobre todo en las primeras ocho semanas de

gestación, caracterizado por una expansión de los lobulillos y reducción del estroma interlobular. El pezón se prepara para la producción de leche, volviéndose más largo y erecto. Estos cambios se producen como consecuencia de un aumento en los niveles de estrógenos y progesterona que producen, respectivamente, un aumento de la ramificación ductal y del tejido glandular (Bellenir, 2009; Márquez y Ordi, 2012).

Durante el segundo trimestre de gestación se produce un cúmulo progresivo de material de secreción. La principal hormona responsable de la producción de leche es la prolactina, la cual empieza a producirse a partir de la octava semana de gestación y va aumentando constantemente hasta llegar a su máximo en el momento del nacimiento. Los altos niveles de estrógenos y progesterona bloquean algunos de los receptores de prolactina inhibiendo así la producción de leche hasta el nacimiento (Bellenir, 2009).

Tras el nacimiento, los niveles de estrógenos y progesterona disminuyen, y gracias a la acción de la oxitocina se produce la secreción de la leche, que ocurre entre los tres y cinco días después de haber dado a luz. Cuando el recién nacido succiona el pezón estimula la producción y liberación de la leche, gracias a la acción de la prolactina y de la oxitocina, respectivamente (Bellenir, 2009).

En la mama lactante se aprecian de forma muy marcada los cambios gestacionales junto con un aumento de la vacuolización de las células epiteliales y de la secreción luminal. Estos cambios inician su regresión entre los siete y diez días tras el final de la lactancia, pero la mama no vuelve a su completo estado de reposo hasta los tres o cuatro meses siguientes (Márquez y Ordi., 2012).

1.3.3. Involución postmenopáusica

Tras la menopausia, debido a la disminución en la secreción ovárica de estrógenos y progesterona, se produce una involución de los elementos parenquimatosos.

Disminuye el número de acinos glandulares, se atrofian y atenúan las células epiteliales, se engrosa la membrana basal y el estroma periductal se transforma en un tejido denso. Y ya a una edad avanzada el tejido graso desaparece por completo (Márquez y Ordi, 2012).

2. CÁNCER.

2.1. Definición

El cáncer, también denominado tumor maligno o neoplasia, engloba a un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo y descontrolado de las células de un tejido u órgano, que se originan a partir de una única célula, y las cuales son capaces de difundirse a otros tejidos del cuerpo a través del sistema vascular sanguíneo y linfático (Laso, 2010).

Presenta una gran incidencia y es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, con 14,1 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes en 2012, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Ferlay y cols., 2013).

2.2. Características generales

Las células tumorales sufren una serie de alteraciones esenciales en su fisiología que les llevan a adquirir un fenotipo maligno. Según Hanahan y Weiberg (Hanahan y Weinberg, 2000, 2011) existen seis características principales que describen a las células tumorales:

1. Autonomía en la producción de señales de crecimiento.

En los tejidos normales la proliferación está muy controlada por señales de crecimiento, de manera que en ausencia de ellas las células se mantienen en un estado quiescente. Sin embargo, las células tumorales son capaces de desregular estas señales, produciendo las suyas propias y manteniendo así una proliferación crónica. Se ha visto que muchos oncogenes pueden actuar imitando estas señales. La adquisición de esta autonomía fue la primera característica definida claramente y es un rasgo fundamental de las células tumorales (Hanahan y Weinberg, 2011).

Existen tres vías principales por las que las células tumorales adquieren esta autonomía. Por un lado son capaces de producir y liberar mitógenos intrínsecos, que actúan de manera autocrina o paracrina estimulando la proliferación. También son capaces de alterar la expresión y las propiedades de receptores y canales iónicos de la superficie celular, haciéndolas más sensibles a los factores de crecimiento. Y finalmente, el mantenimiento de la señalización proliferativa puede ser debido a la desregulación de las vías de señalización o a una expresión constitutiva de alguno de los componentes de estas vías, haciendo que no sea necesaria la unión del ligando al receptor para comenzar la división celular (Prevarskaya y cols., 2010).

2. Evasión de los mecanismos supresores del crecimiento.

En la regulación de la proliferación, además de existir señales de crecimiento, existen reguladores antiproliferativos, muchos de los cuales dependen de la acción de genes supresores de tumores como Rb o p53. Entre las principales señales inhibitoras del crecimiento encontramos el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), que actúan a través de la unión a su receptor de superficie, activando así vías de señalización intracelular que culminarán con la expresión de diferentes genes, cuya acción final será detener la proliferación. Por lo tanto, para mantener su proliferación, las células tumorales deben también eludir estas señales a través de diversas estrategias.

Generalmente lo consiguen por pérdida de la función de los genes supresores de tumores gracias a mutaciones, o bien por modificación de las rutas de señalización (Bernstein y cols., 2013; Prevarskaya y cols., 2010).

3. Evasión de la apoptosis.

La capacidad de una población celular de expandirse depende tanto de la tasa de proliferación como de la de muerte celular. Y en esta última, la apoptosis o muerte celular programada juega un papel muy importante. La apoptosis se desencadena en respuesta a diversas señales, como el estrés fisiológico que se da en las células tumorales, por lo que serviría como una barrera natural contra el cáncer, sin embargo, muchas de estas células son capaces de evitar esta respuesta permitiendo a la población expandirse (Paul, 2014).

Existen tres mecanismos principales por los que las células tumorales evaden la apoptosis: desequilibrio entre las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, función reducida de las caspasas y deficiencias en la señalización de los receptores de muerte (Sankari y cols., 2012).

4. Inmortalidad replicativa.

Casi todos los tipos celulares tienen un programa autónomo que limita su replicación, es decir, tienen un número limitado de ciclos de replicación tras los cuales entran en senescencia y muerte celular. Está ampliamente aceptado que las células tumorales tienen que evadir esta barrera y adquirir un potencial de replicación ilimitado para poder dar lugar a un tumor macroscópico (Hanahan y Weinberg, 2011).

La capacidad de proliferación está mediada por los telómeros, unos elementos cromosómicos esenciales para la replicación y protección de los extremos de los cromosomas. En células en proliferación, los telómeros se acortan de forma

progresiva, llegando un momento en el que se da una detención irreversible del crecimiento, dando como resultado lo que se conoce como senescencia celular. Los telómeros serían como “un reloj” que marca el tiempo de vida celular. La mayoría de las células tumorales consiguen la inmortalidad replicativa gracias a la reactivación de los mecanismos que permiten mantener la longitud de los telómeros. Esto lo consiguen mediante la sobreexpresión de la telomerasa, que es la enzima encargada del mantenimiento de los telómeros, y que en el caso de células somáticas diferenciadas se encuentra reprimida (Diotti y Loayza, 2011).

5. Inducción de angiogénesis.

Al igual que los tejidos normales, los tumores necesitan oxígeno y nutrientes así como evacuar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono, y para ello necesitan generar vasos sanguíneos. El proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis no se da en condiciones normales en el adulto, activándose sólo de forma transitoria en algunas situaciones como la curación de heridas. Por ello, la angiogénesis es esencial para el desarrollo y evolución del cáncer, ya que tanto para el crecimiento tumoral como para la metástasis son necesarios nuevos vasos sanguíneos. En la angiogénesis tumoral se originan nuevos vasos a partir de los preexistentes, pero son vasos heterogéneos y desorganizados que presentan anormalidades en su estructura y función (Benazzi y cols., 2014).

Para el desarrollo de este proceso se da un desequilibrio entre las señales inductoras e inhibitoras de la angiogénesis, lo que permite que el proceso esté continuamente activado, formándose nuevos vasos que permitan la expansión del tumor. Entre las señales inductoras, la más importante es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que con frecuencia se encuentra altamente expresado en tumores. En general, existen tres mecanismos por los que esta señal se encuentra activa en los tumores humanos. La hipoxia es el principal factor inductor de angiogénesis, el factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) alcanza el núcleo donde

induce la expresión de factores angiogénicos. También puede ocurrir una desregulación en la producción de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) o TGF- β , que conduce a la producción de VEGF, o mutaciones en las señales de proliferación celular que activen la expresión de VEGF. Pero no sólo las células tumorales están implicadas en este proceso, sino que también participan células del estroma y células madre tumorales (Alevizakos y cols., 2013; Dimova y cols., 2014).

6. Capacidad de invadir tejidos y metástasis.

Durante el desarrollo tumoral algunas células sufren alteraciones en su forma y en la expresión de moléculas relacionadas con la adhesión intercelular y con la matriz extracelular, lo que les permite romper la membrana basal e invadir el estroma circundante. Tras ello pueden pasar a los vasos sanguíneos o linfáticos cercanos, lo que les permite diseminarse a otras partes del cuerpo y formar allí colonias donde el espacio y los nutrientes no estarían limitados. La metástasis es un proceso complejo, en el que están implicadas diferentes proteínas de adhesión y proteasas que varían en función del órgano de localización. Es un marcador de la agresividad del tumor, y por tanto de mal pronóstico, ya que se estima que es la responsable del 90 % de las muertes por cáncer (Chang y Erler, 2014; Gilkes y cols., 2014).

A estas seis características se le han añadido reciente dos nuevas capacidades más, como son la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la respuesta inmune (figura 1).

Para mantener una proliferación incontrolada, además de la desregulación de su control, es necesario un ajuste metabólico que permita la producción de la energía necesaria para un continuo crecimiento (Hanahan y Weinberg, 2011). Las células tumorales tienen unos requerimientos energéticos diferentes a los de las células

normales, y los suplen consumiendo nutrientes diferentes y utilizando diferentes vías metabólicas. Otto Warburg fue uno de los primeros autores en demostrar el metabolismo anómalo de las células tumorales, ya que observó que muchas de estas células podían metabolizar la glucosa y producir lactato independientemente de la disponibilidad de oxígeno por un proceso conocido como glucólisis anaeróbica (Butler y cols., 2013; Vander Heiden, 2011; Warburg, 1956).

Por otro lado, el sistema inmune es el responsable de reconocer y eliminar las células tumorales incipientes, evitando así que se formen los tumores. Sin embargo, no siempre ocurre así, por lo que las células que forman los tumores han tenido que desarrollar diversos mecanismos que les permiten evadir el ataque y posterior eliminación por parte de las células del sistema inmune (Hanahan y Weinberg, 2011).

Además, las células tumorales presentan otra serie de propiedades que son las responsables de la aparición del resto de características mencionadas anteriormente, como son alta inestabilidad genómica, las altas tasas de mutación y la capacidad de inducir respuestas inflamatorias (Hanahan y Weinberg, 2011).

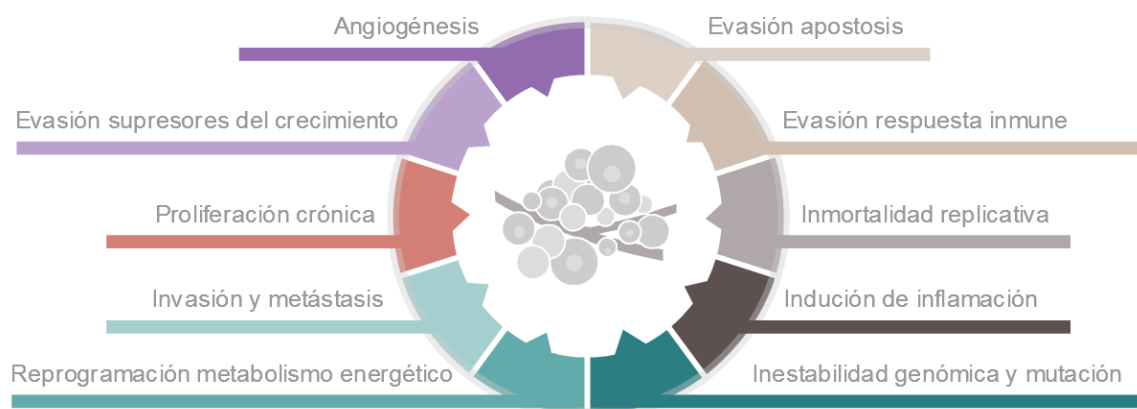


Figura 1. Características generales de las células tumorales (Modificada de Hanahan y Weinberg, 2011)

2.3. Progresión tumoral

El proceso de desarrollo del cáncer o carcinogénesis es un proceso escalonado en el cual las células sufren una serie de cambios metabólicos y de comportamiento que les llevan a una proliferación excesiva, y finalmente a invadir tejidos distantes. Durante este proceso, en primer lugar ocurre la transformación neoplásica, también denominada tumorigénesis u oncogénesis. En ella una célula sufre una alteración genética que provoca su proliferación incontrolada y la de las células que derivan de ella (proliferación clonal), es decir, se transforma en una célula maligna con capacidad de producir un tumor. Estas células van creciendo produciéndose la progresión tumoral, durante la cual, las células sufren una serie de cambios genéticos y epigenéticos, y adquieren diferentes características fenotípicas. Entre ellas, destacan la resistencia al tratamiento o la capacidad de nutrirse mediante angiogénesis, y que van acompañados de una pérdida progresiva de la homeostasis del tejido y de cambios en su arquitectura, pudiendo culminar en la invasión del parénquima por parte de las células tumorales y la consiguiente metástasis a órganos distantes (Boyle y Levin, 2008; Kumar y Weaver, 2009; Laso, 2010).

En el proceso de metástasis, la célula tumoral debe adquirir propiedades invasivas que le permitan emigrar desde el tumor primario a la sangre o sistemas vasculares linfáticos por medio de la remodelación o destrucción de la membrana basal. Estas células, que reciben el nombre de células circulantes, son capaces de sobrevivir en el sistema sanguíneo o linfático, y migrar por ellos hasta llegar a un sitio secundario distante, donde ocurre la extravasación gracias a la adhesión a las células endoteliales seguida de la degradación de la matriz. Esto permite a las células invadir el tejido secundario, estableciendo así micrometástasis, las cuales pueden crecer y originar tumores secundarios macroscópicos y clínicamente evidentes (Bersini y cols., 2014; Gunasinghe y cols., 2012; Talbot y cols., 2012).

El mecanismo exacto por el cual una célula tumoral no invasiva adquiere capacidad metastásica aún no se conoce bien, pero hay muchas pruebas que apoyan la teoría de la transición epitelio-mesenquimal (EMT). Las células epiteliales se relacionan mediante uniones adherentes formadas por la proteína E-cadherina, una proteína transmembrana, que se une al citoesqueleto de actina mediante β -catenina, lo que proporciona una estructura rígida a las células. (Gunasinghe y cols, 2012; Wang y Zhou, 2011)

Durante EMT, las células epiteliales pierden los contactos célula-célula, y ganan propiedades de células mesenquimales, incluyendo la morfología fibroblástica y la adquisición de propiedades migratorias y móviles, que serían las responsables de la rotura de la membrana basal y de la capacidad de emigrar a zonas distantes. A nivel molecular se caracteriza por una pérdida de marcadores epiteliales como E-cadherina y un aumento de marcadores mesenquimales como son N-cadherina o vimentina. De hecho, la característica principal de EMT es la disminución de E-cadherina. EMT es un proceso fundamental para embriogénesis y desarrollo, así como para la cicatrización de heridas, pero recientemente se ha relacionado su activación patológica con la progresión tumoral y la metástasis (Smit y Peeper, 2010; Talbot y cols., 2012).

El papel de EMT sobre la invasión y metástasis viene respaldado por numerosos estudios. Por ejemplo, en muestras de pacientes con cáncer de colon se ha demostrado que la pérdida de β -catenina se asocia con un fenotipo más agresivo e invasivo. En muestras de pacientes con cáncer de mama se han podido relacionar mutaciones en el gen que codifica para E-cadherina con la infiltración celular que se encuentra en algunos carcinomas lobulales. También en el caso del cáncer de mama, se ha encontrado una asociación entre el aumento de inhibidores de E-cadherina como Slug y Snail con un aumento de migración e invasión. Además, células tumorales circulantes de sangre de pacientes de cáncer de mama normalmente muestran un fenotipo EMT. Una vez establecida la metástasis, parece ser que las células vuelven a adquirir marcadores epiteliales, como la

expresión de E-cadherina, por lo que se ha propuesto que estas células experimentarían un proceso opuesto a EMT, conocido como transición mesenquimal-epitelial (MET) (Cheung y Ewald, 2014; Steinestel y cols., 2014).

2.4. Genética del cáncer

El cáncer se considera como una enfermedad genética, ya que puede aparecer tras mutaciones somáticas surgidas a lo largo de la vida o bien debido a una susceptibilidad genética del individuo (Boyle y Levin, 2008). La mayoría de las alteraciones del ADN incluyen cambios en la secuencia nucleotídica, es decir, mutaciones. Éstas pueden ser el resultado de la exposición a carcinógenos, de errores de replicación aleatorios o de defectos en el proceso de reparación del ADN (Longo, 2012).

Generalmente una única mutación no es capaz de transformar una célula normal en una tumoral, haciendo falta múltiples mutaciones que suelen afectar a tres tipos de genes: proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN.

2.4.1. Proto-oncogenes

Fueron los primeros genes en asociarse al cáncer. Juegan un papel importante en el desarrollo humano normal y en el mantenimiento de órganos y tejidos, ya que codifican proteínas involucradas en ciclo celular, proliferación, diferenciación y muerte celular (apoptosis). Sin embargo, su expresión descontrolada o la de sus formas mutadas denominadas oncogenes, altera estos procesos dando lugar a la transformación maligna. Por tanto, los proto-oncogenes son genes que cuando sufren una alteración pueden contribuir al desarrollo del cáncer. La conversión de un proto-oncogen en oncogen ocurre por mutaciones o alteraciones que aumentan su nivel de expresión o de actividad. Estas mutaciones son dominantes, y pueden

ser de tres tipos: puntuales, amplificaciones génicas o translocaciones cromosómicas (Chial, 2008; Lodish, 2013).

La expresión de oncogenes puede ser necesaria para el inicio del cáncer, pero también para su mantenimiento, por lo que muchos investigadores se han centrado en ellos como dianas específicas contra la enfermedad. En estudios con roedores se ha visto que cuando se expresan oncogenes hay una alta frecuencia en la aparición de tumores, pero cuando este estímulo es eliminado se produce una regresión. Sin embargo, en humanos no ocurre lo mismo, y de hecho terapias basadas en este fenómeno fallan a la hora de erradicar los tumores. Por lo tanto parece que no sería posible revertir la tumorigénesis en humanos inactivando los genes defectuosos que la causaron (Vicente-Dueñas y cols., 2013).

Unos de los primeros oncogenes descubiertos, hace ya más de treinta años, son miembros de la familia de proteínas Ras, que codifican para unas pequeñas GTPasas monoméricas. Los genes Ras desempeñan una función importante en la activación de la ruta de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), implicada en los procesos de proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte celular (Aoki y cols., 2008). Dentro de esta familia encontramos tres isoformas: K-Ras, H-Ras, y N-Ras. Más de un 30% de los tumores humanos presentan mutaciones en alguno de estos genes, predominando las alteraciones en K-Ras. Además, estas mutaciones suelen aparecer durante las primeras etapas del proceso tumoral, lo que indica que K-Ras podría tener un papel importante en la tumorigénesis humana (Fernández-Medarde y Santos, 2011).

Otro grupo importante de oncogenes es el formado por factores de crecimiento y sus receptores. Dentro de estos encontramos la familia de receptores ErbB, relacionada con receptores tirosina quinasa: EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) y HER4 (ErbB-4). Estos receptores se encuentran implicados en desarrollo embrionario, renovación y reparación de tejidos, así como en el

cáncer. Todos los miembros de esta familia están implicados en la activación de la ruta de señalización de las MAPK, así como en las rutas fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)/AKT y mTOR, rutas implicadas en proliferación y supervivencia (Papanastopoulos, 2014; Sheng y Liu, 2011).

La desregulación de la ruta de señalización ErbB se ha relacionado con varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama, donde promueve procesos tumorales como la angiogénesis o la metástasis, y lo que se asocia en términos generales con un peor pronóstico (Eccles, 2011; Lurje y Lenz, 2009; Sheng y Liu, 2011). Los cuatro miembros de esta familia se ven sobreexpresados en distinto grado en el cáncer de mama, pero los más importantes son HER2 (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2) y EGFR (receptor de EGF).

HER2 aparece sobreexpresado en un 20-25% de los cánceres de mama y está asociado con un peor pronóstico (Eccles, 2011). De hecho, hay un subtipo molecular de cáncer de mama que se caracteriza por ser HER2 positivo, y que presenta alto riesgo de recurrencia y resistencia a muchos tipos de terapia. En el caso de EGFR se le asocia con un mayor tamaño tumoral, una peor diferenciación y un mal pronóstico. Aunque aparece sobreexpresado en todos los tipos de cáncer de mama, es más frecuente en los cánceres de mama triple negativo y en los inflamatorios (Masuda y cols., 2012).

Entre los factores de transcripción oncogénicos, encontramos la familia Myc, siendo c-Myc el representante más importante. Éste regula la proliferación celular y controla la expresión de gran cantidad de genes, algunos de los cuales están implicados en apoptosis y senescencia (Zimonjic y Popescu, 2012). c-Myc posee un dominio de cremalleras de leucina mediante el cual interacciona con Max (miembro de la familia Myc) formando un heterodímero necesario para activar la transcripción, y así promover proliferación celular y apoptosis (Tu y cols., 2014). Su nivel de expresión está cuidadosamente regulado y se induce a nivel transcripcional en respuesta a factores de crecimiento, nutrientes y estímulos

mitogénicos. La regulación inapropiada de su expresión es uno de los eventos más frecuentes en los tumores humanos (Dang, 2012; Shortt y Johnstone, 2012).

2.4.2. Genes supresores de tumores

Son genes que codifican proteínas inhibitoras de la proliferación celular, ya sea por una parada del ciclo celular o por la inducción de apoptosis; por tanto, su denominación es algo incorrecta, ya que su función en sí misma no es la de suprimir la formación de tumores. Un déficit en estas proteínas supondrá una pérdida del control sobre la proliferación celular, desencadenando el proceso de carcinogénesis (Laso, 2010).

Uno de los genes supresores de tumores más estudiados es p53, conocido como el “guardián del genoma”, ya que se le atribuye el papel de mantener la integridad del genoma celular y es esencial en la regulación de la respuesta al estrés celular (Lane, 1992). Su función principal es controlar que no haya daños en el material genético ni en los mecanismos de división celular antes de que ésta ocurra. En respuesta a daños genotóxicos, p53 estimula procesos de reparación y mecanismos protectores, e induce una parada en el ciclo celular y/o la promoción de la apoptosis, actuando para ello como un factor de transcripción o bien como un regulador proteico de numerosas rutas de señalización (Donehower, 2014).

En función del daño, p53 determina el destino de la célula, parando el ciclo celular y reparando el ADN o causando la muerte celular cuando el daño no puede ser reparado. Aún no se sabe bien como p53 dirige un destino u otro, pero parece ser que está influenciado por los propios niveles de p53; niveles bajos se relacionan con una parada del ciclo celular, mientras que niveles altos lo hacen con apoptosis. Además se sabe que p53 presenta mayor o menor afinidad por distintas zonas de unión al ADN. Esto determina una hipótesis en la que el destino celular estaría marcado tanto por los niveles de p53 como por su afinidad a las zonas de unión.

De esta manera, los inductores de genes de alta actividad, que son los que coducen a la detención del ciclo celular, se activarían ante bajos niveles de p53 y bajos niveles de estrés; mientras que los genes de alta afinidad, que serían los que promueven la apoptosis, necesitarían mayor activación de p53 y mayor estrés. De acuerdo con esto, se ha demostrado que los genes implicados en la parada del ciclo celular se inducen a tiempos más tempranos que aquellos implicados en apoptosis (Carvajal y Manfredi, 2013; Yoshida y Miki, 2010).

En condiciones normales, p53 es una proteína de vida corta que se encuentra a bajos niveles en la célula gracias a su regulador negativo, la proteína Mdm2. Esta proteína inhibe a p53 por un bloqueo estérico del dominio de transactivación de p53, o gracias a su función como ubiquitina quinasa específica de p53, promoviendo su ubiquitinización y la subsiguiente degradación proteosomal. Esta unión induce la expresión de Mdm2, que sigue promoviendo la degradación de p53, es decir, se forma un bucle Mdm2-p53 de acción constante que mantiene los niveles basales de p53 bajos. Sin embargo, cuando la célula se somete a condiciones de estrés, sobre todo aquellas que puedan dañar el ADN, p53 se activa rápidamente por la ruptura de la unión p53-Mdm2. La proteína p53 que se va acumulando sufre modificaciones postraduccionales que aumentan su estabilidad y modulan su función como factor de transcripción. Una vez estabilizado pasa al núcleo donde activa o reprime la transcripción de muchos genes implicados en la regulación de las principales respuestas celulares al estrés, tales como ciclo celular, reparación ADN, senescencia y apoptosis (Carvajal y Manfredi, 2013; Levav-Cohen y cols., 2014; Levine y Oren, 2009).

Las mutaciones de p53 son las más frecuentemente encontradas en las neoplasias humanas, y alrededor del 50 % de tumores humanos las presentan. Mediante la inhibición de p53 y miembros de su familia, estas mutaciones confieren susceptibilidad al cáncer, contribuyendo a la transformación, metástasis y resistencia a fármacos. El 74 % de estas mutaciones son de sentido erróneo del dominio central de unión al ADN, afectando a la estabilidad termodinámica del

dominio de unión. Muchas afectan a los aminoácidos involucrados en el reconocimiento específico del ADN inactivando la función de p53, mientras que otras se localizan en zonas distantes, inactivando la función de p53 por defectos en la conformación proteica (Goh y cols., 2011; Polager y Ginsberg, 2009).

Otro supresor de tumores importante es el gen del retinoblastoma (Rb), el cual toma su nombre del cáncer infantil en el que se identificó por primera vez. Es una de las proteínas clave en la regulación del ciclo celular, ya que controla la transición de la fase G₁ a la fase S a través de la interacción con la familia de factores de transcripción E2F (Yang y cols., 2014b). Estos factores de transcripción tienen la función de activar genes necesarios para el inicio de la fase S, pero su unión con Rb inhibe su función y garantiza que no pueda iniciarse la fase S. La presencia de factores de crecimiento, permite la inactivación de Rb gracias a su fosforilación por medio del complejo CDK (quinasa dependiente de ciclinas)/ciclina D1, quedando E2F libre para activar la transcripción de genes del ciclo celular, dentro de los cuales encontramos genes reguladores como los de la ciclina D1. En la mayoría de cánceres aparece una desregulación de la ruta Rb, ya sea por mutación del gen Rb, desregulación de ciclina D1 o CDK, o por inactivación de inhibidores de CDK tales como p15, p16, p21o p27, entre otros (Lee y Muller, 2010; Talluri y Dick, 2012).

Otros genes supresores de tumores importantes son BRCA1 y BRCA2, ambos implicados en la respuesta al estrés celular a través de procesos de reparación del ADN. BRCA1 parece además estar implicado en otros procesos celulares, tanto a nivel nuclear como citoplasmático, participando en replicación del ADN o en regulación de la transcripción de proteínas, así como en la regulación de la división celular, reorganización del citoesqueleto, apoptosis e incluso reparación del ADN mitocondrial. Mutaciones en estos genes están relacionadas con la aparición de diferentes tipos de cáncer, sobre todo con el de mama (Alanee y cols., 2014; Paul y Paul, 2014).

2.4.3. Genes reparadores del ADN

Los genes reparadores del ADN codifican proteínas cuya función es corregir los errores que aparecen en la duplicación del ADN de las células antes de que se dividan. Mutaciones en estos genes pueden provocar un fallo en la reparación de errores del ADN, lo que puede permitir la acumulación de mutaciones que acabarían desencadenando el proceso canceroso. Se conocen alrededor de 150 genes de este tipo, aunque seguramente su número será mayor debido a que muchos de los genes conocidos tienen, aún, función desconocida (Gu y cols., 2011a).

Hay dos vías principales para la reparación de errores, una es la de reparación por escisión de nucleótidos (NER) y otra es la reparación por escisión de bases (BER). NER es necesaria para eliminar alteraciones de gran magnitud presentes en el ADN, que han sido inducidos por agentes genotóxicos. El proceso reparador se realiza a través de múltiples pasos en los que se dan interacciones entre 20-30 proteínas, incluyendo las proteínas del xeroderma pigmentoso A (XPA) y D (XPD). La vía BER elimina diferentes tipos de daño en las bases, incluyendo rotura de hebras simples, daño oxidativo o alquilación del ADN. (Lavender y cols., 2010). La endonucleasa APE1 humana es una de las principales proteínas implicadas en esta ruta, actuando como fosfodiesterasa para iniciar la reparación de rupturas en la cadena de ADN. Pero también tiene un papel como activador transcripcional de numerosos factores de transcripción implicados en el desarrollo del cáncer (Kelley y cols., 2012; Zhou y cols., 2011).

2.4.4. Susceptibilidad genética al cáncer

Entre un 5 y un 10 % de los casos de cáncer tienen su origen en un componente hereditario (Banks y cols., 2012). Estos síndromes familiares siguen patrones de herencia mendelianos, pero en este caso lo que se transmite a la descendencia no es la enfermedad propiamente dicha, sino una predisposición genética que

aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad (Pomerantz y Freedman, 2011). Defectos en los genes supresores de tumores son una de las causas más comunes de los síndromes de cáncer familiar. Generalmente se hereda un alelo defectuoso del gen, por lo que para el desarrollo del tumor sería necesaria sólo la inactivación al azar del otro alelo, o mayoritariamente por mecanismos genéticos que promuevan la pérdida de heterocigosidad (Hunt y cols., 2014; Laso, 2010; Pomerantz y Freedman, 2011).

El cáncer hereditario se distingue clínicamente en base al historial familiar en el que varios individuos de diferentes generaciones aparecen afectados de cáncer. Además, en los individuos predispuestos, la enfermedad suele aparecer a una edad más temprana que en el caso esporádico y suelen presentar múltiples tumores primarios. Estas neoplasias suelen ser de un tipo concreto dentro de la familia, pero también pueden encontrarse otro tipo de tumores o incluso un conjunto de diferentes tumores, tanto en un individuo concreto como dentro del historial familiar (Hunt y cols., 2014).

2.5. Modelos sobre el origen del cáncer

Una característica común a todos los tipos de tumores es la gran variabilidad celular que aparece dentro de un único tumor. Estas células se diferencian en características como el tamaño, la morfología, la expresión de antígenos o la composición de la membrana, así como en comportamientos tales como la tasa de proliferación, la interacción célula-célula, el potencial metastásico o la sensibilidad a la quimioterapia. Esta heterogeneidad intratumoral complica el estudio y tratamiento del cáncer, y para explicarla se han propuesto diferentes teorías (Campbell y Polyak, 2007; Hwang-Verslues y cols., 2012; Russnes y cols., 2011).

Durante varias décadas han coexistido dos hipótesis sobre el origen del cáncer (figura 2). Una de ellas postula que una célula somática diferenciada puede adquirir propiedades cancerosas gracias a un proceso de desdiferenciación o

reprogramación, mientras que la otra sostiene que el proceso carcinogénico se inicia a partir de una célula madre adulta. Si bien, ambas hipótesis comparten algunas similitudes, son conceptos diferentes, lo que conlleva, especialmente, diferentes implicaciones clínicas. Aunque hay estudios que apoyan tanto una hipótesis como la otra, en la actualidad existen mayores evidencias a favor de la hipótesis de las células madre tumorales (Hwang-Verslues y cols., 2012; Trosko, 2009).

2.5.1. Modelo de evolución clonal

El modelo de evolución clonal o modelo estocástico fue propuesto por primera vez por Nowell en 1976 (Nowell, 1976) cuando observó que en los tumores, a medida que avanzan, se da una pérdida de las características y propiedades de diferenciación. Esto lo interpretó como un mecanismo para mejorar su capacidad de proliferación e invasión, que podía ser debido a presiones selectivas dentro del propio tumor. Según este modelo, los tumores proceden de una única célula, la cual sufre diversas mutaciones que le proporcionan una ventaja selectiva con respecto a las células adyacentes.

A medida que esta célula se va dividiendo, debido a la inestabilidad genética, sus descendientes portarán nuevas mutaciones, produciéndose una selección clonal debido a la adquisición de nuevas características que les aportan ventajas con respecto a las células vecinas. Por lo tanto, aparecen nuevas subpoblaciones celulares que serían las responsables tanto de la heterogeneidad intratumoral como de la progresión del tumor (Crockford y cols., 2014; Gui y cols., 2014).

Este modelo parte de la idea de que todas las células de un tumor son biológicamente homogéneas, y que la heterogeneidad observada entre ellas sería debida al azar o influencias estocásticas que alteran el comportamiento individual de las células. Estas influencias pueden ser intrínsecas como serían cambios en los niveles de factores de transcripción o en la regulación de las rutas de

señalización; o extrínsecas debidas al microambiente o a la respuesta inmune. Por lo tanto, todas las células tumorales tienen la misma capacidad de generar un tumor, pero sólo algunas la desarrollarán si reciben las influencias adecuadas. Esto hace imposible poder aislar la fracción iniciadora del tumor, ya que todas las células tienen el mismo potencial (Dick, 2009; Ding y cols., 2013).

2.5.2. Modelo de las células madre tumorales

El modelo de las células madre tumorales (CSCs) o modelo jerárquico sostiene que los tumores tienen una organización similar a la de algunos tejidos como la piel o la sangre, en los que existe una jerarquía celular en la que aparecen distintas clases de células con diferentes funciones y comportamientos, y que es mantenida por células madre. Este modelo establece que sólo un subconjunto de células con propiedades de células madre, llamadas células madre tumorales, son las responsables de la iniciación y el mantenimiento del tumor.

Estas células tienen capacidad de auto-renovación indefinida y de diferenciación, lo que les permite producir todos los tipos celulares del tumor. Mientras, la mayoría de células del tumor no tendrían estas características, por lo que no serían células tumorales propiamente dichas. Por tanto, de acuerdo con este modelo las células iniciadoras del tumor podrían aislarse basándose en las características que las diferencian del resto de células del tumor (Ciurea y cols., 2014; Dick, 2009).

Es importante señalar que ambos modelos no son mutuamente excluyentes y que es probable que ambos coexistan en el cáncer humano. Las propias CSCs pueden verse sometidas a un proceso de evolución clonal, como se ha visto en el caso de la leucemia. Además, las CSCs podrían sufrir una mutación que diera lugar a una segunda generación de CSCs con propiedades más agresivas (Ding y cols., 2013; Visvader y Lindeman, 2008).

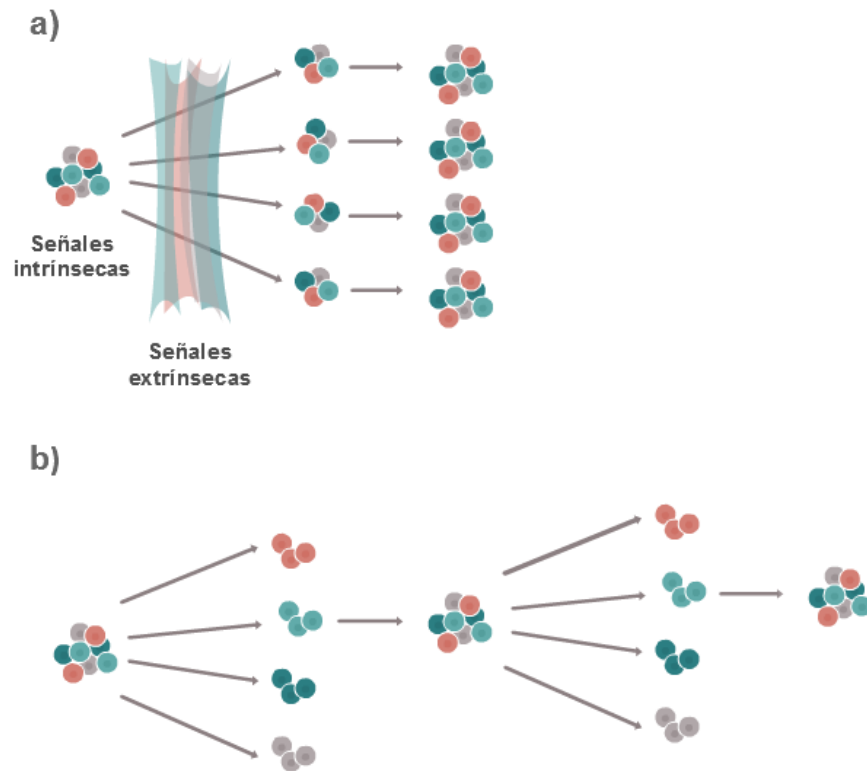


Figura 2. Origen del cáncer. a) Modelo estocástico. b) Modelo de las CSCs (Modificada de Dick, 2009)

2.6. Tipos de tumores

Una de las clasificaciones tumorales más utilizadas es la basada en el tejido de origen. Cuando el tumor se origina a partir de células epiteliales, que es lo más frecuente, recibe el nombre de carcinoma. Éstos se clasifican a su vez en dos tipos: carcinoma de células escamosas cuando se origina a partir del epitelio escamoso estratificado, o adenocarcinoma cuando lo hace de células glandulares. Si el tumor se origina a partir de tejido conectivo recibe el nombre de sarcoma, cuyo nombre dependerá del tipo de tejido conectivo al que afecte, por ejemplo si se origina a partir de hueso recibe el nombre de osteosarcoma. Por último, los tumores que se origina a partir de células sanguíneas reciben el nombre de

leucemias si derivan de células hematopoyéticas, o linfomas si lo hacen de tejido linfoide. Otra clasificación, más sencilla, pero muy utilizada, es la basada en función de su localización, hablándose así de cáncer de mama, colon, pulmón, próstata, etc. (Kumar, 2010). Dentro de esta gran variedad tumoral, los cánceres más frecuentes son los carcinomas, y dentro de ellos, los de pulmón, colon y mama (Ferlay y cols., 2013).

Además de lo mencionado anteriormente, a la hora del diagnóstico del cáncer es importante ofrecer información acerca del estadio de desarrollo de la enfermedad, ya que constituye una información clínicamente muy útil debido a que se puede relacionar con la tasa de supervivencia y el pronóstico, entre otros aspectos. La clasificación TNM desarrollada y mantenida por la "American Joint Committee on Cancer" (AJCC) y la "International Union for Cancer Control" (UICC) es la más utilizada para determinar el estadio de un tumor. Este sistema se basa en la evaluación de tres componentes: extensión del tumor primario (T), ausencia o presencia de nódulos linfáticos adyacentes (N) y ausencia o presencia de metástasis lejanas (M). A cada uno de los cuales se le asigna un número en función del grado de extensión (Sobin y Wittekind, 2009).

2.6.1. Cáncer de pulmón

La incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón ha aumentado desde 1930 de manera constante debido sobre todo al aumento del consumo de tabaco, pasando de ser una enfermedad rara a un problema de salud mundial (Ridge y cols., 2013). El cáncer de pulmón es el más común en el mundo, con 1,8 millones de nuevos casos en 2012, y que suponen el 13% de los cánceres diagnosticados. Además es la principal causa de muerte por cáncer, con 1,58 millones de muertes en el 2012. Es el cáncer más común entre los hombres, y la primera causa de muerte por cáncer entre éstos, mientras que en las mujeres ocupa el cuarto puesto, siendo la segunda causa de muerte por cáncer entre ellas (Ferlay y cols., 2010a, 2013).

A pesar de ser el cáncer más común a nivel global, aparecen diferencias en su incidencia en función de la región, siendo mayor en las regiones desarrolladas que en aquellas que se encuentran en vías de desarrollo. Las mayores tasas de incidencia entre los hombres aparecen en Europa Occidental y del Norte, América del Norte, Micronesia, Polinesia y Asia Oriental, mientras que las menores aparecen en África Subsahariana. En el caso de las mujeres, la mayor incidencia aparece en América del Norte, Europa del Norte, Australia y Nueva Zelanda. En China, a pesar de la baja tasa de fumadores, las mujeres tienen una elevada incidencia de cáncer de pulmón. En este caso, se considera que es debido a la alta contaminación que se encuentra en el aire de las casas por el humo de la cocina y las estufas sin ventilación, así como a la exposición ocupacional. Las diferencias observadas en la incidencia del cáncer de pulmón en función del país o del sexo reflejan en gran medida las diferencias en las pautas de tabaquismo (Jemal y cols., 2011).

El tabaco es, con diferencia, el factor de riesgo más importante en el desarrollo del cáncer de pulmón. Un aumento del consumo de tabaco se relaciona con un aumento de los casos de cáncer de pulmón años después. El riesgo de sufrir cáncer de pulmón entre los fumadores es entre diez y treinta veces superior al de los no fumadores. En el caso de los ex fumadores, el riesgo disminuye en comparación con los fumadores, aunque puede que no desaparezca del todo (Boyle y Levin, 2008; Pallis y Syrigos, 2013). Además, existe una asociación fuerte entre el tabaquismo y la muerte por cáncer de pulmón. En Estados Unidos se estima que al año, el 90% de las muertes por cáncer de pulmón en hombres, y entre el 75 y 80% en mujeres son causadas por el tabaco (Ridge y cols., 2013). Por tanto, el control del tabaquismo es la principal estrategia de prevención del cáncer de pulmón.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en el humo del tabaco son compuesto carcinógenos que inducen mutaciones en p53, desregulando el ciclo celular e induciendo el proceso de carcinogénesis. De igual modo, también se

aparecen en el humo del tabaco otras sustancias químicas cancerígenas como los compuestos N-nitroso (Ridge y cols., 2013).

Pero no sólo el consumo de tabaco es un factor de riesgo para el cáncer de pulmón, sino que la exposición ambiental al humo del tabaco también lo es. Se ha visto que en no fumadores expuestos al humo del tabaco se da un aumento de carcinógenos específicos del tabaco en sangre y orina. En el caso de no fumadores que conviven con fumadores, el riesgo de padecer cáncer de pulmón puede aumentar hasta en un 24% (Ridge y cols., 2013).

El radón se considera la segunda causa de cáncer de pulmón después del consumo de tabaco. La primera asociación surgió tras observar que los mineros expuestos a altas concentraciones de radón tenían mayor riesgo de sufrir cáncer de pulmón, y posteriormente la relación se extrapoló al resto de la población. La principal exposición al radón es por inhalación, y cuando esto ocurre puede tener un efecto cancerígeno debido a la emisión de partículas α en el pulmón. Además puede tener un efecto sinérgico con el humo del tabaco (Choi y Mazzone, 2014).

Existen además otros factores de riesgo, cuya relación con el cáncer de pulmón es baja o moderada, como pueden ser factores hormonales, polución o infecciones por VIH o *M. tuberculosis*. El hecho de sobrevivir a la resección de un tumor de pulmón implica un riesgo acumulado de sufrir un segundo cáncer de pulmón (el riesgo aumenta cada año un pequeño porcentaje) y es una causa común de muerte entre los supervivientes de cáncer de pulmón. Además, parece que existen una serie de factores genéticos que pueden estar implicados en la susceptibilidad y el desarrollo del cáncer de pulmón. Se han relacionado algunas regiones cromosómicas con una susceptibilidad al cáncer de pulmón, sin embargo existen pocos estudios al respecto, siendo necesario realizar más pruebas (Pallis y Syrigos, 2013; Ridge y cols., 2013).

Existen dos tipos principales de cáncer de pulmón, uno de ellos es el cáncer de pulmón de células no pequeñas, que supone un 85% de los casos, y que a su vez se puede dividir en tres subtipos principales: carcinoma escamoso, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes. El otro tipo es el cáncer de pulmón de células pequeñas, que representa un 15% de los casos. A pesar de los avances en detección temprana y tratamiento, este último tipo de cáncer se suele diagnosticar en un estado avanzado y presenta un mal pronóstico (Herbst y cols., 2008; Su y Pan, 2014).

2.6.2. Cáncer de colon

El cáncer de colon, también conocido como cáncer colorrectal, es el tercer tipo de cáncer más común en el mundo, siendo el tercero entre los hombres y el segundo entre las mujeres, con un total de 1,4 millones de nuevos casos diagnosticados en 2012, lo que suponen el 9,7% del total de casos de cáncer a nivel mundial (Ferlay y cols., 2013). Además representa un 8% de las muertes por cáncer a nivel global, lo que supone la cuarta causa de muerte por cáncer. En cuanto a su incidencia, casi el 60% de los casos se dan en los países desarrollados, presentándose las tasas más altas en Australia, Nueva Zelanda y Europa Occidental, y las más bajas en África, exceptuando la zona sur. Respecto al sexo, las tasas de incidencia son más altas en hombres que en mujeres (Ferlay y cols., 2010a). Además, su incidencia se ha visto aumentada rápidamente en ciertas regiones donde era baja, como España y algunos países del este asiático y europeo, debido, en parte, a cambios en la dieta y a un aumento de la obesidad y del consumo de tabaco (Jemal y cols., 2011).

En el desarrollo del cáncer colorrectal se ven implicados una serie de factores, tanto ambientales como genéticos. Se han identificado muchos factores ambientales que suponen un aumento del riesgo de padecer esta enfermedad. Entre ellos encontramos el tabaquismo, una baja actividad física, el sobrepeso y la obesidad, la falta de sueño, el consumo en exceso de alcohol y una dieta

desequilibrada. Los factores alimentarios tienen un papel muy importante, relacionándose las tasas de incidencia más altas con los países donde la dieta se compone principalmente de carnes rojas y procesadas con un bajo consumo de fibra (Durko y Malecka-Panas, 2014; Tarraga y cols., 2014).

El modelo de desarrollo del cáncer colorrectal es un proceso de múltiples etapas en el que se acumulan mutaciones necesarias para la iniciación y progresión del cáncer. El evento genético desencadenante es la inactivación de la vía APC. Mutaciones o desregulación de la expresión de genes supresores de tumores como APC, SMAD 2 o p53, y en oncogenes como K-Ras u otras rutas también se encuentran implicadas en el desarrollo tumoral y en metástasis (Migliore y cols., 2011).

Aunque la mayoría de los casos de cáncer colorrectal se cree que son esporádicos, aproximadamente el 20% son familiares, con más de dos parientes de primer grado afectados por la enfermedad (Valle, 2014). Se pueden distinguir dos tipos de cáncer hereditario: tipo I o síndromes polipósicos, entre los que destaca la poliposis adenomatosa familiar (PAF), y tipo II o síndrome no polipósico, también conocido como enfermedad de Lynch. El tipo de mutación variará en función del tipo de carcinoma. En la PAF encontramos mutaciones en la línea germinal del gen APC, mientras que en el síndrome de Lynch las mutaciones en la línea germinal se encuentran en los genes reparadores de ADN MMR (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2), y principalmente en los genes MLH1 y MSH2, cuyas mutaciones están presentes en un 50% y en un 40% de los casos, respectivamente. La mayoría de estos síndromes familiares se asocian a genes supresores de tumores (Manzano y Pérez-Segura, 2012; Zabalegui y cols., 2003).

El cáncer colorrectal es una enfermedad heterogénea que se puede dividir en dos categorías principales, en función de si la localización del tumor es proximal o distal al ángulo esplénico del colon. Los cánceres de estos dos segmentos anatómicos muestran un predominio diferente en términos de la vía genética. Los

tumores proximales son más estables genéticamente y parecen seguir los mismos mecanismos que la enfermedad de Lynch, mientras que los tumores distales muestran mayor inestabilidad genética y parecen seguir los mismos mecanismos que los síndromes polipósicos. Además los proximales son más frecuentes en personas de mayor edad y en mujeres (Ayiomamitis y cols., 2014; Azzoni y cols., 2007; Bufill, 1990).

3. CÁNCER DE MAMA

3.1. Incidencia, prevalencia y mortalidad

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres, con 1,7 millones de nuevos casos diagnosticados en 2012. Supone un 25,2% de los cánceres diagnosticados en mujeres, y a nivel global ocupa el segundo puesto con un 11,9% del total de la población afectada por cáncer (Ferlay y cols., 2013). Según datos estadísticos, y debido al aumento de su incidencia, el cáncer de mama afectará en algún momento de su vida, hasta a una de cada ocho mujeres (Ferlay y cols., 2010b).

A pesar de ser el cáncer más común en mujeres a nivel global, aparecen diferencias en su incidencia en función de la región, siendo mayor en las regiones desarrolladas que en aquellas que se encuentran en vías de desarrollo. Las mayores tasas de incidencia aparecen en Europa Occidental y del Norte, Estados Unidos, Canadá, Australia y Nueva Zelanda, mientras que las menores aparecen en Asia y África Subsahariana. Estas diferencias parecen ser debidas tanto a factores ambientales, como hormonales y reproductivos (Jemal y cols., 2011). También aparecen diferencias en función de la raza, siendo las mujeres caucásicas las que presentan una mayor incidencia, seguidas de las de raza negra, mientras que las mujeres de origen asiático son las que presentan menor incidencia. Además, también encontramos diferencias en función de los estilos de

vida, apareciendo mayor incidencia en las zonas urbanas que en las zonas rurales dentro de un mismo país (Porter, 2009).

No obstante, los patrones a nivel global están cambiando, acercándose cada vez más la incidencia en los países menos desarrollados a la de los más desarrollados, debido tanto al envejecimiento de la población como a la adaptación de los estilos de vida. Se ha visto que mientras la incidencia en algunos países como Estados Unidos o Australia está disminuyendo, debido sobre todo a la reducción del uso de terapia hormonal sustitutiva, en muchos países africanos y asiáticos como Uganda o India, la incidencia y la mortalidad se están viendo aumentadas, debido al aumento de la esperanza de vida, así como a cambios en el estilo de vida o en los patrones reproductivos. También la mayor concienciación sobre la enfermedad y la mejora de los programas de detección pueden ser responsables del aumento de la incidencia en los países en vías de desarrollo (Are y cols., 2013; Jemal y cols., 2011).

La tasa de mortalidad a nivel global es mucho menor que la tasa de incidencia, apareciendo aproximadamente entre 6-19 muertes por 100.000 mujeres, mientras que la tasa de incidencia puede variar entre menos de un 40 por 100.000 en los países menos desarrollados, y más de un 80 por 100.000 en los países desarrollados. Esta disminución de la tasa de mortalidad se debe, sobre todo, a la mayor supervivencia en las regiones desarrolladas (Ferlay y cols., 2010a), lo que es posible gracias, principalmente, a la mejora del tratamiento y a la mejora del diagnóstico. Hay evidencias que señalan que la realización de un programa eficaz de diagnóstico con mamografía puede reducir en al menos el 20% la mortalidad por cáncer de mama en mujeres mayores de 50 años (Boyle y Levin, 2008). La ratio tasa de mortalidad-tasa de incidencia (MR:IR) en cáncer de mama a nivel global es de 0,35, aunque varía mucho entre las distintas regiones. A modo de ejemplo, en África es de un 0,6 mientras que en Norteamérica es sólo de un 0,12. Esto es debido a las diferencias en la mortalidad, siendo mucho mayor en los países en vías de desarrollo, debido sobre todo a la existencia de sistemas de

salud inadecuados y el empleo de tratamientos no óptimos (Porter, 2009). Como resultado, el cáncer de mama es la quinta causa de muerte por cáncer a nivel global, pero sigue siendo la primera causa de muerte por cáncer en mujeres (Ferlay y cols., 2010a).

En nuestro país, la tasa de incidencia varía entre 40 y 75 por 100.000. En el año 2008, era de 61 por 100.000, una de las tasas más bajas en los países desarrollados. Al igual que en el resto del mundo, es el tumor maligno más frecuente en mujeres y la principal causa de muerte por cáncer en la población femenina. Cada año se diagnostican unos 15.000 nuevos casos, y fallecen unas 6.000 mujeres. La tasa de mortalidad se sitúa en 28,2 por 100.000 y supone un 26% de las muertes en mujeres menores de 65 años, a pesar de que a partir de los años 90 se está dando una disminución de la mortalidad. La supervivencia en los últimos años ha mejorado mucho, situándose por encima de la media europea (78%) con un 83% (Ferlay y cols., 2010a; Forouzanfar y cols., 2011; Martín y cols., 2013; Sánchez y cols., 2010).

3.2. Etiología y factores de riesgo

La etiología del cáncer de mama es desconocida y parece ser multifactorial. Existen una serie de factores de riesgo que permiten identificar a las mujeres con mayor predisposición a la enfermedad. Sin embargo, sólo el 30% de los cánceres de mama son atribuidos a factores de riesgo conocidos (Escudero, 2006; Martín y cols., 2013). Entre los factores de riesgo más importantes encontramos los factores genéticos y familiares, y la edad. Otros dos grupos de factores importantes son los factores hormonales y los ambientales, que se encuentran íntimamente relacionados. Por último, también se pueden considerar como factores de riesgo los antecedentes personales de patología benigna de la mama o de otro tipo de cáncer.

3.2.1. Edad y sexo

La edad y el sexo son dos factores muy importantes, y a diferencia de otros, no se pueden controlar (Xercavin y cols., 2012). El riesgo de padecer cáncer de mama aumenta con la acumulación de ciclos ováricos, disminuyendo un 15% por año de retraso de la menarquia, y aumentando un 3% por año de retraso de la menopausia. Es decir, el riesgo de enfermedad aumenta con la edad, apareciendo principalmente a partir de los 40 años, y aumentando a medida que avanza la edad hasta la menopausia, tras la cual sigue elevándose pero a una velocidad menor. Esta ralentización tras la menopausia puede ser debida a la disminución de los estrógenos circulantes. Un 77% de los casos son mujeres mayores de 50, mientras que en el caso de menores de 40 años se reduce a un 6,5% (Colditz y cols., 2006; Fritz y Speroff, 2011; Xercavin y cols., 2012). En cuanto al sexo, el cáncer de mama es una enfermedad que afecta casi exclusivamente a mujeres, sólo menos del 1% de los pacientes son hombres. Y de ellos, la mayoría son de edad avanzada, apareciendo una mayor incidencia a los 71 años de edad (Charlot y cols., 2013).

3.2.2. Factores genéticos y familiares

La carga genética es el factor más importante que afecta al desarrollo del cáncer de mama, aumentando el riesgo individual de padecer la enfermedad proporcionalmente con el número de familiares afectados (Powers y Stopfer, 2014). Aproximadamente, entre un 20% y un 30% de los casos de cáncer de mama son debidos a factores hereditarios, pero sólo en el 5-10% de los casos se ha identificado un fuerte componente genético. De estos casos, sólo el 4-5% se debe al efecto de genes de alta penetrancia, como son BRCA1, BRCA2 y p53. Variaciones genéticas en algunos genes como PALB1, BRIP, ATM o CHEK2 están relacionadas con un riesgo moderado. Entre los genes de alta y moderada penetrancia suman un 25% de los casos de cáncer de mama con componente familiar, por lo que actualmente se están identificando numerosos genes de baja

penetrancia, cuya acumulación tendría efecto sobre el riesgo de padecer cáncer de mama (Fanale y cols., 2011; Lalloo y Evans, 2012).

Las mutaciones en los genes supresores de tumores BRCA1 y BRCA2 son las más conocidas e importantes. Aunque suelen afectar a una proporción muy pequeña de la población, son de alta penetrancia y suponen un alto riesgo de padecer tanto cáncer de mama como de ovario. En el caso del cáncer de mama pueden aumentar el riesgo entre 10 y 20 veces. Mutaciones heredadas en la línea germinal en el gen BRCA1 en mujeres supone un riesgo de un 80% de padecer cáncer de mama en algún momento de la vida, y además se relaciona con una edad temprana de aparición de la enfermedad. En el caso de mutaciones en BRCA2 el riesgo varía entre el 26 y el 84%. Los tumores con mutaciones en BRCA2 son similares fenotípicamente a los tumores esporádicos, mientras que los de BRCA1 difieren de ambos. Éstos son altamente proliferantes y de mayor grado histológico, suelen ser de grado 3, expresan con menor frecuencia receptores hormonales de estrógenos y progesterona, y son más propensos a mutaciones en p53 (Apostolou y Fostira, 2013; Lalloo y Evans, 2012).

3.2.3. Factores hormonales y reproductivos

Los estrógenos, hormonas sexuales esteroideas, cumplen diversas funciones biológicas, entre las que cabe destacar la regulación del ciclo menstrual y la reproducción, o la movilización del colesterol. Sin embargo, a pesar de su acción beneficiosa, niveles anómalamente altos se asocian con un mayor riesgo de algunos tipos de cáncer como el de mama (Liang y Shang, 2013).

Por consiguiente, la administración de hormonas exógenas podría aumentar el riesgo de padecer cáncer de mama. La terapia hormonal sustitutiva en mujeres menopaúsicas se asocia con un mayor riesgo de cáncer de mama. El estudio WHI (Women's Health Initiative) encontró un aumento de la tasa de cáncer de mama en mujeres que seguían un tratamiento continuo durante más de cinco años con

estrógenos y progestina (Rozenberg y cols., 2013). En el caso de los anticonceptivos orales, se les relaciona con un aumento moderado del riesgo, el cual disminuye a los pocos años de haber dejado de usarlos (Rosenberg y cols., 2009).

Tanto la menarquía precoz como la menopausia tardía son factores de riesgo en mujeres al existir una actividad ovárica más prolongada. En mujeres premenopáusicas, el incremento de andrógenos en suero se correlaciona con un aumento del riesgo (Xercavin y cols., 2012).

El embarazo ejerce un efecto protector frente al cáncer de mama, sobre todo cuando ocurre a edades tempranas. Aunque en un principio podría parecer perjudicial por el aumento de estrógenos durante el primer trimestre de embarazo, a la larga tiene un efecto beneficioso debido, entre otros factores, a un aumento de la prolactina.

La lactancia materna parece disminuir el riesgo de cáncer de mama, sumándose al efecto protector del embarazo, y aumentando este efecto con el aumento de su duración. Esto puede ser debido a la supresión de la ovulación durante el periodo lactante (Xercavin y cols., 2012). Además, las células mamarias permanecen indiferenciadas hasta el momento del embarazo y de la lactancia, que es cuando se produce su diferenciación completa. Por ello, aumenta el número de células diferenciadas y disminuye el de células madre, aumentando por ello la resistencia a la transformación maligna (Anothaisintawee y cols., 2013; Russo y cols., 2006).

3.2.4. Factores ambientales

Tanto la dieta como el estilo de vida pueden influir en el desarrollo del cáncer de mama (Khazaee-Pool y cols., 2014). Estos factores son modificables, por lo que conociendo su implicación en la enfermedad se podrían diseñar nuevas estrategias de prevención. En el caso de la dieta, a pesar de que numerosos estudios *in vitro* e

in vivo sugieren una relación de algunos nutrientes o de una dieta rica en grasas con el desarrollo de cáncer, sólo en el caso del consumo de alcohol, así como de la obesidad o del aumento de peso se ha podido establecer una relación clara entre ellos y un aumento significativo del riesgo de cáncer de mama (Lof y Weiderpass, 2009; Vera-Ramirez y cols., 2013). Por otro lado, mantener una dieta saludable, un peso adecuado y realizar actividad física de manera regular reduce la incidencia de diferentes tipos de cáncer, entre ellos el de mama, y de otros tipos de enfermedades; y además puede contrarrestar algunos de los efectos adversos del tratamiento así como atenuar la progresión de la enfermedad (Davies y cols., 2011).

Se estima que el exceso de peso es el responsable de alrededor de un 20% de todos los cánceres, y en el caso de las mujeres, el estudio Million Women ha demostrado que en mujeres postmenopáusicas la mitad de los casos pueden deberse a la obesidad (De Pergola y Silvestris, 2013). El sobrepeso o la obesidad se relacionan directamente con un mayor riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas, y en mujeres mayores de 60 años pueden aumentar ese riesgo hasta en un 55%, así como aumentar su agresividad. Esto puede ser debido al aumento de las hormonas reproductivas en el tejido adiposo de estas mujeres (López y cols., 2013).

En cuanto al consumo de alcohol, la ingesta de tres o más bebidas alcohólicas diarias parece aumentar el riesgo de cáncer de mama en un 30-50% (Boyle y Levin, 2008). Se han propuesto varios mecanismos para esta asociación, que parece darse sobre todo en mujeres con tumores positivos para los receptores de estrógenos, por lo que uno de los mecanismos propuestos es que el alcohol produce un aumento de los niveles endógenos de estrógenos, lo que se relaciona directamente con el cáncer de mama. Además, los metabolitos del alcohol son tóxicos, por lo que pueden causar modificaciones en el ADN. Por ello se recomienda evitar un consumo excesivo, especialmente en mujeres que presenten otros factores de riesgo conocidos (Coronado y cols., 2011).

Otro hábito poco saludable y que se ha relacionado con el cáncer de mama es el tabaquismo. Ser fumador activo aumenta el riesgo de cáncer de mama, siendo mayor en el caso de mujeres que comenzaron a fumar a una edad temprana y/o mucho antes del primer embarazo a término. En el caso de las fumadoras pasivas está menos claro este efecto, aunque hay voces que dicen que puede tener importancia especialmente antes de la menopausia (Reynolds, 2013).

Un factor ambiental que también puede aumentar la tasa de cáncer de mama es la exposición a radiación, como ocurre en determinados tratamientos contra el cáncer en los que se irradia el tórax, o en casos de exposición a una bomba atómica o accidente nuclear. El riesgo es mayor cuando la exposición ocurre a edad joven y con altas dosis de radiación (Lester, 2010).

3.2.5. Patología benigna de la mama

Las mujeres que han padecido una enfermedad benigna de la mama tiene un riesgo algo mayor, de entre 1,3 y 5,3, que el resto de la población de sufrir cáncer de mama. Si bien, esto depende mucho del tipo de lesión que se padezca. En el caso de lesiones no proliferativas no existe un riesgo mayor, a no ser que exista un fuerte historial familiar (Colditz y cols., 2014).

3.2.6. Antecedentes personales de cáncer

Las mujeres que han padecido cáncer de mama primario tienen entre 15-25% más de probabilidades de desarrollar un nuevo tumor maligno, principalmente en el seno opuesto. La tasa de incidencia varía con la edad, aumentando a medida que pasan los años. En cuanto a los factores implicados en su desarrollo tenemos la edad, el estado del receptor de hormonas, el historial familiar, la obesidad o el tratamiento adyuvante, aunque no se conoce cómo interactúan para producir la enfermedad (Druesne-Pecollo y cols., 2012; Lizarraga y cols., 2013).

3.3. Diagnóstico

La detección y el tratamiento precoz del cáncer de mama mejoran su pronóstico y por tanto la supervivencia de los pacientes (Smith y cols., 2012). Por este motivo se intenta diagnosticar el cáncer de mama en estadios tempranos, que es cuando mejor responden al tratamiento. Para ello existen múltiples pruebas de cribado, siendo las más importantes y más usadas convencionalmente la autoexploración mamaria, el examen clínico y la mamografía (Al-Foheidi y cols., 2013; Griffin y Pearlman, 2010). Entre ellos, la mamografía es el método más efectivo ya que permite detectar lesiones no palpables, más pequeñas, y por tanto con menos probabilidad de tener afectación ganglionar (Gemignani, 2011). Además casi todos los estudios realizados demuestran que el uso de mamografías como método de cribado reduce la mortalidad del cáncer de mama entre un 18% y un 45%, a pesar de que su sensibilidad es de un 80-90% (Schmidt y Powers, 2011).

La mayoría de guías clínicas recomiendan realizar una mamografía cada uno o dos años en mujeres de entre 40 y 59 años, y una al año en mujeres mayores de esa edad. En el caso de mujeres con riesgo moderado, se recomienda empezar a los 40 años con las mamografías anuales, así como la realización de autoexploraciones mamarias una vez al mes, y exámenes clínicos también una vez al año (Feldman y cols., 2012; Gemignani, 2011). Pero esto también depende de cada país. En España actualmente se realiza una mamografía cada dos años, y la edad de inicio depende de la comunidad autónoma considerada (Herruzo y cols., 2012). Atendiendo a la información proporcionada por la página web del Servicio Andaluz de Salud, en Andalucía se realiza una mamografía cada dos años a las mujeres de entre 50 y 69 años residentes en Andalucía, como parte del programa de detección precoz de cáncer de mama que comenzó en el año 1995.

Además de estas pruebas, se han introducido otras pruebas de imagen como son las ecografías automatizadas o las resonancias magnéticas de la mama. La ecografía se utiliza como método complementario a la mamografía y como primera

prueba diagnóstica en mujeres jóvenes, siendo especialmente útil en la detección de masas quísticas. La resonancia magnética es más sensible pero menos específica que la mamografía, por lo que su uso se recomienda en pacientes de alto riesgo. Además, permite un mejor reconocimiento de lesiones que no han podido ser bien identificadas mediante mamografía o ecografía (Griffin y Pearlman, 2010; Schmidt y Powers, 2011). Actualmente hay nuevas técnicas de imagen que se encuentran en estudio, como es la mamografía de emisión de positrones, con la que se pretende aumentar la sensibilidad a la hora de la detección del cáncer de mama (Feldman y cols., 2012).

Si los resultados de estas pruebas nos dan un diagnóstico de sospecha, éste debe ser confirmado mediante biopsia. Gracias a ella se obtienen datos de la histología y grado del tumor, capacidad de invasión y presencia de marcadores. Tras la confirmación del diagnóstico se realiza un estudio de extensión para determinar si hay enfermedad a distancia. Un vez realizadas todas las pruebas, y en función del estadio de la enfermedad se decidirá el tratamiento a seguir (Longo, 2013).

3.4. Pronóstico

Un factor pronóstico puede definirse como una medida biológica o clínica tomada en el momento del diagnóstico de la enfermedad y que permite predecir el resultado clínico en ausencia de terapia adyuvante. Por otro lado, un factor predictivo es una medida asociada al grado de respuesta a una determina terapia, lo que permite seleccionar el tratamiento adecuado según el tipo de paciente (Leong y Zhuang, 2011).

En el caso del cáncer de mama, al ser una enfermedad heterogénea, su compleja biología hace que sea muy difícil encontrar un buen marcador pronóstico. Debido a ello, se han estudiado un gran número de parámetros tanto clínicos como anatomopatológicos que nos permitieran establecer un pronóstico con el fin de

predecir la supervivencia del paciente y la eficacia del tratamiento (Dávila-Arias y cols., 2013).

Clásicamente se han utilizado factores clinicopatológicos como son tamaño, tipo histológico y grado tumoral, presencia de metástasis en ganglios linfáticos axilares o invasión linfovascular, tanto como factores pronóstico como predictivos. En la actualidad, los avances y mejoras en las técnicas moleculares han permitido incorporar nuevos biomarcadores moleculares que dan información sobre ciertos genes relacionados con proliferación, invasión y metástasis, y que también presentan significado tanto pronóstico como predictivo. Pero de ellos, sólo los receptores de estrógenos (ER) y progesterona (PR) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) se analizan de forma rutinaria en los pacientes con cáncer de mama (Parise y Caggiano, 2014; Weigel y Dowsett, 2010; Yin y cols., 2014).

3.4.1. Factores clinicopatológicos

- Edad: El cáncer de mama en mujeres jóvenes presenta un carácter más agresivo, por lo que en la conferencia de St Gallen en 1998 (Zujewski y Liu, 1998) se concluyó que una edad menor de 35 años es un factor de mal pronóstico. Muchos estudios han relacionado el riesgo de muerte por cáncer con la edad de diagnóstico, y han llegado a la conclusión de que este riesgo es mayor en los dos extremos de la vida (Yago y cols., 2010).

- El factor pronóstico mejor establecido es la presencia o ausencia de metástasis en los ganglios axilares, que está en cierta forma relacionado con el tamaño tumoral. Un 70% de los casos con afección ganglionar desarrollan metástasis, pero este porcentaje se reduce al 20-30% en aquellos casos sin afección ganglionar, y dentro de ellos, los tumores menores de 1 cm tienen un pronóstico más favorable, con una tasa de supervivencia libre de enfermedad del 90% a los 10 años (Dávila-Arias y cols., 2013).

- Grado de invasión linfovascular: La invasión de los vasos sanguíneos y/o linfáticos próximos al tumor por parte de las células tumorales es uno de los primeros pasos en la diseminación metastásica, por lo que su presencia es un factor de mal pronóstico, relacionándose con una peor supervivencia. En el caso de pacientes con ganglios negativos, su presencia supone un riesgo intermedio de recaída y muerte, mientras que su ausencia se relaciona con un bajo riesgo. En el caso de pacientes con ganglios positivos esta relación no es tan clara, por lo que son necesarios más estudios que permitan clarificarlo (Gujam y cols., 2014).

- Tipo histológico y grado de diferenciación: Aunque no se suele utilizar como tal para definir el pronóstico de la enfermedad, se sabe que los diferentes tipos histológicos presentan diferente pronóstico. El grado de diferenciación se refleja en el informe patológico ya que tiene poder pronóstico en la evolución clínica de los pacientes. Se distinguen tres grados: bien (1), moderadamente (2) y pobremente (3) diferenciado. Es un factor pronóstico independiente del tamaño y estado ganglionar. Un paciente de grado 3 presenta un peor pronóstico y recaerá más rápidamente que uno de grado 2 (Herruzo y cols., 2012).

3.4.2. Factores moleculares

- Receptores hormonales: La presencia o ausencia de receptores de estrógenos y de progesterona es el factor pronóstico más importante y su determinación en cualquier muestra de tejido tumoral de mama es obligatoria. Los tumores ER positivos suelen ser más diferenciados, menos agresivos y de mejor pronóstico. Además, la presencia de ER, identificada por tinción inmunohistoquímica, es el único marcador utilizado clínicamente para predecir la respuesta a la terapia endocrina. Se asocia con una buena respuesta al tratamiento endocrino, pero con una peor respuesta a la quimioterapia. La expresión de PR está fuertemente asociada a la de ER, ya que los tumores positivos para PR y negativos para ER son muy raros, representando menos del 1% de todos los casos de cáncer de

mama. En general, los tumores que expresan ambos marcadores tienen unas características clinicopatológicas más favorables, mejor pronóstico y una respuesta más favorable a la terapia endocrina (Beelen y cols., 2012; Patani y cols., 2013; Weigel y Dowsett, 2010).

- HER2: Es uno de los receptores más importantes de la familia de receptores de crecimiento ErbB. Los tumores con el gen HER2 amplificado y sobreexpresado representan un 20-25% de los casos de cáncer de mama, y presentan un pronóstico peor, sobre todo en pacientes con ganglios positivos. Es el biomarcador predictivo de respuesta al anticuerpo trastuzumab y de inhibidores de tirosina quinasa, como el lapatinib (Duffy, 2001; Patani y cols., 2013).

- Una mayor proliferación del tumor se asocia con una mayor agresividad. Para su determinación se pueden utilizar métodos directos, como la determinación del porcentaje de células en fase S por citometría de flujo o por análisis de imagen, o el grado de ploidía obtenido por citometría de flujo. También podemos encontrar métodos indirectos como es la detección por inmunohistoquímica de proteínas que se expresan en ciertas fases del ciclo celular, como Ki67 (Herruzo y cols., 2012). Ésta es una proteína nuclear cuya expresión varía a lo largo del ciclo celular, su síntesis se inicia en la fase G₁, y alcanza su máxima expresión durante la fase M (mitosis), tras la cual desaparece rápidamente; es decir, sólo se detecta en células en proliferación, no en reposo. Por ello, se han desarrollado anticuerpos específicos contra Ki67 que permiten determinar su expresión mediante inmunohistoquímica (Pathmanathan y Balleine, 2013; Romero y cols., 2014).

- Gen supresor de tumores p53: aparece mutado en un 15-35% de los casos de cáncer de mama, siendo más frecuente en tumores negativos para receptores de hormonas. A pesar de que aún no existe un consenso general, la presencia de mutaciones en su locus se considera como un marcador de mal pronóstico, aunque en el caso de tumores con ganglios negativos se asocia con una buena

respuesta al tratamiento con quimio y radioterapia (Herruzo y cols., 2012; Ma y cols., 2013; Olivier, 2013).

- Marcadores de apoptosis. Bcl-2 es una proteína reguladora de la apoptosis, que ejerce un papel importante en el proceso de carcinogénesis debido a que actúa bloqueando la apoptosis, y a que colabora con c-Myc en la transformación celular. Se ha demostrado su potencial tumorigénico en modelos animales, y se ha encontrado sobreexpresado en tumores donde parece actuar como un oncogen. Sin embargo, en muchos tumores sólidos, incluidos el cáncer de mama, paradójicamente Bcl-2 parece funcionar como supresor de tumores, asociándose su expresión con un pronóstico favorable. Se relaciona con expresión de receptores de estrógenos, mejor respuesta al tamoxifeno y mayor supervivencia sin recaída. Son varios los estudios que han demostrado su valor como marcador pronóstico independiente, no obstante, su implicación terapéutica no está clara. Son necesarios estudios a gran escala, incluidos ensayos clínicos, que permitan establecer de forma más precisa su utilidad clínica (Callagy y cols., 2008; Redondo, 2013).

- Marcadores de vascularización. La angiogénesis es un proceso necesario para el desarrollo de tumores, y estudios preclínicos han confirmado su papel en el cáncer de mama y en su potencial metastásico. La densidad de microvasos en los tumores de mama se relaciona con micrometástasis en médula ósea, la recurrencia de la enfermedad y la supervivencia global. Se ha propuesto el análisis mediante inmunohistoquímica de marcadores de vascularización como CD31, CD34, factor VIII y VEGF, pero los resultados son contradictorios; algunos casos relacionan altas tasas de angiogénesis con peor pronóstico en pacientes con ganglios negativos, mientras que en otros casos esta relación no se confirma (Herruzo y cols., 2012; Mackey y cols., 2012).

- Marcadores de transición epitelio-mesenquimal. EMT es un proceso implicado en el desarrollo de metástasis, por lo que proteínas características de dicho proceso,

como son la E-cadherina, y su proteína de unión, β -catenina, pueden ser utilizadas como marcadores de pronóstico. β -catenina es además una proteína muy importante en la regulación de la ruta Wnt. Su degradación es necesaria para el correcto funcionamiento celular, y su estabilización puede promover la progresión tumoral. La pérdida de expresión de E-cadherina y/o de β -catenina está implicada en desdiferenciación y adquisición de capacidad migratoria, por lo que se asocia con un mal pronóstico (Fang y cols., 2010; Mandal y cols., 2013; Menezes y cols., 2012).

3.5. Clasificación del cáncer de mama

Desde el punto de vista histológico, la OMS clasifica los tumores que afectan a la mama en ocho grupos principales: epiteliales, mioepiteliales, mesenquimales, fibroepiteliales, tumores del pezón, linfomas malignos, tumores metastásicos y masculinos. La mayoría de los cánceres de mama son epiteliales y se suelen originar en la unidad ducto-lobulillar terminal, por lo que reciben el nombre de adenocarcinomas. Éstos representan un 90% de las neoplasias malignas de mama, afectando en un 70-80% de los casos al epitelio ductal, y entre un 5 y un 10% al epitelio lobulillar. Los adenocarcinomas se dividen principalmente en dos grupos: carcinomas *in situ* y carcinomas invasivos. Estos últimos son principalmente importantes, ya que son capaces de invadir tejidos adyacentes y de metastatizar a zonas distantes (Boyle y Levin, 2008; Lester, 2010; Tavassoli y Devilee, 2003).

El cáncer de mama es una enfermedad altamente heterogénea, en la que se pueden distinguir varios subtipos moleculares que difieren claramente en sus características biológicas y comportamiento patológico (Dawson y cols., 2013; Wesolowski y Ramaswamy, 2011). Durante la última década, gracias al uso de técnicas para el estudio de la expresión génica, se ha avanzado mucho en el conocimiento de la heterogeneidad de la enfermedad. Esto ha permitido dividir el cáncer de mama en cuatro subtipos moleculares intrínsecos, diferenciados

principalmente por la expresión o no de genes característicos de células luminales epiteliales. Según esta clasificación los subtipos de cáncer de mama serían luminal A, luminal B, HER2, subtipos triple negativos, y según algunos autores también aparecería el tipo normal (Guiu y cols., 2012; Yersal y Barutca, 2014).

Los subtipos luminal A y B son los que expresan marcadores de células luminales epiteliales. Los tumores del subtipo luminal A son los más frecuentes y se caracterizan por la expresión de ER y/o PR, pero no de HER2, mientras que el subtipo luminal B expresa generalmente los tres receptores, presentando además mayores tasas proliferativas y de expresión de Ki67. En el caso de los tumores HER2, no aparece expresión de los receptores de hormonas, pero sí sobreexpresión de HER2. Los subtipo triple negativo carecen de expresión de los marcadores referidos, mientras que el subtipo normal representa un pequeño grupo de tumores bien diferenciados, que expresan ER pero no HER2, y cuyo patrón de expresión génica es similar al del tejido mamario normal (Perou y cols., 2000; Guiu y cols., 2012; Yersal y Barutca, 2014).

A medida que se ha ido profundizando en los estudios de expresión génica se han conseguido detallar aún más los subtipos. De hecho, dentro del los triple negativos se ha establecido un nuevo subtipo denominado claudin-low. Éste se caracteriza porque además de ser negativo para ER, PR y HER2, posee una baja expresión de genes implicados en la adhesión celular, como los genes de claudinas 3, 4, 7 (de ahí su nombre), E-cadherina y ocludina. A diferencia de otros tumores triple negativo como el basal, en el subtipo claudin-low aumenta la expresión de marcadores de transición epitelio-mesenquimal, y sus células comparten características con las células madre tumorales (Prat y Perou, 2011).

La identificación de estos subtipos moleculares conlleva gran importancia clínica, ya que aporta información sobre la posible respuesta al tratamiento, y por tanto, sobre cuál sería la terapia más adecuada para cada paciente. Además tienen un valor pronóstico propio. A los subtipos triple negativo se les atribuyen un peor

pronóstico, al igual que aquellos que expresan HER2, ya que son más propensos a metastatizar. Por el contrario, los cánceres de mama positivos para los receptores de hormonas (ER y PR) tienen en general mejor pronóstico (Moriya y cols., 2010; Norum y cols., 2014).

Respecto al tratamiento, en los casos de cánceres positivos para ER y PR se recomienda la terapia endocrina, mientras que los casos HER2 positivos suelen responder mejor a la terapia con anticuerpos anti-HER2, como trastuzumab (Vuong y cols., 2014). Sin embargo los tumores triple negativo no responden a estas terapias, por lo que la única opción que tienen los pacientes es la quimioterapia, y aunque algunos responden bien, la tasa de recaída es alta, y la supervivencia menor. Es por ello el subtipo de cáncer de mama de peor pronóstico y el más agresivo, siendo el más frecuente en mujeres con mutaciones en BRCA1 (Minami y cols., 2011). El subtipo claudin-low se relaciona también con un mal pronóstico, y una mayor resistencia a la quimioterapia estándar, si bien su tasa de respuesta a ella se encuentra intermedia entre los tipos luminales y los basales (Prat y cols., 2010; Roll y cols., 2013; Wesolowski y Ramaswamy, 2011).

3.6. Tratamiento

El tratamiento del cáncer de mama se basa en muchos factores, incluido el tipo y estadio del cáncer. En el caso de mujeres con cáncer de mama en estadios I, II y III, el objetivo principal del tratamiento es eliminar la enfermedad e impedir que reaparezca. En el caso del estadio IV, al ser en la mayoría de los casos incurable, el objetivo del tratamiento sería mejorar los síntomas y alargar la vida del paciente, es decir, paliar y cronificar la enfermedad (Bafford y cols., 2009; Steinauer y cols., 2014).

En la mayoría de los casos, el tratamiento del cáncer de mama incluye de forma rutinaria una cirugía, seguida de tratamientos adyuvantes llevados a cabo mediante radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia y tratamientos de base

inmunológica como el trastuzumab. Este tratamiento complementario tiene como finalidad eliminar o impedir el crecimiento de micrometástasis que hayan podido quedar ocultas, evitándose así posibles recaídas y mejorando la supervivencia de los pacientes (Adamowicz y cols., 2009; Passant y Borley, 2013).

Existe además un tratamiento neoadyuvante que en principio se aplicaba a pacientes con cáncer de mama inoperable, localmente avanzado o inflamatorio con la finalidad de reducir el tumor permitiendo así su intervención. En la actualidad también está indicado antes de la intervención en tumores operables, pero que requieren mastectomía, para reducir la extensión de la cirugía y poder realizar una cirugía conservadora. En términos de supervivencia global tiene una eficacia similar a la obtenida con cirugía inicial seguida de quimioterapia adyuvante. Además, permite monitorizar la respuesta, por lo que se puede suspender o modificar el tratamiento en caso de que el paciente no responda, y aporta una importante información pronóstica (Avril y cols., 2009; Gampenrieder y cols., 2013; Rea y cols., 2013).

La cirugía es el tratamiento local de elección del cáncer de mama, que se realiza con el objetivo de eliminar el tumor y analizar el estado de los ganglios axilares (Zamora y cols., 2010). Durante las dos últimas décadas, el tratamiento quirúrgico del cáncer de mama ha evolucionado desde la mastectomía radical hacia tratamientos locales menos invasivos como son la cirugía conservadora o la oncoplástica (Kaviani y cols., 2013). La decisión de realizar un tipo u otro de cirugía es multifactorial, dependiendo en gran medida del tamaño y posición del tumor en la mama, y en algunos casos también de la elección del paciente (Goyal, 2012). En el caso de la axila, lo más utilizado es la técnica del ganglio centinela, en la que se extirpa únicamente el primer ganglio de drenaje axilar para el estudio de metástasis. En el caso de que el ganglio esté infiltrado por el tumor entonces se recurre a la disección del nódulo linfático axilar (Damgaard y cols., 2013; Zamora, y cols., 2010).

Tal y como mencionábamos anteriormente, tras la cirugía se suele realizar un tratamiento complementario o adyuvante mediante quimioterapia, radioterapia, hormonoterapia o inmunoterapia. La quimioterapia tiene como objetivo la eliminación del mayor número de células, muy frecuentemente mediante la inducción de apoptosis por interferencia con el ADN o actuando sobre proteínas implicadas en la división celular. Generalmente su acción se dirige a células en división, por lo que no es específica de células tumorales, y se ven afectadas también células normales que se encuentran en proliferación como por ejemplo las células hematopoyéticas (Marchini y cols., 2004; Mitchison, 2012). Aunque en un principio se utilizaba sólo para el tratamiento del cáncer metastásico, en la actualidad se utiliza con diversos objetivos. Se puede administrar antes de la cirugía (tratamiento neoadyuvante) o tras ella (tratamiento adyuvante), y además se puede administrar de forma conjunta con la radioterapia (tratamiento concomitante). Por último, en etapas terminales de la enfermedad, su uso está limitado al alivio del dolor u otros síntomas de la enfermedad, por lo que en este caso sería un tratamiento paliativo (Hickey y cols., 2013).

El uso de quimioterapia en cáncer de mama mejora la supervivencia sobre todo en estadios tempranos de la enfermedad y actualmente es la única opción para el tratamiento de cáncer de mama metastásico. Los tratamientos con antraciclinas (doxorubicina o epirubicina) y taxanos (paclitaxel o docetaxel) son los más utilizados y efectivos (Mohan y Ponnusankar, 2013; Vriens y cols., 2013).

La radioterapia es un tratamiento físico capaz de dañar todos los tejidos a su paso. Las radiaciones ionizantes producen la ruptura del ADN, causando daños irreparables, y su selectividad frente a las células tumorales puede ser debida a defectos en la reparación del ADN (Sausville y Longo, 2012). En cáncer de mama se ha demostrado que el uso de radioterapia tras cirugía conservadora no sólo reduce el riesgo de recurrencia sino también de forma moderada el riesgo de morir por la enfermedad. Esto es debido a que la radioterapia elimina los focos microscópicos que hayan podido quedar en el tumor, reduciendo así la posibilidad

de recurrencia y de aparición de metástasis distales (EBCTCG y cols., 2011; Hickey y cols., 2013). La radioterapia se ha convertido en el tratamiento estándar del cáncer de mama en estadio temprano, y su uso junto a cirugía conservadora en este estadio presenta la misma supervivencia que la mastectomía (Bourgier y cols., 2013; Cao y cols., 2013).

La hormonoterapia es un tipo de terapia dirigida indicada para pacientes con cáncer de mama positivo para los receptores de hormonas, sobre todo en casos en los que no se puede utilizar quimioterapia. También, en el caso de mujeres postmenopáusicas se utiliza para reducir el tumor antes de la cirugía (Charehbil y cols., 2014). Su uso tanto en mujeres pre y postmenopáusicas con cáncer de mama en estadio temprano positivo para los receptores de hormonas reduce la recurrencia y la mortalidad. En el caso de mujeres premenopáusicas el tratamiento estándar se realiza con tamoxifeno, siendo también una opción la ablación ovárica. Para mujeres postmenopáusicas el uso de inhibidores de aromatasa es más eficaz que el uso de tamoxifeno (Cottu, 2013; den Hollander y cols., 2013; Stuart-Harris y Davis, 2010).

Otro tipo de terapia dirigida la encontramos frente a HER2, la cual ha mejorado significativamente la supervivencia de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo. Entre las estrategias terapéuticas frente a HER2 encontramos anticuerpos monoclonales como el trastuzumab o inhibidores de la tirosina quinasa como el lapatinib (Li y Li, 2013).

4. CÉLULAS MADRE TUMORALES

Las células madre tumorales (CSCs) son células con una alta capacidad para generar tumores. Comparten algunas de las características principales con las células madre normales de los tejidos, como son la auto-renovación y la capacidad de división asimétrica que les permite producir diversos tipos de células. Pero a

diferencia de las células madre normales, las CSCs sufren una desregulación de los procesos de auto-renovación, proliferación y reparación del daño celular, entre otros, lo que les confiere un fenotipo maligno. Además son células que persisten en los tumores y son responsables de la recaída y las metástasis, así como del fracaso del tratamiento (Carrasco y cols., 2014b; La Porta, 2012; Verga Falzacappa y cols., 2012).

Aunque la existencia de CSCs se comprobó hace apenas medio siglo, ya en el siglo XVII George Stahl hablaba de que tras la resección del tumor, podía quedar una “semilla” que fuera capaz de volver a propagarse (Aronowitz, 2007). Posteriormente, en el siglo XIX, después de la observación de las similitudes histológicas entre los tumores y el tejido embrionario aparece la “teoría embrionaria”, propuesta por Virchow en 1858 (Virchow, 1858) y ampliada por Cohnheim en 1877 (Cohnheim, 1877). Según esta teoría, los tejidos adultos tienen un remanente embrionario, que a veces puede salir de su estado latente y convertirse en un tumor (Wu, 2010). Pero no fue hasta la segunda mitad del siglo XX cuando se produjeron los primeros avances en el estudio *in vitro* de las CSCs (Southam y Brunschwig, 1961; Hamburger y Salmon, 1977).

En 1961, Southam y Brunschwig realizaron uno de los primeros experimentos que demostraron la existencia de CSCs en tumores humanos. A partir de muestras de pacientes con neoplasia diseminada, observaron que sólo una pequeña proporción de esas células eran capaces de generar tumores en otras partes del cuerpo de los propios pacientes cuando se inyectaban por vía subcutánea (Southam y Brunschwig, 1961). Y ya en 1997 Bonnet y Dick identificaron y aislaron por primera vez estas células de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA). Se aislaron células que expresan el marcador de superficie CD34, pero que carecían del marcador CD38 (células CD34⁺/CD38⁻), capaces de inducir LMA humana en ratones NOD/SCID. Estas células poseían las capacidades que se esperan para una célula madre leucémica, como son la diferenciación, proliferación y auto-renovación (Bonnet y Dick, 1997).

El origen de estas células no está claro, y de hecho existen varias teorías al respecto. Una de las teorías más extendidas propone que las CSCs derivan de células madre de tejidos normales que sufren una serie de cambios ambientales y/o mutaciones genéticas que causan la desregulación de su capacidad de auto-renovación y de las rutas de diferenciación (Gil y cols., 2008; Yu y cols., 2012). Una segunda teoría sostiene que se originan a partir de células tumorales que se encuentran jerárquicamente debajo de las células madre, pero que no se han diferenciado del todo y han adquirido la capacidad de auto-renovación (Takebe y Ivy, 2010). Otros sin embargo, opinan que se originan a partir de células progenitoras u otro tipo de células más diferenciadas mediante un proceso de desdiferenciación (Visvader y Lindeman, 2008), a través de una transición epitelio-mesenquimal (EMT), capaz de originar células con características y propiedades similares a las de las CSCs, como la motilidad que favorecería la capacidad metastásica. Recientes estudios han identificado un paralelismo entre células sometidas a EMT y el fenotipo CSC, e incluso se han podido generar CSCs de mama mediante inducción de EMT *in vitro* (Ahmed y cols., 2010; Pinto y cols., 2013; Polyak y Weinberg, 2009). Además, números estudios han demostrado que la radioterapia y la quimioterapia pueden incrementar el número de CSCs (Auffinger y cols., 2014; Fillmore y Kuperwasser, 2008; Lee y cols., 2011).

4.1. Características generales

Entre los criterios que se utilizan para definir a las CSCs, los más importantes son su capacidad de auto-renovación y diferenciación a distintos tipos de células no tumorigénicas. Además, las CSCs representan una pequeña fracción de la población total de células tumorales, expresan marcadores de superficie específicos que permiten su identificación y son capaces de inducir tumores en ratones inmunodeficientes (Chen y cols., 2011). No obstante, respecto a las células madre normales, las CSCs presentan un diferente comportamiento biológico, debido principalmente a una desregulación de la capacidad de auto-

renovación. Aparecen diferencias en el modo de división, en el ciclo celular, en la capacidad de replicación, en la reparación del ADN, así como desregulación de rutas de señalización. Todo esto confiere a las CSCs un fenotipo maligno (Verga Falzacappa y cols., 2012).

Las CSCs deben mantener la estabilidad de las rutas de señalización a fin de conservar su capacidad de auto-renovación y diferenciación. Se ha visto que una alteración o una activación excesiva de algunas de ellas pueden inducir el desarrollo tumoral. Entre las rutas de señalización principalmente implicadas encontramos las rutas Wnt, Notch y Hedghog (Hu y Fu, 2012).

La ruta de señalización Wnt está implicada en multitud de procesos celulares, fisiológicos y embriológicos, y ejerce su acción mediante dos vías diferentes. Participa en la determinación del destino celular a través de β -catenina (vía canónica) y en el control del movimiento celular y la polaridad por una vía independiente de β -catenina (vía no canónica). Esta última vía es importante en la embriogénesis, pero poco se conoce sobre su papel en el cáncer. En la vía canónica, en ausencia de las proteínas Wnt, β -catenina es secuestrada por el complejo formado por las proteínas APC, GSK3, y CK1, entre otras. GSK3 y CK1 fosforilan a β -catenina, provocando su ubiquitinización y posterior degradación por el proteosoma 26S. Cuando las proteínas Wnt se unen a sus receptores transmembrana formados por la familia de proteínas Frizzled, se inhibe la acción de GSK3. Esto permite la estabilización de β -catenina en el citoplasma, su translocación al núcleo y la inducción de genes que regulan la progresión del ciclo celular y el crecimiento celular, entre los que se incluyen c-Myc y CD44 (Karamboulas y Ailles, 2013).

El primer gen Wnt de mamíferos descrito fue el Wnt1, identificado como un locus de un gen activado por la inserción retroviral del virus del tumor mamario murino (MMTV). Ratones transgénicos MMTV-Wnt1 desarrollaron hiperplasia de la glándula mamaria y mostraron una mayor propensión a los adenocarcinomas

(Tsukamoto y cols., 1988). Tras ello se ha demostrado la implicación de la desregulación de esta ruta en diferentes tipos tumorales, así como su relación con CSCs de leucemia, y cánceres de mama, colon, hígado o melanoma. Además, esta ruta está implicada en las metástasis, debido a la importancia que tiene en la transición epitelio-mesenquimal (An y cols., 2013; Holland y cols., 2013).

La ruta de señalización Notch es una de las más conservadas evolutivamente y juega un papel importante en la determinación del destino celular, diferenciación y progresión del ciclo celular. En mamíferos, la familia de receptores Notch se compone de cuatro miembros (Notch 1, 2, 3,4). Estos receptores son proteínas transmembrana caracterizadas por un dominio extracelular con repeticiones de tipo EGF, participes en la unión con el ligando. En cuanto a los ligandos, encontramos dos tipos, los ligandos tipo delta (DLL1, DLL3 y DLL4), y las proteínas Jagged (JAG1 y 2) (Hu y Fu, 2012; Karamboulas y Ailles, 2013).

Esta ruta se inicia cuando una célula que expresa uno de los ligandos DLL o JAG interacciona con otra que expresa uno de los receptores Notch. Tras la unión entre ligando y receptor, se produce un cambio conformacional en el receptor que permite la acción del complejo formado por la metaloproteasa ADAM y por secretasas, lo cual provoca la división del receptor en dos fragmentos, uno extracelular y otro intracelular. Este último se transloca al núcleo donde interacciona con factores de unión al ADN nuclear y proteínas co-activadoras, regulando así la activación de factores de transcripción de genes diana, entre los que se incluyen genes de las subfamilias Hey y Hes (Guo y cols., 2011; Sun y cols., 2014). Se ha demostrado la implicación de esta ruta en el mantenimiento de las propiedades CSCs en glioblastoma y cáncer de mama entre otros (Hu y Fu, 2012).

La ruta de señalización Hedgehog (Hh) juega un papel esencial en la regulación del desarrollo embrionario en vertebrados, participando en el mantenimiento de células madre, diferenciación y proliferación celular así como en la polaridad de los

tejidos, entre otros procesos (Gupta y cols., 2010). Esta ruta sigue activa en el adulto, participando en este caso en la regulación de la homeostasis de los tejidos, y en la regeneración y el mantenimiento de células madre. La transducción de la señal se inicia por la unión de los ligandos Sonic Hedgehog (SHh), Desert Hedgehog (Dhh) o Indian Hedgehog (Ihh) a su receptor transmembrana Patched1 (Pth1), lo que provoca que deje de inhibir a la proteína transmembrana Smoothed (Smo). Esta activación de Smo permite la liberación de los factores de transcripción Gli1, Gli2 y Gli3 de un gran complejo proteico, permitiendo su translocación al núcleo y la consiguiente transcripción de genes diana. Gli1 y Gli2 actúan como activadores de los genes diana de Hh, mientras que Gli3 actúa en gran parte como represor (Kasper y cols., 2009; Tanaka y cols., 2009).

Recientemente se ha reconocido la importancia que tiene esta ruta en el cáncer así como su papel como diana terapéutica. Mutaciones o desregulaciones de esta vía están implicadas en la proliferación y la diferenciación celular, lo que conduce a la tumorigénesis o a acelerar el crecimiento del tumor en varios tejidos adultos. Una activación constitutiva de la vía Hh se ha encontrado en varios tipos de tumores como glioblastoma o cáncer de mama, entre otros, y los datos obtenidos a partir de ellos sugieren que la ruta Hh está implicada en la regulación de CSCs (Gupta y cols., 2010; Hu y Fu, 2012).

Las CSCs se relacionan con la resistencia al tratamiento debido a una serie de características:

- Expresión de transportadores asociados a resistencia a multidroga (MDR), aumentando así su capacidad de eliminar fármacos. Sobreexpresan proteínas transportadoras ABC (del inglés "ATP binding cassette"), las cuales utilizan la energía obtenida de la hidrólisis del ATP para expulsar los fármacos hacia el exterior de las células. Entre estas proteínas destacan P-glicoproteína (P-gp/ABCB1), proteína 1 de resistencia a multidroga (MRP1/ABCC1) y la proteína

de resistencia al cáncer de mama (BCRP/ABCG2) (Choi y Yu, 2014; Zinzi y cols., 2014).

- Actividad aldehído deshidrogenasa (ALDH). ALDH es una enzima responsable de la oxidación de aldehídos intracelulares que se encuentra activada de forma específica en varios tipos de CSCs. Su expresión se correlaciona con mal pronóstico en distintos tipos de cáncer, incluido el de mama (Avoranta y cols., 2013; Bi y cols., 2012; Wang y cols., 2012).

- Aumento de la respuesta al daño en el ADN y de la capacidad de reparación del ADN, lo que les permite evadir tratamientos genotóxicos (Bacelli y Trumpp, 2012).

- Aumento de la expresión de antioxidantes, lo que podría protegerlas del daño en el ADN causado por las especies reactivas de Oxígeno, lo que explica, en parte, su resistencia a radioterapia (Bacelli y Trumpp, 2012).

- Quiescencia. Los tratamientos actuales están dirigidos a células en división, y las CSCs escaparían de ellos porque la mayoría se encuentran en estado quiescente, es decir, no se dividen (Zhang y cols., 2012).

Aunque las células responsables de la metástasis o células iniciadoras de metástasis no han sido bien identificadas, hay evidencias que las relacionan con las CSCs. Algunas de estas evidencias indican que las CSCs poseen la capacidad de iniciar un tumor y de expresar marcadores EMT lo que les permitiría migrar y, por tanto, iniciar la metástasis (Bacelli y Trumpp, 2012). También en el proceso metastásico se han visto implicados una serie de receptores de quimioquinas que se expresan en CSCs, tales como CXCR4 en cáncer de páncreas (Hermann y cols., 2007) o CD44 en cáncer de mama (Liu y cols., 2010a) entre otros.

4.2. Aislamiento y caracterización

Entre las principales características que se utilizan para identificar y aislar las CSCs se encuentran la expresión diferencial de marcadores de superficie y de actividad celular (Hu y Fu, 2012). Entre los marcadores más utilizados podemos destacar, entre otros, CD133, CD44, CD24, CD326 (EpCAM), CD116 (ALCAM) o CD118 (CXCR4), que han sido relacionados con varios tipos de cáncer (Hermann y cols., 2010; Vaiopoulos y cols., 2012; Wright y cols., 2008; Zhu y cols., 2010). Aunque se han propuesto una gran variedad de marcadores para cada tipo tumoral, es una herramienta muy útil para poder conocer mejor este tipo de células y así poder actuar de una forma más eficaz contra ellas.

En cuanto a la expresión de actividades celulares, las dos utilizadas son la expresión de proteínas transportadoras ABC y la actividad ALDH. La actividad de las proteínas ABC se demuestra mediante el ensayo conocido como “side population”. Las CSCs que sobreexpresan estos transportadores tienen la capacidad de eliminar ciertos colorantes fluorescentes como Hoechst o rodamina 123, lo cual puede ponerse de manifiesto mediante citometría de flujo. Al realizar la citometría de flujo, sólo una pequeña proporción de células, que se correspondería con la población de CSCs, contendrían una baja o nula fluorescencia ya que los colorantes serían eliminados por la actividad de las proteínas ABC (Liu y cols., 2010b; Moghbeli y cols., 2014; Niess y cols., 2014).

La actividad ALDH se demuestra comúnmente mediante un ensayo de citometría basado en el aldefluor. Esta técnica se basa en la conversión, por medio de la ALDH, del sustrato boron-dipirrometano (BODIPY)-aminocetaldehído en el producto fluorescente BODIPY-aminoacetato. Por ello, la subpoblación de CSCs, que presenta alta actividad ALDH, emite fluorescencia intensamente y puede ser detectada y aislada (Balicki, 2007; Storms y cols., 1999).

Otra de las características de las CSCs es que son más tumorigénicas que el resto de células del tumor, siendo suficiente un pequeño número de ellas para dar lugar a un tumor. Por ello, después del aislamiento con marcadores específicos, se suele realizar un ensayo *in vivo* en ratones inmunodeficientes para verificarlo. Este ensayo generalmente se complementa con un ensayo de “formación de esferas”, esto es un ensayo *ex vivo* de clonogenicidad que mide la capacidad de las células aisladas para formar colonias en cultivos no adherentes. Este ensayo puede ser un sustituto útil del ensayo *in vivo* (Alison y cols., 2011).

4.3. Marcadores específicos de células madre tumorales de mama

Tras el descubrimiento de la existencia de CSCs en leucemia, el primer tumor sólido en el que se identificaron y aislaron fue en el cáncer de mama. Al-Hajj y colaboradores utilizaron un modelo de ratón inmunodeficiente en el que inocularon células de cáncer de mama y observaron que sólo una minoría de ellas era capaz de generar un tumor (Al-Hajj y cols., 2003). Aislaron estas células y las caracterizaron en base a la expresión de marcadores de superficie. En primer lugar diferenciaron las células tumorales del resto por la ausencia de los marcadores de células normales CD2, CD3, CD10, CD16, CD18, CD31, CD64 y CD140b, a lo que llamaron linaje- (Lin-), y luego las clasificaron en función de los marcadores CD44 y CD24. De esta manera identificaron las CSCs de mama (BCSCs) como Lin⁻/CD44⁺/CD24^{-/low}, ya que era la combinación de marcadores de superficie que mayor capacidad tumorigénica tenía, siendo suficiente 100 células con este fenotipo para generar tumores, mientras que miles de células con otros fenotipos no fueron capaces de desarrollarlos.

CD44 es una familia de glicoproteínas de membrana implicadas en adhesión celular y por tanto en el mantenimiento de la integridad tisular. Estas proteínas regulan crecimiento, supervivencia, diferenciación y migración mediante contactos entre las células, o entre ellas y la matriz extracelular (Orian-Rousseau, 2010). Algunas de sus isoformas, y en especial la variante CD44v6, está involucrada en

metástasis y en una mayor agresividad de varios tumores humanos, incluido el cáncer de mama (Afify y cols., 2009).

CD24 es una proteína de la superficie celular similar a la mucina, fuertemente glicosilada, que se une a la membrana plasmática a través de glicosilfosfatidilinositol (Thomas y cols., 2012). Se expresa predominantemente en células hematopoyéticas, y en células tumorales actúa como ligando de P-selectina, lo que permite su interacción con células endoteliales y la adhesión con plaquetas, y por ello podría participar en la diseminación metastásica. También parece estar implicada en la regulación de la proliferación, migración e invasión en células tumorales (Salnikov y cols., 2013).

El fenotipo $CD44^+/CD24^{-/low}$ es el más utilizado para el aislamiento y caracterización de las BCSCs, y de hecho varios ensayos clínicos han confirmado el mal pronóstico de los tumores que poseen este fenotipo (Buess y cols., 2009; Ricardo y cols., 2011). Pero a pesar de ello existen controversias sobre el papel de CD24, ya que algunos estudios asocian su expresión con un peor pronóstico (Buck y cols., 2013; Hosonaga y cols., 2014; Mylona y cols., 2008). Por esta razón, hay una continua búsqueda de marcadores complementarios que ofrezcan un mayor conocimiento sobre estas células.

Otro marcador muy utilizado es la actividad ALDH, que como hemos mencionado anteriormente es un marcador funcional utilizado en varios tipos de cáncer. Ginestier y colaboradores demostraron que ALDH es un marcador de células madre mamarias humanas tanto normales como malignas. Al analizar muestras de tumores encontraron que aunque sólo el 1% de la población positiva para ALDH poseía el fenotipo $Lin^-/CD44^+/CD24^{-/low}$. Estas células presentaron mayor tumorigenicidad, siendo suficiente sólo 20 de ellas para generar un tumor, mientras que del fenotipo $CD44^+/CD24^{-/low}/ALDH^-$ se necesitaron unas 50.000 células (Ginestier y cols., 2007).

Los ensayos de “formación de esferas”, conocidos como formación de mamíferas en el caso del cáncer de mama, también dan buenos resultados a la hora de aislar y enriquecer las BCSCs. Ponti y colaboradores fueron los primeros en propagar *in vitro* como mamíferas no adherentes células madre procedentes de tres muestras de cáncer de mama, así como de una línea celular de carcinoma de mama establecida (Ponti y cols., 2005). De igual modo, Dontu y colaboradores consiguieron propagar mediante estos cultivos 3D células madre normales de mama (Dontu y cols., 2003). Para ello sembraron las células en medio DMEM-F12 libre de suero, complementado con 10 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 5 mg/ml de insulina y 0,4% de albúmina de suero bovino. Este método de aislamiento es utilizado por muchos autores, aunque con algunas modificaciones en el medio de cultivo, como es el uso del suplemento B27 (Invitrogen) (Kuch y cols., 2013).

Este es un método útil para el estudio de las propiedades de las BCSCs, así como para analizar nuevas estrategias terapéuticas frente a ellas. Sin embargo, todavía no está claro si estos cultivos celulares son realmente BCSCs o por el contrario progenitores intermedios que adquirieron propiedades de células madre debido a causas genéticas o al propio mantenimiento en cultivo. Aun así, la formación de mamíferas sirve además como una medida indirecta de la capacidad de auto-renovación, y también se correlaciona con la capacidad de inducir tumores en ratones inmunodeprimidos (Velasco-Velázquez y cols., 2012).

5. CICLO CELULAR

5.1. Definición

El ciclo celular es una secuencia cíclica y ordenada de procesos que culminan con el crecimiento de la célula y su división en dos células hijas. Por tanto, podemos decir que es el tiempo que transcurre desde el término de una división celular

hasta el final de la siguiente división, con una duración variable en función de la estirpe celular (Sánchez, 2006). Para que la división celular tenga éxito tienen que darse dos condiciones esenciales: que la replicación del ADN sea exacta y que los cromosomas replicados se distribuyan correctamente entre las dos células descendientes (Baychelier y Vieillard, 2013).

En los organismos pluricelulares la división celular es esencial para el desarrollo y crecimiento del organismo y para la regeneración de células envejecidas o dañadas (Karp, 2014).

5.2. Fases del ciclo celular

En las células eucariotas el ciclo celular se divide en cuatro fases que se suceden de forma cíclica y que básicamente pueden ser divididas en dos etapas funcionales, fase M o mitosis y fase S o de síntesis de ADN, que se encuentran separadas por intervalos (del inglés “gap”) de diferente duración conocidos como fases G_1 y G_2 (Calegari y Waskow, 2014).

Clásicamente el ciclo celular se divide en dos periodos: interfase y mitosis. La interfase comprende el periodo en el que la célula no se está dividiendo, es el periodo más largo, durando hasta un 95% del total del ciclo celular, y engloba tres fases del ciclo celular (G_1 , G_2 y M) y una fase quiescente o de reposo (G_0). La mitosis o fase M, es el periodo de división celular y comprende la mitosis propiamente dicha o cariocinesis (división del núcleo) y la citocinesis (división del citoplasma) (Karp, 2014).

- Fase G_1 , transcurre entre la mitosis y la síntesis de ADN. Es una fase muy activa metabólicamente en la que la célula aumenta de tamaño, se sintetizan desoxiribonucleótidos y enzimas necesarias para la replicación y se generan nuevos orgánulos (mitocondrias, ribosomas y estructuras membranosas).

- Fase S, es la fase de síntesis o replicación del ADN. Además se sintetizan las histonas, proteínas asociadas al ADN en eucariotas. Al final de esta fase en el núcleo aparecen los cromosomas duplicados, formados por dos cromátidas idénticas.

- Fase G₂, comprendida entre la síntesis de ADN y la mitosis. En esta fase, la célula vuelve a aumentar de tamaño, a generar la energía gastada durante la fase S y se sintetizan las enzimas necesarias para la mitosis. Además, permite a la célula comprobar que la replicación ha ocurrido con éxito antes de dividirse.

- Fase M, es la fase de división celular. En ella se sincronizan la división del núcleo y la división del citoplasma, con lo que la célula madre se divide en dos células hijas, cada una de las cuales llevará una dotación completa de cromosomas (Yasutis y Kozminski, 2013).

La duración de estas fases varía considerablemente según el tipo celular, pero para una célula tipo con un ciclo celular de 24 horas la distribución sería la siguiente: la fase G₁ es la fase más variable, pudiendo durar entre 6 y 12 horas. En algunos casos, en condiciones subóptimas de crecimiento, esta fase puede durar días, meses o años, e incluso hay células que no vuelven a dividirse y pasan toda su vida en un estado quiescente conocido como fase G₀. La duración del resto de fases es más constante, siendo de entre 8 y 9 horas para la fase S, entre 2 y 3 para la fase G₂ y de 1 hora para la fase M (Kapinas y cols., 2013; Sánchez, 2006).

5.3. Regulación del ciclo celular

A lo largo del ciclo celular existen una serie de puntos de control que evalúan las condiciones intra y extracelulares para evitar que el ciclo progrese si las condiciones no son las adecuadas. Estos puntos de control actúan sobre todo en respuesta a daños en el ADN, de manera que detienen el ciclo celular para reparar el daño, pero si el daño no puede ser reparado impiden de manera permanente la

progresión del ciclo. Al final de la fase G_1 existe lo que se conoce como punto de restricción, en el cual las células detienen su crecimiento si las condiciones no son las adecuadas, pero una vez que lo sobrepasan, las células se comprometen a progresar a través del ciclo, independientemente de las condiciones ambientales (Bertoli y cols., 2013; Iyer y Rhind, 2013).

Existen al menos tres puntos de control: transición fase G_1 -S, S y transición G_2 -M. El primer punto de control se encuentra al final de la fase G_1 , para reparar los daños que se encuentren en el ADN antes de que sea replicado en la siguiente fase. En el punto de control de la fase S se reparan los errores que ocurran durante la replicación o los daños causados al ADN durante esta fase, bloqueando mientras la replicación. Y por último aparece el punto de control G_2 -M para reparar los daños que se ocasionan en G_2 o que han escapado a los dos puntos de control anteriores, e impedir así que la célula se divida con errores (Bucher y Britten, 2008; Chen y cols., 2012).

El ciclo celular se regula principalmente por proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), cuya activación depende de su unión a ciclinas. Diferentes CDKs se unen a diferentes ciclinas formando una serie de complejos que se van expresando a lo largo del ciclo y van regulando la transición entre las distintas fases (Zhao y cols., 2011).

5.3.1. Quinasas dependientes de ciclina (CDKs)

Las CDKs son una familia de serin/treonin quinasas cuya actividad catalítica depende de su unión a subunidades reguladoras positivas conocidas como ciclinas. Esta familia está formada por 26 miembros, y aunque una de sus funciones más estudiadas es la regulación del ciclo celular, sólo algunas ellas (CDK1, 2, 3, 4, 6) están involucradas en este proceso. La mayoría de los miembros de la familia de CDKs, están implicados en otros procesos celulares, incluyendo la

transcripción, traducción, procesamiento del ARNm o control de la función y diferenciación neuronal (Mikolcevic y cols., 2012).

La concentración de CDKs se mantiene más o menos constante a lo largo del ciclo celular, y la activación de su actividad enzimática está regulada por cuatro mecanismos moleculares (Hisanaga y Endo, 2010; Karp, 2014; Noatynska y cols., 2013): asociación con las ciclinas correspondientes (regulación positiva), dando lugar a los complejos CDK/ciclina, y cuya formación depende de la síntesis y degradación de las ciclinas; activación de los complejos mediante fosforilación en el residuo de treonina en posición 160, o 161 en el caso de la CDK1; asociación con inhibidores de CDKs (CKIs), que constituye un mecanismo de regulación negativa; y la fosforilación inhibidora en los residuos Treonina 14 y tirosina 15.

Los complejos CDK/ciclina son específicos para cada fase del ciclo celular, y su activación secuencial es esencial para una correcta progresión del ciclo celular (Diaz-Padilla y cols., 2009; Lim y Kaldis, 2013) (figura 3).

Al principio de la fase G_1 , CDK4 y CDK6 se unen a ciclina D, y actúan estimulando la transcripción y expresión de genes necesarios para la progresión de la fase G_1 . Estos complejos fosforilan la proteína Rb, liberándose el factor de transcripción E2F, dando lugar a la expresión de genes implicados en el ciclo celular, entre los que encontramos los genes que codifican las ciclinas E y A. Así se genera un entorno adecuado para la actividad de CDK2, y por tanto para la continuación del ciclo (Ang y cols., 2014; Echalié y cols., 2010; Satyanarayana y Kaldis, 2009).

CDK2 se asocia con las ciclinas A y E, y es esencial para la progresión del ciclo durante las fases G_1 y S. Al final de la fase G_1 , CDK2 se activa mediante su unión con la ciclina E, lo que posibilita pasar el punto de restricción de la fase G_1 y que se pueda iniciar la fase S. Durante esta fase, la ciclina E es remplazada del complejo por la ciclina A, permitiendo la progresión de la fase S y por tanto la

replicación del ADN, mediante la fosforilación de proteínas implicadas en este proceso (Deng y cols., 2014; Satyanarayana y Kaldis, 2009).

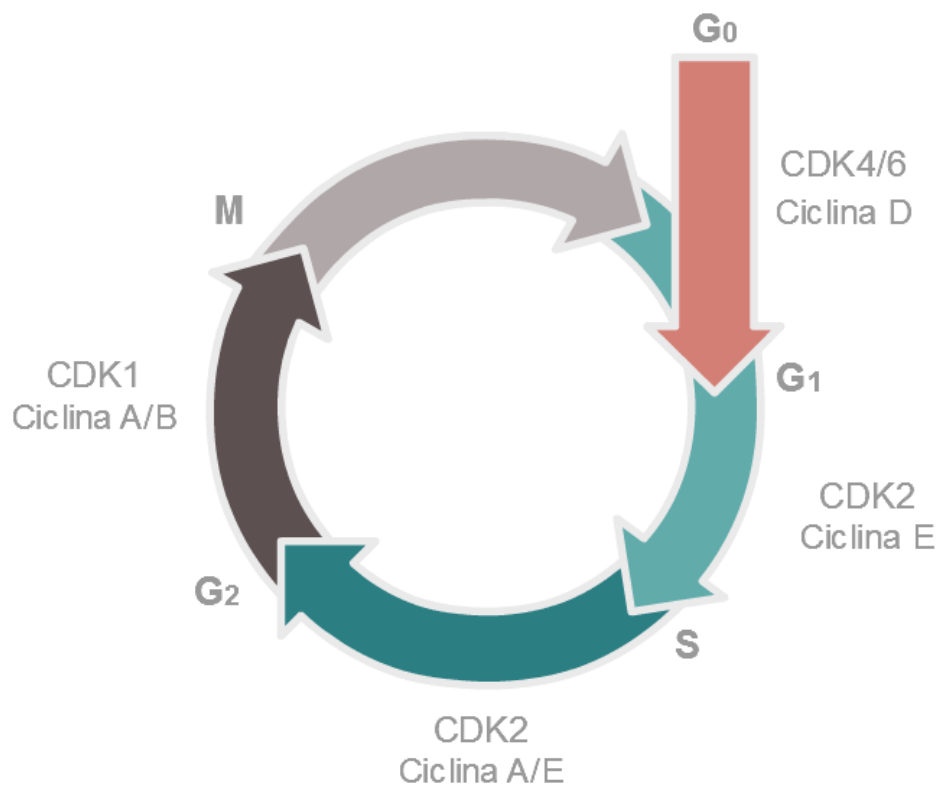


Figura 3. Fases del ciclo celular y sus complejos CDK/ciclinas

Tras ello, actúa CDK1, también conocida como cdc2, implicada en la transición de la fase G₂ a la fase M, siendo su activación necesaria para la progresión de la mitosis. Durante la transición G₂-M se requiere su activación mediante la unión a ciclina A para el inicio de la profase. Tras ello se une a la ciclina B, sintetizada durante las fases S y G₂. Durante esas fases se da una acumulación de complejos CDK1/ciclina B, que actúan fosforilando los efectores necesarios para el desarrollo de la mitosis. En la transición metafase/anafase la ciclina B es degradada, de manera que se inhibe la actividad de CDK1 permitiendo que el ciclo celular vuelva a la fase G₁. Aunque este es el papel principal y más conocido de CDK1, parece

que también actúa en la transición entre otras fases del ciclo celular. (Hu y Moscinski, 2011; Lim y Kaldis, 2013; Rhind y Russell, 2012).

5.3.2. Ciclinas

Las ciclinas son una familia de proteínas activadoras de serin/treonin quinasas, cuya concentración varía en función de la fase del ciclo celular en la que se encuentre la célula, y que regulan la activación de CDKs (Karp, 2014).

En los mamíferos hay cuatro clases principales de ciclinas: A, B, D y E, cuya localización varía, siendo la ciclina E principalmente citoplasmática, mientras que el resto son nucleares (Satyanarayana y Kaldis, 2009). Estas ciclinas alcanzan su concentración máxima cada una en una fase diferente del ciclo permitiendo así la activación de las diferentes CDKs y por tanto la progresión del ciclo (figura 4). En consecuencia tenemos ciclinas cuya máxima expresión se da en fase G₁ (ciclinas D), otras en transición G₁-S (ciclina E), y otras que aparecen en la fase G₂-M (ciclinas A y B), también conocidas como ciclinas mitóticas (Lim y Kaldis, 2013; Sánchez y cols., 2009; Wolgemuth y cols., 2013).

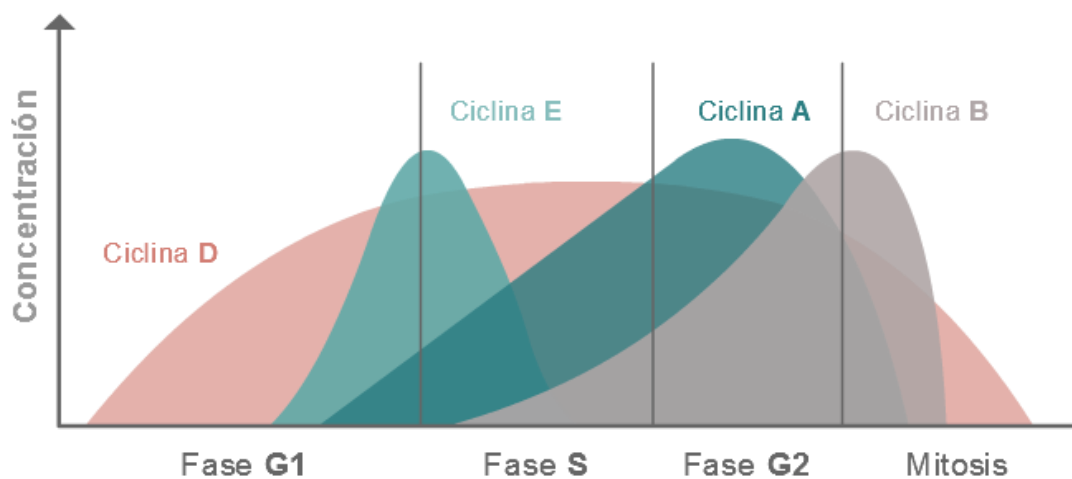


Figura 4. Concentración de ciclinas a lo largo del ciclo celular (Modificada de Sánchez y cols., 2009)

La familia de ciclinas D (1, 2 y 3) son las primeras que aparecen en el ciclo celular, y como hemos visto anteriormente se unen a CDK4 y CDK6 para regular la transición G₁-S. Sus niveles se mantienen bajos durante la fase G₀ y van aumentando a lo largo de G₁, manteniéndose así durante el resto del ciclo (Zhao y cols., 2011). En cuanto a su síntesis, se induce en respuesta a factores de crecimiento, pero en ausencia de ellos se degradan rápidamente, impidiendo que las células pasen de G₁ a S, por lo que quedarían inactivas o entrarían en fase G₀ (Weis y cols., 2014).

La ciclina D1 fue la primera de su familia en ser identificada. Su principal función es el control y la regulación del ciclo celular como hemos comentado, pero también se le atribuyen funciones independientes de CDK, y por tanto no propias del ciclo celular. Parece jugar un papel en el desarrollo neuronal y en la regulación de genes en el Sistema Nervioso, y además se ha demostrado que es una proteína de unión al ADN (Hasanali y cols., 2012).

La ciclina E se sintetiza al final de la fase G₁, donde activa a CDK2 para así promover la progresión del ciclo celular. Una vez la célula ha pasado el punto de restricción y comienza la fase S, la ciclina E es degradada por proteólisis dependiente de ubiquitina (Brandt y cols., 2011). Tras la degradación de la ciclina E, en la fase S la ciclina A se va a unir a CDK2 para regular la iniciación y síntesis del ADN. Además tiene un papel importante en la transición G₂-M, ya que coordina la activación del complejo CDK1/ciclina B (Blanchard, 2014).

Para la activación del complejo CDK1/ciclina B es necesario que haya gran cantidad de ciclina B en la célula. La transcripción de esta ciclina comienza en la fase S, siendo necesaria la actividad del complejo CKD2/ciclina A para que ocurra, y los mayores niveles los alcanza al final de G₂ y al inicio de la mitosis. Al inicio de la metafase es degradada por un proceso de ubiquitinación llevado a cabo por el complejo APC/C (del inglés "anaphase-promoting complex/cyclosome"), y continúa así hasta el inicio de la fase S, donde este complejo es inhibido, entre otros por

fosforilación mediada por CDK2/ciclina A. De esta manera se regula la síntesis y degradación de la ciclina E, quedando su expresión limitada al final del ciclo (Lindqvist y cols., 2009).

5.3.3. Inhibidores de CDKs

Existen dos familias de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs): la familia INK4 formada por p15, p16, p18 y p19, y la familia Cip/Kip formada por p21, p27 y p57. El equilibrio entre las CDKs y sus inhibidores parece ser responsable de la proliferación celular; las CDKs promueven la proliferación, mientras que los CKIs se encargan de frenarla (Tateishi y cols., 2012).

Las proteínas de la familia INK4 se unen de forma selectiva a las quinasas CDK4 y CDK6, por lo que actúan solamente a nivel de la fase G₁ temprana. Al unirse directamente a estas CDKs alteran su estructura, lo que impide su unión con ciclinas D, y por tanto su activación (Cuomo y cols., 2011; Forget y cols., 2008). Generalmente no se expresan en células en proliferación y se inducen rápidamente en respuesta a señales antiproliferativas como TGFβ (Blain, 2008).

Las proteínas de la familia Cip/Kip, a diferencia de las INK4, se unen tanto a las ciclinas como a las CDKs de todos los complejos, por lo que actúan en las diferentes fases del ciclo celular (Besson y cols., 2008; Cuomo y cols., 2011; Tateishi y cols., 2012). Aunque en un primer momento se identificaron como inhibidores, p21 y p27 parecen tener además un papel regulador cuando se encuentran en el citoplasma, promoviendo la unión de CDK4/6 con ciclinas D. Esta interacción es más compleja, concentraciones fisiológicas de p21 y p27 promueven la activación de los complejos CDK (4/6)/ciclina D pero niveles mayores parecen tener un efecto inhibitor. Además, el secuestro de estos inhibidores por parte de los complejos CDK(4/6)/ciclina D los aleja de los complejos CDK2/ciclina E/A lo que facilita su activación y por tanto la continuidad del ciclo celular (Besson y cols., 2008; Yoon y cols., 2012).

Además de su papel en el ciclo celular, los miembros de la familia Cip/kip participan en otras funciones celular independientes de los complejos CDK/ciclinas, como pueden ser apoptosis, migración celular o transcripción. El mecanismo de acción de p21 y p27 depende de su fosforilación y localización celular, actuando como supresores de tumores cuando se encuentran en el núcleo o como oncogenes cuando se encuentran en el citoplasma (Haque y cols., 2014; Yang y cols., 2014c; Yoon y cols., 2012).

p21 se identificó como una diana transcripcional de p53 que también aparece implicada en la inhibición de la actividad de los complejo CDK/ciclina, y durante la senescencia y la reparación del daño en el ADN. En respuesta a un daño en el ADN se activa p53, el cuál induce la expresión de p21, bloqueando el ciclo celular en fase G₁ y reparando el daño o induciendo apoptosis en el caso de que el daño no pueda ser reparado. Además, la expresión de p21 también se regula de una manera independiente de p53, por la acción a nivel transcripcional de un grupo de oncogenes o de genes supresores de tumores. p21 se une al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), inhibiendo directamente la replicación del ADN en fase S (Perez-Sayans y cols., 2013; Warfel y El-Deiry, 2013).

Muchas señales antiproliferativas inducen la expresión de p27, que se acumula en células quiescentes y en fase G₁, inhibiendo la continuidad del ciclo celular. Para que la célula pueda progresar hacia la fase S, los niveles de p27 han de reducirse, lo que se consigue mediante una degradación proteolítica a nivel transcripcional. Se reduce rápidamente gracias a un bucle de retroalimentación positiva: el complejo CDK2/ciclina E fosforila a p27 favoreciendo su reconocimiento por la ligasa ubiquitina Skp2 y su posterior degradación, lo que va a permitir que se activen más complejos CDK2/ciclina E, aumentando así la fosforilación y degradación de p27. Además, al igual que p21, tiene funciones independientes de CDK, como son la regulación de la migración celular o la inhibición de la replicación del DNA mediante su unión al factor MCM7 (Jäkel y cols., 2012).

5.4. Ciclo celular y cáncer

La conexión entre el ciclo celular y cáncer es evidente. El ciclo celular controla la proliferación celular, y el cáncer se caracteriza por una proliferación inadecuada (Chulu y Liu, 2009), por lo que la desregulación del ciclo celular es un aspecto fundamental en el desarrollo del cáncer. A diferencia de las células normales, que proliferan sólo en respuesta a señales mitogénicas, la proliferación de las células tumorales no siempre responde a este tipo de señales, y más específicamente, al control proliferativo establecido en el tejido. Además las células tumorales también son capaces de evitar los puntos de control del ciclo celular que detienen la proliferación en respuesta a daños en el ADN (Díaz-Moralli y cols., 2013; Torres y cols., 2014).

En muchos tumores humanos se encuentran dañados genes implicados en el control del ciclo celular. Por ejemplo, las CDKs se encuentran sobreactivadas en algunos tipos de cáncer, debido a la sobreexpresión de ciclinas o una disminución de la regulación de CKIs. Por ello, algunos investigadores están buscando una estrategia contra el cáncer basada en la inhibición de CDKs. Hay estudios que sugieren que esta inhibición puede ser eficaz frente a diferentes tipos de cáncer, incluido el de mama (Nwabo Kamdje y cols., 2014).

Pero no sólo ciclinas y CDKs se pueden encontrar alteradas en cáncer, sino que podemos encontrar mutaciones en una amplia variedad de rutas de transducción de señales que conllevan a una desregulación de la maquinaria implicada en la progresión del ciclo celular, lo que puede conducir a una desregulación de la actividad CDK. Por ejemplo, es frecuente encontrar alteraciones en la función del gen Rb, principal regulador de la transición G₁-S, y por tanto las CDKs que regulan su función, principalmente CDK2, 4 y 6 se consideran unas dianas terapéuticas importantes frente al cáncer (Santamaria y Ortega, 2006).

El ciclo celular, al ser un punto donde convergen rutas de señalización oncogénicas y al estar su desregulación implicada en la proliferación aberrante característica de las células tumorales, es una diana prometedora para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer (Williams y Stoeber, 2012).

6. APOPTOSIS

6.1. Definición

El término apoptosis proviene de la palabra griega cuyo significado es “caída”. Fue propuesto por Kerr y cols. en 1972 para definir al proceso de muerte celular controlada, complementario pero opuesto a la mitosis, con características morfológicas, bioquímicas y genéticas concretas, que se activa o inhibe en respuesta a una gran variedad de estímulos ambientales (Kerr y cols., 1972).

La apoptosis es un fenómeno natural regulado fisiológicamente, fundamental para el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis tisular (Poon y cols., 2014). Se distingue de la muerte por necrosis, principalmente, por ser una muerte celular programada controlada genéticamente y por la ausencia de una respuesta inflamatoria asociada (Gkogkou y cols., 2014).

Morfológicamente, las células apoptóticas se caracterizan por experimentar un redondeo y una reducción del volumen celular, retracción de pseudópodos, ruptura de las uniones por desmosomas, incremento de la condensación del citoplasma, condensación de la cromatina y posterior fragmentación del núcleo, modificaciones ultraestructurales de algunos orgánulos citoplasmáticos como retículo endoplasmático y mitocondrias, y finalmente la formación de protuberancias en la membrana plasmática que dan lugar a los cuerpos apoptóticos que serán fagocitados por los macrófagos o células adyacentes sin provocar respuesta

inflamatoria ni daño tisular (Aghbali y cols., 2013; Blankenberg y Norfray, 2011; Kroemer y cols., 2008).

Los principales cambios bioquímicos que sufren las células apoptóticas son activación de las caspasas, fragmentación del ADN, desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico, disipación del potencial transmembrana mitocondrial y pérdida de la asimetría de la membrana citoplasmática que produce la exposición de la fosfatidilserina en la superficie celular (Tait, 2008; Wlodkowic y cols., 2012). Estas características suelen utilizarse como un indicador de apoptosis, aunque no deben usarse de forma exclusiva, ya que es posible que algunas células no muestren algunos de estos cambios. Por ejemplo, la fragmentación del ADN no siempre ocurre en este tipo de muerte celular (Kroemer y cols., 2008).

6.2. Mecanismos moleculares de la apoptosis

Los ejecutores principales de la apoptosis son las caspasas, una familia de cisteín-aspártico proteasas intracelulares, cuya activación da lugar a los cambios morfológicos y bioquímicos descritos anteriormente. En humanos se han identificado 11 caspasas implicadas en procesos inflamatorios (caspasas 1, 4 y 5) o en apoptosis. Estas últimas se dividen en dos grupos: caspasas iniciadoras (2, 8, 9 y 10) y caspasas efectoras (3, 6 y 7), dependiendo del momento en el que actúan. Las caspasas iniciadoras son las primeras en actuar, y son responsables de la activación de las caspasas efectoras (MacKenzie y Clark, 2012).

Las caspasas se regulan a nivel postraducciona, asegurando así que puedan activarse rápidamente. Se sintetizan como procaspasas, zimógenos inactivos o de baja actividad, que para dar lugar a la enzima activa deben de sufrir una oligomerización o proteólisis. Estas procaspasas constan de un prodominio N-terminal junto a dos subunidades, una pequeña (de aprox. 10 KDa) y otra grande (de aprox. 20 KDa). Los dos grupos de caspasas apoptóticas se diferencian también en el tamaño del prodominio N-terminal, siendo largo en el caso de las

caspasas iniciadoras y corto en las caspasas efectoras (Taylor y cols., 2008; Venero y cols., 2013).

La apoptosis es un proceso regulado que implica la interacción de moléculas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas. La apoptosis en mamíferos puede ocurrir por dos vías principales: la vía intrínseca, mediada por la despolarización de la membrana mitocondrial, o la vía extrínseca, mediada por receptores de muerte de la membrana celular (Hassen y cols., 2012) (figura 5).

La vía intrínseca o vía mitocondrial se inicia en respuesta a estímulos internos como pueden ser daño irreparable en el ADN, hipoxia, estrés oxidativo, altos niveles de Ca^{+2} citosólico o deprivación de factores de crecimiento. Estos estímulos, al causar un daño irreparable, desencadenan la transcripción de p53, que estimulará a otras proteínas implicadas en apoptosis para iniciar la cascada de muerte celular (Karp, 2014; Nunes y cols., 2014). La principal familia de proteínas que regula la vía intrínseca es conocida como Bcl-2, y está formada por miembros pro-apoptóticos como Bax, Bak, Bid o Bad entre otros y anti-apoptóticos como Bcl-2, Bcl-XL o Bcl-W. Las proteínas pro-apoptóticas promueven la liberación del citocromo c, mientras que las anti-apoptóticas lo impiden.

Cuando se produce un desequilibrio entre proteínas pro y anti-apoptóticas en favor de las primeras, t-Bid interacciona con Bax y Bad alterando la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que produce la liberación de diversos factores pro-apoptóticos al citoplasma, entre los que destaca el citocromo c. Una vez liberado, el citocromo c formará junto con Apaf-1 y caspasa 9 un complejo denominado apoptosoma que activará a la caspasa 3. Otros de los factores apoptóticos liberados desde la membrana mitocondrial son Smac/DIABLO u Omi/HtrA2. Éstos se unen a proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAP), impidiendo su interacción con las caspasas 3 o 9, promoviendo de esta manera su activación (Huerta y cols., 2007; Nunes y cols., 2014; Wong, 2011).

La vía extrínseca se inicia cuando unos ligandos específicos se unen a los receptores, denominados genéricamente receptores de muerte. Estos receptores se encuentran en la membrana citoplasmática y se encargan de la transducción de señales apoptóticas desde el espacio extracelular al citoplasma. Entre los receptores de muerte más conocidos encontramos el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1) y el receptor Fas, cuyos ligandos son, respectivamente, TNF y FasL. Estos receptores presentan un dominio de muerte intracelular por el que se unen a las proteínas adaptadoras TRADD o FADD. Cuando el ligando se une a su receptor, se forma el sitio de unión para la proteína adaptadora, formándose entre los tres un complejo conocido como complejo de la señal inductora de muerte (DISC). Este complejo recluta a la procaspasa 8, que se activa y libera en el citoplasma, activando a su vez a la caspasa efectora 3 (Krüger y Mooren, 2014; Rahman y cols., 2012; Sankari y cols., 2012).

Ambas vías convergen en la caspasa 3, la vía intrínseca por medio de la caspasa 9 y la extrínseca por la caspasa 8. La caspasa 3 separa al inhibidor de la desoxirribonucleasa activada por caspasa, que será la responsable de los efectos a nivel nuclear. Además, el resto de caspasas que actúan después inducen la escisión de proteínas quinasas, del citoesqueleto, reparadoras del ADN y de subunidades inhibitoras de endonucleasas. Además afectan a la estructura del citoesqueleto, a las vías de señalización y a la regulación del ciclo celular, lo que contribuye a los cambios morfológicos típicos de la apoptosis (Wong, 2011).

6.3. Apoptosis en células tumorales

La función de la apoptosis es eliminar células dañadas o potencialmente dañinas, por lo que su alteración juega un papel importante en la carcinogénesis. Defectos en la apoptosis permiten a las células neoplásicas sobrevivir durante más tiempo, lo que les da mayor tiempo para acumular alteraciones genéticas que afecten a la proliferación, diferenciación, desarrollo de angiogénesis, y aumenten la invasividad (Hassan y cols., 2014).

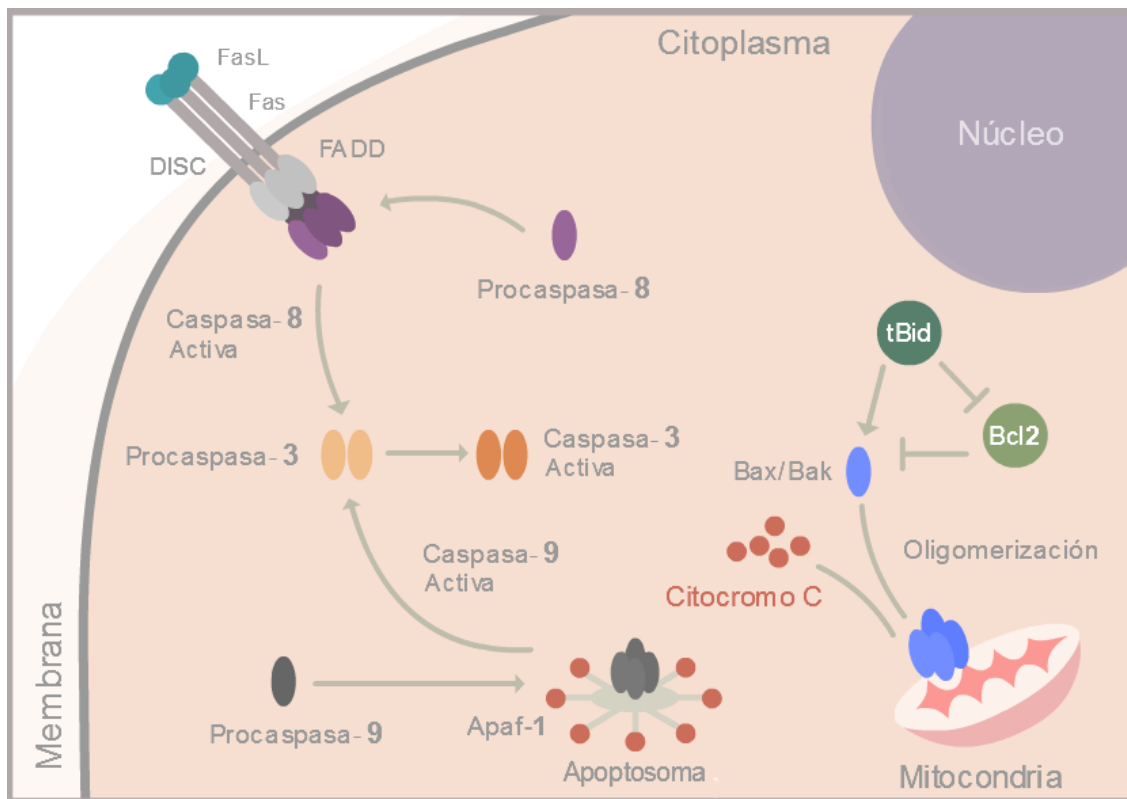


Figura 5. Vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis (Modificada de Kurokawa y Kornbluth, 2009)

Existen tres mecanismos principales por los que las células tumorales adquieren resistencia a la apoptosis o la reducen: desequilibrio entre las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, función reducida de las caspasas y deficiencias en la señalización de los receptores de muerte (Sankari y cols., 2012).

La familia de proteínas Bcl-2 incluye proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, y juegan un papel muy importante en el desarrollo de la apoptosis, sobre todo en la vía intrínseca. Cuando se da un desequilibrio entre ellas se desregula la apoptosis. Esto puede ser debido a una reducción de la expresión de proteínas pro-apoptóticas, a una sobreexpresión de las proteínas anti-apoptóticas o a una combinación de ambas (Dewson y Kluck, 2010; Rahman y cols., 2012). Por ejemplo, Raffo y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de Bcl-2

protege a las células de cáncer de próstata de la apoptosis (Raffo y cols., 1995). En el caso de la leucemia linfocítica crónica, se ha demostrado *in vivo* que las células tumorales presentan altos niveles de Bcl-2, y bajos de proteínas proapoptóticas como Bax, por lo que el desarrollo tumoral se debería sobre todo a una reducción de la apoptosis, más que a un aumento de la proliferación (Goolsby y cols., 2005). p53 regula la expresión de proteínas de la familia Bcl-2, por lo que alteraciones en su función van a afectar a la apoptosis (Sankari y cols., 2012).

Como mencionamos anteriormente, las caspasas son los ejecutores principales de la apoptosis, por lo que no es de extrañar que una disminución de sus niveles o de su función esté relacionada con una disminución de la apoptosis y con la carcinogénesis. De hecho, es relativamente frecuente encontrar mutaciones en esta familia de proteínas en varias neoplasias. Se han encontrado mutaciones tanto en caspasas efectoras como en iniciadoras en diferentes tipos de cáncer (Ghavami y cols., 2009).

En el caso de los receptores de muerte, se ha comprobado que a veces los ligandos se unen a receptores “señuelo” que no presentan dominio de muerte, por lo que no se inicia la señalización. También se han encontrado algunas anomalías en esta vía de señalización que pueden permitir la evasión de la apoptosis, como son una baja regulación de los receptores o un deterioro en la función del receptor, lo que alteraría la señalización y por tanto reduciría la apoptosis. Además, hay estudios que relacionan estos problemas en los receptores con resistencia a fármacos (Wong, 2011).

Todos estos defectos que permiten a las células tumorales evadir la apoptosis pueden ser utilizados como dianas terapéuticas contra el cáncer. Así, los tratamientos que puedan restaurar las vías apoptóticas hacia la normalidad permitirán activar selectivamente la muerte de las células tumorales. En la actualidad, muchas de las estrategias terapéuticas en desarrollo están dirigidas a los principales reguladores de la apoptosis. Entre las dianas más utilizadas para

este tipo de terapias encontramos activadores de caspasas, las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, p53, TNF o IAP, entre otros (Hassan y cols., 2014; Zielinski y cols., 2013).

7. ESTRÉS OXIDATIVO

7.1. Definición

El estrés oxidativo fue definido por primera vez por Sies en 1985 como un desequilibrio entre los prooxidantes y los sistemas antioxidantes en favor de los primeros (Sies, 1985). Más recientemente ha sido definido como una situación en la que el estado de los radicales libres se ve aumentado de forma crónica o transitoria, lo cual altera el metabolismo celular y su regulación, y daña los constituyentes celulares (Lushchak y Gospodaryov, 2012).

El estrés oxidativo es una consecuencia inevitable de vivir en una atmósfera rica en oxígeno. Las especies reactivas de oxígeno se generan, mayoritariamente, de forma natural como subproductos del metabolismo aeróbico. De aquí surge la “paradoja del oxígeno”, y es que el oxígeno puede causar daño en muchas formas de vida para las que a su vez es esencial en la producción de energía (Davies, 1995).

7.2. Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas que contienen uno o más electrones desapareados y que pueden existir de forma independiente. La presencia de estos electrones no apareados confiere a los radicales libres una alta reactividad, tomando parte fácilmente en reacciones químicas con componentes de la célula para donar u obtener otro electrón y alcanzar la estabilidad. Pueden ser generados

por reacciones homolíticas, heterolíticas o reacciones de reducción-oxidación (Powers y Jackson, 2008; Vera-Ramirez y cols., 2011).

Los radicales libres más abundantes son los radicales de oxígeno y los derivados de éstos, que generalmente se conocen como especies reactivas de oxígeno (ROS), siendo el principal el anión superóxido (O_2^-), pero también incluye otros como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($HO\cdot$) o el oxígeno singlete (1O_2). Otra familia importante de radicales libres son las especies reactivas de nitrógeno (RNS), entre los que encontramos el óxido de nitrógeno ($NO\cdot$), el catión nitrosonio (NO^+), el anión nitroxilo (NO^-) o el peróxido nítrico ($ONOO^-$) (Aprioku, 2013; Nowak, 2013).

La principal fuente de ROS endógeno es la mitocondria, donde se producen de forma accidental durante la cadena respiratoria, siendo el principal ROS el anión superóxido. Pero también existe una fuente de ROS exógena debida a la exposición a agentes ambientales, como las radiaciones ultravioleta o ionizantes (Kim y Byzova, 2014; Zorov y cols., 2014). ROS se forman como subproductos normales del metabolismo celular, e intervienen en la transducción de señales y transcripción de genes. A bajas concentraciones son esenciales para varios procesos fisiológicos, incluyendo fosforilación de proteínas, crecimiento, proliferación y diferenciación celular, apoptosis, inmunidad celular y defensa contra microorganismos. Sin embargo, cuando se producen en exceso pueden dañar la funcionalidad celular debido a que pueden aceptar electrones de moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ADN, alterando su función (Rajendran y cols., 2014; Vera-Ramirez y cols., 2011).

7.3. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias capaces de “atrapar” radicales libres y por lo tanto de contrarrestar los efectos perjudiciales del estrés oxidativo en los tejidos corporales. Los antioxidantes terminan las reacciones en cadena de los radicales

libres mediante la neutralización de los intermediarios, inhibiendo así otras reacciones oxidativas. Esto lo consiguen donando electrones a los radicales libres, reduciéndolos y convirtiéndolos en moléculas estables sin volverse ellos inestables. Por lo tanto, los antioxidantes son a menudo agentes reductores (Aprioku, 2013; Baradaran y cols., 2014).

Existe un conjunto de antioxidantes, de naturaleza enzimática o no enzimática, que actúan de manera organizada en el organismo para protegerlo del daño oxidativo o repararlo, y para mantener la homeostasis. Entre los antioxidantes enzimáticos encontramos las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. Existen muchos antioxidantes no enzimáticos, algunos de ellos son sintetizados endógenamente como el glutatión o la bilirrubina, mientras que otros se incorporan con la dieta como son las vitaminas C y E o el β -caroteno (Kaur y cols., 2014).

En cuanto a su actividad, presentan diferentes estrategias. Unos actúan convirtiendo los ROS en moléculas menos activas y evitando que se transformen en otras moléculas perjudiciales. Por ejemplo, la enzima superóxido dismutasa reduce el anión superóxido a peróxido de hidrógeno y agua, y la catalasa se encarga de transformar ese peróxido en agua y oxígeno. Otros antioxidantes lo que hacen es reducir la disponibilidad de pro-oxidantes, como hacen proteínas que se unen a iones metálicos.

Otros antioxidantes, generalmente de bajo peso molecular, como glutatión, vitamina C o E reducen los radicales libres por donación de electrones, pero en el proceso se generan otros radicales libres adicionales, como la vitamina C oxidada, lo que requiere que actúen enzimas adicionales para regenerar el antioxidante (Kaur y cols., 2014; Powers y Jackson, 2008; Samuel y cols., 2014).

7.4. Daño oxidativo en las estructuras celulares

El estrés oxidativo influye en los organismos vivos ya que los radicales libres al ser altamente inestables interactúan con componentes celulares, principalmente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, modificando su función (Samuel y cols., 2014).

La peroxidación de los lípidos es un proceso celular normal, que llega a ser muy perjudicial cuando las células se encuentran bajo condiciones de estrés oxidativo. En este caso si afecta a los lípidos de la membrana se producen alteraciones en las propiedades biológicas de ésta, modificando su fluidez, lo que puede llevar a inactivar receptores o enzimas anclados en ella y afectar a la función normal de la célula (Avery, 2014). Los radicales libres, y en particular el radical hidroxilo, reaccionan con los lípidos de la membrana, rompiéndolos y formando una gama de productos oxidativos primarios como los hidroperóxidos lipídicos y secundarios como los malonildialdehidos (MDA) o el trans-4-hidroxi-2-noenal (4-HNE). Este proceso ocurre en tres etapas: iniciación, propagación y terminación, generándose productos secundarios como MDA y 4-HNE, que son altamente reactivos, y que pueden reaccionar con otros sustratos biológicos como las proteínas o el ADN (Kaur y cols., 2014; Shah y cols., 2014).

Las proteínas, debido a su abundancia, son las biomoléculas cuantitativamente más afectadas por los radicales libres. Éstos causan daños en las proteínas tanto estructuralmente, alterando desde la estructura primaria a la cuaternaria, como funcionalmente. Este daño puede ocurrir por interacción directa con los radicales libres, o de manera indirecta por la interacción con productos secundarios originados por el estrés oxidativo como los radicales lipídicos anteriormente comentados, y por medio de varios mecanismos, como puede ser la rotura del péptido o modificación de la cadena lateral de los aminoácidos. Aunque puede afectar a todos los aminoácidos, es más frecuente encontrar modificaciones en lisina, arginina, prolina y treonina. El daño en la proteínas suele ser irreparable y

conlleva una serie de consecuencias como la inhibición de la actividad enzimática o de unión de esas proteínas, un aumento o disminución de la captación por las células, un aumento de la capacidad de agregación y de la proteólisis, e incluso puede modificar la inmunogenicidad (Avery, 2014; Venkataraman y cols., 2013).

El exceso de ROS también causa un daño importante en el ADN, tanto nuclear como mitocondrial, siendo este último el más susceptible debido a que se encuentra más cerca de la principal fuente de ROS celular. Este daño implica roturas en las cromátidas o pérdidas de fragmentos cromosómicos, entrecruzamientos o modificaciones de purina, pirimidina o desoxirribosa, mediado por reacciones de oxidación, metilación, depurinación o desaminación de bases. La escisión del ADN inducida por ROS suele ocurrir en la región internucleosomal, lo que da lugar a un patrón de fragmentación similar al de la apoptosis. El estrés oxidativo también puede dañar el ARN, tanto ribosómico como mensajero (Kaur y cols., 2014; Venkataraman y cols., 2013).

7.5. Estrés oxidativo y cáncer

El daño en el ADN juega un papel muy importante en mutagénesis y carcinogénesis, por lo que el daño oxidativo en el ADN puede estar implicado en la etiología del cáncer. De hecho, hay evidencias que sugieren que el estrés oxidativo puede ser un factor iniciador en el desarrollo del cáncer. El sistema de reparación del ADN es continuo, pero en situaciones de alto estrés oxidativo pierde capacidad de reparación, lo que contribuye a un aumento de la mutagénesis y por tanto del proceso carcinogénico (Bridge y cols., 2014; Kaur y cols., 2014).

Tal y como señalamos, debido al daño que causan los radicales libres en los componentes celulares, y especialmente en el ADN, el estrés oxidativo parece desempeñar un papel en la iniciación y promoción de la carcinogénesis. Los radicales libres colaboran en la transformación celular causando daño oxidativo en el ADN, tanto de forma directa como indirecta por la generación de productos

altamente reactivos como los peróxidos lipídicos. Los daños en el ADN producen inestabilidad y mutaciones en genes implicados en el desarrollo del cáncer, como es el gen supresor de tumores p53; así como alteraciones en proteínas implicadas en rutas de señalización relacionadas con la proliferación celular. Sin embargo, se puede dar el efecto opuesto si los niveles de ROS se regulan y se mantiene el balance oxidativo. Esto puede aumentar la expresión de p53 e inducir apoptosis en las células tumorales, lo que inhibiría el proceso tumoral (Alawadi y cols., 2011; Saeidnia y Abdollahi, 2013; Vera-Ramirez y cols., 2011).

Las células tumorales presentan unos niveles de ROS elevados en comparación con sus homólogas normales, esto es debido a su alta actividad metabólica. Los antioxidantes celulares no son suficientes para contrarrestar este exceso de ROS, lo que las mantiene en un estado crónico de estrés oxidativo. Estos niveles de ROS crónicamente elevados parecen promover cambios adaptativos que juegan un papel fundamental en la progresión tumoral, mediante la alteración de las rutas de señalización que promueven supervivencia, proliferación, adaptación al microambiente y migración (Bourgeois y cols., 2013; Hole y cols., 2011).

Las células tumorales tienen que presentar mecanismos adaptativos para contrarrestar los efectos tóxicos del estrés oxidativo. Se ha visto, que con el fin de evitar los efectos perjudiciales de ROS, las células tumorales regulan activamente la producción de proteínas antioxidantes en las zonas de mayor emisión de ROS. Muestras de tejido de pacientes con cáncer han mostrado un aumento en los niveles de enzimas antioxidantes (Glasauer y Chandel, 2014; Sainz y cols., 2012).

Por tanto, las células tumorales, en comparación con las normales, presentan mayores niveles de ROS, pero también de proteínas antioxidantes con el fin de mantener el equilibrio oxidativo. Esto permite a los altos niveles de ROS activar las rutas de señalización implicadas en procesos carcinogénicos, pero sin un acúmulo excesivo de ROS que podría inducir muerte celular o senescencia (Glasauer y Chandel, 2014). Sin embargo, al ser tan elevados los niveles de estrés oxidativo,

utilizan todos los mecanismos de adaptación y tienden a agotar su capacidad antioxidante, a diferencia de las células normales, que al mantener los niveles de ROS bajos, reservan una mayor capacidad antioxidante para hacer frente a otros daños oxidativos (Gupte y Mumper, 2009).

8. COMPUESTOS NATURALES Y SUS DERIVADOS CON PROPIEDADES ANTITUMORALES

A lo largo de la historia, los compuestos naturales se han utilizado como una fuente de productos para aliviar todo tipo de enfermedades. Como ejemplos actuales podemos nombrar algunos analgésicos como la aspirina o los opioides, o antibióticos como la penicilina (Cherblanc y cols., 2013). Por ello, no es de extrañar que en el caso del cáncer también se utilicen compuestos naturales o sus derivados, muchos de los cuales se incluyen dentro de los regímenes estándar de quimioterapia (Zhong y cols., 2012). De hecho, más del 70% de los compuestos anticancerígenos tienen un origen natural, siendo productos naturales, o derivados de ellos (Karikas, 2010). Además, cabe destacar, que desde 1998 a 2008, un 36% de las moléculas de primera línea aprobadas por la FDA eran de origen natural o derivados naturales (Swinney y Anthony, 2011).

En primer lugar, y gracias a su accesibilidad, la búsqueda de compuestos antitumorales de origen natural se centró en los organismos terrestres, pero luego, gracias a los avances en las técnicas de análisis, la búsqueda se dirigió también a organismos marinos y microorganismos. La enorme diversidad estructural y la bioactividad de compuestos derivados de estos organismos ha permitido identificar muchos principios activos ampliamente utilizados, incluyendo: irinotecan, vincristina o paclitaxel, aislados a partir de extractos vegetales; doxorubicina, mitomicina C, o actinomicina D, obtenida a partir de microorganismos; o citarabina, ziconotida o aplidina, aislados de organismos marinos (Robles-Fernández y cols., 2013).

Sin embargo, sigue siendo necesaria la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales. Los principios activos aislados a partir de estos organismos podrían mejorar su potencial terapéutico mediante cambios en su estructura. La modificación de los grupos funcionales podría permitir generar análogos con mayor actividad farmacológica y con menos efectos secundarios. Además, estas tareas se pueden complementar con cribados de alto rendimiento, química combinatoria y computacional, y bioinformática, con objeto de obtener compuestos mucho más eficientes que los utilizados actualmente (Bauer y Brönstrup, 2014; McKee y cols., 2014).

La síntesis de compuestos derivados naturales comenzó en 1853 con la aspirina, y ya en 1964 se aprobó el uso del primer compuesto natural, la actinomicina, en cáncer. Tras ello y hasta 1997, otros medicamentos de origen natural como las antraciclinas, camptotecinas o taxanos fueron una parte esencial del tratamiento del cáncer. A partir de 1997, con el desarrollo de las terapias dirigidas con moléculas sintéticas y anticuerpos, el desarrollo de los compuestos naturales se redujo mucho, y de hecho hasta 2007 no se aprobó ningún nuevo compuesto natural contra el cáncer en EEUU. Sin embargo, esta nueva tendencia terapéutica no proporcionó los resultados esperados, ni una mejora en la esperanza de vida de los pacientes, por lo que se retomó el interés por los compuestos naturales. Debido a ello, desde 2007 se han aprobado 12 nuevos productos de origen natural para el tratamiento del cáncer, tales como la rapamicina y sus derivados (Basmadjian y cols., 2014).

8.1. Compuestos naturales de origen vegetal

A lo largo de la historia del hombre, se han utilizado todo tipo de productos vegetales como medicamentos, en lo que representa el antecedente más significativo de la medicina moderna (Nobili y cols., 2009).

Muchos de los compuestos utilizados tradicionalmente contra el cáncer provienen de organismos vegetales. Entre ellos destacamos los taxanos como el paclitaxel, aislado a partir de *Taxus brevifolia*, o el docetaxel, aislado a partir de *Taxus baccata*. El paclitaxel es uno de los medicamentos más eficaces contra los cánceres de mama y ovario, y su uso ha sido aprobado a nivel mundial. Otro grupo de compuestos vegetales lo forman los alcaloides de la vinca, vincristina, vinblastina y vindesina, aislados a partir de *Catharanthus roseus*. El mecanismo de acción de estos compuestos se basa en la desestabilización de los microtúbulos, lo que conduce a la detención del ciclo celular y a la inducción de apoptosis. Otros compuestos vegetales utilizados actualmente contra el cáncer son las camptotecinas aisladas de *Camptotheca acuminata*, entre las que destaca el irinotecan, o las podofilotoxinas obtenidos a partir de *Podophyllum peltatum*. En estos casos el mecanismo de acción se basa en la inhibición de las topoisomerasas de ADN, enzimas necesarias para la replicación del ADN, recombinación y transcripción (Nobili y cols., 2009; Robles-Fernández y cols., 2013).

Existen otros muchos compuestos de origen vegetal con capacidad antitumoral que están siendo estudiados en ensayos preclínicos e incluso clínicos. Entre ellos cabe destacar las combretastatinas, una familia de estilbenos aislada a partir de *Combretum caffrum* que actúan como agentes de alteración vascular a través de su interacción con la tubulina, produciendo la oclusión de los vasos sanguíneos que suministran oxígeno y nutrientes a la masa tumoral, y causando por tanto la muerte de las células tumorales (Banerjee y cols., 2008; Hori y cols., 2014).

Uno de los representantes más activos de esta familia es la combretastatina A4, pero presenta poca solubilidad acuosa por lo que se ha sintetizado un profármaco fosfatado para solventar este problema (CA4P). Esta combretastatina presenta una toxicidad selectiva hacia la vasculatura tumoral y en modelos *in vivo* produce la regresión del tumor con dosis por debajo de la máxima tolerada. Además, existen

ensayos clínicos en fase I que demostraron que CA4P reduce el flujo sanguíneo en los tumores a dosis bien toleradas. Esto ha conducido a la realización de diferentes ensayos en fase II para valorar el uso de CA4P en el tratamiento del cáncer de tiroides anaplásico avanzado; en combinación con paclitaxel y carboplatino para el tratamiento de tumores sólidos avanzados; o en combinación con bevacizumab, carboplatino y paclitaxel en el caso del cáncer de pulmón de células no pequeñas (Nathwani y cols., 2013; Rustin y cols., 2010).

8.2. Compuestos naturales aislados de microorganismos

Aunque, como hemos comentado anteriormente, el hombre ha utilizado productos naturales para el tratamiento de enfermedades durante miles de años, la era de la quimioterapia moderna comenzó en la década de 1940. Durante la Segunda Guerra Mundial (1939-1945), la demanda de penicilina y de otros nuevos antibiótico llevó a las principales compañías farmacéuticas a desarrollar nuevos programas de investigación centrados en el estudio de productos naturales con el fin de identificar metabolitos secundarios que presentaran nuevas actividades biológicas, incluyendo la actividad antitumoral (Giddings y Newman, 2013).

El primer antibiótico con actividad antitumoral descubierto fue la actinomicina D, aislada por Waksman y Woodruff en 1940 a partir de *Actinomyces antibioticus* (Waksman y Woodruff, 1941). Este compuesto actúa como inhibidor de la ARN polimerasa, y es un miembro de la familia de antibióticos de las actinomicinas que se han aislado de bacterias del suelo del género *Streptomyces*. En 1963 la actinomicina D se aprobó para el tratamiento de tumores altamente malignos, sin embargo su uso se ha restringido debido a su alta toxicidad. Las dosis de actinomicina D se calculan para cada paciente y se usa principalmente en el caso de rhabdomyosarcomas y tumores de Wilms en niños (Giddings y Newman, 2013).

Tras el descubrimiento de las actinomicinas, se probó la actividad antitumoral y se desarrolló el uso clínico de una amplia variedad de antibióticos aislados de

microorganismos terrestres, como las bleomicinas, mitomicinas, mitramicinas, y antraciclina. Entre estas encontramos la daunorrubicina y la doxorubicina, aisladas a partir de *Streptomyces peucetius* y varias cepas relacionadas (Giddings y Newman, 2013).

La doxorubicina es una de las antraciclina más utilizadas, ya que presenta gran actividad, incluso a dosis bajas, frente a una amplia variedad de tumores humanos tales como leucemias, linfomas, tumores sólidos como el cáncer de mama o tumores sólidos de niños. En los años 80 se estableció como tratamiento de primera línea para el cáncer de mama, tanto en estadio temprano como avanzado, un régimen de quimioterapia combinada basado en doxorubicina (Carvalho y cols., 2014; Crozier y cols., 2014). Se han propuesto varios modelos para explicar el mecanismo por el cual la doxorubicina es capaz de causar la muerte celular, entre ellos destaca la inhibición de las topoisomerasas I y II, formación de aductos de ADN, generación de estrés oxidativo o sobreproducción de ceramida (Tacar y Dass, 2013; Yang y cols., 2014a). Sin embargo, presenta varios inconvenientes que limitan su uso, como es la aparición de resistencia en las células tumorales, efectos secundarios, y sobre todo su cardiotoxicidad, que puede conducir a una insuficiencia cardíaca en los pacientes (Thorn y cols., 2011).

Además de microorganismos terrestres, también se han utilizado microorganismos marinos para el aislamiento de compuestos antitumorales, entre los que podemos destacar la salinosporamida A, un metabolito secundario aislado a partir de *Salinospora tropica*, un actinomiceto encontrado en sedimentos marinos. La salinosporamida A ha demostrado ser un potente inhibidor del proteosoma 20S, con una alta actividad antitumoral, que incluso se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento de una amplia variedad de tipos tumorales (Ma y cols., 2011; Niewerth y cols., 2014). Debido a que son microorganismos difíciles de cultivar, se estudió su síntesis completa en laboratorio, y se consiguió desarrollar en 2004 bajo el nombre de Marizomib, que actualmente se encuentra en fase de ensayo clínico. En este ensayo se ha administrado junto con vorinostat a pacientes de melanoma,

cáncer de páncreas y cáncer de pulmón, aumentando la actividad antitumoral a una dosis tolerable (Millward y cols., 2012; Reddy y cols., 2004).

Un método para el descubrimiento de nuevos productos naturales, puede ser explotar entornos inusuales, como por ejemplo los drenajes ácidos de las minas, ya que en estas zonas existe una alta presión ecológica que puede desencadenar la producción de nuevos metabolitos. El cocultivo de especies de estos entornos con otros microorganismos puede inducir la expresión de genes que se encontraran silenciados, produciéndose así nuevos metabolitos secundarios. Un ejemplo sería el cocultivo de la cepa bacteriana KMK-001 de *Sphingomonas sp.* con la cepa KMC-901 del hongo *Aspergillus sp.* que da como resultado la producción de un metabolito secundario llamado glionitrin A, que presenta actividad antimicrobiana y antiproliferativa frente células tumorales (Park y cols., 2009; Robles-Fernández y cols., 2013).

8.3. Compuestos naturales de origen marino

El mar es una fuente de compuestos naturales poco explorada debido a las dificultades técnicas para recoger muestras y el poco conocimiento que se tiene de él (Zhou, 2014). Sin embargo, el desarrollo de las técnicas de buceo y los avances en la recogida de muestras en aguas profundas han permitido identificar un gran número de compuestos marinos, aunque son muy pocos los que se encuentran en evaluación clínica o preclínica (Nobili y cols., 2009).

En 2004 se aprobó en Estados Unidos por primera vez un compuesto aislado de un organismo marino para el tratamiento del dolor. Este fue la ziconotida, aislado a partir de un caracol tropical. Y en 2007, se aprobó en la Unión Europea la trabectedina, primer fármaco antitumoral de origen marino (Molinski y cols., 2009). La trabectedina, también conocido como ecteinascidina 743 o ET-743, y comercializado por Pharmamar bajo el nombre de Yondelis, inicialmente se aisló a partir del tunicado caribeño *Ectenascidia turbinata*, y actualmente se produce por

semi-síntesis a partir de cianosafracina B, un metabolito producido por *Pseudomonas fluorescens* (Cuevas y cols., 2000; van Kesteren y cols., 2003).

En cuanto al mecanismo de acción de la trabectedina, parece ser que se une por un enlace covalente al surco menor del ADN e interactúa con diferentes proteínas del sistema de reparación del ADN NER, inhibiendo su acción y conduciendo a la célula a una muerte celular por apoptosis, de manera independiente de p53. Además, estudios de ciclo celular en células tumorales han demostrado que produce una parada en las fases G₂-M. La obtención de buenos resultados *in vitro* e *in vivo* permitieron su desarrollo y posterior aprobación para el tratamiento de sarcoma de tejidos blandos y cáncer de ovario (D'Incalci y cols., 2014; Kawano y cols., 2014; Mayer y cols., 2010). Además, se están realizando ensayos clínicos en diferentes fases para conocer su posible uso en el tratamiento de otros tipos de cáncer como el de mama, pulmón o próstata, su uso en combinación con otros fármacos o para conocer su actividad en los diferentes subtipos de sarcoma (Blay, 2014; Blay y cols., 2014a, 2014b).

PM00104 es un alcaloide sintético con estructura similar a la trabectedina, y otros compuestos naturales como la juromicina, reineramicinas y safracinas, aislados de nudibranchios, esponjas y bacterias, respectivamente. Ha mostrado una buena actividad antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo* frente a una variedad de tumores humanos, y en la actualidad se encuentra dentro de diferentes ensayos clínicos en fase II para su uso en el tratamiento de sarcoma de Ewing, carcinoma urotelial, mieloma múltiple, cáncer de endometrio o cervical. En cuanto a su mecanismo de acción es similar al de la trabectedina, ya que se une al ADN pudiendo causar una ruptura de la doble hélice que conduciría a la parada del ciclo y a la muerte celular. Aunque las diferencias en su estructura hacen que la unión al ADN ocurra de una manera diferente (Petek y Jones, 2014).

Otro de los pocos compuestos de origen marino que han sido aprobados para el tratamiento del cáncer es el mesilato de eribulina, conocido con el nombre

comercial de Halaven. Es una cetona macrocíclica análoga de la halicondrina B, aislada originalmente de la esponja marina *Halichondria okada*, y que actúa por inhibición de los microtúbulos. Presenta una estructura más sencilla que la halicondrina B pero conserva las propiedades farmacéuticas del compuesto natural, como es el efecto antimitótico irreversible que produce en las células tumorales causándoles la muerte celular. Fue aprobado por la FDA en 2010 para el tratamiento de cáncer de mama metastásico con progresión de la enfermedad después de haber recibido dos regímenes de quimioterapia para enfermedad en etapa avanzada (Basmadjian y cols., 2014; Dezső y cols., 2014).

Existen otros muchos compuesto de origen marino con propiedades antitumorales que se encuentran en estudios preclínicos o clínicos. Entre ellos encontramos la elisidepsina, un péptido cíclico derivado del kahalalide F, un compuesto antitumoral aislado a partir de la babosa marina *Elysia rufescens*. Elisidepsina ha mostrados una alta actividad antitumoral *in vitro* frente a una gran variedad de líneas celulares tumorales humanas. En un ensayo clínico en fase I con pacientes de cáncer sólido avanzado los resultados preliminares mostraron actividad antitumoral con dosis bien toleradas (Mayer y cols., 2010; Salazar y cols., 2012).

Otros compuestos de origen marino a destacar son las neopeltolidas, aisladas de la familia de esponjas marinas *Neopeltidae*, cuya actividad antitumoral parece estar mediada por su acción sobre el citocromo c (Kinghorn y cols., 2009). O los merosesquiterpenos, compuestos anticancerígenos naturales derivados de esponjas marinas y formados por una unidad sesquiterpeno unida a un grupo fenol (Robles-Fernández y cols., 2013).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

1. Una nueva familia de merosesquiterpenos sintéticos presenta cierta analogía estructural con la fracción activa de otras moléculas naturales con actividad antitumoral, como es el caso de las puupehenonas, unos metabolitos secundarios aislados a partir de esponjas marinas, y que destacan por sus propiedades citotóxicas, antimicrobianas e inmunomoduladoras. Por todo ello, planteamos la siguiente hipótesis:

Una nueva familia de merosesquiterpenos sintéticos presenta actividad antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*.

2. Recientemente se ha señalado que las células madre tumorales son importantes para el desarrollo y la progresión del cáncer, así como para la resistencia a la quimioterapia. Por todo ello, planteamos la siguiente hipótesis:

El conocimiento en profundidad de la biología de las células madre tumorales de mama y el desarrollo de terapias específicas frente a ellas mejorarán los resultados clínicos del cáncer de mama.

Objetivos

1. Analizar la actividad antiproliferativa de nuevos merosesquiterpenos sintéticos frente a líneas celulares tumorales de mama, colon y pulmón.
2. Identificar el mecanismo de acción por el que actúan los compuestos, centrándonos en sus efectos sobre el estrés oxidativo, el ciclo celular, la apoptosis y la transición epitelio-mesenquimal.
3. Estudiar el efecto de los merosesquiterpenos sobre el desarrollo de tumores *in vivo*, utilizando un modelo murino inmunocompetente de isoinjerto.
4. Analizar las alteraciones estructurales inducidas por los compuestos en los tumores y sus efectos sobre la expresión de marcadores pronóstico.
5. Revisar la implicación clínica de las células madre tumorales en el cáncer de mama, las dianas terapéuticas identificadas y los ensayos clínicos que se centran en su análisis.

RESULTADOS

Novel merosesquiterpene exerts a potent antitumor activity against breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*

Esther Carrasco ^{a,b}, Pablo Juan Álvarez ^a, Consolación Melguizo ^a, José Prados ^a, Enrique Álvarez-Manzaneda ^c, Rachid Chahboun ^c, Ibtissam Messouri ^c, María Isabel Vázquez-Vázquez ^a, Antonia Aránega ^a, Fernando Rodríguez-Serrano ^a,

^a *Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), University of Granada, 18071 Granada, Spain*

^b *PhD Program in Biomedicine, University of Granada, 18071 Granada, Spain*

^c *Department of Organic Chemistry, Institute of Biotechnology, University of Granada, 18071 Granada, Spain*

European Journal of Medicinal Chemistry 79 (2014) 1-12

European Journal of Medicinal Chemistry 79 (2014) 1–12



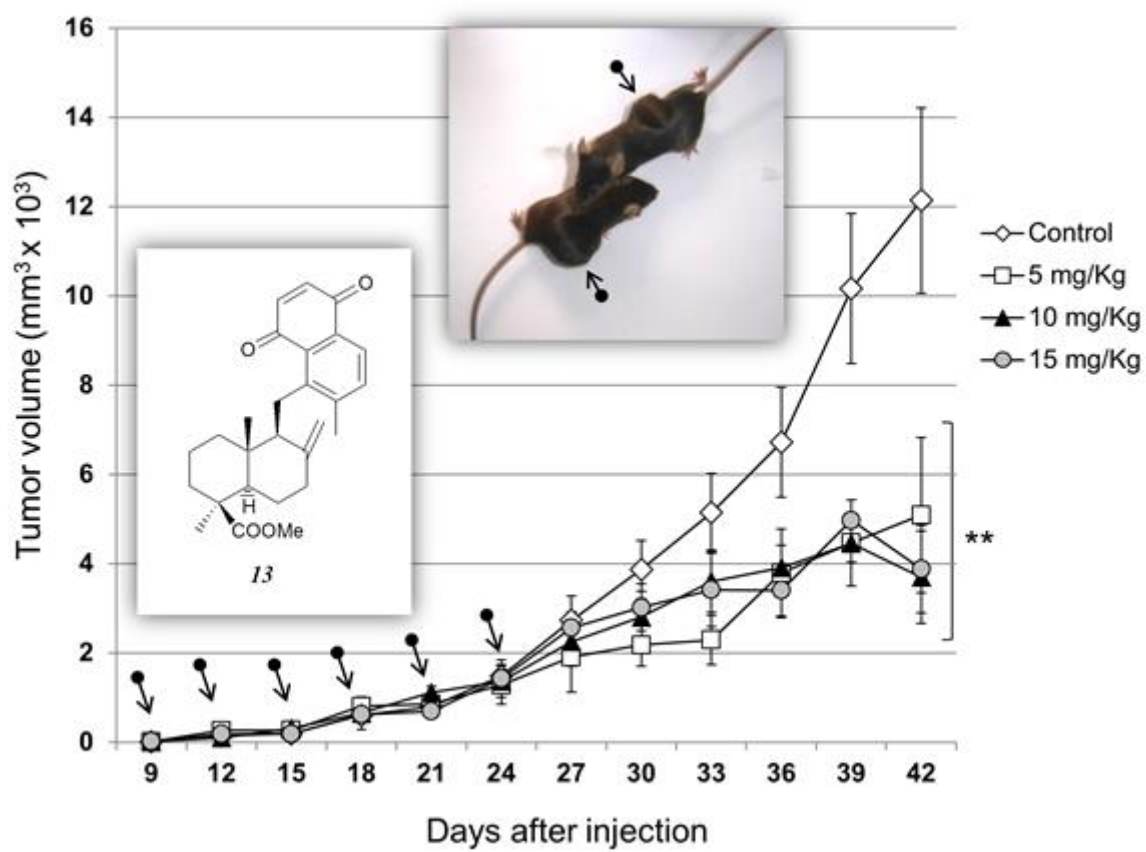
Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



Graphical abstract



Abstract

This article describes the antitumor properties of a new family of merosesquiterpenes, which were synthesized by Diels-Alder cycloaddition of the labdane diene *trans*-communic acid, highly abundant in *Cupressus sempervirens*, or its methyl ester, with the appropriate dienophile. These compounds demonstrated potent cytotoxic activity *in vitro* against human breast, colon, and lung tumor cells. We highlight the elevated activity (IC_{50} : $0.35 \pm 0.10 \mu\text{M}$) and specificity (TI: 9) of compound **13** against the MCF-7 line, which corresponds to the most prevalent breast cancer cell subtype, luminal A. It was found that compound **13** exerts its anti-tumor action by inducing oxidative stress, arresting the cell cycle in stages G_0 - G_1 , and activating apoptosis, which are all associated with low cyclin D1 regulation, pRb hypophosphorylation, increased expression of p27 and p53, and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) fractioning. Epithelial-mesenchymal transition, a phenomenon associated with metastasis promotion and a worsened prognosis also appeared to be inhibited by compound **13**. In addition, it markedly reduced tumor development in immunocompetent C57BL/6 mice with allografts of E0771 mouse breast tumor cells (luminal A subtype). According to these findings, this new family of compounds, especially compound **13**, may be highly useful in the treatment of human breast cancer.

1. Introduction

The term cancer defines a group of diseases characterized by the uncontrolled growth of cells and their dissemination to other body tissues through blood and lymphatic vascular systems. Cancer is one of the main causes of death worldwide, with 12.7 million new cases and 7.6 million deaths in 2008 according to the World Health Organization [1, 2]. Generally, cancers of the breast, lung, colorectal, and prostate cancer have been the most frequent types in developed countries and cancers of the stomach, liver, oral cavity, and cervix cancer the most frequent in developing countries, although these patterns are changing, especially due to population aging and life style changes [3].

Breast cancer is the most frequent cancer among women worldwide, with 1.38 million new cases being diagnosed in 2008. Although the mortality rate is much lower than the incidence (around 6-19 per 100,000), it remains the first cause of death by cancer in females [1]. Breast cancer is currently treated with surgical resection, chemotherapy, radiotherapy, and/or hormone therapy, but there is an elevated rate of recurrence and development of metastatic disease, largely attributable to the onset of resistance to some chemotherapies or other treatments. There is a need to develop more effective and selective treatments that produce lesser systemic toxicity and do not generate resistance [4,5].

Medicinal plants have been used as a source of therapeutic agents against all types of disease for thousands of years. For instance, natural compounds and their derivatives have been used as anticancer agents, including many widely administered "standard" chemotherapeutics such as paclitaxel, vinblastine, or vincristine, among others [6]. Attention first centered on terrestrial organisms, given their accessibility, and then turned to marine organisms and microorganisms, aided by advances in analysis techniques [7].

Natural products of mixed biosynthetic origin (polyketide-terpenoid) containing a sesquiterpene unit joined to a phenolic or quinone moiety are generally named “merosesquiterpenes” [8]. The most important metabolites of this family are the compounds bearing a bicyclic terpene (drimane) moiety, mainly due to their potent biological activities. Drimenyl phenols include the cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibitors wiedendiol A (**1**) and wiedendiol B (**2**), isolated from the marine sponge *Xestospongia wiedenmayeri* [9]. Drimenyl quinones include: the antitumor tauranin (**3**), isolated from *P. spinarum*, a fungal strain endophytic in *Platycladus orientalis* [10], which also inhibits cholesterol biosynthesis; the anti-HIV (+)-hyatellaquinone (**4**), found in the sponge *Hyatella intestinalis* [11]; and the recently reported discomycete metabolite (–)-F-12509 A (**5**), which exhibits sphingosine kinase inhibitory activity [12] (Fig. 1).

More recently, merosesquiterpenoids with different functionalities on the C-4 of the drimane moiety were reported. These include: the 15-human lipoxygenase (15-HLO) inhibitor jaspic acid (**6**), found in the Papua New Guinea marine sponge *Jaspis cf. johnstoni* [13]; the antileishmanial disulfated meroterpenoid ilhabrene (**7**), isolated from the Brazilian marine sponge *Callyspongia* sp. [14]; and the fungitoxic terpenoid-quinone pycnanthuquinone C (**8**), isolated from the stem bark of *Pycnanthus angolensis* (Welw.) [15].

The two-synthon strategy is the most frequently applied method for synthesizing this type of compound and usually involves the reaction of a drimane electrophile with a nucleophilic phenol derivative [16]. However, this strategy has some drawbacks: a nucleophilic aromatic synthon must be utilized, preventing the straightforward generation of compounds bearing electrophilic groups, such as COOR, COR, and CN in the phenolic moiety, i.e., the immediate precursors of metabolites **3** and **6**. In addition, the two-synthon strategy involves the use of a drimane electrophile, which is usually prepared in a multistep synthetic sequence from a labdane diterpene.

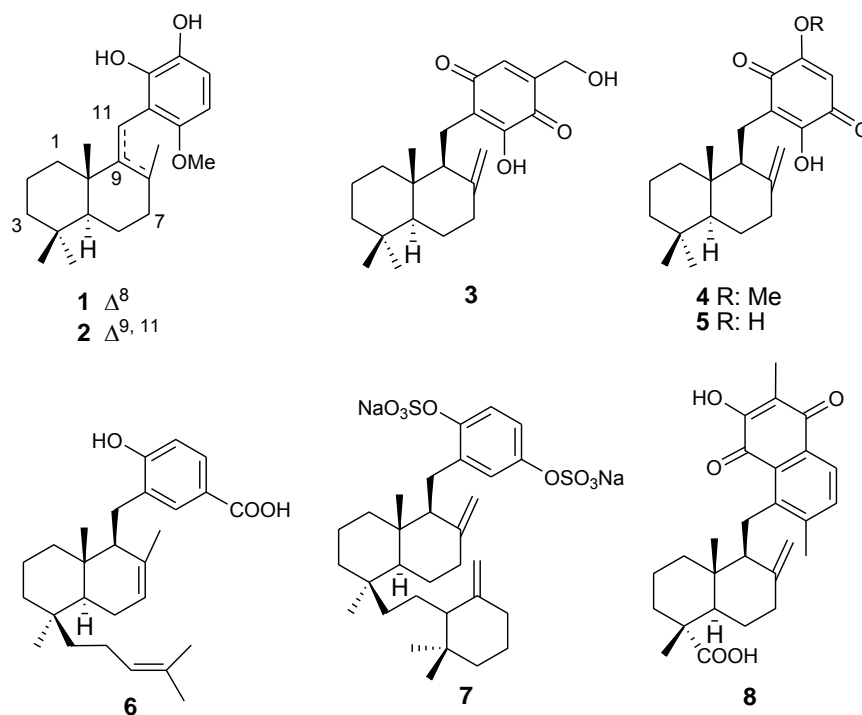
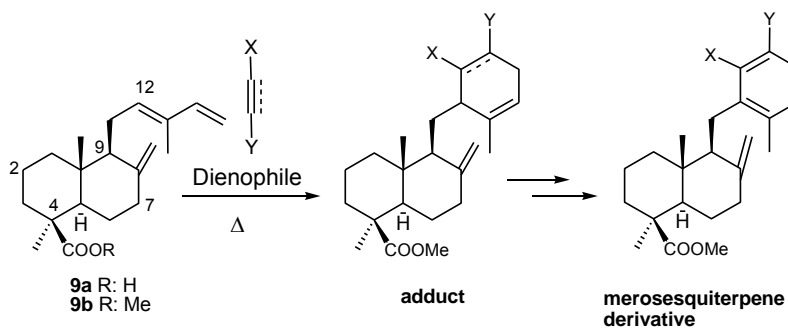


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1-8

Recently, Álvarez-Manzaneda *et al.* reported a new procedure for producing this type of compound. The merosesquiterpene skeleton of these compounds is constructed by Diels-Alder cycloaddition of the labdane diene *trans*-communic acid (**9a**), highly abundant in *Cupressus sempervirens*, or its methyl ester (**9b**), with the appropriate dienophile. The Diels-Alder adduct was converted into the corresponding merosesquiterpene derivative after aromatization (scheme 1) [17].



Scheme 1. Reaction protocol for synthesis of the new merosesquiterpenes

Fig. 2 shows some Diels-Alder adducts, aromatization products (merosesquiterpene derivatives), and other compounds obtained after functionalization of the aromatic compounds.

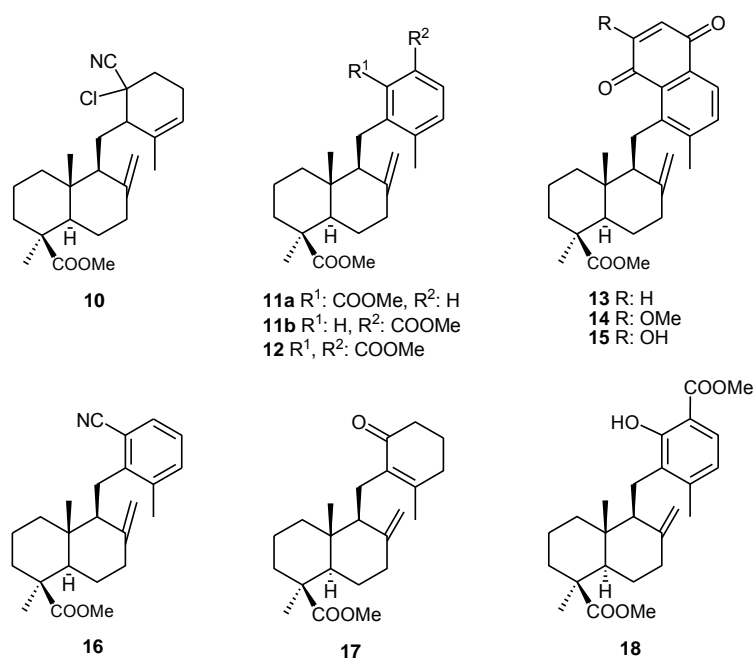


Fig. 2. Chemical structure of novel synthetic merosesquiterpenes

When the methyl *trans*-communate (**9b**) was treated with 2-chloroprop-2-enitrile in refluxing toluene for 48 h, the α -chloronitrile **10** was obtained (88% yield). The treatment of ester **9b** with methyl prop-2-ynoate in xylene under reflux for 12 h and the subsequent treatment of the resulting crude product with DDQ (1.1 eq) in refluxing dioxane rendered a 1: 1 mixture of regioisomers **11a** and **11b** (94% yield). Compound **11a** was isolated unreacted after treating the mixture with MeMgBr. When ester **9b** was heated with dimethyl but-2-ynedioate in xylene under reflux for 6 h and then aromatized by treating with DDQ (1.1 eq) in refluxing dioxane, the result was diester **12** (95% yield). The heating of ester **9b** with cyclohexa-2,5-diene-1,4-dione or 2-methoxycyclohexa-2,5-diene-1,4-dione in toluene, under appropriate reaction conditions, and further treatment with DDQ (2.2 eq) in dioxane under reflux gave a good yield of naphthoquinones **13** and **14**, respectively. Methoxyquinone **14**

was efficiently converted into hydroxyquinone **15** after treatment with KOH in MeOH at room temperature.

Cycloadduct **10** was transformed into aromatic compounds **16** and **17**. The α -chloronitrile **10** was readily transformed into the aromatic nitrile **16** after dehydrohalogenation, by treating with DBU in refluxing benzene and subsequent aromatization with DDQ in dioxane under reflux. Alternatively, chloronitrile **10** was converted into the corresponding α,β -unsaturated ketone **17** by refluxing with KOH in *t*-BuOH. This ketone was transformed into salicylate **18** after methoxycarbonylation and further aromatization.

This study investigated the antitumor properties of this new family of synthetic merosesquiterpenes, whose synthesis and antitumor effects are protected under international patents WO/2009/112622 [18] and WO/2010/076358 [19], respectively. After an initial screening in breast, lung, and colon cancer cells, the compound showing the highest activity and therapeutic index, compound **13**, was selected for study of its mechanism of action against breast tumor cells, which were found to be the most susceptible cells to this compound. We studied its effects on oxidative stress, the cell cycle, and apoptosis, given their high involvement in the action of chemotherapeutics. Finally, we examined the effect of this compound on the development of *in vivo* tumors in a murine model of breast cancer allograft.

2. Results and discussion

2.1. *In vitro* cytotoxicity assay

In a first phase, we assessed the cytotoxic action of the compounds listed in Fig. 2 against human breast (MCF-7), lung (A-549), and colon (T-84) tumor lines. In general, activity was observed by all of these molecules, with inhibitory concentration 50 (IC_{50}) values < 50 μ M in all cases (table 1). The optimal results

were observed for compounds **13** and **14**. The highest activity was evidenced by **13**, with an $IC_{50} < 1 \mu M$ in both MCF-7 and T-84 cells. Although the structure-activity relationship for this type of compound is poorly understood, the active compound usually possesses a quinone moiety. It has been postulated that the activity of this group may be attributable to the Michael acceptor (electrophile) character of the unsaturated carbonyl system present in this type of compound; this proposal was supported by our observation of the activity of quinones **13**, **14**, and **15**. Thus, compounds **14** and **15**, which have methoxy and hydroxyl groups, respectively, in the double bond, thereby diminishing the electrophilic character of the quinone system, exerted a markedly lower activity in comparison to compound **13** (IC_{50} of $38.37 \mu M$ for **15** vs. $0.35 \mu M$ for **13** in MCF-7 cells).

Table 1. Antiproliferative activities of merosesquiterpenes against MCF-7, A-549 and T-84 cells

Compound	IC_{50} (μM) ^a		
	MCF-7	A-549	T-84
11a	40.41 ± 9.75	28.14 ± 0.45	29.02 ± 0.48
12	33.01 ± 2.79	19.89 ± 0.22	25.04 ± 0.24
13	0.35 ± 0.10	1.38 ± 0.83	0.56 ± 0.13
14	16.02 ± 0.40	17.51 ± 0.75	16.74 ± 0.62
15	38.37 ± 5.30	41.17 ± 2.70	30.01 ± 3.92
16	39.63 ± 6.00	20.17 ± 0.21	23.66 ± 4.40
17	45.06 ± 6.5	26.96 ± 0.14	40.02 ± 0.23

^aData are means ± SD of four determinations

Lipophilicity (log P) is a key parameter of the biological effect developed by these compounds, because it can determine their capacity to penetrate biological membranes and therefore influence intracellular bioavailability [20]. The log P of the studied molecules was determined by using Marvin 6.0.5 software (ChemAxon Ltd., 2013). Table 2 shows the resulting theoretical values. A very strong and inversely proportional relationship was found between the IC₅₀ in the three tumor lines treated with compounds **13**, **14**, and **15** and the log P values of the lines (Spearman's correlation coefficient -1, p=0), although no major differences in these values were observed. This increase in compound activity with higher log P was not observed in the remaining compounds.

Table 2. Lipophilicity values of synthetic merosquiterpenes

Compound	11a	12	13	14	15	16	17
Log P	6.21	6.22	5.73	5.32	5.21	6.07	6.56

Based on the initial screening results, we elected to study the effect of **13** on other breast and colon cell lines, comparing the results with those obtained under the same experimental conditions with 5-fluorouracil (5-Fu), a commercial pharmaceutical widely administered to treat colon and breast cancer, among other solid tumors [21,22]. The IC₅₀ values of these two compounds were determined in human breast tumor lines MCF-7, MDA-MB-231, and T-47D, mouse breast tumor line E0771, and human colon tumor lines T-84, HT-29, RKO, and SW-480. Their IC₅₀ was also obtained in normal human breast (MCF-10A) and colon (CCD18Co) cell lines (table 3) in order to calculate their *in vitro* therapeutic index (TI).

The IC₅₀ of compound **13** was < 1 μM in all lines with the exception of HT-29 (1.97 μM). In general, the activity of **13** was highly superior to that of 5-Fu. Thus, the mean IC₅₀ was 0.48 μM for **13** versus 10.51 μM for 5-Fu in human breast tumor lines and 1.04 μM for **13** versus 3.44 μM for 5-Fu in human colon tumor lines.

Table 3. IC₅₀ and TI of **13** and 5-fluorouracil against breast and colon cancer cells

	Cell Line	13		5-Fu	
		IC ₅₀ (μM) ^a	TI	IC ₅₀ (μM) ^a	TI
Breast	MCF-7	0.35 ± 0.10	9.00	2.86 ± 0.21	2.82
	MDA-MB-231	0.46 ± 0.18	6.85	18.12 ± 1.41	0.44
	T-47D	0.63 ± 0.08	5.00	10.56 ± 0.92	0.76
	E0771	0.39 ± 0.04	8.08	0.28 ± 0.01	28.79
	MCF-10 A	3.15 ± 0.08	1.00	8.06 ± 0.18	1.00
Colon	T-84	0.56 ± 0.13	0.59	3.35 ± 0.58	2.76
	HT-29	1.97 ± 0.22	0.17	2.58 ± 0.68	3.60
	RKO	0.59 ± 0.24	0.56	4.39 ± 0.22	2.11
	SW-480	0.92 ± 0.03	0.36	3.69 ± 0.49	2.51
	CCD18Co	0.33 ± 0.24	1.00	9.26 ± 1.28	1.00

^a Data are means ± SD of four determinations

Exceptionally, the activity of 5-Fu was almost 30% higher than that of **13** in the mouse E0771 line, which has an elevated proliferative rate, with a three-fold shorter duplication time in comparison to MCF-7 cells. Hence, E0771 cells would require high rates of nucleoside and nucleotide synthesis to include them in their nucleic acids and metabolic mediators. 5-Fu inhibits thymidilate synthase enzyme, responsible for the *de novo* synthesis of thymidylate, a nucleotide required for DNA synthesis and repair. 5-Fu can also introduce errors during DNA and RNA synthesis through its inclusion in the chain instead of thymidine or uracil [22,23]. These effects of the drug on nucleic acid metabolism may explain why its effect on the highly proliferative E0771 cells was greater than that of **13**.

The TI values of **13** were ≥ 5 in the breast cell lines and were markedly higher than those of 5-Fu with the exception again of the E0771 line, in which the value was 28.79. In the colon cell lines, however, the TI was < 0.6 for **13** versus > 2 for 5-Fu. According to these findings, **13** is more selective against human breast tumor lines and 5-Fu is more selective against colon tumor lines. Taking the IC_{50} and TI values together, the best results were obtained using **13** against the MCF-7 line, with values of $0.35 \mu\text{M}$ and 9.00, respectively. We therefore selected this line for in-depth study of the action mechanism of compound **13**.

The MCF-7 cell line was the first human breast cancer line to be isolated and permanently maintained in culture (in 1970), and it has been one of the most widely used for the study of breast cancer biology and treatment. Its phenotypic and genotypic properties and characteristics are well documented. It is known to be wild-type for p53 and to express estrogen and progesterone receptors, making it a good model for studying the most prevalent breast cancer subtype, luminal A. These features made the MCF-7 line ideal for our study [24,25].

The assays described below were conducted under conditions of high cell density, 5×10^4 cells/cm², to obtain sufficient biomass. Hence, for the induction of the cultures, the IC_{50} calculated under these conditions was taken as the reference value, i.e., $2.09 \pm 0.25 \mu\text{M}$ for compound **13** and $18.21 \pm 1.66 \mu\text{M}$ for 5-Fu.

2.2. Study of oxidative stress induction

Reactive oxygen species (ROS) intervene in signal transduction and gene transcription, activating different pathways involved in biological processes, including cell growth, proliferation, differentiation, and apoptosis. They appear as metabolic by-products of oxygen and present unpaired electrons; therefore, ROS can accept electrons from other biological molecules, such as lipids, proteins, and nucleic acids, altering their function. Antioxidants act to avoid this, being responsible for neutralizing ROS by electron donation and establishing a dynamic

balance (oxidative balance). Oxidative stress develops when this balance is altered in favor of ROS [26].

These free radicals have a dual role in cancer and can either favor or inhibit its development. Because of their cell toxicity, their accumulation can damage the DNA, producing the instability and the mutation of genes (e.g. tumor suppressor gene p53) associated with cancer development, and it can also alter proteins involved in signaling pathways related to cell proliferation. Conversely, when ROS levels are regulated and oxidative balance is maintained, they can increase p53 expression and even induce apoptosis, inhibiting the tumor process [27]. ROS levels are higher in cancer cells than in normal cells due to the elevated metabolic activity of the former, which leads to a chronic state of oxidative stress. It has been suggested that the action mechanism of numerous anticancer drugs is based on the promotion of ROS production, contributing to oxidative imbalance and the death of tumor cells. The first known anticancer drug to act by ROS induction and oxidative stress was elesclomol, whose antitumor activity is strongly reduced when administered with the antioxidant N-acetylcysteine (NAC), as in the case of paclitaxel [27,28]. Moreover, some drugs, e.g., endostatin, only act when used with other conventional chemotherapeutic drugs capable of generating ROS [29].

In order to determine whether the mechanism of action of **13** on line MCF-7 is mediated by oxidative stress induction, MCF-7 cells were induced with this compound in the presence or absence of NAC at 20 mM. After 3 days, the cultures were processed for calorimetric quantification with sulforhodamine B, following the procedure reported in Material and Methods. A dose-dependent decrease in cell viability was observed in the cultures induced at concentrations of 1, 2, and 3 μ M, with reductions of 90.21%, 46.09%, and 23.26%, respectively, *versus* controls (Fig. 3). In the presence of NAC, however, the compound showed no cytotoxicity, and no significant differences were found with controls, indicating that the action of **13** is based on oxidative stress induction.

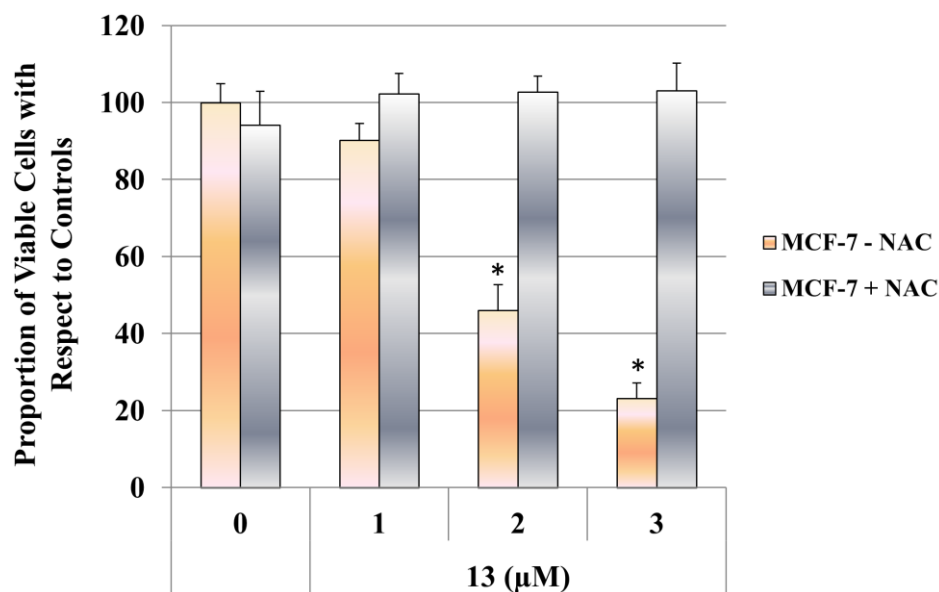


Fig. 3. Effect of **13** on the viability of MCF-7 cells in the presence (+) or absence (-) of the antioxidant NAC for 3 days. The histogram depicts means \pm SD of four determinations.

These findings were confirmed by measuring the intracellular ROS production in cultures induced with 2 μ M **13** for 12 h in the presence or absence of NAC. Fig. 4 shows that the intracellular ROS concentration was increased by **13** in the absence but not in the presence of NAC, when the fluorescence intensity was very similar to that of the control group.

These results allow us to become involved in the continuing debate on the benefits of antioxidants for cancer patients. Evidence has been published since the 1990s on the chemopreventive effect of antioxidants consumed as food supplements or as part of the diet, and many of them have been attributed with action against some types of cancer, e.g., resveratrol, folic acid, vitamins A and E, among many others. However, there has been an increase in studies reporting a negative effect of antioxidants on cancer therapy, mainly in initial stages. It has been suggested that foods with antioxidant capacity should not be consumed during treatment with certain drugs, but there is no clinical evidence to endorse this measure, and published clinical trials have been controversial [27-30]. It is clear that oxidative

stress and ROS levels affect cancer development and treatments, and this issue warrants continued research to reach a consensus on the optimal recommendations for patients. In the present case, the effect of **13**, a highly active compound with a promising TI value, was completely annulled in the presence of an antioxidant, as in the aforementioned cases of elesclomol and paclitaxel.

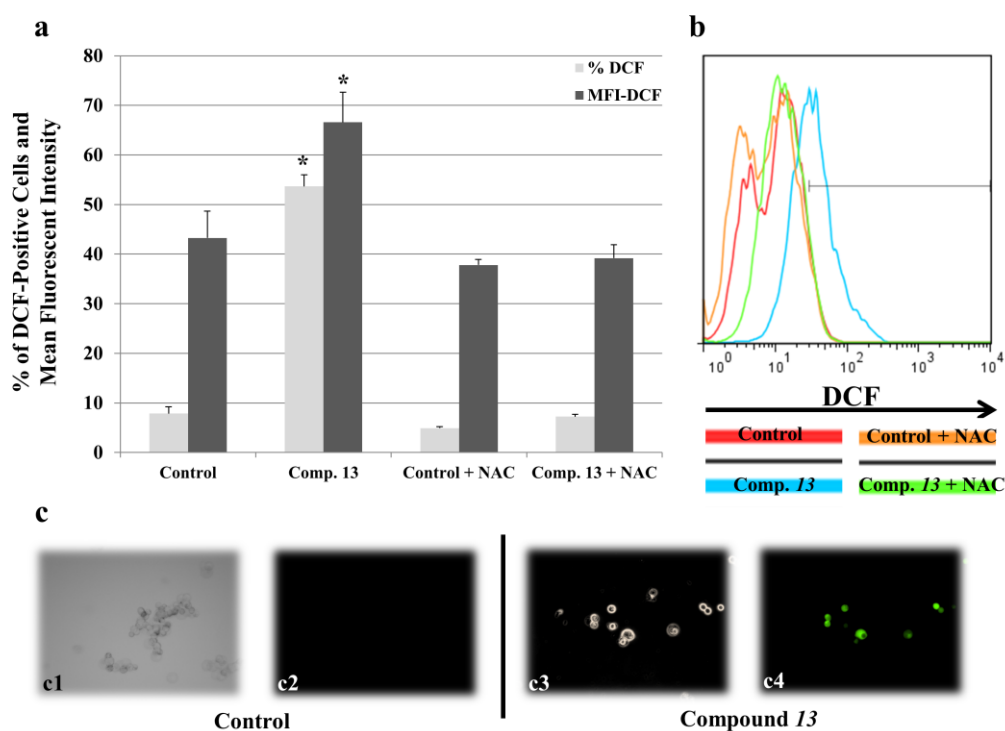


Fig. 4. ROS production in MCF-7 cultures induced with 2 μ M of compound **13** for 12 h in the presence or absence of NAC. (A) Percentage of DCF-positive cells and mean fluorescent intensity. The histogram depicts means \pm SD of four determinations. (B) Comparative cytogram of intracellular ROS production (C) Bright field micrographs (c1 and c3) and DCF-fluorescence (c2 and c4) of control (left) and **13**-treated (right) MCF-7 cells.

2.3. Cell cycle analysis

The cell cycle is one of the most important chemotherapeutic targets. In order to determine the effect of compound **13** on this process, we first synchronized MCF-7 cell cultures, maintaining them in a serum-free medium for 24 h. At that time, as

shown in Fig. 5 (control 0), most of the cells were in phase G₀-G₁ (81.00%), while 12.86% were in phase S, and 6.15% in phase G₂-M. After 24 h in the presence of serum, culture cells begin to enter the cell cycle, with 42.34% of the cells in phase G₀-G₁, 49.46% in phase S, and 8.20% in phase G₂-M (control 24 h). However, the induction of the synchronized cultures with compound **13** at 1, 2, and 3 μM for 24 h produced dose-dependent cell cycle arrest in phase G₀-G₁, with an increase of cells in this stage to 51.40%, 66.61%, and 75.67%, respectively, in comparison to 42.34% in the control group. This increase in G₀-G₁ is associated with a corresponding reduction in the proportion of cells in phases S and G₂-M (Fig. 5).

At 24 h after induction with compound **13**, no major differences were found in the fraction of cells in sub-G₁; therefore, the cytograms in Fig. 5 only represent the cells found in any cycle phase. However, at 48 h post-induction, there was a dose-dependent increase in the sub-G₁ population from 8.02% in the control group, to 15.56%, 31.09%, and 39.91% after induction with 1, 2, and 3 μM of **13**, respectively (Fig. 6), suggesting that the effect of compound **13** is mediated by apoptosis induction.

2.4. Apoptosis assays with annexin-V

Cultures of MCF-7 cells were induced with compound **13** for 48 h, and flow cytometry was used in a viability study with annexin V-FITC to determine whether the increased fraction of cells in Sub-G₁ was due to apoptosis promotion. Treatment with compound **13** reduced the cell viability from 93.0% in the control group to 80.5, 58.4, and 32.6% in the cultures treated with 1, 2, and 3 μM, respectively. This viability reduction was correlated with an increase in the fraction of cells in both early and late apoptosis, with total apoptosis increasing from 3.44% in the control group to 11.07, 29.13, and 57.8% in the cultures treated with 1, 2, and 3 μM, respectively (Fig. 7). These results indicate that the compound exerts its action by apoptosis induction.

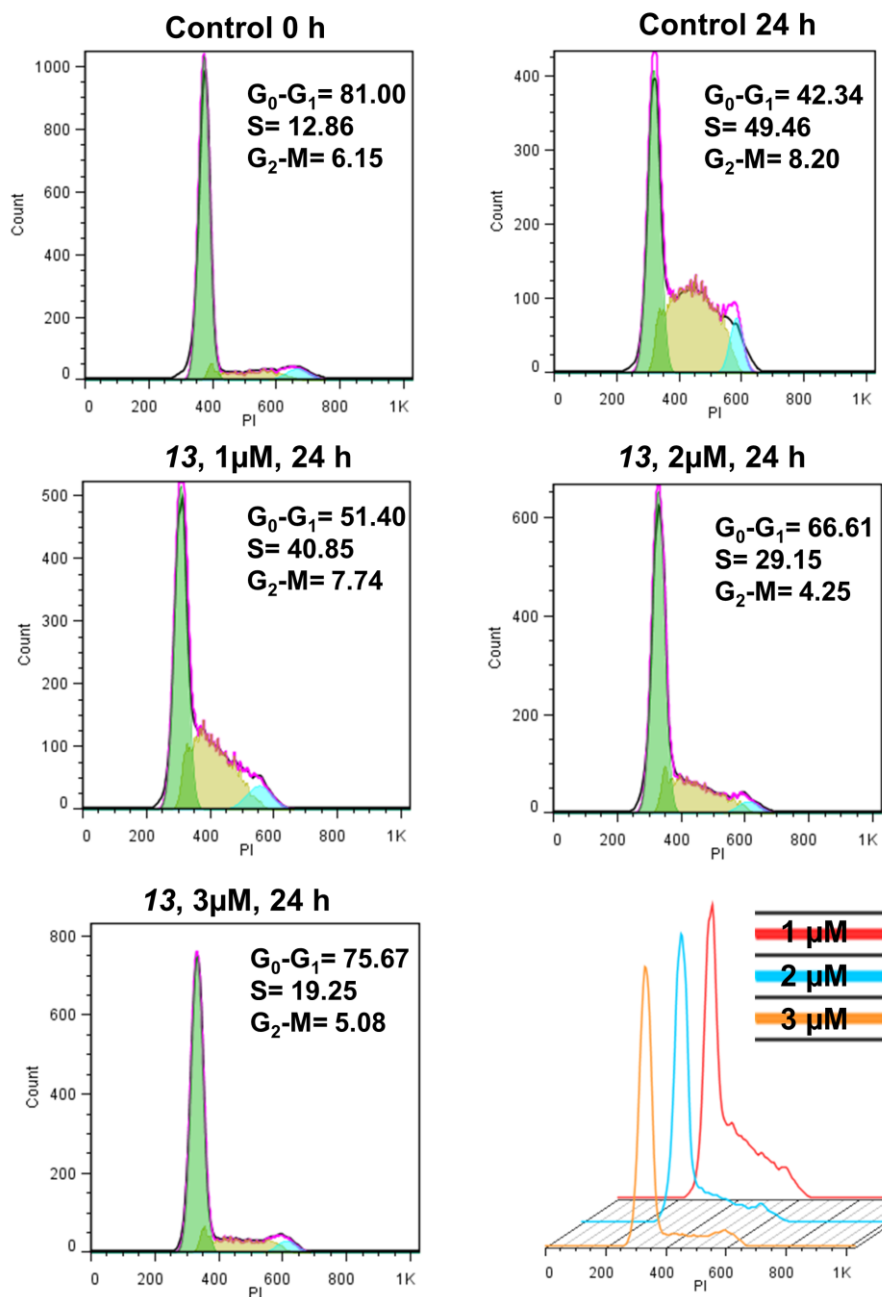


Fig. 5. Effect of compound **13** on MCF-7 cell cycle. Cultures were synchronized for 24 h with serum-free medium (control 0), and were subsequently incubated with complete medium for 24 h without (control 24 h) or with compound **13** at 1, 2, and 3 μ M. The experiment was repeated independently three times yielding similar results.

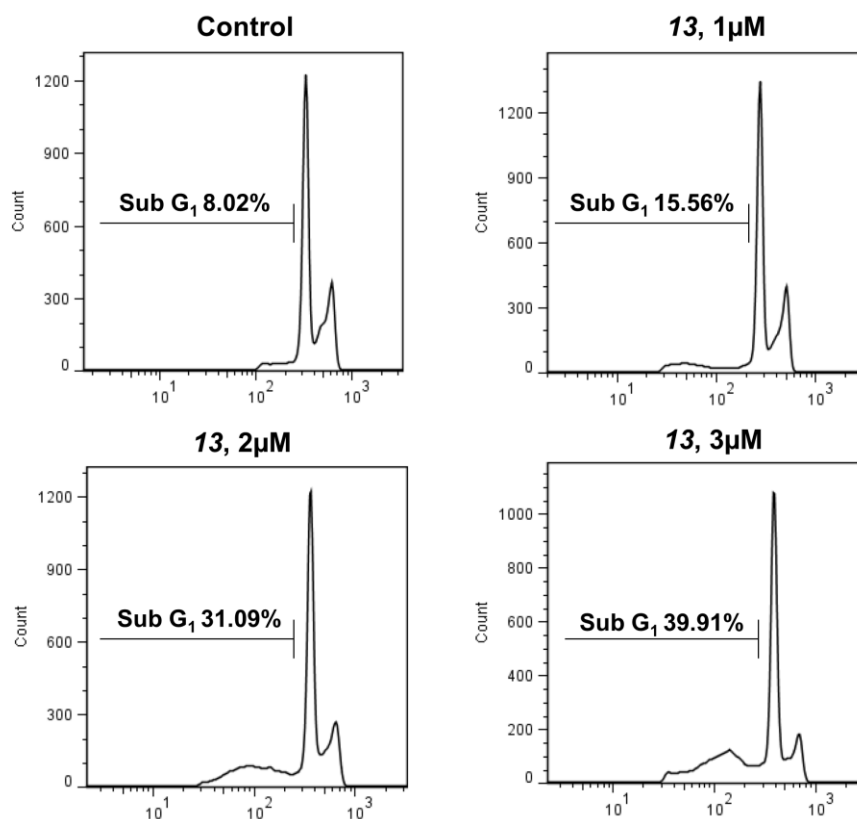


Fig. 6. Effect of compound **13** on the fraction of MCF-7 cells in Sub-G₁. Cultures were induced in complete medium for 48 h without (control) or with compound **13** at 1, 2, and 3 µM. The experiment was repeated independently three times yielding similar results.

Taken together, the above findings indicate that the action of compound **13** on MCF-7 cells is mediated by the induction of oxidative stress, cell cycle arrest in G₀-G₁, and induction of apoptosis. An increasing number of studies report the involvement of oxidative stress in the action mechanism of a wide range of antitumor compounds. The manner in which compound **13** exerts its action is similar to that reported for various other compounds, including: natural extracts of *Garcinia epunctata* against promyelocytic leukemia [31], chromenopyrazolediones against hormone-sensitive prostate tumor cells [32], acetylsalicylic acid against hepatocellular carcinoma cells [33], and the synergic action of quercetin and 2-methoxyestradiol against human hepatocellular carcinoma lines [34].

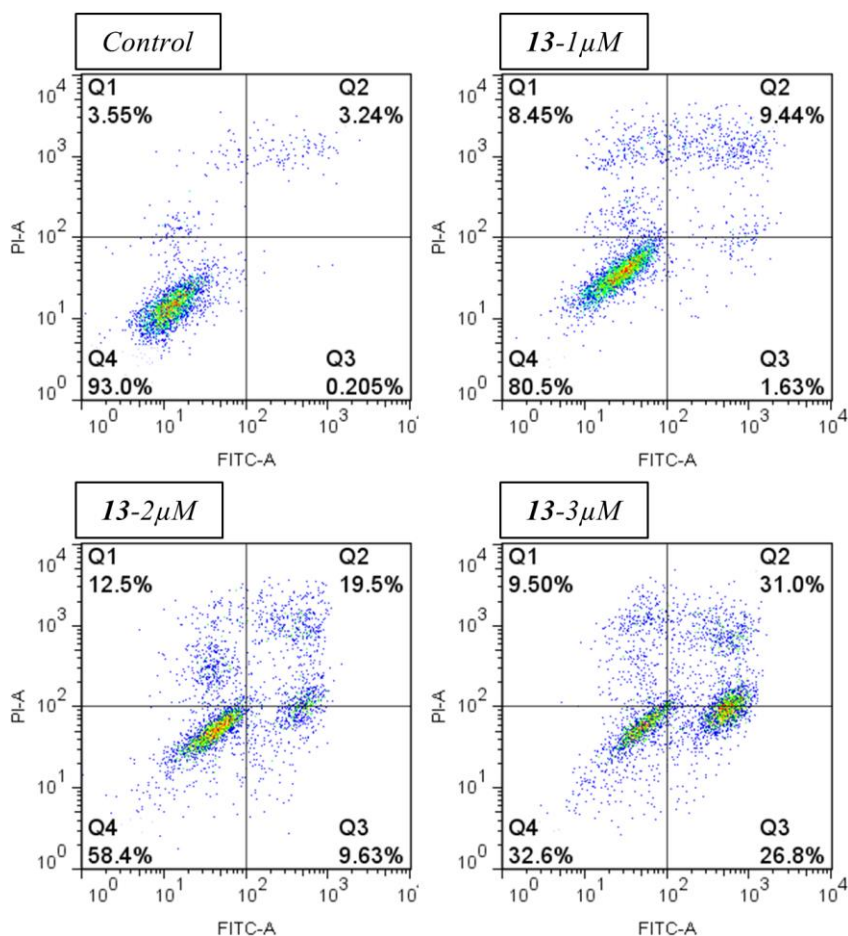


Fig. 7. Apoptosis assay with annexin-V by flow cytometry of MCF-7 cells induced with 1, 2, and 3 μM compound **13** for 48 h. Viable (Q4), necrotic (Q1), early (Q3), and late (Q2) apoptotic cells can be distinguished. The experiment was repeated independently three times yielding similar results.

2.5. Western blot analysis

After confirmation that the antitumor effect of compound **13** is mediated by cell cycle arrest and apoptosis activation, the expression of proteins involved in these processes was studied by western blot and band densitometry (Fig. 8).

Cell cycle is mainly regulated by cyclin-dependent kinase (CDK) proteins. Their activation depends on their binding to cyclins, which are expressed throughout the

cycle and regulate the transition between phases [35]. The expression of cyclin B1, which is essential for the passage from phase G_2 to M [36], was markedly reduced after treatment with compound **13** and was almost absent (6%) at 16 h. This result is in agreement with the cell cycle study findings, given that the induction by **13** of arrest in phase G_0 - G_1 means that the proteins involved in subsequent phases are no longer expressed. Likewise, the expression of cyclin D1, which is involved in the transition between phases G_1 and S, remained low during phase G_0 and then gradually increased during G_1 and was maintained during the remainder of the cycle [37]. Researchers have demonstrated that the degradation of cyclin D1 is sufficient for cycle arrest in G_0 - G_1 [43]; therefore, its decreased expression is evidence of cycle arrest in phase G_0 - G_1 . In the present study, 4 h of treatment of MCF-7 cells with compound **13** produced an 80% decrease in its expression in comparison to baseline values.

pRb is the product of the retinoblastoma tumor suppressor gene, an essential protein for the transition between phases G_1 and S. It forms a complex with transcription factor E2F, inhibiting its activity and progression throughout the cell cycle. When there are appropriate mitogenic signals, pRb is phosphorylated by the cyclin D1/CDK4 complex, permitting the release of E2F and consequent activation of the genes required for progression to phase S [38]. Total and phosphorylated forms of pRb expression both decreased in the **13**-treated cells, reaching a reduction of around 90% at 16 h in both cases (Fig. 8). One of the target genes of E2F is proto-oncogene c-myc, a transcription factor that participates in numerous cell processes, including the transition from G_0 - G_1 to S. Overexpression and amplification of this gene is frequent in many tumors, including breast cancer, and novel strategies are under development to achieve its inhibition [39]. In the present study, treatment with compound **13** reduced c-myc expression by 50% at 16 h and by 80% at 24 h (Fig. 8), supporting the results reported above for cell cycle arrest markers.

Besides activators such as cyclins, Cip/Kip protein family members are also of major importance in CDK expression and therefore in cell cycle regulation, leading to inhibition of the kinase activity of CDK/cyclin complexes and cell cycle arrest [40]. One of the family members, p27, is used as a prognostic marker in breast cancer, because its decreased expression is associated with tumor development and progression [41]. Treatment of the MCF-7 line with compound **13** produced a significant increase in p27 expression (Fig. 8). In previous studies, arrest in G₀-G₁ induced by lapatinib and euphol compounds was also associated with the overexpression of p27 in breast tumor cells; euphol compounds also produced reductions in cyclins B1 and D1 and in pRb hypophosphorylation [42, 43].

In many cases, the response to cell stress is mediated by cell cycle arrest, DNA repair and, when damage is not repaired, apoptosis. Tumor suppressor gene p53 is one of the main genes involved in regulating this response. The baseline expression of p53 under normal conditions increases in response to stress and undergoes a series of posttranslational modifications, including phosphorylation, which lead to its stabilization and activation. This permits its action as a transcription factor at nuclear level, regulating the expression of genes involved in the cell cycle and apoptosis, among others [44-46]. Given that the MCF-7 line is wild-type for p53, we assessed the effect of **13** on its expression, finding that it increases the levels of total p53 and its active phosphorylated form (Fig. 8). This may indicate that **13**-induced apoptosis is dependent on p53. It may also support the effect of **13** on the cell cycle, because it has been reported that there may be an increase in p53 expression in phase G₁ arrest as well as a decrease in cyclin D1 [47].

Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) is the protein responsible for the synthesis of poly (ADP-ribose) chains, which are essential for DNA repair, among other processes. However, PARP cleavage by caspases is an unequivocal sign of apoptosis [48, 49]. In the present study, we found an increase in the cleaved fraction of the protein, confirming the induction of apoptosis (Fig. 8).

Finally, the expression of phospho-p44/42 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) was analyzed, because these proteins are involved in cell proliferation and survival signaling pathways [50]. The p44/42 MAPK signaling pathway is known to be activated in human breast tumor cells in response to sexual steroid hormones and growth factors, including estrogens, progesterone, and epidermal growth factor (EGF) [51]. It has also been verified that a reduction in phospho-p44/42 MAPK levels in breast cancer patients is associated with good clinical response and higher global survival after treatment with neoadjuvant chemotherapy [52]. In our study, a major increase in the expression of phospho-p44/42 MAPKs was observed at 4 h after treatment with compound **13** (Fig. 8), likely because the compound acts downstream from these proteins in the mitogenic signaling pathway. From 4 h onwards, a progressive reduction was observed in the expression of proteins downstream from p44/42 MAPK, especially that of cyclins and pRb, as well as in phospho- p44/42 MAPK levels, which were lower than control levels at 24 h of treatment. This may be explained by the reduced expression of pRb, which is responsible for the expression of steroidal hormones, especially the estrogen receptor [53]. Consequently, pRb reduction may downregulate the estrogen receptor and reduce the emission of mitogenic signals towards p44/42 MAPK, which would produce a decrease in its phosphorylated active forms.

2.6. Expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers

Epithelial mesenchymal transition (EMT) is an essential process during development, when embryonic cells change their characteristics and acquire a mesenchymal phenotype. However, EMT also plays a key role in the acquisition of metastatic capacity by cancer cells, which involves cytoskeleton remodeling, polarity and intercellular contact loss and the consequent acquisition of high motility and invasiveness [54,55]. At molecular level, this process is associated with a decrease in the expression of cell adhesion markers, such as E-cadherin and its intracellular association molecule, β -catenin [56]. E-cadherin is a transmembrane

glycoprotein that binds to the cytoskeleton of actin *via* β -catenin. Its extracellular region, stabilized by Ca^{2+} , binds to itself and forms homodimers that interact with those of adjacent cells [57]. β -catenin is also a highly important protein in the regulation of the Wnt pathway, which is crucial for correct cell development and functioning [58].

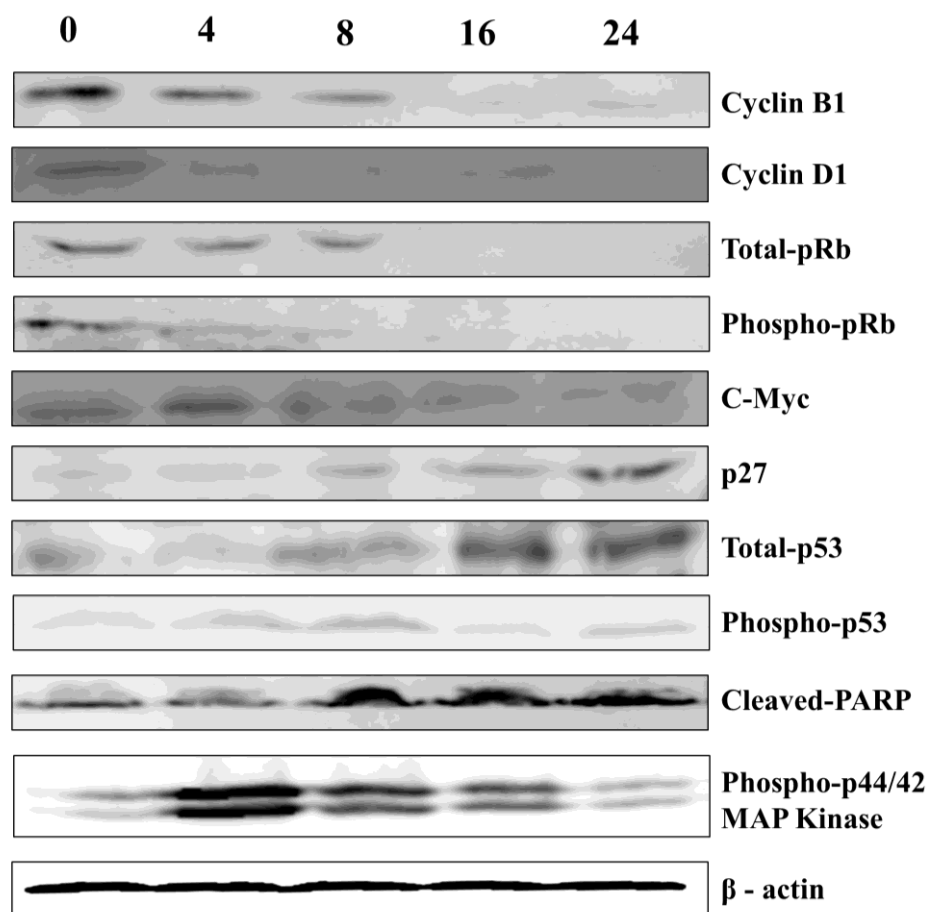


Fig. 8. Western blot analysis of cell cycle and apoptosis-related markers in MCF-7 human breast cancer cells induced by 2 μM compound **13** for 0, 4, 8, 16, and 24 h.

Given the importance of EMT in the development of metastasis, flow cytometry was used to assess the effect of compound **13** on the expression of E-cadherin and its associated protein, β -catenin, after 48 h of induction. As observed in Fig. 9, **13** promoted the expression of both markers, suggesting that merosynesquiterpene acts

by inhibiting EMT development, which is of major translational interest given the importance of this process.

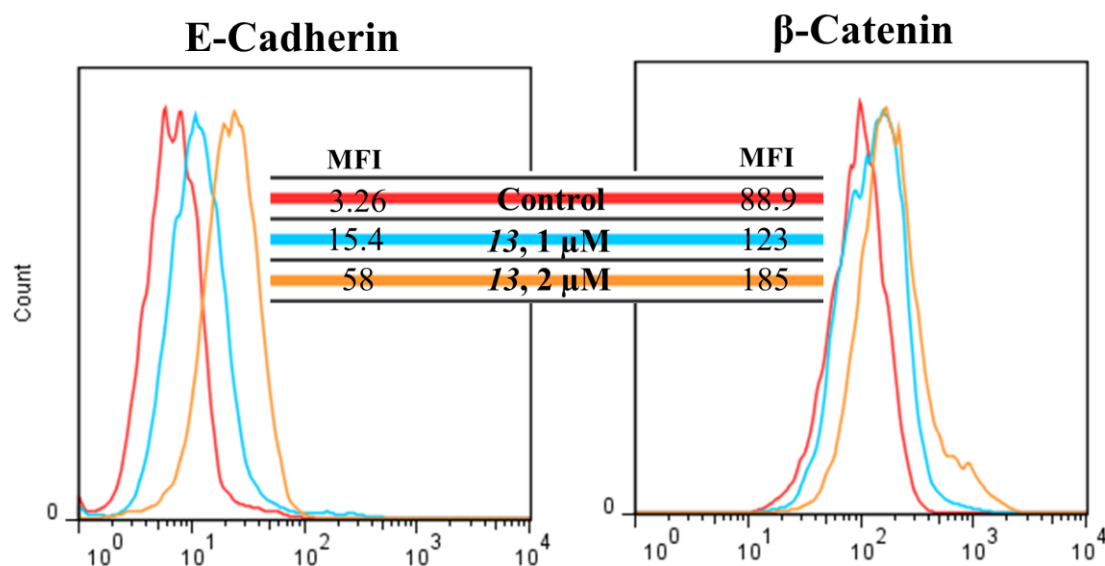


Fig. 9. E-cadherin and β -catenin expression in MCF-7 cells after treatment for 48 h with 1 and 2 μ M compound **13**. The figures depict the superposition of the cytograms and express the mean fluorescence intensity (MFI) values. The experiment was repeated independently three times yielding similar results.

2.7. *In vivo* assay

The *in vitro* assay results prompted us to assess the effect of compound **13** on tumor development *in vivo*. C57BL/6 mice were inoculated with cells from the breast cancer tumor line E0771, established from a C57BL/6 mouse tumor. This model of murine breast cancer syngeneic allograft generates highly proliferative tumors in immunocompetent animals of the same species, offering a scenario that is closer to the clinical situation from a translational perspective. It also allows assays to be developed in a more convenient manner and at a lower cost in comparison to immunodepressed models, enhancing the histological reproducibility and growth rate of the tumor and simplifying the statistical analysis for data

validation [59]. Crucially, E0771 cells are of the luminal A subtype, as are the MCF-7 cells used in the *in vitro* assays, allowing the study of compound **13** in cells with the same breast cancer subtype [60].

Forty C57BL/6 mice were subcutaneously injected with 1 million E0771 cells. At 9 days, when the tumor volume reached 75 mm³, four experimental groups of 10 randomly assigned animals each were orally administered with the vehicle (1% methylcellulose solution) on six occasions or with compound **13** at a concentration of 5, 10, or 15 mg/kg. Fig. 10 depicts the mean tumor volumes in each experimental group, indicating the days on which **13** was administered (arrows).

The volume of tumors started to increase faster in control *versus* treated animals from day 27 onwards, and the difference reached significance by day 33. At the end of the assay on day 42, the mean volume of control tumors was 2.4- to 3.3-fold that of treated tumors ($p < 0.01$), confirming the *in vivo* antitumor activity of compound **13**. Paradoxically, no significant differences were found on day 42 among the animals treated with 5, 10, or 15 mg/kg. Fig. 10 includes a photograph that permits differentiation between a control animal (below) and an animal treated with 15 mg/Kg **13** (above), due to the major difference in tumor volumes (arrow).

There were no significant differences in animal survival among the study groups. No signs of toxicity, e.g., hair loss or diarrhea, were observed in the animals treated with **13**, despite its oral administration. These findings suggest a very good tolerance to compound **13**. The absence of significant differences among groups treated at 5, 10, or 15 mg/kg indicates that the dosage could be increased to optimize treatment outcomes.

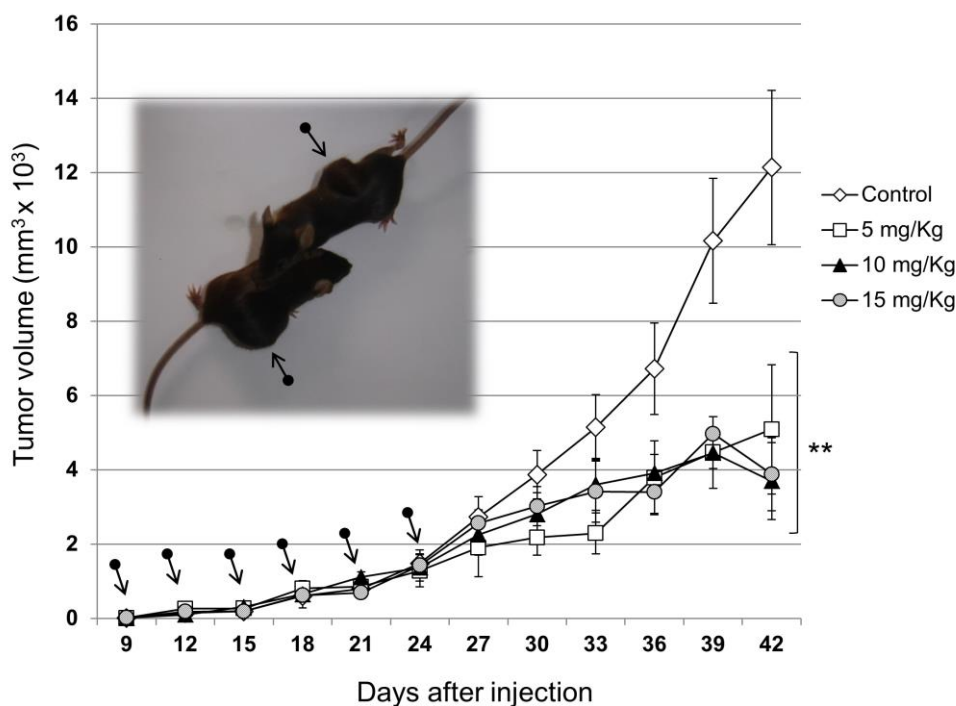


Fig. 10. Effect of compound **13** on tumor growth in C57BL/6 mice with E0771 mouse breast cancer cell allografts; the tumor volume is plotted against the days elapsed since tumor cell inoculation. Arrows indicate days on which the vehicle (control) or compound **13** (5, 10, or 15 mg/kg) were orally administered. ** = significant difference with control group, $p < 0.01$. In the photograph, a control animal (below) can be distinguished from an animal treated with 15 mg/Kg of compound **13** (above).

3. Conclusion

We screened the antitumor activity of seven new merosesquiterpenes, whose synthesis and properties are under the protection of international patents. These compounds demonstrated elevated activity against human breast, colon, and lung tumor cells. Compound **13** evidenced the highest activity and specificity against MCF-7 breast cancer cells, which offer a good model for the study of the most prevalent molecular subtype of breast cancer, luminal A. Compound **13** acts against the cells by inducing oxidative stress, arresting the cell cycle in phase G_0 - G_1 , and activating apoptosis. Epithelial-mesenchymal transition, associated with

metastasis promotion and a worse disease prognosis, also appears to be inhibited by compound **13**. This compound strongly inhibits tumor development in C57BL/6 immunocompetent mice with allografts of E0771 mouse breast tumor cells, which are also luminal A subtype. These findings indicate that this new family of compounds, especially compound **13**, may be highly useful to treat breast cancer in humans. Studies are under way to further explore their mechanism of action and to gather key data for structure-based drug design.

4. Materials and methods

4.1. Compounds

We assessed the antitumor effect of seven merosesquiterpene compounds, **11a**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, and **18** (Fig. 2), which were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20 C. For each experiment, the stock solutions were further diluted in medium to obtain the desired concentrations. The final solvent concentration in cell culture was <0.1% v/v DMSO.

4.2. Cell lines and culture

Human breast tumor lines MCF-7, T-47D, and MDA-MB-231, mouse breast tumor line E0771, human colon tumor lines RKO, HT-29, SW-480, and T-84, human lung tumor line A-549, and non-tumor lines of breast MCF-10A and colon CCD-18Co were supplied by the Department of Cell Cultures of the Granada University Scientific Instrumentation Center. All lines were cultured at 37° C in 5% CO₂ and 90% humidity and, except for MCF-10A, with Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, 10 ml/L penicillin-streptomycin 100X, and 2 mM L- glutamine. MCF-10A line was cultured in DMEM with Ham F-12 nutrient mixture (DMEM/F-12; 1:1) supplemented with 10 ml/L penicillin-streptomycin 100X, 20 ng/ml EGF, 100 ng/ml cholera toxin, 10 µg/ml

bovine insulin, 0.5 µg/ml hydrocortisone, and 5% inactivated horse serum. Culture media and respective supplements were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

4.3 *In vitro* cytotoxicity assay

In order to calculate the IC₅₀ of compounds, 5 x 10³ cells/cm² were seeded by quadruplicate. At 24 h, cells were induced with increasing compound concentrations for 3 days. Subsequently, cells were fixed with 10% cold trichloroacetic acid (4°C) and stained with 0.4% sulforhodamine in 1% acetic acid. The colorant was solubilized with 10 mM Tris-base pH 10.5, and optical density values were determined by colorimeter at 492 nm (Multiskan EX, Thermo Electron Corporation, Milford, MA, USA). IC₅₀ values were calculated from the semi-logarithmic dose-response curve by linear interpolation. The TI was calculated as the Normal line IC₅₀ / Tumor line IC₅₀, with a higher TI value indicating greater specificity of the compound towards tumor *versus* normal cells.

The IC₅₀ of cultures established at high cell density (5 x 10⁴ cells/cm²) was also calculated, because the oxidative stress, cell cycle, apoptosis, and gene expression assays were conducted under these conditions to obtain sufficient cell biomass, taking the IC₅₀ obtained at high cell density as reference for induction of these cultures.

4.4. Study of the induction of oxidative stress

MCF-7 cells were seeded at high density (5 x 10⁴ /cm²) and, at 24 h, induced with different concentrations of compound **13** for 3 days in the presence or absence of 20 mM NAC. The cells in culture were counted by staining with sulforhodamine B (see above section). Intracellular ROS levels were also determined in these cultures, using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San José, CA, USA) to quantify the fluorescence intensity emitted after incubation with 10 µM 2',7'-

dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C. The percentage of DCF-positive cells and mean fluorescent intensity were calculated by FlowJo software (v 7.6.5, Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA). Samples of cultures were also analyzed by fluorescence microscopy (Leica DM5500B).

4.5. Cell cycle analysis

MCF-7 cells were seeded (5×10^4 /cm²), and the culture medium was replaced with a serum-free medium at 24 h to synchronize their cell cycles. 24 h later, they were again placed in culture medium with serum and induced with different concentrations of **13** for 24 or 48 h, depending on the case. After this time, cultures were washed with PBS, fixed with 70% cold ethanol, and incubated with a DNA extraction solution (0.2 M Na₂HPO₄, 0.1M Citric Acid, pH 7.8) for 15 min at 37°C. Cells were then centrifuged, washed with PBS, and resuspended in 250 µl of a solution of propidium iodide (40 µg/ml) and RNase (100 µg/ml) for 30 min at 37°C in the dark. Finally, samples were analyzed in a FACScan flow cytometer, using a linear scale for the cell cycle and a logarithmic scale to determine the sub-G1 fraction. Results were analyzed with FlowJo software (v 7.6.5, Tree Star, Inc.).

4.6. Apoptosis assays with annexin-V

Cell viability was determined by flow cytometry using the Annexin V-FITC kit (Pharmingen, San Diego, CA, USA). MCF-7 cells were seeded (5×10^4 /cm²) and, after 24 h, were induced with different concentrations of **13** for 48 h. Cells were then detached with PBS-EDTA, washed twice with cold PBS, and collected by centrifugation at 500 g for 10 min. Cells were stained following the manufacturer's protocol, and samples were then analyzed in a FACScan flow cytometer, using FlowJo software (v 7.6.5, Tree Star, Inc.).

4.7. Western Blot analysis

We seeded MCF-7 cells ($5 \times 10^4/\text{cm}^2$) and, after 24 h, induced them with $2\mu\text{M}$ **13** for different time periods. The medium was then removed, and cells were lysed with sample buffer (62.76 mM Tris– HCl pH 6.8, 5% β -mercaptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol, 0.5% bromophenol blue). Proteins were separated by electrophoresis in 12% acrylamide gels in a Mini Protean Tetracell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and were then transferred to nitrocellulose membranes (Bio-rad, 162-0115), which were blocked for 1 h at room temperature with 5% nonfat milk powder in PBS. The membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against cyclin B1 (Cell Signaling, 4138), cyclin D1 (Cell Signaling, 2978), total pRb (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-102), phospho-pRb (Cell Signaling, 9301), C-Myc (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-70465), p27 (Cell Signaling, 2552), total p53 (Sigma, p5813), phospho-p53 (Cell Signaling, 9284), cleaved-PARP (Cell Signaling, 9541), phospho-p44/22 MAPK (Cell Signaling, 4370), or β actin (Sigma, A3854). They were then washed and incubated for 1 h at room temperature with the corresponding secondary antibodies (Cell Signaling, 7074 or Sigma, A9044). Protein-antibody complexes were detected by chemiluminescence using the ECL system (Amersham Pharmacia Biotech, UK). The relative expression of the proteins was semi-quantified with Quantity One software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

4.8. Expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers

MCF-7 cells ($5 \times 10^4/\text{cm}^2$) were seeded and, after 24 h, induced with different concentrations of **13** for 48 h. They were subsequently detached with PBS-EDTA, washed with PBS, and resuspended in 100 μl blocking buffer (PBS, 2% BSA, 0.07% EDTA) to which 10 μl of the corresponding antibody, E-cadherin (R&D Systems, FAB18381P) or β -catenin (R&D Systems, IC13292F), was added. Cells were incubated for 30 min at 4°C in the dark, washed with PBS, and analyzed by flow cytometry (FACScan). Results were analyzed using FlowJo software (v 7.6.5, Tree Star, Inc.).

4.9. *In vivo* assay

We used 40 female C57BL/6 mice weighing 25-30 g (Scientific Instrumentation Center of Granada University), which were kept in a laminar flow cabinet in a room with a controlled environment (37°C, 40-70% relative humidity, 12-h light/dark cycle, and pathogen-free). The *in vivo* study was approved by the ethics committee of the University of Granada. Tumors were induced by subcutaneous injection of 1×10^6 cells of the E0771 line in the right side of the mice. At 9 days, when the tumor volume reached 75 mm^3 , mice were randomly distributed into four groups for oral treatment with vehicle alone (1% methylcellulose) or with compound **13** at concentrations of 5, 10, or 15 mg/kg. The compound was administered on days 9, 12, 15, 18, 21, and 24 post-injection, and periodical measurements were made during the *in vivo* assay of the largest (a) and the next largest (b) diameter using a digital caliper. Tumor volume was calculated as $V = ab^2\pi/6$.

4.10. Statistical Analysis

SPSS 14 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) was used for the statistical analysis. Results were compared with the Student's test, one- and two-way ANOVAs, and Spearman's test. $P < 0.05$ was considered significant. Data were graphically represented by using Microsoft Excel 2010 software (Microsoft Corporation).

5. Competing interests

All authors declare that they have no conflict of interest.

6. Acknowledgements

This study was supported by the University of Granada, the Ministry of Science and Innovation (Project GREIB_PYR_2010_11) and the Regional Government of Andalusia (Project P11-CTS-7651 and assistance to the CTS-107 and FQM-348 groups). EC received an FPU pre-doctoral fellowship (Ministry of Education, Culture and Sport), and this article is related to her PhD thesis.

7. References

1. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. *Int J Cancer J Int Cancer* 127 (2010) 2893–2917.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. *CA Cancer J Clin* 61 (2011) 69–90.
3. Are C, Rajaram S, Are M, Raj H, Anderson BO, Chaluvarya Swamy R, Vijayakumar M, Song T, Pandey M, Edney JA, Cazap EL. *J Surg Oncol* 107 (2013) 221-226.
4. Lü X, Deng Q, Li H, Suo Z. *Exp Ther Med* 2 (2011) 821-826.
5. Sheri A, Johnston S. *Clin Oncol R Coll Radiol Gt Br* 25 (2013) 117–126.
6. Zhong Z, Dang Y, Yuan X, Guo W, Li Y, Tan W, Cui J, Lu J, Zhang Q, Chen X, Wang Y. *Cell Physiol Biochem* 30 (2012) 778-90.
7. Robles-Fernández I, Rodríguez-Serrano F, Álvarez PJ, Ortiz R, Rama AR, Prados J, Melguizo C, Álvarez-Manzaneda E, Aránega A. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 8 (2013) 203-215.
8. Simpson TJ. *Top Curr Chem* 195 (1998)
- 9 a) Coval SJ, Conover MA, Mierzwa R, King A, Puar MS, Phife DW, Pai JK, Burrier RE, Ahn MS, Boykow GC, Patel M, Pomponi SA. *Bioorg Med Chem Lett* 5 (1995) 605-610. b) Chackalamannil S, Xia Y, Wang Y, Tsai M, Czarniecki M, Nang S, Clemmons A, Ahn HS, Boykow G. *Bioorg Med Chem Lett* 5 (1995) 2005-2010. c) Tall AR. *J Lipid Res* 34 (1993) 1255-1274. d) Marotti KR, Castle CK, Boyle TP, Lin AH, Murray RW, Melchior GW. *Nature* 364 (1993) 73-75. e) Koizumi J, Inazu A, Yagi K, Koizumi I, Uno Y, Kajinami K,

- Miamoto S, Moulin P, Tall AR, Mabuchi H, Takeda R. *Atherosclerosis* 90 (1991) 189-196. f) Barrero AF, Álvarez-Manzaneda EJ, Chahboun R. *Tetrahedron Lett* 38 (1997) 8101-8104. g) Barrero AF, Álvarez-Manzaneda EJ, Chahboun R. *Tetrahedron* 54 (1998) 5635-5650. h) Álvarez-Manzaneda EJ, Chahboun R, Barranco Pérez I, Cabrera E, Álvarez E, Álvarez-Manzaneda R. *Org Lett* 7 (2005) 1477-1480. i) Bernet A, Seifert K. *Helv Chim Acta* 89 (2006) 784-796. j) Arima Y, Kinoshita M, Akita H, *Tetrahedron: Asymmetry* 18 (2007) 1701-1711. k) Laube, T, Bernet A, Dahse, HM, Jacobsen ID, Seifert K. *Bioorg Med Chem* 17 (2009) 1422-1427.
10. a) Kawashima K, Nakanishi K, Nishikawa H. *Chem Pharm Bull* 12 (1964) 796–803. b) Wijeratne EM, Paranagama PA, Marrou MT, Gunatilaka MK, Arnold AE, Gunatilaka AAL. *J Nat Prod* 71 (2008) 218–222. c) Ishii S, Fujii M, Akita H. *Chem Pharm Bull* 57 (2009) 1103-1106.
11. a) Talpir R, Rudi A, Kashman Y, Loya Y, Hizi A. *Tetrahedron* 50 (1994) 4179–4184. b) Poigny S, Huor T, Guyot M, Samadi M. *J Org Chem* 64 (1999) 9318–9320. c) Bernet A, Schroeder J, Seifert K. *Helv Chim Acta* 86 (2003) 2009–2020. d) Laube T, Beil W, Seifert K. *Tetrahedron* 61 (2005) 1141-1148. e) Amano Y, Kinoshita M, Akita H. *J Molec Catal B: Enzymatic* 32 (2005) 141-148. f) Rubio BK, Van Soest RWM, Crews P. *J Nat Prod* 70 (2007) 628-631. g) Yong KWL, Jankam A, Hooper JNA, Suksamrarn A, Garson MJ. *Tetrahedron* 64 (2008) 6341-6348.
12. a) Kono K, Tanaka M, Ogita T, Hosoya T, Kohama T. *J Antibiot* 53 (2000) 459–465. b) Kono K, Sugiura M, Kohama T. *J Antibiot* 55(2002) 99–104. c) Maezawa N, Furnichi N, Tsuchikawa H, Katsumura S. *Tetrahedron Lett* 48 (2007) 4865–4867. d) Bonhoure E, Lauret A, Barnes DJ, Martin C, Malavaud B, Kohama T, Melo JV, Cuvillier O. *Leukemia* 22 (2008) 971-979.
13. a) Murray LM, Johnson A, Diaz MC, Crews P. *J Org Chem* 62 (1997) 5638. b) Cichewicz RH, Kenyon VA, Whitman S, Morales N M, Arguello JF, Holman TR, Crews P. *J Am Chem Soc* 126 (2004) 14910-14920. c) Robinson SJ, Hoobler EK, Riener M, Loveridge ST, Tenney K, Valeriote FA, Holman TR, Crews P. *J Nat Prod* 72 (2009) 1857-1863.

14. Gray CA, de Lira SP, Silva M, Pimenta EF, Thiemann OH, Oliva G, Hajdu E, Andersen RJ, Berlink R GS. *J Org Chem* 71 (2006) 8685-8690.
15. Wabo HK, Tatsimo SN, Tane P, Connolly JD. *Planta Med* 73 (2007) 187-189.
16. For some representative syntheses based on the two synthon strategy, see: a) Trammel GL *Tetrahedron Lett* (1978) 1525-1528. b) Barrero AF, Álvarez-Manzaneda EJ, Chahboun R. *Tetrahedron Lett* 38 (1997) 2325-2328. c) Arjona O, Garranzo M, Maluego J, Maroto E, Plumet J, Sáez B. *Tetrahedron Lett* 38 (1997) 7249-7252. d) Barrero AF, Álvarez-Manzaneda EJ, Chahboun R, Cortés M, Armstrong V. *Tetrahedron* 55 (1999) 15181-15208. e) Takao KI, Sasaki T, Kozaki T, Yaganisawa Y, Tadano KI, Kawashima A, Shinonaga H *Org Lett* 3 (2001) 4291. f) Maiti S, Sengupta S, Giri C, Achari B, Banerjee AK. *Tetrahedron Lett* 42 (2001) 2389-2391. g) Quideau S, Lebon M, Lamidey AM. *Org Lett* 22 (2002) 3975-3978. h) Armstrong V, Barrero AF, Álvarez-Manzaneda EJ, Cortés M, Sepúlveda B. *J Nat Prod* 66 (2003) 1382-1383.
17. Álvarez-Manzaneda E, Chahboun R, Cabrera E, Álvarez E, Haidour A, Ramos JM, Álvarez-Manzaneda R, Romera JL, Escobar MA, Messouri I. *Synthesis* (2008) 4019-4027.
18. Álvarez-Manzaneda Roldán E, Chahboun. WO/2009/112622 (2009)
19. Aránega A, Álvarez-Manzaneda Roldán E, Chahboun R, Rodríguez-Serrano F, Boulaiz H, Marchal JA, Melguizo C, Perán M, Prados JC. WO/2010/076358 (2010)
20. Yousefi R, Khalafi-Nezhad A, Rad MNS, Behrouz S, Panahi F, Esmaili M, Ghaffari SM, Niazi A, Moosavi-Movahedi AA. *Med Chem Res* 21 (2012) 1921-1928.
21. Uluer ET, Aydemir I, Inan S, Ozbilgin K, Vatansever HS. *Acta Histo Chem* 114 (2012) 641-646.
22. Saleh EM, El-Awady RA, Anis N. *Oncol Lett* 5 (2013) 321-327.
23. Álvarez P, Marchal JA, Boulaiz H, Carrillo E, Vélez C, Rodríguez-Serrano F, Melguizo C, Prados J, Madeddu R, Aránega A. *Expert Opin Ther Patents* 22 (2012)107-123.
24. Levenson AS, Jordan VC. *Cancer Res* 57 (1997) 3071-3078.

-
25. Beaver JA, Gustin JP, Yi KH, Rajpurohit A, Thomas M, Gilbert SF, Rosen DM, Park BH, Lauring J. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 19 (2013) 5413-5422.
 26. Vera-Ramirez L, Sánchez-Rovira P, Ramírez-Tortosa MC, Ramirez-Tortosa CL, Granados-Principal S, Lorente JA, Quiles JL. *Crit Rev Oncol Hematol* 80 (2011) 347–368.
 27. Saeidnia S, Abdollahi M. *Toxicol Appl Pharmacol* 271 (2013) 49–63.
 28. Yang C-Y, Zhang M, Du Z, Barsoum J, Bertin J. *Mol Cancer Ther* 7 (2008) 2319–2327.
 29. Watson J. *Open Biol* 3 (2013) 120144.
 30. Sainz RM, Lombo F, Mayo JC. *Cancers (Basel)* 4 (2012) 442-474.
 31. Constant Anatole P, Guru SK, Bathelemy N, Jeanne N, Bhushan S, Murayama T, Saxena AK. *Environ Toxicol Pharmacol* 36 (2013) 865-874.
 32. Morales P, Vara D, Gómez-Cañas M, Zúñiga MC, Olea-Azar C, Goya P, Fernández-Ruiz J, Díaz-Laviada I, Jagerovic N. *Eur J Med Chem* 70 (2013) 111-119.
 33. Raza H, John A, Benedict S. *Eur J Pharmacol* 668 (2011) 15-24.
 34. Chang YF, Hsu YC, Hung HF, Lee HJ, Lui WY, Chi CW, Wang JJ. *Nutr Cancer* 61 (2009) 735-745.
 35. Zhao W, Zhou SF, Zhang ZP, Xu GP, Li XB, Yan JL. *Oncol Rep* 25 (2011) 1289-1295.
 36. Pfaff KL, King RW. *PLoS One* 8 (2013) e59169.
 37. Masamha CP, Benbrook DM. *Cancer Res* 69 (2009) 6565-6572.
 38. Munro S, Carr SM, La Thangue NB. *Oncogene* 31 (2012) 4343-4352.
 - 39 Song A, Ye J, Zhang K, Sun L, Zhao Y, Yu H. *Biochem Genet* 51 (2013) 603-617.
 40. Yoon MK, Mitrea DM, Ou L, Kriwacki RW. *Biochem Soc Trans* 40 (2012) 981-988.
 41. He W, Wang X, Chen L, Guan X. *Cancer Biother Radiopharm* 27 (2012) 399-402.

-
42. Tang L, Wang Y, Strom A, Gustafsson JÅ, Guan X. *Cell Cycle* 12 (2013) 2665-2674.
 43. Wang L, Wang G, Yang D, Guo X, Xu Y, Feng B, Kang J. *Mol Med Rep* 8 (2013) 1279-1285.
 44. Vousden KH, Lu X. *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 594-604.
 45. Yoshida K, Miki Y. *Cancer Sci* 101 (2010) 831-835.
 46. Carvajal LA, Manfredi JJ. *EMBO Rep* 14 (2013) 414-421.
 47. Wong FC, Woo CC, Hsu A, Tan BK. *PLoS One* 8 (2013) e78021.
 48. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. *Cancer Res* 53 (1993) 3976-3985.
 49. Singh B, Guru SK, Kour S, Jain SK, Sharma R, Sharma PR, Singh SK, Bhushan S, Bharate SB, Vishwakarma RA. *Eur J Med Chem* 70 (2013) 864-874.
 50. Roberts PJ, Der CJ. *Oncogene* 26 (2007) 3291-3310.
 51. Zhou C, Steplowski TA, Dickens HK, Malloy KM, Gehrig PA, Boggess JF, Bae-Jump VL. *PLoS One* 8(2013) e55730.
 52. Huang L, Chen T, Chen C, Chen S, Liu Y, Wu J, Shao Z. *World Journal of Surgical Oncology* 11 (2013) 307.
 53. Caligiuri I, Toffoli G, Giordano A, Rizzolio F. *Oncotarget* 4 (2013) 875-883.
 54. Talbot LJ, Bhattacharya SD, Kuo PC. *Int J Biochem Mol Biol* 3 (2012) 117-136.
 55. Choi Y, Lee HJ, Jang MH, Gwak JM, Lee KS, Kim EJ, Kim HJ, Lee HE, Park SY. *Hum Pathol* 44 (2013) 2581-2589.
 56. Smit MA, Peeper DS. *Aging* 2 (2010) 735-741.
 57. Baranwal S, Alahari SK. *Biochem Biophys Res Commun* 384 (2009) 6-11.
 58. Menezes ME, Mitra A, Shevde LA, Samant RS. *Biochem J* 444 (2012) 573-580.
 59. de Jong M, Maina T. *J Nucl Med* 51 (2010) 501-504.
 60. Young E, Miele L, Tucker KB, Huang M, Wells J, Gu J-W. *Cancer Biol Ther* 10 (2010) 703-711.

Meroxest improves the prognosis of immunocompetent C57BL/6 mice with allografts of E0771 mouse breast tumor cells.

Esther Carrasco^{a,b}, Jose Manuel Garrido^c, Pablo Juan Álvarez^a, Enrique Álvarez-Manzaneda^d, Rachid Chahboun^d, Ibtissam Messouri^d, Consolación Melguizo^a, Antonia Aránega^a, Fernando Rodríguez-Serrano^a

^a *Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), University of Granada, 18071 Granada, Spain*

^b *PhD Program in Biomedicine, University of Granada, 18071 Granada, Spain*

^c *Department of Cardiovascular Surgery, Virgen de las Nieves Hospital, 18014 Granada, Spain*

^d *Department of Organic Chemistry, Institute of Biotechnology, University of Granada, 18071 Granada, Spain*

Archives of medical science, 10.5114/aoms.2014.45442



Abstract

Introduction: Recently, we have reported the antitumor properties of a new family of synthetic merosesquiterpenes, which highlights meroxest, since it has high activity and specificity for ER⁺ breast cancer cells. In this paper, we characterize allografts of ER⁺ E0771 mouse breast tumor cells in immunocompetent C57BL/6 mice, and also analyze the effect of meroxest on the prognosis of the disease.

Material and methods: 20 female C57BL/6 mice were injected with 10⁶ E0771 cells. Once the tumors reached the appropriate size, the mice were divided into two groups, one control and another treated orally with 15 mg/Kg of meroxest. After 20 days, tumor samples were taken for a histopathological study and for the determination of the expression of the prognostic markers Ki67 and VEGF by immunofluorescence.

Results: In sections stained with hematoxylin-eosin, we observed that tumors have a well-defined capsule enclosing E0771 tumor cells. The central area of tumors contains necrotic regions with leukocyte infiltration. Meroxest treatment significantly reduces tumor size, induces changes in its structure, decreases the degree of leukocyte infiltration, and significantly reduces the expression of Ki67 and VEGF.

Conclusions: Meroxest improves the prognosis of mice since it reduces leukocyte infiltration, and decreases the expression of Ki67 and VEGF markers. Consequently, the merosesquiterpene could become a useful antiangiogenic drug in the treatment of breast cancer. These results encourage us to deepen the study of meroxest, in order to find more evidences that support the convenience of its evaluation in a clinical study or trial.

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide [1], and in the past few decades, the incidence has increased [2]. Despite advances in detection and targeted therapies, it remains the first cause of death by cancer in females [3]. In general, oncogenic transformation is the result of alterations in genes associated with DNA repair, tumor suppression and/or genes involved in cell cycle and apoptosis [4]. Clinically, this disease is highly heterogeneous, distinguishing several subtypes that differ in their biological characteristics and pathological behavior. This is associated with differences in prognosis and treatment response [5, 6]. The use of immunohistochemistry and gene expression studies have allowed the classification of breast cancer in at least five molecular subtypes: luminal A, luminal B, HER2, and the triple negative subtypes, basal-like and claudin-low. This classification is established primarily depending on the presence of estrogen (ER) and/or progesterone (PR) receptors, and human epidermal growth factor receptor-2 (HER2). Among them, luminal A subtype is the most prevalent, characterized by ER and/or PR expression, but not HER2 amplification (ER⁺, PR^{+/-}, HER2⁻) [7-9].

Breast cancer is currently treated with conservative surgery, adjuvant and/or neoadjuvant chemotherapy, radiotherapy, and hormone therapy, as appropriate. However, there is an elevated rate of patients who relapse with metastatic disease [10-12]. Therefore, we need to develop new treatments aimed to be more effective and selective, and that contribute to improve the prognosis and survival of patients.

Throughout the entire history of man, organisms of different nature have been used to alleviate all kinds of diseases, especially medicinal plants [13]. With technological development, compounds with different biological activity were purified from such organisms, including many widely administered "standard" chemotherapeutics such as paclitaxel, vinblastine or vincristine, among others [14].

Natural products of mixed biosynthetic origin (polyketide-terpenoid) containing a sesquiterpene unit joined to a phenolic or quinone moiety are generally named “merosesquiterpenes” [15]. The most important metabolites of this family are the compounds bearing a bicyclic terpene (drimane) moiety, mainly due to their potent biological activities. As an example we can highlight the Drimenyl phenols wiedendoil A y wiedendiol B, which are inhibitors of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibitors, isolated from the marine sponge *Xestospongia wiedemayeri* [16, 17]. Other examples within the Drimenyl quinones are the antitumor tauranin, isolated from *Phyllosticta spinarum*, a fungal strain endophytic in *Platycladus orientalis* [18], which also inhibits cholesterol biosynthesis; the anti-HIV (+)-hyatellaquinone (4), found in the sponge *Hyatella intestinalis* [19, 20]; and the recently reported discomycete metabolite (-)-F-12509 A, with sphingosine kinase inhibitory activity [21].

We have recently reported the antitumor properties of a new family of synthetic merosesquiterpenes. These compounds, whose synthesis and effects are protected under international patents WO/2009/112622 and WO/2010/076358, have cytotoxic activity against human breast, colon, and lung tumor cells. However, they have shown greater specificity against breast cells. Among them, compound 13 was highlighted, henceforth referred to as meroxest (figure 1), that has an elevated activity and specificity against the luminal breast cancer cell MCF-7. We proved that potent antitumor activity of meroxest against MCF-7 was mediated by the induction of oxidative stress; cell cycle arrest in G₀-G₁ phase accompanied by a downregulation of cyclin D1, pRb hypophosphorylation and increased expression of p27; and apoptosis associated with increased expression of p53 and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) fractioning. Moreover, meroxest appears to inhibit epithelial-mesenchymal transition, a process involved in metastasis and associated with poor prognosis. The *in vitro* results prompted us to assess its effect *in vivo*. For this purpose, we analyzed the effect of meroxest on tumor growth in immunocompetent C57BL/6 mice with allografts of E0771 mouse breast tumor cells

(luminal subtype), and we found that meroxest markedly reduced the volume of tumors [22].

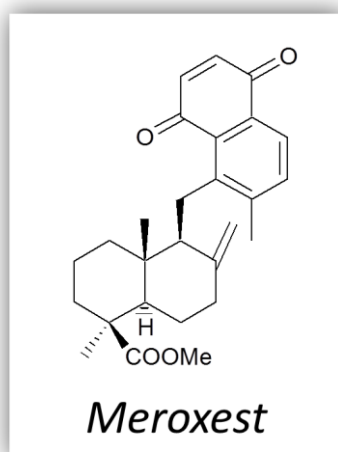


Figure 1. Chemical structure of Meroxest

In this paper, we characterize the histopathology of allografts of E0771 mouse breast tumor cells in immunocompetent C57BL/6 mice, and we also analyze the effect of meroxest on the prognosis of the disease, considering two markers widely used for this purpose, Ki67 and vascular endothelial growth factor (VEGF).

Material and methods

Cell line and culture

Mouse breast tumor line E0771 was supplied by the Cell Culture Service of the Scientific Instrumentation Center (University of Granada). The cell line was cultured at 37°C in 5% CO₂ and 90% humidity with Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, 10 ml/L penicillin-streptomycin 100X, and 2 mM L-glutamine. Culture media and supplements were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Subcutaneous Allograft Study

20 female C57BL/6 mice weighing 25-30 g were purchased from Scientific Instrumentation Center of Granada University and were kept in a laminar flow cabinet in a room with a controlled environment (37°C, 40-70% relative humidity, 12 h light/dark cycle, and pathogen-free). The *in vivo* study was approved by the ethics committee of the University of Granada. Exponentially growing E0771 cells suspension containing 1×10^6 cells was injected subcutaneously in the right side of the mice. At 9 days, when the tumor volume reached 75 mm^3 , mice were randomly distributed into two groups, for oral treatment with vehicle alone (1% methylcellulose) or with compound 13 at concentrations 15 mg/kg. The compound was administered on days 9, 12, 15, 18, 21, and 24 post-injection.

Histological analysis

On day 42 after injection, mice were sacrificed and tissue samples obtained from tumors allografts were processed as described previously [23]. Briefly, samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin, cut at 5 μm thickness, and stained with hematoxylin and eosin for histologic examination.

Immunofluorescence analysis of Ki-67 and VEGF expression

Sections were deparaffinized in xylene and gradually hydrated through a graded series of ethanol solutions from 100% to 50% and ddH₂O. For antigen retrieval, slides were placed in a container with 10 mM Sodium Citrate Buffer at 95°C for 10 min. Later, slides were washed in ddH₂O and preincubated in a humidity box with 10 % normal serum, 0.1% tween and 0.1% triton in PBS for 30 min to block nonspecific labeling. Blocking solution was removed and primary antibody against Ki67 (sc-7846) or VEGF (sc-7269) were added and samples were incubated overnight at 4°C. Antibody solution was removed and slides were washed with PBS tween 0.1% three times for 5 min each. Slides were incubated with secondary

antibody, anti-goat (sc-2024) or anti-mouse (sc-2010), for 1 h at room temperature in a dark room and washed with PBS tween 0.1% three times for 5 min each. Following DAPI counterstain, the tissue sections were examined and photographed with a fluorescence microscope (Leica DM IL LED Fluo). Total fluorescence measurements were performed taking 30 fields of vision from each slide and were analyzed using ImageJ software.

Statistical analysis

SPSS 14 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) was used for the statistical analysis. Results were compared with the Student's test and $p < 0.05$ was considered significant. Data were graphically represented by using Microsoft Excel 2010 software (Microsoft Corporation).

Results

Analysis of tumors

We found that the rate of tumor formation using allografts of E0771 cells in immunocompetent C57BL/6 mice is very high, over 95% of cases. In figure 2A, a mouse bearing a tumor can be observed, and panel 2B shows photographs of tumors isolated from the sacrificed animals. The mean volume of control tumors was $12.14 \times 10^3 \text{ mm}^3$ whereas that of tumors treated with meroxest was $3.89 \times 10^3 \text{ mm}^3$. Macroscopically, we found that meroxest significantly reduces tumor size (figure 2B1), and also that it induces changes in tumor structure, as compared to controls (figure 2B2 vs. figure 2B3). We found important differences in the texture of tumors, since control showed a consistency similar to liver, while tumors of animals treated with meroxest presented a more compact and robust consistency, similar to cartilage tissue (figure 2B3).

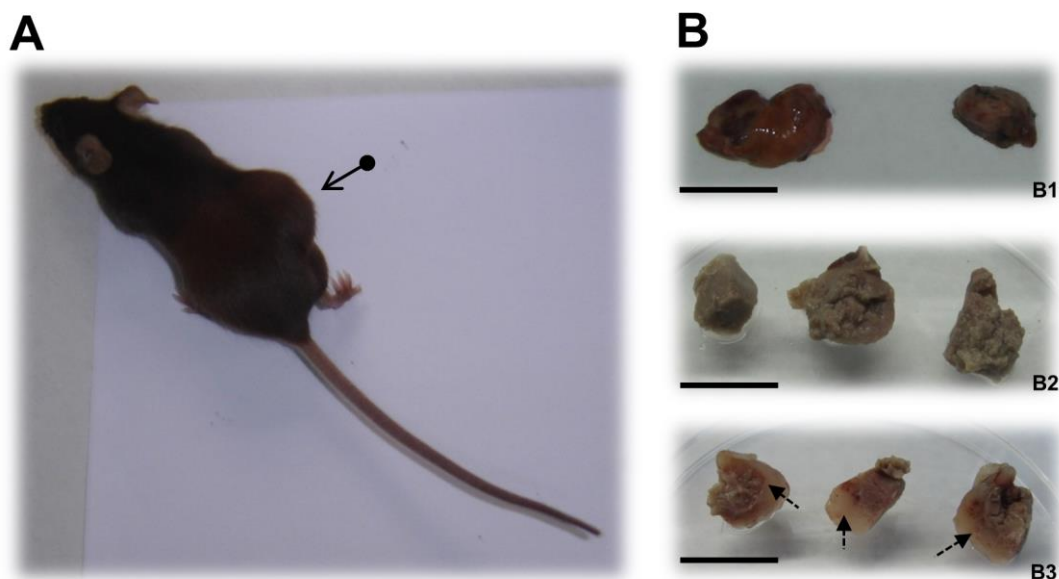


Figure 2. Allografts of E0771 cells in C57BL/6 mice. A - Mouse bearing a tumor (arrow). B - Samples of tumors: whole tumor from control (left) and from 15 mg/kg meroxest-treated animal (right) (B1). The mean volume of control tumors was $12.14 \times 10^3 \text{ mm}^3$ whereas that of tumors treated with meroxest was $3.89 \times 10^3 \text{ mm}^3$. Fragments from control tumors (B2) and from 15 mg/kg meroxest-treated tumors (B3). Arrows in B3 indicate areas with marked modifications in the structure of meroxest-treated tumors as compared to controls. Bars: 24 mm (B1) and 15 mm (B2 and B3).

In sections stained with hematoxylin-eosin, we observed that the tumors of E0771 cells exhibit a well-defined capsule formed by normal tissue, enclosing a mass of tumor cells. The central area of the tumors contains necrotic centers with plenty of debris and leukocyte infiltration (figures 3A and 3B). Interestingly, we often found that the tumor cells were capable of invading the underlying muscle tissue (figures 3C and 3D). Tumors from animals treated with meroxest shared the characteristics described for the control tumors, except that a significant less leukocyte infiltration was found in tumors from meroxest-treated mice (figures 3E and 3F).

Immunofluorescence analysis of Ki-67 and VEGF expression

We analyzed the expression of the prognostic markers Ki67 and VEGF by immunofluorescence. It was observed a high expression of Ki67 in tumor cells of control animals. However, animals treated with meroxest experienced a significant

decrease in Ki67 expression of over 33%. Similarly, expression of VEGF was significantly reduced by more than 80% in treated animals as compared with controls (figures 4 and 5).

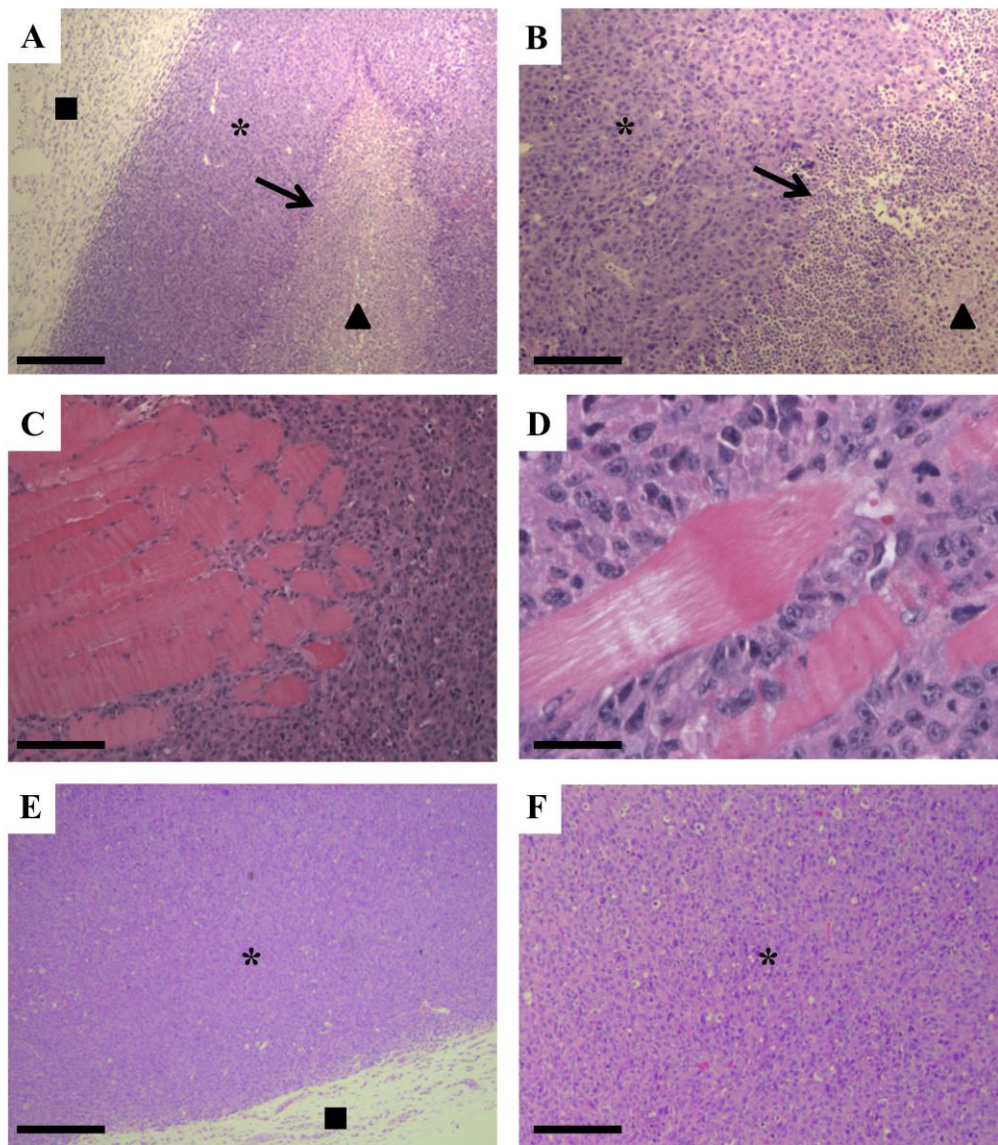


Figure 3. Histological analysis of E0771 allografts. A - Micrograph of a hematoxylin-eosin-stained control tissue section showing a peripheral capsule of normal tissue (■), enclosing tumor cells (*) and necrotic centers (▲) with leukocyte infiltration (arrow). B - Micrograph with higher magnification which shows leukocyte infiltration at the edge of a necrotic center. C and D - E0771 tumor cells invading the underlying muscle tissue. E and F - Tumor sections from a 15 mg/kg merxest-treated animal exhibiting less leukocyte infiltration than controls. Bars: 367.5 μ m (A,E), 147 μ m (B,C,F) and 36.75 μ m (D).

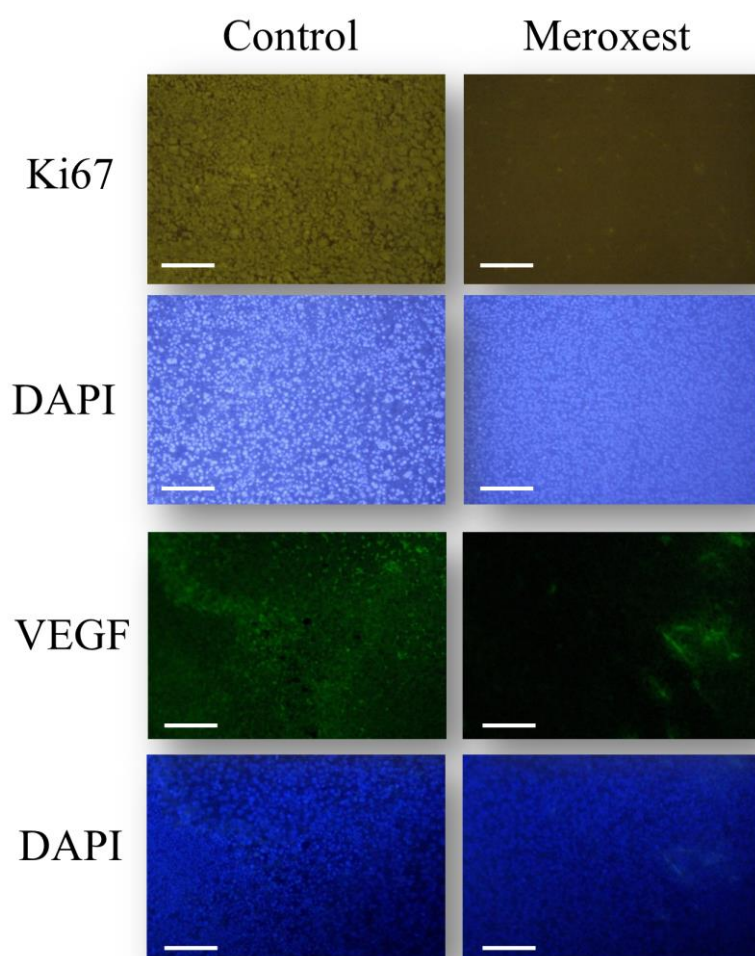


Figure 4: Immunofluorescence analysis of Ki67 and VEGF expression in tumor sections from control and 15 mg/kg meroxest-treated animals. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Bars: 100 μ m.

Discussion

Meroxest is a novel merosesquiterpene which was synthesized by Diels-Alder cycloaddition of the labdane diene trans-communic acid, highly abundant in *Cupressus sempervirens*. Previously, we reported that meroxest acts selectively against breast tumor cells through a mechanism that comprises the arrest of cells in G₀-G₁ phase, and the induction of oxidative stress and apoptosis. Furthermore

meroxest is capable of inhibiting the growth of tumors *in vivo* [22]. In this paper, we have characterized allografts of E0771 mouse breast tumor cells in immunocompetent C57BL/6 mice. Moreover, we have evaluated the effects of meroxest on tumor development, at both macroscopic and microscopic levels, and the expression of two important prognostic markers, Ki67 and VEGF. Ki67 is a classic proliferation marker widely used in clinic, and it is considered as an ideal marker for monitoring breast cancer [24]. By contrast, VEGF is a marker whose importance has been emphasized more recently, because of its involvement in an important process for tumor development, the angiogenesis [25].

We have used E0771 murine breast cancer cells to induce syngeneic allografts in C56BL/C mice since it is an immunocompetent experimental model. We believe that this system provides translational results due to most breast cancer patients are also immunocompetent. It must be considered that immunocompetent microenvironment is necessary for the study of cancer stem cells (CSCs) *in vivo* and the complex interaction between therapies targeting CSCs and immune system [26, 27]. This is very important, because according to the hypothesis of CSCs, these cells would be responsible for the origin and progression of cancer, as well as relapse and treatment failure [28]. Moreover, allografts of E0771 cells in C56BL/C mice are subcutaneous models with high invasiveness, a typical feature of human breast cancer [26, 29], as we have found in our samples. All these aspects, along with the high rate of tumor formation make us believe that the experimental model chosen is suitable for the proposed study. However, there are few articles that refer to the use of E0771 model in C57BL/6 mice, and we believe that its use should be more widespread.

We first analyzed macroscopically the tumors. We found important differences between tumors treated and untreated with meroxest, appearing in the former cartilage-like consistency, while the latter had a consistency similar to the liver. This aspect is of relevance in the anatomo-pathological description of tumors since it reflects structural and ultrastructural modifications. Microscopically, control tumors

had necrotic centers with abundant leukocyte infiltration. This histopathological organization concurs with the single previous description of these tumors that we found in the literature, and that resemble medullary breast tumors [29]. Interestingly, tumors from animals treated with meroxest experienced a significant reduction of leukocyte infiltration.

At present, tumor-associated inflammation is considered a hallmark of tumor development, and there is growing evidence of its clinical significance in different types of tumors [30]. Paradoxically, the presence of leukocyte infiltration is associated with good or bad clinical outcome depending on the type of tumor [31]. In the case of breast cancer its role is still unclear, and even there are contradictory studies, which could be justified based on the heterogeneity of this cancer [32]. In ER⁺ breast tumors, leukocyte infiltration is associated with a high tumor grade and high expression of Ki67, both markers of poor prognosis, and decreased survival. On the contrary, in ER⁻ and HER2⁺ tumor infiltration is associated with good prognosis [33, 34]. The cell line that we used for the induction of tumors, E0771, was originally isolated from a spontaneous mouse medullary breast adenocarcinoma. The cells have a phenotype ER⁺ [35], therefore and as stated above, meroxest improves the prognosis of treated animals by means of a significant reduction in leukocyte infiltration.

Overall, the high cell proliferation rate in tumors is associated with increased aggressiveness and worse prognosis. One method used to assess the state of cell proliferation is the determination of Ki67 marker expression [36]. Ki67 is a nuclear protein that is differentially expressed in the cell cycle, and thus it only can be detected in proliferating cells, not in quiescent cells [37]. There are numerous evidences in favor of the use of Ki67 as a prognostic marker, and that associate increased expression with poor clinical outcome and bad response to chemotherapy [38-41]. In fact, it is a marker employed in the histopathological classification of breast cancer patients. In our study, the tumors of animals treated with meroxest presented a significant decrease in the expression of Ki67 as

compared to controls. This effect would indicate a lower proliferative potential of the cells, and a better prognosis for animals, and correlates with our previous results, in which we could prove a significant reduction of tumor volume in animals treated with oral meroxest at 5, 10 or 15 mg/kg [22]. Consequently, volume reduction may be due to loss of proliferative potential of tumoral cells after the treatment with the merosesquiterpene.

A very important process for growth, development and progression of tumor is the angiogenesis, which is responsible for new vessel formation. Without vasculature, tumors could not grow beyond 2-3 mm because they would not receive the necessary nutrients and gases [42]. Therefore, during the growth of primary and metastatic tumors, new vessels are formed. The process of angiogenesis is regulated by a balance established between proangiogenic and antiangiogenic factors [43, 44]. The most important proangiogenic factor is the vascular endothelial growth factor (VEGF) [45]. VEGF, also known as VEGF-A, is a member of the VEGF family, which also includes VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D and PLGF (placental growth factor) [46]. VEGF is overexpressed in many human tumors, including breast cancer, which correlates with progression, grade and poor prognosis of the disease [44, 46, 47]. We analyzed the expression of VEGF in our samples and we found over 80% lower expression in tumors from animals treated with meroxest than control tumors. This effect would indicate a better prognosis for animals, and correlates with our previous results. The lower expression of VEGF could lead to a poor development of the tumor vasculature, thereby affecting tumor growth.

Because of the involvement of angiogenesis in tumor progression, the antiangiogenic therapy has been presented as a promising strategy in the treatment of disease, and especially in combination with chemotherapy. Among the most commonly used antiangiogenic agents are inhibitors of VEGF and its receptors. A leading example is bevacizumab, a VEGF inhibitor that was the first anti-VEGF monoclonal antibody approved by the FDA for the treatment of various types of tumors. Its use in metastatic colon cancer increases survival when given in combination with chemotherapy [48, 49]. However, an important percentage of

patients develop resistance to VEGF inhibitors [50-52]. Therefore, it is necessary the discovery and/or development of new antiangiogenic drugs, and especially those effective in resistant patients [53, 54]. In this work, we demonstrate that meroxest leads to a reduction of VEGF expression. Thus, we hypothesize that meroxest may be a useful antiangiogenic drug in the treatment of human breast cancer. In addition, we think that meroxest may be useful in resistant patients due to it interferes with VEGF expression, and not against the expressed protein, that is the form in which most inhibitors act. However, this needs to be clarified in detail.

Conclusion

We believe that allografts of E0771 mouse breast tumor cells in immunocompetent C57BL/6 mice constitute an experimental model of great clinical-translational value in breast cancer. This is due to the model provides a natural immune environment, with invasive cells and a high rate of tumor induction. Meroxest improves the prognosis of animals bearing those allografts since it reduces tumor leukocyte infiltration, and the expression of Ki67 and VEGF markers. Consequently, the merosesquiterpene could become a useful antiangiogenic drug in the treatment of human breast cancer. These results encourage us to deepen the study of meroxest, in order to find more evidences that support the convenience of its evaluation in a clinical study or trial.

Acknowledgements

This study was supported by the Regional Government of Andalusia (Project P11-CTS-7651 and assistance to the CTS-107 and FQM-348 groups). EC received an FPU pre-doctoral fellowship (Ministry of Education, Culture and Sport), and this article is related to her PhD thesis.

References

1. Piotrowski G, Gawor R, Stasiak A, Gawor Z, Potemski P, Banach M. Cardiac complications associated with trastuzumab in the setting of adjuvant chemotherapy for breast cancer overexpressing human epidermal growth factor receptor type 2 – a prospective study. *Arch Med Sci.* 2012; 8(2):227-35.
2. Xu YL, Sun Q, Shan GL, *et al.* A case-control study on risk factors of breast cancer in China. *Arch Med Sci.* 2012;8(2):303-9.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61: 69-90.
4. Mojgan H, Massoud H, Ahmad E. ERCC1 intron 1 was associated with breast cancer risk. *Arch Med Sci.* 2012;8(4): 655-8.
5. Dawson SJ, Rueda OM, Aparicio S, Caldas C. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *EMBO J.*2013; 32:617-28.
6. Badowska-Kozakiewicz AM, Sobol M, Patera J, Kozłowski W. Immunohistochemical evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 and estrogen and progesterone receptors in invasive breast cancer in women. *Arch Med Sci.* 2013; 9(3): 466-71.
7. Byler S, Goldgar S, Heerboth S, *et al.* Genetic and Epigenetic Aspects of Breast Cancer Progression and Therapy. *Anticancer Res.* 2104; 34: 1071-77.
8. Cadoo KA, Fornier MN, y Morris PG. Biological subtypes of breast cancer: current concepts and implications for recurrence patterns. *Q J Nucl Med Mol Imaging.*2013; 57: 312-21.
9. Guiu S, Michiels S, Andre F, *et al.* Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann Oncol.* 2012; 23: 2997-3006.
10. Hashemi-Meshkini A, Keshavarz K, Gharibnaseri Z, *et al.* Cost-effectiveness analysis review of exemestane in the treatment of primary and advanced breast cancer. *Arch Med Sci.* 2013; 9(3): 472-8

11. Lu X, Deng Q., Li H, Suo Z. Altered characteristics of cancer stem/initiating cells in a breast cancer cell line treated with persistent 5-FU chemotherapy. *Exp. Ther. Med.* 2011; 2: 821-26.
12. Sheri A, Johnston S. New developments and future directions in systemic therapy. *Clin Oncol (R Coll Radio)*.2013; 25: 117-26.
13. Linjawi S, Khalil W, Hassanane MM, Ahmed ES. Evaluation of the protective effect of *Nigella sativa* extract and its primary active component thymoquinone against DMBA-induced breast cancer in female rats. *Arch Mes Sci*.2013.
14. Robles-Fernández I, Rodríguez-Serrano F, Álvarez PJ, *et al.* Antitumor properties of natural compounds and related molecules. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*.2013; 8: 203-15.
15. Simpson T J. Application of Isotopic Methods to Secondary Metabolic Pathways. In: Leeper DFJ, Vederas PJC, editors. *Biosynthesis*. Springer Berlin Heidelberg; 1998, p. 1-48.
16. Álvarez-Manzaneda E J, Chahboun R, Barranco Pérez I, Cabrera E, Álvarez E, Álvarez-Manzaneda R. First Enantiospecific Synthesis of the Antitumor Marine Sponge Metabolite (-)-15-Oxopuupehenol from (-)-Sclareol. *Org Lett*. 2005; 7: 1477-80.
17. Coval SJ, Conover MA, Mierzwa R, *et al.* Wiedendiol-A and -B, cholesteryl ester transfer protein inhibitors from the marine sponge *Xestospongia wiedenmayeri*. *Bioorg Med Chem Lett*.1995; 5: 605-10.
18. Ishii S, Fujii M, Akita H. First Syntheses of (-)-Tauranin and Antibiotic (-)-BE-40644 Based on Lipase-Catalyzed Optical Resolution of Albicanol. *Chem Pharm Bull*.2009; 57: 1103-06.
19. Talpir R, Rudi A, Kashman Y, Loya Y, Hizi A. Three new sesquiterpene hydroquinones from marine origin. *Tetrahedron*. 1994; 50: 4179-84.
20. Yong KWL, Jankam A, Hooper J NA, Suksamrarn A, Garson MJ. Stereochemical evaluation of sesquiterpene quinones from two sponges of the genus *Dactylospongia* and the implication for enantioselective processes in marine terpene biosynthesis. *Tetrahedron*. 2008; 64: 6341-48.

-
21. Bonhoure E, Lauret A, Barnes DJ, *et al.* Sphingosine kinase-1 is a downstream regulator of imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia*. 2008; 22: 971-79.
 22. Carrasco E, Álvarez PJ, Melguizo C, *et al.* Novel merosesquiterpene exerts a potent antitumor activity against breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Med Chem*. 2014; 79: 1-12.
 23. Gottwald L, Danilewicz M, Suzin J, *et al.* Assessment of the argyrophilic nucleolar organizer region area/nucleus ratio in ovarian serous epithelial adenomas, borderline tumors and cancers. *Arch Med Sci*. 2013;9(1):79-85.
 24. Sun JZ, Chen C, Jiang G, Tian WQ., Li Y, Sun SR. Quantum dot-based immunofluorescent imaging of Ki67 and identification of prognostic value in HER2-positive (non-luminal) breast cancer. *Int J Nanomedicine*. 2014; 9: 1339-46.
 25. Taneja P, Maglic D, Kai F, *et al.* Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clin Med Insights Oncol*. 2010; 4: 15-34.
 26. de Jong M, Maina T. Of mice and humans: are they the same?--Implications in cancer translational research. *J Nucl Med*. 2010;51: 501-4.
 27. Kruger J A, Kaplan CD, Luo Y, *et al.* Characterization of stem cell-like cancer cells in immune-competent mice. *Blood*. 2006; 108: 3906-12.
 28. Carrasco E, Álvarez PJ, Prados J, *et al.* Cancer stem cells and their implication in breast cancer. *Eur J Clin Invest*. 2014; 44: 678-87.
 29. Ewens A, Mihich E, Ehrke MJ. Distant metastasis from subcutaneously grown E0771 medullary breast adenocarcinoma. *Anticancer Res*. 2005; 25: 3905-15.
 30. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009; 30: 1073-81.
 31. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 298-306.

-
32. Mohammed ZMA, Going JJ, Edwards J, Elsberger B, Doughty JC, McMillan DC. The relationship between components of tumour inflammatory cell infiltrate and clinicopathological factors and survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer*.2012; 107: 864-873.
 33. Tsang JY, Hui SW, Ni YB, *et al*. Lymphocytic infiltrate is associated with favorable biomarkers profile in HER2-overexpressing breast cancers and adverse biomarker profile in ER-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2014; 143: 1-9.
 34. Tsang JY, Ni YB, Chan SK, *et al*. Increased lymphocytic infiltration in breast cancer correlated with molecular subtypes and HER2 gene amplification. *Histopathology*. 2013; 62: 963-5.
 35. Gu JW, Young E, Patterson SG, *et al*. Postmenopausal obesity promotes tumor angiogenesis and breast cancer progression in mice. *Cancer Biol Ther*.2011; 11: 910-7.
 36. Herruzo A, Luján S, Moreno J. Cáncer de mama IV. Tratamiento locorregional del cáncer infiltrante de mama. Factores de pronóstico. Tratamiento adyuvante. In Cabero i Roura L, Cabrillo Rodríguez E, Bajo Arenas JM, editors. *Tratado de ginecología y obstetricia*. 2nd ed. Madrid: Médica Panamericana; 2012. p. 860-77.
 37. Pathmanathan N, Balleine RL. Ki67 and proliferation in breast cance. *J Clin Pathol*.2013; 66:512-6.
 38. Ingolf JB, Russalina M, Simona M, *et al*. Can Ki-67 Play a Role in Prediction of Breast Cancer Patients' Response to Neoadjuvant Chemotherapy? *BioMed Res Int*. 2014.
 39. Kim KI, Lee KH, Kim TR, Chun YS, Lee TH, Park HK. Ki-67 as a Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. *J Breast Cancer*. 2014; 17: 40-6.
 40. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer. *J Clin Oncol*.2005; 23:7212-20.
 41. Viale G. Pathological work up of the primary tumor: Getting the proper information out of it. *Breast*. 2011; 20:S82-6.

-
42. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971; 285: 1182-6.
 43. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011; 144: 646-74.
 44. Fakhrejehani E, Toi M. Antiangiogenesis Therapy for Breast Cancer: An Update and Perspectives from Clinical Trials. *Jpn J Clin Oncol.* 2014; 44: 197-207.
 45. Gu JW, Makey KL, Tucker KB, *et al.* EGCG, a major green tea catechin suppresses breast tumor angiogenesis and growth via inhibiting the activation of HIF-1 α and NF κ B, and VEGF expression. *Vasc Cell.* 2013; 5: 9.
 46. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9: 669-76.
 47. Ruma IM, Putranto EW, Kondo E, *et al.* Extract of *Cordyceps militaris* inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth of human malignant melanoma cells. *Int J Oncol.* 2014; 45: 209-18.
 48. Lindholm EM, Kristian A, Nalwoga H, *et al.* Effect of antiangiogenic therapy on tumor growth, vasculature and kinase activity in basal- and luminal-like breast cancer xenografts. *Mol Oncol.* 2012; 6: 418-27.
 49. Guo Yt, Ding L, Li Th. [Application of bevacizumab on metastatic breast cancer]. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2012; 44: 708-14.
 50. Warin R, Xiao D, Arlotti JA, Bommareddy A, Singh SV. Inhibition of human breast cancer xenograft growth by cruciferous vegetable constituent benzyl isothiocyanate. *Mo. Carcinog.* 2010; 49: 500-7.
 51. Sharma T, Dhingra R, Singh S, *et al.* Aflibercept: A Novel VEGF Targeted Agent to Explore the Future Perspectives of Anti-Angiogenic Therapy for the Treatment of Multiple Tumors. *Mini Rev Med Chem.* 2013; 13: 530-40.
 52. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell.* 2011; 146: 873-87.
 53. Kerbel RS. Strategies for improving the clinical benefit of antiangiogenic drug based therapies for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2012; 17: 229-39.

54. Xynos ID, Tanna N, Patten DK, Palmieri C. Prior exposure to chemotherapy: a marker of sensitivity and selection for antiangiogenic therapy in breast cancer? *Expert Rev Anticancer Ther.* 2014; 14: 163-72.

Cancer stem cells and their implication in breast cancer

Esther Carrasco^{1,2}, Pablo Juan Álvarez¹, José Prados¹, Consolación Melguizo¹,
Ana Rosa Rama³, Antonia Aránega¹, Fernando Rodríguez-Serrano¹

¹ *Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), University of
Granada, 18071 Granada, Spain*

² *PhD Program in Biomedicine, University of Granada, 18071 Granada, Spain*

³ *Department of Health Science, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain*

Eur J Clin Invest 2014;44(7):678-687

European Journal of Clinical Investigation

THE JOURNAL OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION

Abstract

Background. The cancer stem cell (CSC) hypothesis on the origin of cancer has recently gained considerable support. CSCs are tumour cells with the capacity for self-renewal and differentiation that direct the origin and progression of the disease and may be responsible for relapse, metastasis and treatment failures.

Design. This article reviews breast CSCs (BCSCs) phenotyping, clinical implications and clinical trials focused on BCSCs in breast cancer. Relevant studies were found through PubMed and Clinicaltrials.gov databases.

Results. Cancer stem cells are identified and isolated using membrane and cell activity markers; in the case of BCSCs, these are CD44⁺/CD24^{low/-1} and show aldehyde dehydrogenase activity, alongside their capacity to grow and form mammospheres. The presence of stem cell properties is associated with a worse outcome. Hence, these cells have important clinical implications, and elucidation of the mechanisms underlying their activity will allow the development of novel effective therapies and diagnostic instruments, improving the prognosis of these patients.

Conclusions. Standard treatments are directed against the tumour mass and do not eliminate CSCs. There is therefore a need for specific anti-CSC therapies, and numerous authors are investigating new targets to this end, as reported in this review. It is also necessary for clinical trials to be undertaken to allow this new knowledge to be applied in the clinical setting. However, there have been few trials on anti-BCSCs therapies to date.

Introduction

Cancer stem cells possess a high capacity to generate tumours in animal models. They share some of the main features of normal stem cells, including self-renewal and the capacity for asymmetric division and for the production of phenotypically diverse cells; however, their proliferation and genetic damage repair processes are uncontrolled, unlike in normal stem cells. These cells persist in tumours and may be responsible for relapse and metastasis [1].

In addition, CSCs frequently appear to be responsible for treatment failure, which has been attributed to a number of features, including the expression of multidrug resistance (MDR) transporters, such as ATP-binding cassette (ABC) efflux transporters of P-glycoprotein (P-gp/ABCB1), multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) and breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) [2,3], which increases drug efflux. Thus, it was demonstrated in a "side population" assay that CSCs are able to pump out Hoechst fluorescent dye [4]. In addition, aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1), a detoxifying enzyme responsible for the oxidation of intracellular aldehydes, is active in several CSCs, and its expression has been associated with a poor prognosis in breast carcinoma [5]. CSCs were also found to possess an enhanced DNA damage checkpoint response and DNA repair capacity, allowing them to evade genotoxic treatments [6]. Furthermore, CSCs show an increased expression of free radical scavengers, which may protect them from DNA damage mediated by reactive oxygen species and explain their resistance to irradiation treatments. In this regard, some studies have indicated that this resistance may be reversible [6]. Finally, current therapies target dividing cells, whereas most CSCs are in the resting phase of the cell cycle [7].

Numerous studies have associated the presence of cells with stem cell properties in tumour disease with a worse prognosis [8-10], and there is a need for novel drugs that preferentially act against CSCs in an effective manner.

The origin of CSCs remains unclear, and various theories have been advanced. One widespread theory is that they result from environmental changes or genetic mutations in normal stem cells, resulting in the deregulation of their self-renewal and differentiation pathways [11, 12]. Another theory describes CSCs as originating from cancer cells that are hierarchically downstream of CSCs but have not differentiated and have acquired the capacity for self-renewal [13]. A further proposal is that they derive from progenitor cells or from more differentiated cells via a dedifferentiation process [14]. In this case, epithelial mesenchymal transition (EMT) appears to play an important role by endowing cells with some of the characteristics and behaviours of CSCs, including motility, thereby favouring metastasization. Recent studies have identified a parallelism between cells undergoing EMT and BCSC phenotype and have even generated BCSCs by induction of EMT *in vitro* [15, 16]. Finally, it has been claimed that radiotherapy and chemotherapy can produce a marked increase in the number of CSCs [16, 17].

Breast Cancer Stem Cell (BCSC) phenotyping

After its discovery in leukaemia, CSCs were isolated in many solid malignancies. The first report was by Al-Hajj et al in breast cancer [19]. They isolated these cells and designated them as CD44⁺CD24^{-/low} lineage⁻ (CD2, CD3, CD10, CD 16, CD18, CD31, CD64, and CD140b). One thousand of these cells were sufficient to generate tumours when xenotransplanted into NOD / SCID mice, although around fifty thousand were needed in the unsorted population.

CD44⁺/CD24^{-/low} cells have evidenced stem cell features, and many studies have confirmed the poor prognosis of tumours with CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype [20, 21]. However, the role of CD24 remains controversial, and some studies have associated its higher expression with a worse outcome [22, 23]. For this reason, there is an ongoing search for complementary markers.

ALDH1 is widely used as a functional marker in various types of cancer. Ginestier *et al.* demonstrated that ALDH1 activity is a marker of the stemness of normal and malignant human breast cells. Analysis of tumour samples found that only 1% of the ALDH-positive cell population also had the CD44⁺/CD24^{-low}/lin⁻ phenotype reported for CSCs, although the population with both phenotypes evidenced greater tumorigenicity, with around 20 cells being sufficient to generate a tumour [5]. It should be borne in mind ALDH is a superfamily of detoxifying enzymes and that ALDH1A1 and ALDH3A isoforms have functions in normal stem cells. Furthermore, the expression of ALDH1 is associated with a worse prognosis in patients with breast cancer [24].

Other potential markers of BCSCs have since been identified (i.e. CD29, CD49f, CD133), but CD44⁺/CD24^{low/-} and ALDH⁺ phenotypes are the most widely used for their identification.

The "sphere forming" assay (mammosphere assay for breast cancer) has also been used to isolate or enrich BCSCs. Ponti *et al.* [25] were the first to propagate stem cells from three breast cancer lesions and from an established breast carcinoma cell line *in vitro* as nonadherent mammospheres, in agreement with similar findings by Dontu *et al.* [26] with normal mammary stem cells. This is a useful method for studying the properties of BCSCs and therapeutic strategies that target them, although it is not yet clear whether these cell cultures are real BCSCs or intermediate progenitors that acquired stem properties due to genetic causes. Nevertheless, mammosphere formation serves as an indirect measure of the capacity for self-renewal and also correlates with the ability to induce tumours in SCID mice. [27].

The presence of CSCs may be associated with a worse prognosis, and it is of interest to explore relationships between different breast cancer subtypes and the presence of stem markers. The prognosis and treatment of patients depend upon the cancer subtype. Triple-negative tumours, which lack estrogen receptor,

progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) overexpression, are the most aggressive, with a poor prognosis and no effective therapy [28, 29]. Some studies report a higher percentage of CD44⁺/CD24^{-/low} and ALDH⁺ cells in triple-negative basal-like and claudin-low tumours but of CD44^{-/low}/CD24⁺ cells in non triple-negative luminal subtypes [30, 21]. As a representative example, Creighton *et al.* [31] found an increase in cells with CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype and in mammosphere formation in breast tumours after treatment with docetaxel and letrozole. Gene expression analysis demonstrated that these cells corresponded to the claudin-low subtype.

Clinical implications

Breast cancer is treated with surgery, radiotherapy and/or chemotherapy but is associated with an elevated recurrence rate. A cause of relapse may be the drug resistance presented by CSCs, although little is known about the effect of chemotherapy on these cells. This issue was addressed by Lü *et al.* [32], who confirmed that the resistance is in part due to CSCs. After exposing the breast cell line MDA-MB-468 to six rounds of 5-Fluorouracil, they evaluated the protein and mRNA expression of stem/initiating factors (CD44⁺/CD24⁻, Oct 3/4, SOX2 and β -catenin) and the clone formation rate. They also analyzed the drug-resistance genes BCRP and MRP1 and the anti-apoptosis gene survivin, reporting that BCRP and survivin were both positively correlated with the CSC factors analyzed and therefore associated with CSC drug resistance, with a low expression in differentiated cells.

Various studies have implicated CSCs in radioresistance. Phillips *et al.* [33] isolated CD44⁺/CD24^{-/low} cells from MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer monolayer cultures and propagated them as mammospheres; they investigated the response of this cell population to radiation and found that CD44⁺/CD24^{-/low} enriched cancer-initiating cells were more resistant to radiation than cells in monolayer culture.

Moreover, the number of BCSCs increased with continual doses of radiation. The mechanism underlying this radioresistance is poorly understood. Zhan *et al.* [34] investigated the role of STAT-1 in BCSCs radioresistance after reports of its implication in radiation resistance in glioma, prostate cancer [35] and renal carcinoma [36]. They found that post-irradiation STAT1 levels were higher in mammosphere cultures of MCF-7, which had the BCSC phenotype (CD44⁺/CD24^{low}), than in monolayer cultures. They also reported that STAT1 inhibition with fludarabine increased apoptosis, reduced the colony-forming rate and decreased the survival in the breast cancer-initiating cells in comparison to MCF-7 cells derived from monolayer cultures. They concluded that radiation increases STAT1 expression, inducing radioresistance in BCSCs. The mechanism by which STAT1 participates in radioresistance is unclear, but their findings indicate that STAT1 may be a good target to reduce radioresistance and enhance the efficacy of radiotherapy.

Stat-3 is one of the new anti-BCSC targets under investigation. This protein plays a major role in cell growth regulation, differentiation and survival and is activated in response to extracellular cytokines and growth factors. Cytoplasmic Stat-3 becomes activated by phosphorylation, and hyper-phosphorylation of Stat-3 has been observed in various tumours, including breast cancer [37]. The role of Stat-3 in breast cancer stem cell drug resistance is not well understood. Gopalan *et al.* [38] studied the anticancer effect of simvastatin (SVA) and gamma-tocotrietol (γ T3) in drug-resistant breast cancer cell lines and found the lines to be enriched with CSCs, in part maintained by overexpression of pStat-3 and its downstream mediators. When these cells were separately treated with SVA and γ T3, the CSCs were eliminated by the suppression of Stat-3 signalling, while the combined treatment achieved the same results at lower doses. These data suggest that Stat-3 signalling may be a target for CSCs elimination and that the combined use of SVA and γ T3 against CSCs may represent a novel approach to the prevention and treatment of drug-resistant breast cancer.

Another target that has been studied is HER2, a tyrosine kinase receptor belonging to the human epidermal growth factor receptor (EGFR) family, which regulates cell survival, proliferation, differentiation and migration [39]. Overexpression of HER2 is found in 20-25% of breast cancers and is often associated with a poor prognosis and an increase in stem cell markers [21]. The primary adjuvant therapy for HER2-positive cancers is with trastuzumab, which targets HER2 and is one of the most effective treatments in oncology. However, a substantial number of patients show resistance produced by different mechanisms. Oak *et al.* [40] suggested that resistance may be due to the heterogeneity of the tumour, which can contain a HER2 low population that is not affected by this treatment; consequently anti-HER2 therapies will not necessarily eliminate cancer stem cells and may lead to a more aggressive cancer cell phenotype. They used an *in vitro* mammosphere culture system, observing elevated HER2 levels and its differential expression in individual mammosphere cells, yielding sorter HER2^{high} and HER2^{low} populations. The HER2^{low} population overexpresses stem cell markers (e.g., NANOG, OCT4 and SOX2) and possesses stem-cell-like properties. A population that survives trastuzumab treatment might be enriched in CSCs. They treated the population with trastuzumab in combination with salinomycin, which has proven effective against human BCSCs resistant to chemotherapeutic drugs such as paclitaxel, doxorubicin, actinomycin D and camptothecin [14]. The CSC population was reduced when the mammospheres were treated with salinomycin, and these authors proposed a novel combined treatment strategy that targets most cells in heterogeneous breast cancers, using trastuzumab against HER2^{high} cells and salinomycin against HER2^{low} cells, i.e., CSCs [40].

The Neuropilin-1 (Nrp1)/NF-κB pathway plays a major role in mammosphere formation and CSC-mediated tumour initiation. Glinka *et al.* [41] proposed the blockade of the Neuropilin-1 (Nrp1)/NF-κB pathway as a potentially effective anti-BCSC therapy. In a previous study, they demonstrated that tranilast, which is used for allergies but has demonstrated anti-CSC properties [42], inhibits mammosphere formation and metastasis after xenotransplantation [43]. Their study of the

participation of the Nrp1/NF- κ B pathway in the action mechanism of tranilast showed that this drug inhibits mammosphere formation by suppressing both Nrp1 expression and NF- κ B activation. This suggests that NRP1 may be important for the function of BCSCs and may therefore represent a good target.

Given that elevated ALDH activity is a marker of BCSCs, its inhibition may contribute to their reduction or elimination. Recent studies demonstrated that the inhibition of ALDH activity reduces stem-like cell properties and associated resistance to drugs and radiotherapy. Croker *et al.* [24] inhibited ALDH activity directly with the specific ALDH inhibitor diethylaminobenzaldehyde (DEAB) and indirectly with all-trans retinoic acid (ATRA). They isolated ALDH^{high}/CD44⁺ and ALDH^{low}/CD44⁻ populations and demonstrated that ALDH^{high}/CD44⁺ human breast cancer cells were resistant to standard cancer therapies. They subjected both populations to treatment with doxorubicin, paclitaxel or radiation in the presence or absence of DEAB or ATRA; the reduction in cell viability produced by pre-treatment with DEAB or ATRA was significantly greater in the ALDH^{high}/CD44⁺ vs. ALDH^{low}/CD44⁻ population but only DEAB maintained this sensitization over the long term. This was the first demonstration that ALDH activity influences the resistance of breast cancer cells to anthracyclines, taxanes and radiation, suggesting a wider role for ALDH in the response to treatment than previously thought.

Abnormalities in Wnt, Notch and Hedgehog (Hh) signalling pathways in mammary glands have been implicated in breast tumorigenesis, and therapies targeting these pathways may be useful against BCSCs. Yin *et al.* [44] studied the effects of PARP inhibitors (AZD2281 and BSI-201), paclitaxel, docetaxel, cisplatin and cisplatin plus TRAIL on CSCs derived from CRL-2335 and MDA-MB-468 triple-negative breast cancer cells. The cisplatin plus TRAIL treatment proved the most effective in removing CSCs as well as the total population; TRAIL inhibits Wnt1 signalling by reducing β -catenin, phospho β -catenin and cyclin D1. This treatment also increased apoptosis and reduced proliferation and mammosphere formation,

showing an even greater effectiveness in comparison to that of Wnt1 siRNA. Therefore, cisplatin plus TRAIL is highly effective against CSCs and may represent a useful approach in triple-negative breast cancer patients who may not benefit from normal treatment.

Cyclopamine was the first Hh pathway inhibitor to be identified, acting by binding to and inactivating Smo [45]. However, because of the low affinity, poor oral bioavailability and suboptimal pharmacokinetics of cyclopamine, more potent derivatives have been synthesized, such as small-molecule Smo antagonist. Some of these have been tested in preclinical models [46] but not yet against BCSCs.

Inhibition of the Notch pathway alone or in combination with chemotherapeutic agents can reduce the tumour size by inducing apoptosis and reducing the number of CSCs. Thus, Mao *et al.* [47] used a short hairpin RNA (shRNA) to knock-down Notch1, which inhibited BCSCs growth and conferred sensitivity to paclitaxel. In addition, a monoclonal antibody against Notch1 developed by Qui *et al.* [48] reduced the formation of mammospheres when administered alone or in combination with docetaxel. Finally, the γ -secretase inhibitors MK-0752 (Merck) and RO4929097 (Roche) are currently in phase I/II clinical trials [49] (Table 1).

Chemotherapy has troublesome adverse effects, because the drug in the blood kills healthy as well as cancer cells [50]. One example of new technologies developed to minimize these effects is the nanoparticle drug-delivery system, which improves the effectiveness of treatment and reduces adverse effects. It achieves this by selectively targeting tumour cells, using ligands within the nanoparticle that recognize receptors in the cancer cells and allow penetration of the cells and the release of the drugs it carries. Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles are being employed to improve the properties of some widely used drugs in breast cancer, including trastuzumab, paclitaxel and doxorubicin [51]. This type of therapy has proven beneficial but still meets with resistance from CSCs. It may therefore be

of interest to explore the use of salinomycin-conjugated nanoparticles, given reports that salinomycin acts on stem cells and inhibits tumour growth in mice [52].

Table 1. Genes and pathways in BCSCs with clinical relevance

Gene/pathway	Status	Effect	Ref
CD44+/CD24-, Oct 3/4, SOX2 and β -catenin	Expression	Drug resistance	[32]
BCRP and survivin	Expression	Correlated with CSC factors and associated with CSC drug resistance	[32]
CD44+/CD24-	Expression	Radioresistance	[33]
STAT1	Expression	Induces radioresistance in BCSC	[34]
Stat3	Hyper-phosphorylation	Implicated in BCSC drug resistance. Susceptible to Simvastatin plus gamma tocotrienol	[38]
HER2	Overexpression	Associated with poor prognosis. Susceptible to trastuzumab	[40]
HER2	Low expression	Resistant to trastuzumab, enriched in BCSC. Susceptible to salinomycin	[40]
Nrp1/NFk-b	Expression	Role in mammosphere formation and CSC-mediated tumour initiation. Susceptible to tranilast	[41]
ALDH	Elevated activity	ALDH inhibition reduces resistance to treatment of BCSC	[24]
Wnt1	Implicated in breast tumorigenesis	Susceptible to cisplatin plus TRAIL	[44]
Notch1	Implicated in breast tumorigenesis	Susceptible to shRNA, monoclonal antibody against Notch1 and γ -secretase inhibitors	[47,48,49]

Zhang *et al.* [7] recently reported that a combination of octreotide (Oct)-modified paclitaxel (PTX)-loaded PEG-b-PCL polymeric micelles (Oct-M-PTX) and salinomycin (SAL)-loaded PEG-b-PCL polymeric micelles (M-SAL) showed high antitumour efficacy and eliminated BCSCs as well as breast cancer cells. They used the MCF-7 breast cancer line in their study, because it overexpresses somatostatin receptors (SSTR), finding that the nanoparticle with PTX bound to Oct entered the cell better and reduced the IC₅₀ in comparison to the nanoparticle without Oct. This is because Oct is an octapeptide analogue of endogenous somatostatin and mainly binds to SSTR. They then isolated CSCs using Hoechst and characterized them as CD44⁺/CD24⁻. They tested the effect of free SAL and M-SAL on the CSC and non-CSC populations and observed a greater effect on the CSC population. Furthermore, use of M-SAL in the population in general reduced the percentage of CSCs. Next, they studied the combined effect of Oct-PTX and M-SAL on MCF-7 cells in comparison to PTX+SAL and M-PTX+M-SAL, observing that the former combination had a greater effect, although followed by the free drugs. Finally, they studied their effect *in vivo*, demonstrating that the best effect was obtained with the combination of Oct-PTX and M-SAL.

Clinical trials

The responsibility of CSCs for treatment failures and relapses is well-documented, as is their potential usefulness as therapeutic and prognostic targets. The final aim of these investigations is to improve treatment of the disease, which requires clinical trials to test results obtained in the lab. However, the clinical trial database at Clinicaltrials.gov [53] shows that few have focused on CSCs or BCSCs. These studies can be divided between two groups with distinct objectives: trials that characterize BCSCs in tissue samples from patients in order to determine their implication in the development or risk of the disease; and trials designed to study the effectiveness of treatment to eliminate BCSCs, either using existing drugs in different combinations or drugs not previously tested in this disease (Table 2).

The aim of clinical trials designed to improve the characterization and isolation of BCSCs in patients is to improve our understanding of their implication in the disease and to establish good markers of the risk, prognosis and response to treatment. *In vitro* techniques are applied to characterize BCSCs isolated from tissue samples taken from biopsy specimens or intra-operatively, as part of the usual treatment protocol. Two trials of this type were undertaken by the National Institutes of Health Clinical Center (CC) in Maryland (NCT00340392 and NCT00083733).

The genetic and protein profiles of samples were determined in order to detect markers associated with BCSCs and metastasis for the development of more effective treatments. Ongoing trials in this line include one by the CC (NCT00923052), which will perform a genetic analysis of CSCs from solid organs and determine whether they are present in blood or bone marrow (metastasis). Samples will derive from biopsy or surgical specimens in patients aged over 16 years with hepatic, pancreatic, pancreatic ductal, colorectal, breast or gastric cancer. Blood samples drawn before and during the biopsy or surgery and at routine follow-up sessions will also be analyzed as well as bone marrow samples, when this is possible.

Another trial is being led by Dr Fadi-Mizyed in collaboration with the Rambam Health Care Campus (NCT01641003). It also aims to improve the isolation, characterization and enrichment of CSCs by utilizing insoluble fibrogen particles (IFPs) and comparing results in fresh glioma, pancreas and breast cancer samples with those obtained by standard methods. The percentage of CSCs will be determined by using CD133⁺ as marker in glioma and pancreatic cancer samples and CD44⁺/CD24^{-/low} in breast cancer samples.

A trial on prognostic markers has been initiated by the CC (NCT00923377) to describe and compare the presence of stem cells in samples from two groups of

healthy women with low and high risk of breast cancer, respectively, with the aim of establishing a relationship between these cells and the development of the disease.

Various trials are under way to study markers of the response to different treatments. One trial (NCT01424865), run by Daniel F. Hayes (University of Michigan Cancer Center), is evaluating the co-expression of ALDH1 and HER2 as a predictor of the response to adjuvant treatment with trastuzumab. It studies samples from breast cancer patients with positive nodes in stages 3 or 4A who overexpress HER2 and who had participated in the NSBAP-B-31 trial. The expression of HER2 and ALDH1 will be measured in BCSC samples and different tissues in order to determine whether stem cell properties are associated with a poor prognosis in patients undergoing adjuvant doxorubicin hydrochloride plus cyclophosphamide followed by paclitaxel (the "control arm" of B31) or the same chemotherapy with trastuzumab.

An interesting trial led by the oncologist Federico Cappuzzo (Associazione Oncologia Traslazionale), designated STELLA (NCT01483001), isolates CSCs from the lung, colon and breast and tests their response to *in vitro* anti-cancer drug treatments. They use samples from lung, colon and breast cancer patients for whom no further standard treatment is available.

Another type of clinical trial is designed to develop more effective treatments that eliminate BCSCs, at least in part. Most of these trials have studied combined therapies. The University of Maryland is running a trial (NCT01118975) to evaluate the response of advanced-stage solid tumours (including breast cancer) to treatment with lapatinib and vorinostat. Lapatinib is approved by the Food and Drug Administration (FDA) for metastatic HER2-positive breast cancer, while vorinostat is only approved for the treatment of T-cell cutaneous lymphoma. This trial followed preclinical and clinical studies that demonstrated the ability of vorinostat to kill certain tumour cells, preventing their metastasis and thereby improving the

effectiveness of lapatinib. Recent laboratory studies also showed that the combination of lapatinib and vorinostat can reduce the number of CSCs.

Another form of combined therapy is with drugs and monoclonal antibodies, and the Case Comprehensive Cancer Center is performing a trial (NCT00949247) on the use of the chemotherapeutic drugs docetaxel and carboplatin in combination with the monoclonal antibodies trastuzumab and bevacizumab in patients with stage 1, 2 or 3 breast cancer and micrometastasis in bone marrow. Besides studying the response of patients to the treatments, the expression of growth factors and chemokines will be correlated with the outcome of patients and the frequency of mammospheres with the CSC phenotype in culture.

Pre-surgical chemotherapy is important to reduce the tumour and the amount of normal tissue to be resected. A trial at Northwestern University (NCT01372579) is aimed at improving this chemotherapy, testing the administration of eribulin mesylate and carboplatin before surgery in patients with triple-negative breast cancer. Besides studying the response to treatment, stem cell markers (CD44⁺, CD24⁻, CD133, ALDH1 and NOTCH pathway) will be measured in tissues from pre-treatment biopsies and post-treatment surgical specimens. A similar trial is planned by the Institut Paoli-Calmettes (AVASTEM; NCT01190345) to evaluate the effect of pre-surgical bevacizumab in combination with conventional chemotherapy and neo-adjuvant treatment in comparison to controls treated with the chemotherapy alone. The effect will be evaluated by comparing ALDH1-positive cell counts before and after four treatment cycles.

It is important to study novel drugs that can act against CSCs. Although important work is being done in this field, the rate of progress appears very slow, with only a few clinical trials undertaken on new anti-CSC drugs. One such drug, MK-072, a gamma secretase inhibitor (GSI) that inhibits the Notch pathway, proved effective in preclinical studies against CSCs and against recurrence when administered with docetaxel. MK-072 is safe for humans when administered alone, but the safety and

effectiveness of its joint administration with docetaxel are not known. For this reason, a trial was undertaken by the University of Michigan Cancer Center (NCT00645333) to evaluate the safety of combined treatment with MK-072 and docetaxel in patients with metastatic breast cancer and its effectiveness to eliminate BCSCs. Schott *et al.*, the authors of this trial, recently reported that the treatment was effective to reduce the formation of mammospheres and CD44⁺/CD24⁻ and ALDH⁺ cell populations in serial biopsies from the patients. These results indicate that the combination of Notch inhibitors and chemotherapy may be effective in breast cancer and warrants further research [54].

Table 2. Clinical trial focused on breast cancer stem cells. * Date accessed on March 27, 2014

Identifier	Objective/s	Study type	Institution	Status (date of last update)*	Start Date
NCT00340392	To isolate CSC employing the same methods used to isolate embryonic stem cells	Observational	National Institutes of Health Clinical Center (USA)	Completed (Mar. 2011)	Apr. 2006
NCT00083733	To define the molecular profile of breast tissue from pre-and post-menopausal women and from primary and metastatic breast cancer. To identify and characterize BCSC and establish cell lines from the pleural fluid of women with breast cancer and malignant pleural effusions	Observational	National Institutes of Health Clinical Center (USA)	Completed (Mar. 2012)	May 2009
NCT00923052	To achieve a collection of cancer stem cells of solid organs (SOCs). To analyze these SOCSC at genetic level and determine whether SOCSCs are found in blood or bone marrow	Observational	National Institutes of Health Clinical Center (USA)	Recruiting (Mar. 2014)	Feb. 2009

NCT01641003	To evaluate the use of insoluble fibrinogen particles (iFP) for isolating and characterizing CSCs in comparison to standard methods and to improve their isolation and enrichment	Observational	Rambam Health Care Campus (Israel)	Not yet recruiting (Jul. 2012)	Jul. 2012
NCT00923377	To describe CSCs in women who do not suffer from breast cancer. To compare the presence of BCSCs between women with low and high risk for breast cancer and study the relationship of the number and type of CSCs with the density of the mammogram. To perform cell culture of BCSCs	Observational	National Institutes of Health Clinical Center (USA)	Completed (May 2010)	Mar. 2007
NCT01424865	To study stem cellness as marker of poor prognosis in women with early breast cancer treated in the NSABP-B-31 trial or with the same chemotherapy plus trastuzumab	Observational	University of Michigan Cancer Center (USA)	Unknown (Nov. 2011)	Nov. 2011
NCT01483001	To analyze the <i>in vitro</i> susceptibility of CSCs of different origin to several antineoplastic drugs in order to identify specific treatments for each patient	Interventional	Associazione Oncologia Traslazionale (Italy)	Unknown (Feb. 2012)	Nov. 2011
NCT01118975	To determine the safety and efficacy of combination therapy lapatinib plus vorinostat in advanced cancer and to test its efficacy in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. To find a combination that reduces the number of CSC and cancer cells in the blood stream	Interventional	University of Maryland (USA)	Recruiting (Jun. 2012)	Mar. 2010

NCT00949247	To analyze the response to treatment with docetaxel, carboplatin, trastuzumab and bevacizumab in HER2-positive patients with stage I-III breast cancer and bone marrow micrometastases. To study the correlation of growth factors and chemokines with the outcome of patients and the frequency of CSC mammospheres in culture	Interventional	Case Comprehensive Cancer Center (USA)	Completed (Abr. 2013)	Dec. 2009
NCT01372579	To determine the effect of eribulin mesylate and carboplatin before surgery in patients with triple-negative breast cancer. To measure stem cell markers (CD44 +, CD24-, CD133, ALDH1 and NOTCH route) in tissue (before and after surgery)	Interventional	Northwestern University (USA)	Active, not recruiting (May 2013)	Aug. 2011
NCT01190345	To analyze the anti-CSC effect of preoperative bevacizumab combination with conventional chemotherapy in breast cancer patients in comparison to those receiving chemotherapy alone	Interventional	Institut Paoli-Calmettes (France)	Active, not recruiting (Marc.2013)	May 2010
NCT00645333	To determine the safety and effectiveness of various doses of MK-0752 in combination with docetaxel, and analyze whether this combination is capable of killing BCSCs	Interventional	University of Michigan Cancer Center (USA)	Completed (Nov. 2012)	Mar. 2008

Conclusion

According to the CSC model, tumours are comprised of a hierarchy of cells, in which CSCs alone possess an unlimited proliferation capacity, giving rise to other tumour cells that do not have this capacity. This hypothesis is supported by an increasing number of studies that show that CSCs may be responsible for relapse, metastasis and treatment failure and that associate them with a worse prognosis. These cells have attracted considerable research interest in efforts to find novel and effective cancer treatments. However, there are many challenges to be overcome, including the identification and isolation of CSCs. Although there is a degree of consensus on the use of CD44⁺/CD24^{low/-} and ALDH⁺ as BCSC markers, some controversy persists, and there is a need to identify further markers. Despite these limitations, major advances are being made in our knowledge of these cells and in the development of specific anti-CSC therapies. We highlight that very few clinical trials have addressed the role of BCSCs in cancer and there is scant information on their results. Although these cells appear to hold great promise for the cure of cancer, it is important to emphasize that this is a recently discovered field, and considerable time and research are required before their clinical usefulness and safety can be established.

Acknowledgements

This study was supported by the University of Granada and Science and Innovation Ministry (Project GREIB_PYR_2010_11) and the Regional Government of Andalusia (Project CTS-7651 and assistance to the CTS-107 group). EC receives a FPU predoctoral fellowship (Ministry of Education, Culture and Sport), and this article is related to her PhD thesis.

Conflict of interest

All authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. La Porta CA. Thoughts about cancer stem cells in solid tumors. *World J Stem Cells* 2012;4:17-20.
2. Zinzi L, Capparelli E, Cantore M, Contino M, Leopoldo M, Colabufo NA. Small and Innovative Molecules as New Strategy to Revert MDR. *Front Oncol* 2014;4:2.
3. Choi YH, Yu AM. ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development. *Curr Pharm Des* 2014;20:793-807.
4. Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:4827-33.
5. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M *et al.* ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007;1:555–67.
6. Baccelli I, Trumpp A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol* 2012;198:281-93.
7. Zhang Y, Zhang H, Wang X, Wang J, Zhang X, Zhang Q. The eradication of breast cancer and cancer stem cells using octreotide modified paclitaxel active targeting micelles and salinomycin passive targeting micelles. *Biomaterials* 2012;33:679-91.
8. Sørliie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869–74.

9. Guler G, Balci S, Costinean S, Ussakli CH, Irkkan C, Suren D *et al.* Stem cell-related markers in primary breast cancers and associated metastatic lesions. *Mod Pathol* 2012;25:949–55.
10. Bane A, Vilorio-Petit A, Pinnaduwege D, Mulligan AM, O'Malley FP, Andrulis IL. Clinical-pathologic significance of cancer stem cell marker expression in familial breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2013;140:195-205.
11. Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Sasiadek MM. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J App Genet* 2008;49:193–9.
12. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:2144-51.
13. Takebe N, Ivy SP. Controversies in cancer stem cells: targeting embryonic signaling pathways. *Clin Cancer Res* 2010;16:3106-12.
14. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 2008;8:755-68.
15. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:265–73.
16. Pinto CA, Widodo E, Waltham M, Thompson EW. Breast cancer stem cells and epithelial mesenchymal plasticity - Implications for chemoresistance. *Cancer Lett* 2013;341:56-62.
17. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C *et al.* Let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 2007; 131:1109-23.
18. Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2008; 10:R25.
19. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3983–8.
20. Buess M, Rajski M, Vogel-Durrer BM, Herrmann R, Rochlitz C. Tumor-endothelial interaction links the CD44(+)/CD24(-) phenotype with poor prognosis in early-stage breast cancer. *Neoplasia* 2009;11:987–1002.

21. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle- Teijeiro JF *et al.* Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtypes. *J Clin Pathol* 2011;64:937–46.
22. Mylona E, Giannopoulou I, Fasomytakis E, Nomikos A, Magkou C, Bakarakos P *et al.* The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24(-/low) and CD44-/CD24 + tumor cells in invasive breast carcinomas. *Hum Pathol* 2008;39:1096– 1102.
23. Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain- Qimron N, Yao J *et al.* Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* 2007;11:259–73.
24. Croker AK, Allan AL. Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44+ human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2012;133:75–87.
25. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D *et al.* Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005;65:5506–11.
26. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ *et al.* *In vitro* propagation and transcriptional profiling of human mammary. *Genes Dev* 2003;17:1253-70.
27. Velasco-Velázquez MA, Homsí N, De La Fuente M, Pestell RG. Breast cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:573-7.
28. Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee JS *et al.* Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res* 2009;69:4116-24.
29. Guiu S, Michiels S, André F, Cortes J, Denkert C, Di Leo A *et al.* Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann Oncol* 2012;23:2997-3006.
30. de Beça FF, Caetano P, Gerhard R, Alvarenga CA, Gomes M, Paredes J *et al.* Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types. *J Clin Pathol* 2013 Mar;66:187-91.

31. Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A *et al.* Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:13820–925.
32. Lü X, Deng Q, Li H, Suo Z. Altered characteristics of cancer stem/initiating cells in a breast cancer cell line treated with persistent 5-FU chemotherapy. *Exp Ther Med* 2011;2:821-6.
33. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24 (-/low)/ CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1777–85.
34. Zhan JF, Chen LH, Yuan YW, Xie GZ, Sun AM, Liu Y *et al.* STAT1 promotes radioresistance of CD44(+)/CD24(-/low) cells in breast cancer. *Exp Biol Med* 2011;236:418-22.
35. Tsai SY, Hsieh TC, Ardelt B, Darzynkiewicz Z, Wu JM. Combined effects of onconase and IFN-beta on proliferation, macromolecular syntheses and expression of STAT-1 in JCA-1 cancer cells. *Int J Oncol* 2002;20:891–6.
36. Khodarev NN, Beckett M, Labay E, Darga T, Roizman B, Weichselbaum RR. STAT1 is overexpressed in tumors selected for radioresistance and confers protection from radiation in transduced sensitive cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:1714-9.
37. Su F, Ren F, Rong Y, Wang Y, Geng Y, Wang Y *et al.* Protein tyrosine phosphatase Meg2 dephosphorylates signal transducer and activator of transcription 3 and suppresses tumor growth in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2012;14:R38.
38. Gopalan A, Yu W, Sanders BG, Kline K. Eliminating drug resistant breast cancer stem-like cells with combination of simvastatin and gamma-tocotrienol. *Cancer Lett* 2013;328:285-96.
39. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF *et al.* Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:672–9.
40. Oak PS, Kopp F, Thakur C, Ellwart JW, Rapp UR, Ullrich A *et al.* Combinatorial treatment of mammospheres with trastuzumab and salinomycin efficiently

- targets HER2-positive cancer cells and cancer stem cells. *Int J Cancer* 2012;131:2808-19.
41. Glinka Y, Mohammed N, Subramaniam V, Jothy S, Prud'homme GJ. Neuropilin-1 is expressed by breast cancer stem-like cells and is linked to NF- κ B activation and tumor sphere formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;425:775-80.
 42. Rogosnitzky M., Danks R., Kardash E. Therapeutic potential of tranilast, an anti-allergy drug, in proliferative disorders. *Anticancer Res* 2012;32: 2471– 8.
 43. Prud'homme GJ, Glinka Y, Toulina A, Ace O, Subramaniam V, Jothy S. Breast cancer stem-like cells are inhibited by a non-toxic aryl hydrocarbon receptor agonist. *PLoS One* 2010;5:e13831
 44. Yin S, Xu L, Bandyopadhyay S, Sethi S, Reddy KB. Cisplatin and TRAIL enhance breast cancer stem cell death. *International Journal of Oncology* 2011;39: 891-8.
 45. Chen JK, Taipale J, Cooper, MK, Beachy PA. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes Dev* 2002;16: 2743-8.
 46. Scales SJ, de Sauvage, FJ. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2008;30:303-12.
 47. Mao J, Song B, Shi Y, Wang B, Fan S, Yu X *et al.* ShRNA targeting Notch1 sensitizes breast cancer stem cell to paclitaxel. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45:1064-73.
 48. Qiu M, Peng Q, Jiang I, Carroll C, Han G, Rymer I *et al.* Specific inhibition of Notch1 signaling enhances the antitumor efficacy of chemotherapy in triple negative breast cancer through reduction of cancer stem cells. *Cancer Lett* 2013;328:261-70.
 49. Al-Husaini H, Subramanyam D, Reedijk MJ, Sridhar SS. Notch signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2010;10:9– 15.
 50. Friedland D, Gorman G, Treat J. Hypersensitivity reactions from taxol and etoposide. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:2036.

51. Aydın RS. Herceptin-decorated salinomycin-loaded nanoparticles for breast tumor targeting. *J Biomed Mater Res A* 2013;101:1405-15.
52. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA *et al.* Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 2009;138:645–59.
53. Clinicaltrials database [Clinicaltrials.gov] accessed March 2013.
54. Schott AF, Landis MD, Dontu G, Griffith KA, Layman RM, Krop I *et al.* Preclinical and Clinical Studies of Gamma Secretase Inhibitors with Docetaxel on Human Breast Tumors. *Clin Cancer Res* 2013;19:1512-24.

DISCUSIÓN

El cáncer es la principal causa de enfermedad y la segunda causa de muerte por enfermedad en el mundo tras las enfermedades cardiovasculares, con 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes en 2012 según estimaciones de la OMS. Estas cifras se espera que aumenten en los próximos años, con unas estimaciones para el año 2030 de 22,2 millones de nuevos casos y 13,2 millones de muertes por año. A nivel mundial los cánceres más diagnosticados, y que a su vez presentan altas tasas de mortalidad, son los cánceres de pulmón, colon y mama. Dentro de ellos, el cáncer de pulmón es el más común entre los hombres, y el cáncer de mama entre las mujeres (Bray y cols., 2012; Ferlay y cols., 2013; Linjawi y cols., 2013).

La incidencia de los distintos tipos de cáncer, así como las muertes relacionadas con ellos, varían en función de la región geográfica, siendo los cánceres de mama, pulmón, colon y próstata los más comunes en los países desarrollados, mientras que en los países menos desarrollados lo son los cánceres de estómago, hígado, cavidad oral y cuello uterino. Sin embargo, estos patrones están cambiando, pareciéndose cada vez más los de los países menos desarrollados a los de los más desarrollados, debido, principalmente, al envejecimiento de la población y a la adaptación de estilos de vida similares (Are y cols., 2013).

La mayoría de tratamientos actuales contra el cáncer actúan de manera citotóxica, pero suelen presentar poca selectividad, no distinguiendo entre células sanas y malignas. Esto conlleva la aparición de toxicidad sistémica y de efectos secundarios no deseados por el daño causado a las células normales cuando los pacientes se exponen a las altas dosis necesarias para eliminar el tumor. Además, muchos pacientes no responden bien al tratamiento y sufren recaídas con metástasis, debido en parte a la actividad limitada de estos tratamientos y a la resistencia que se puede generar tras varios ciclos de tratamiento (Akhtar y cols., 2014b; Lü y cols., 2011; Marin y cols., 2014). Por ello, es necesaria la búsqueda de tratamientos más eficaces y selectivos que produzcan menos toxicidad y no generen resistencia (Carrasco y cols., 2014a; Sheri y Johnston, 2013). En este

sentido hemos enfocado nuestro trabajo, en la búsqueda de nuevas moléculas susceptibles de ser útiles para el tratamiento del cáncer. Concretamente hemos evaluado el potencial terapéutico antitumoral de una nueva familia de merosesquiterpenos sintéticos derivados del ácido trans-comúnico, muy abundante en *Cupressus sempervirens*.

En primer lugar analizamos la actividad citotóxica *in vitro* de esta nueva familia de compuestos en líneas tumorales humanas establecidas de mama (MCF-7), pulmón (A-549) y colon (T-84), ya que como mencionamos anteriormente son los tumores que presentan mayor incidencia y mortalidad. En general, observamos que todos los compuestos analizados presentaban actividad citotóxica, destacando entre ellos el compuesto 13, y que hemos denominado merosexst.

Un importante aspecto a tener en cuenta sobre los compuestos es la lipofilia, ya que es una propiedad que puede influir en la facilidad con la que atraviesen las membranas biológicas, y por tanto en su biodisponibilidad. De hecho, la lipofilia influye en el efecto biológico de muchos compuestos (Yousefi y cols., 2012). Debido a esto, hemos analizado los valores de lipofilia ($\log P$) y su correlación con la IC_{50} . Observamos una relación inversamente proporcional entre la IC_{50} en las tres líneas tratadas con merosexst y los compuestos 14 y 15, respecto a los valores de $\log P$, cosa que no se observó con el resto de compuestos. Esto implicaría que dichos compuestos presentan actividades que al menos en parte podrían justificarse en base a su carácter lipofílico.

Basándonos en estos resultados iniciales nos centramos en el estudio de merosexst. Analizamos su efecto frente a un número más amplio de líneas celulares tumorales de mama y de colon. Además, decidimos comparar sus efectos con los del 5-fluorouracilo (5-Fu), un fármaco comercial ampliamente utilizado actualmente para el tratamiento de diferentes tumores sólidos, entre los que se encuentran el cáncer de mama y el de colon (Saleh y cols., 2013; Uluer y cols., 2012).

En general, meroxest presentó alta citotoxicidad frente a todas las líneas tumorales, y su efecto antiproliferativo fue superior al del 5-Fu en todas las líneas tumorales analizadas, a excepción de la línea murina de cáncer de mama E0771. Esta línea celular presenta una elevada tasa proliferativa, y para mantenerla, creemos que debe presentar altas tasas de síntesis de nucleósidos y nucleótidos. El 5-Fu es un compuesto orgánico análogo del uracilo, con una estructura similar a las moléculas pirimidínicas del ADN y ARN, y por ello es capaz de introducir errores durante la síntesis de ADN y ARN a través de su inclusión en la cadena en lugar de timidina o uracilo. Además, una de las principales acciones del 5-Fu es inhibir a la enzima timidilato sintasa, que es la responsable de la síntesis *de novo* de timidilato, un nucleótido necesario para la síntesis y reparación del ADN (Álvarez y cols., 2012; Saleh y cols., 2013). Estos efectos del 5-Fu sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos podrían explicar, al menos en parte, por qué el efecto del 5-Fu es mayor que el de meroxest en una línea celular altamente proliferativa como es la línea E0771.

Entre todas las líneas celulares analizadas destacó la gran actividad (IC_{50} : $0,35 \pm 0,10 \mu M$) y especificidad (TI: 9) que presentó meroxest frente a la línea de cáncer de mama humano MCF-7, que se corresponde con el subtipo luminal A, el más prevalente (Beaver y cols., 2013). Esta línea celular, es además una de las más utilizadas en el estudio *in vitro* e *in vivo* de la biología y del tratamiento experimental del cáncer de mama. Por todo ello, creemos conveniente el uso de esta línea celular para el estudio del mecanismo de acción de meroxest.

Las células tumorales presentan altos niveles de ROS en comparación con sus homólogas normales, por lo que el desarrollo de compuestos que aprovechen esta característica se presenta innovador en el descubrimiento de nuevos fármacos, y de hecho cada vez son más los fármacos que parecen actuar a este nivel. Estos fármacos promoverían la producción de ROS, elevando sus niveles por encima de un umbral que provoque un desequilibrio del balance oxidativo, y en última instancia la muerte de las células tumorales. En contraste, las células normales, al

presentar menores niveles basales de ROS y una alta capacidad antioxidante en comparación con las células tumorales, serían menos sensibles al daño causado por estos fármacos (Pathania y cols., 2014; Saeidnia y Abdollahi, 2013).

Entre los fármacos que actúan por inducción de ROS encontramos el paclitaxel, que interrumpe la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, produciendo un aumento de la producción del anión superóxido. Otros agentes quimioterapéuticos como cisplatino, carboxiplatino, doxorubicina, procarbazona o anticuerpos como rituximab también ejercen su efecto antitumoral mediante la producción de ROS. El elesclomol es otro fármaco antitumoral que basa su acción en un aumento de la producción de ROS, y aunque no se conoce exactamente su mecanismo, se ha visto que en presencia de antioxidantes pierde su efectividad (Glasauer y Chandel, 2014; Hadzic y cols., 2010; Kirshner y cols., 2008).

En nuestro caso, el efecto de meroxest, un compuesto altamente activo con un valor de TI muy elevado, se anuló completamente en presencia del antioxidante NAC, lo que parece indicar que el mecanismo de acción de meroxest estaría mediado por la inducción de estrés oxidativo. Este hecho nos permitiría predecir un mayor efecto del compuesto sobre células tumorales que sobre células normales, porque, como hemos comentado, estas últimas presenta niveles de antioxidantes suficientes para contrarrestar el daño oxidativo, mientras que las células tumorales los agotan debido a su elevado metabolismo, por lo que no serían capaces de contrarrestar el daño (Gupte y Mumper, 2009).

Son bien conocidos los numerosos estudios que desde los años 90 demuestran el efecto antitumoral de los antioxidantes consumidos en la dieta o como suplementos alimenticios. Además, diferentes estudios epidemiológicos relacionan resveratrol, ácido fólico, vitaminas A y E, y un largo etc. con una baja incidencia de algunos tipos de cáncer. Sin embargo, en los últimos años están aumentando los estudios que señalan un efecto negativo de estos antioxidantes en la terapia del cáncer, sobre todo en estadios iniciales (Chandel y Tuveson, 2014; Sainz y cols.,

2012; Watson, 2013). Estudios recientes sobre la relación entre antioxidantes e incidencia de cáncer reportan resultados contradictorios, y que parecen depender del tipo de antioxidante considerado. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo en Finlandia con hombres fumadores de entre 50 y 69 años, se determinó que la ingesta de 50 mg de vitamina E diarios durante 6 años reducía el riesgo de cáncer de próstata, mientras que 20 mg de β caroteno al día aumentó el riesgo de cáncer de pulmón (Virtamo y cols., 2014). En un estudio reciente llevado a cabo por Sayin y colaboradores (Sayin y cols., 2014), para el que utilizaron un modelo murino de cáncer de pulmón inducido, se demostró que la ingesta de suplementos antioxidantes como NAC o vitamina E en la dieta aumentaba la progresión tumoral y reducía la supervivencia de los animales.

En la actualidad hay oncólogos que recomiendan no tomar alimentos con capacidad antioxidante durante el tratamiento con ciertos fármacos, aunque no hay evidencias clínicas que demuestren que los antioxidantes disminuyan el efecto de la quimioterapia, y los ensayos clínicos que se realizan sólo aumentan la confusión al respecto (Saeidnia y Abdollahi, 2013). Existen ensayos clínicos que relacionan la ingesta de antioxidantes durante el tratamiento con quimio y radioterapia con una mejora de los efectos secundarios y con una protección del daño oxidativo causado por estos agentes en las células sanas. Sin embargo, otros ensayos lo relacionan con una protección de las células tumorales, lo que disminuye la eficacia del tratamiento (Lawenda y cols., 2008).

A pesar de las controversias, está claro que el estrés oxidativo y los niveles de ROS influyen en el desarrollo y tratamiento del cáncer, por lo que es necesario seguir avanzando en su investigación con el fin de alcanzar un consenso que nos permita dar a los pacientes unas recomendaciones óptimas acerca del uso de antioxidantes en su dieta. Además, debido a las diferencias entre las células tumorales y las células normales en cuanto a la presencia de ROS y antioxidantes, conocer el estado oxidativo de los tejidos de un paciente podría ser utilizado como marcador de diagnóstico y/o de pronóstico e incluso podría ayudar en la elección

del tratamiento más adecuado (Ivanova y cols., 2013). Se ha demostrado que la resistencia a algunos fármacos que actúan por inducción de ROS está relacionada con la capacidad antioxidante que presentan las células (Filippova y cols., 2014). Por ejemplo, Ramanathan y colaboradores (Ramanathan y cols., 2005) encontraron que la sensibilidad al paclitaxel se veía influida por el estado oxidativo que presentaban los diferentes cultivos celulares, siendo la IC_{50} del paclitaxel mayor en aquellas líneas celulares que presentaban mayor capacidad antioxidante. Por lo tanto, sería interesante estudiar el estado oxidativo en muestras de pacientes con el fin de predecir el efecto del tratamiento así como de buscar las estrategias más adecuadas.

La división y muerte celular son dos de los principales procesos que regulan la homeostasis de los tejidos normales. La alteración de estos procesos, es decir, la entrada o progresión aberrante en el ciclo celular o una proliferación celular no controlada, tienen un papel fundamental en el desarrollo del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011; Sheppard y McArthur, 2013). Debido a ello se dedican grandes esfuerzos en conocer la regulación y componentes del ciclo celular con el fin de encontrar nuevos tratamientos eficaces contra el cáncer. En las últimas décadas se han logrado grandes avances en el tratamiento del cáncer, gracias en parte, a la mejor comprensión de los mecanismos básicos que regulan el ciclo celular. De hecho, el uso de fármacos reguladores del ciclo celular es uno de los principales mecanismos utilizados contra el cáncer (Nwabo Kamdje y cols., 2014; Wesierska-Gadek y cols., 2004).

Por ello analizamos el efecto de merxest en la distribución del ciclo celular, y comprobamos como, a las 24 horas de tratamiento, produce un bloqueo del ciclo celular dosis-dependiente en G_0 - G_1 , que va asociado a la consiguiente reducción de células en las fases S y G_2 -M.

Merxest produce un bloqueo del ciclo celular en fase G_0 - G_1 , lo que va a prevenir que se replique el ADN que ha sido dañado. Este bloqueo puede deberse a varios

factores, como por ejemplo la inactivación o descenso de la ciclina D1 o a la inducción de proteínas inhibidoras de CDKs, como p27 (Chen y cols., 2012; Yoon y cols., 2012). Para conocer qué factores son los implicados en este bloqueo del ciclo celular analizamos mediante western blot la expresión de proteínas relacionadas con el control de este proceso.

Analizamos la expresión de dos ciclinas muy importantes, como son la ciclina B1 y la ciclina D1. La primera, esencial para el paso de la fase G₂ a la fase M (Pfaff y King, 2013), vio muy disminuida su expresión después del tratamiento con merxest. Éste produce una parada del ciclo en fase G₀-G₁, lo que provocaría que las proteínas implicadas en fases posteriores ya no se expresen. Del mismo modo, encontramos una disminución muy importante de la expresión de ciclina D1 en comparación con los niveles basales, y tras 4 horas de tratamiento. Esta ciclina está implicada en la transición de la fase G₁ a la S, y se ha demostrado que su degradación es suficiente para la detención del ciclo celular en fase G₁ temprana (Masamha y Benbrook, 2009); por lo tanto, una disminución de su expresión es una evidencia de la detención del ciclo en G₀-G₁.

Ciclina D1 forma un complejo con CDK4, y una de sus funciones es fosforilar a pRb, por lo que se libera el factor de transcripción E2F, que actuará permitiendo la progresión del ciclo celular desde la fase G₁ a la fase S (Munro y cols., 2012). Uno de los genes diana de E2F es el proto-oncogen c-Myc, un factor de transcripción que participa en numerosos procesos celulares, incluyendo la transición desde la fase G₁ a la fase S. Su sobreexpresión y amplificación es frecuente en muchos tipos de tumores, incluido el de mama (Song y cols., 2013). En nuestro caso, observamos que merxest produce una reducción de la expresión de pRb tanto de la proteína normal como fosforilada, así como de c-Myc, lo que apoyaría el bloqueo del ciclo en fase G₀-G₁. Estos resultados señalan que el bloqueo del ciclo en fase G₀-G₁ es debido, al menos en parte, a una disminución de los niveles de ciclina D1, lo que conlleva a que el factor de transcripción E2F no se libere de pRb y no

actúe, inhibiéndose de esta manera la transcripción de genes implicados en la progresión del ciclo celular, como c-Myc.

Como hemos comentado anteriormente, el bloqueo del ciclo celular en fase G_0 - G_1 , puede ser debido, no sólo al descenso de ciclina D1, sino también a la acción de inhibidores de CDK, como p27. Éste es un miembro de la familia de proteínas Cip/Kip que desempeña un papel crucial en la regulación del ciclo celular, bloqueando el paso de la fase G_1 a la S mediante la inhibición de los complejos CDK/ciclina. Cuando aparecen señales mitogénicas, los niveles de p27 disminuyen rápidamente, lo que permite la activación de los complejos CDK/ciclina y por tanto la proliferación celular. Dada su importancia funcional, el estado de p27 constituye un valor pronóstico en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama, relacionándose un descenso de su expresión con el desarrollo y la progresión tumoral (Tang y cols., 2013; Wang y cols., 2013). En nuestro caso, meroxest produjo un incremento significativo de su expresión, lo que indicaría que p27 también estaría implicado en el bloqueo del ciclo celular causado por nuestro compuesto, y lo que se asociaría además con un estado celular de mejor pronóstico.

Todo esto nos indica que la parada del ciclo celular en fase G_0 - G_1 producida por meroxest es debida a una disminución de ciclina D1, que provoca una hipofosforilación de pRb, y a un aumento del inhibidor de CDKs, p27. Estudios previos han demostrado que son muchos los fármacos que actúan de esta manera, entre ellos encontramos el lapatinib, cuyo efecto antitumoral se correlaciona con la inducción de apoptosis y el bloqueo del ciclo celular. Recientemente se ha demostrado que para que este bloqueo sea efectivo es necesaria la inducción de p27 (Tang y cols., 2013). Otro caso es el de *Euphorbia tirucalli*, una planta utilizada en el tratamiento de una amplia variedad de tumores de la que no se conocía el mecanismo de acción. Recientemente se ha demostrado que el euphol, un alcohol aislado de su savia, produce una disminución de la viabilidad celular en cultivos de la línea celular de cáncer de

mama T47D, acompañada de una parada del ciclo celular en fase G₁. Esta parada del ciclo se asocia a una reducción de la expresión de ciclina D1 e hipofosforilación de pRb, así como a un aumento de p27 (Feng, 2013). Otro compuesto natural, el deguelin, produce un bloqueo del ciclo celular en la fase G₁ en células de cáncer de colon por un aumento en la expresión de p27, mientras que en células de cáncer de mama este bloqueo está asociado a una disminución de ciclina D1 y pRb (Murillo y cols., 2002, 2009).

Cabe destacar que tras 48 horas de tratamiento encontramos un aumento dosis-dependiente de la población de células en la fracción sub-G₁ con respecto al control, lo que sugiere que el efecto de meroxest podría estar mediado por la inducción de apoptosis.

Un bloqueo en las rutas que conducen hacia la apoptosis puede promover la tumorigénesis e incluso hacer a las células tumorales resistentes al tratamiento (Hassan y cols., 2014). Debido a ello, la apoptosis es una diana muy importante en el tratamiento del cáncer, ya que su reinstauración o promoción permite eliminar células transformadas y malignas (Wang y cols., 2013).

Los avances en el conocimiento de la apoptosis y su implicación en el desarrollo del cáncer han permitido desarrollar terapias capaces de restaurar las rutas apoptóticas normales, activándose de manera selectiva la muerte de las células tumorales (Akhtar y cols, 2014a; Bai y Wang, 2014). El estudio de las rutas de inducción y regulación de la apoptosis en células de cáncer de mama ha sido de gran interés para el descubrimiento de fármacos contra el cáncer, y en la actualidad, muchas de las estrategias terapéuticas van dirigidas a moléculas clave en la regulación de la apoptosis. Por ejemplo, para el tratamiento del cáncer de mama se han desarrollado nuevos fármacos antiapoptóticos que actúan por inhibición de la vía extrínseca a través de Fas o TNF, entre otros, de la vía intrínseca por medio de Bcl-2 o por su acción sobre enzimas como PARP (Basu y cols., 2012; Grimm y cols., 2011).

Aunque el ciclo celular y la apoptosis parecen ser procesos antagónicos, existe una gran relación entre ellos. Como hemos mencionado anteriormente, el equilibrio entre división y muerte celular es responsable de la homeostasis de los tejidos normales. La detención del ciclo celular y la inducción de apoptosis, pueden ser un buen indicador de acción terapéutica antitumoral, según el fármaco considerado. De hecho, hay muchos ensayos que demuestran que el mecanismo de acción de muchos agentes antitumorales afecta al ciclo celular, lo que a su vez puede provocar parada del crecimiento, diferenciación o apoptosis (Hafidh y cols., 2012; Swanton, 2004).

En nuestro trabajo comprobamos cómo el efecto antiproliferativo de meroxest está mediado por la inducción de apoptosis, produciéndose una gran reducción de la viabilidad de manera dosis-dependiente. Dicha reducción se correlaciona con un aumento en la fracción de células apoptóticas. La inducción de altos porcentajes de apoptosis por meroxest es consistente con la detención del ciclo celular en fase G_0 - G_1 , ya que se ha visto que las células expuestas a determinados agentes suelen entrar en apoptosis desde una fase concreta del ciclo celular (Caba y cols., 2011).

La respuesta al estrés celular, en muchos casos, está mediada por la parada del ciclo celular, la reparación del ADN, y si el daño no se puede reparar, por la entrada en apoptosis. El gen supresor de tumores p53 es uno de los principales genes implicados en la regulación de esta respuesta (Carvajal y Manfredi, 2013). Se sabe que p53 es esencial en la respuesta al daño producido por agentes citotóxicos tales como 5-Fu, cisplatino o paclitaxel, entre otros. Por ello, su uso como diana terapéutica es una de las estrategias prometedoras en el tratamiento del cáncer, y son varios los compuestos que se están probando ya en ensayos clínicos dirigidos específicamente frente a él. Además, al encontrarse mutado en más de un 50% de todos los tumores humanos, se están realizando numerosos

estudios para restaurar su actividad natural antitumoral (Huang y cols., 2014; Martínez-Rivera y Siddik, 2012).

En nuestro estudio, hemos utilizado la línea MCF-7, que es salvaje para p53, por lo que estudiamos si meroxest es capaz de modificar su expresión. El tratamiento con meroxest produce un aumento en la expresión de p53, tanto de la proteína total como de su forma fosforilada activa. Esto podría indicar que la apoptosis inducida por meroxest es dependiente de p53. Los valores que hemos encontrado de la proteína también justifican el efecto de meroxest sobre el ciclo celular, ya que p53 regula la expresión de genes implicados en este proceso. De hecho, se ha asociado un aumento de su expresión con la detención del crecimiento celular, y con una disminución en los niveles de ciclina D1 (Wong y cols., 2013).

Además de p53, analizamos la expresión de otras proteínas implicadas en apoptosis, como es el caso de la polimerasa PARP, responsable de la síntesis de poli (ADP-ribosa), esencial para la reparación del ADN. PARP está implicada en la respuesta celular al daño genotóxico a varios niveles, siendo esencial en el mantenimiento de la integridad genómica. Además, es uno de los principales sustratos de las caspasas. La ruptura de PARP por las caspasas promueve la apoptosis debido a que previene la reparación del ADN, impidiendo a la célula sobrevivir (Singh y cols., 2013). En nuestro estudio comprobamos que meroxest aumenta la expresión de la fracción escindida de PARP, lo que confirmaría la inducción de apoptosis.

Por último, dentro del análisis de las modificaciones de expresión inducidas por meroxest, analizamos los niveles de las formas fosforiladas de las proteínas quinasas activadas por mitógenos p44 y p42 (p44/p42 MAPK). Ello es debido a que son proteínas implicadas en proliferación, supervivencia y diferenciación celular, cuya regulación aberrante puede contribuir al desarrollo de enfermedades en humanos, incluido el cáncer (Roberts y Der, 2007). La ruta de señalización de p44/p42 MAPK en células tumorales de mama en humanos se activa en respuesta

a hormonas esteroideas sexuales y factores de crecimiento, incluyendo estrógenos, progesterona y el factor de crecimiento epidérmico (Zhou y cols., 2013). También se ha comprobado que una reducción de los niveles de fosfo-p44/42 MAPK en pacientes con cáncer de mama se asocia con buena respuesta clínica y una mayor supervivencia global después del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante (Huang y cols., 2013).

En nuestro estudio, observamos un aumento de su expresión a las 4 horas de tratamiento, tras lo cual comenzó a disminuir, llegando a las 24 horas a unos niveles inferiores que los del grupo control. A su vez, hemos comprobado cómo otras proteínas que actúan tras ellas en vías de señalización mitogénica disminuyen también de forma progresiva, entre ellas destaca pRb, responsable de la expresión de hormonas esteroideas, y especialmente de los receptores de estrógenos (Caligiuri y cols., 2013). De manera que esta reducción de pRb puede dar lugar a una reducción de la regulación de los receptores de estrógenos, lo que disminuiría la emisión de señales mitogénicas hacia p44/p42 MAPK, produciendo una disminución de sus formas activas fosforiladas.

En conjunto, los resultados anteriores indican que la acción de meroxest en las células MCF-7 está mediada por la inducción de estrés oxidativo, la detención del ciclo celular en fase G₀-G₁, y la inducción de apoptosis. La manera en que meroxest ejerce su acción es similar a la publicada recientemente para diversos compuestos naturales, incluyendo: extractos naturales de *Garcinia epunctata* frente leucemia promielocítica (Pieme y cols., 2013), derivados de pirazolonas frente células tumorales de próstata hormosensibles (Morales y cols., 2013), ácido acetilsalicílico frente células de carcinoma hepatocelular (Raza y cols., 2011), o la acción sinérgica de quercetina y 2-metoxiestradiol frente a líneas de carcinoma hepatocelular humano (Chang y cols., 2009).

Por otro lado, también analizamos el efecto de meroxest sobre la transición epitelio-mesenquimal, ya que ésta tiene un papel muy importante en la adquisición

de capacidad metastásica por parte de las células tumorales. Molecularmente se caracteriza por una disminución de marcadores de adhesión celular como E-cadherina, y su proteína de unión intracelular, β -catenina (Choi y cols., 2013). E-cadherina juega un papel muy importante en la adhesión celular y en el mantenimiento de la integridad estructural de las células, y su represión se asocia con una pérdida de las uniones adherentes, lo que provoca un reordenamiento del citoesqueleto aumentando la motilidad celular, la cual es clave para la invasividad y la metástasis (Li y cols., 2014). Son muchos los estudios que demuestran que la pérdida de expresión de las proteínas E-cadherina y β -catenina está relacionada con un aumento de la capacidad migratoria, y por tanto con un mal pronóstico en muchos tipos de cáncer, incluido el de mama (Bruun y cols., 2014; Horne y cols., 2014; Xu y cols., 2014). Además, EMT también se ha relacionado en algunos casos con el desarrollo de resistencia a fármacos (Miow y cols., 2014).

Al analizar estos marcadores observamos que meroxest es capaz de promover su expresión. Esto nos indica que el compuesto podría actuar inhibiendo el desarrollo de EMT, lo que implicaría una disminución de la capacidad metastásica de las células tumorales y una mejora del pronóstico de la enfermedad. Esto son sólo datos preliminares, pero que nos animan a seguir investigando el efecto de meroxest sobre este proceso.

Los buenos resultados obtenidos *in vitro* nos motivaron a evaluar el efecto de meroxest sobre el desarrollo de tumores *in vivo*. Para ello escogimos el modelo de ratón C57BL/6, al que se le realizó un isoinjerto de células procedentes de la línea tumoral murina de cáncer de mama E0771. La elección de este modelo se basa en las características que presenta: es un modelo inmunocompetente, con gran capacidad invasiva y con altas tasas de desarrollo. Además permite el desarrollo de los ensayos de manera más sencilla y presenta un costo menor que los modelos inmunodeprimidos (Ewens y cols., 2005; de Jong y Maina, 2010). Por último, señalar que la línea celular utilizada presenta un fenotipo ER⁺ (Gu y cols., 2011b), al igual que la línea MCF-7 que hemos utilizado en todos los ensayos, lo

que nos permite estudiar los efectos *in vivo* de meroxest en un modelo similar al utilizado *in vitro*.

Una vez que los tumores inducidos alcanzaron los 75 mm³, se inició el tratamiento oral de los animales con meroxest a las dosis de 5, 10 o 15 mg/kg, según el caso, disueltos en una solución de metilcelulosa al 1%, o bien sólo con el vehículo en el caso de los controles. Tras 3 semanas de tratamiento con un total de 6 dosis de compuesto, se mantuvieron los animales durante 18 días más. Tras dicho tiempo pudimos observar que los tumores control presentaron en promedio entre 2,4 y 3,3 veces el tamaño de los tratados. Esto nos indica que meroxest presenta una importante actividad antitumoral *in vivo*. Sin embargo, entre las tres dosis de compuesto no se encontraron diferencias significativas, y tampoco hubo diferencias en la supervivencia de los animales entre los cuatro grupos.

Meroxest, además de presentar efecto antitumoral no mostró signos de toxicidad, tales como diarrea, caída de pelo o pérdida de peso, lo que a nuestro juicio refleja una buena tolerancia al compuesto. Este hecho, unido a la igualdad de resultados obtenidos con los tres grupos de tratamiento, nos sugiere que podríamos aumentar las dosis con el fin de optimizar el tratamiento y mejorar la supervivencia de los animales.

Además de inhibir el crecimiento tumoral, meroxest también produjo modificaciones en su estructura, pasando los tumores tratados a presentar una consistencia más compacta y robusta. A nivel histológico, los tumores se caracterizaron por presentar una cápsula de tejido normal, que encierra una masa de células tumorales en cuyo interior aparecen focos necróticos rodeados de abundante infiltración leucocitaria. Esta descripción coincide con la única referencia que hemos encontrado en la literatura respecto a este modelo experimental (Ewens y cols., 2005). Nos llama la atención los pocos estudios que emplean este modelo debido a que creemos que es muy interesante para el estudio de tratamientos experimentales contra el cáncer, y de gran valor traslacional. Al ser un

modelo inmunocompetente reproduce mejor el microambiente tumoral, y la situación inmunológica que suelen presentar la mayoría de pacientes. Además, es un modelo subcutáneo con gran capacidad invasiva, comportamiento típico del cáncer de mama en humanos (Ewens y cols., 2005; de Jong y Maina, 2010; Lunardi y cols., 2014). Estas características lo hacen más similar a la enfermedad humana que otros modelos, ofreciendo un escenario más cercano a la clínica. Por ello creemos que el uso de este modelo debería de estar más extendido.

Los tumores procedentes de animales tratados con meroxest presentaron una importante reducción de infiltración leucocitaria. La infiltración leucocitaria es un aspecto importante en la biología tumoral. De hecho, un aumento de las condiciones inflamatorias en ciertos órganos parece aumentar el riesgo de cáncer, y en los tumores parece contribuir al desarrollo de procesos desfavorables como proliferación, supervivencia, angiogénesis o metástasis (Colotta y cols., 2009). Paradójicamente, su asociación con el resultado clínico no es tan clara sino que depende del tipo de tumor, asociándose con buen pronóstico en unos casos y con malo en otros (Fridman y cols., 2012). En el cáncer de mama, al ser una enfermedad heterogénea, parece que su significado clínico depende del subtipo tumoral. En el caso de tumores ER⁺, como es nuestro caso, una alta infiltración leucocitaria se asocia con alto grado tumoral y alta expresión de Ki67, ambos marcadores de mal pronóstico, y con una disminución de la supervivencia (Mohammed y cols., 2012; Tsang y cols., 2013, 2014). Hemos observado que meroxest produce una reducción de la infiltración leucocitaria, lo que implicaría que nuestro compuesto estaría mejorando el pronóstico de la enfermedad en este modelo.

Para confirmarlo analizamos la expresión de dos marcadores pronóstico: Ki67 y VEGF. El primero es un marcador de proliferación clásico muy utilizado en clínica. Por el contrario, el segundo es un marcador cuya importancia ha sido puesta de manifiesto más recientemente, debido a su implicación en un proceso tan importante en el desarrollo tumoral como es la angiogénesis (Carrasco y cols.,

2014c). En ambos casos, vemos que el tratamiento con meroxest reduce de forma significativa la expresión de estos marcadores en los animales tratados, en comparación con los no tratados.

Ki67 es un marcador de proliferación muy utilizado y su expresión se relaciona con mal pronóstico (Kim y cols., 2014). En nuestro caso, la reducción de la expresión de Ki67 indicaría que meroxest disminuye la proliferación celular, mejorando así el pronóstico de la enfermedad. Además, esta reducción del potencial proliferativo concuerda con el hecho de que los tumores tratados presenten un volumen mucho menor que los no tratados.

VEGF es un marcador de angiogénesis y su sobreexpresión también se relaciona con progresión de la enfermedad y mal pronóstico en muchos tipos de cáncer, incluido el de mama (Fakhrejahani y Toi, 2014). De manera que la reducción de su expresión nos indica que el tratamiento con meroxest mejoraría el pronóstico de la enfermedad. Pero además, estaría relacionado con la reducción del volumen tumoral ya que para el crecimiento tumoral es necesario el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, proceso en el que VEGF juega un papel muy importante (Gu y cols., 2013). Al reducirse la presencia de VEGF, el desarrollo de la vasculatura tumoral podría verse dañado, lo que afectaría también al crecimiento del tumor.

Por tanto, podemos decir que meroxest reduce el volumen tumoral, al menos en parte, por su acción sobre la proliferación y la angiogénesis, lo que se ve reflejado en la reducción de la expresión de Ki67 y VEGF, y que, gracias a ello y a la reducción de la infiltración leucocitaria, parece mejorar el pronóstico de la enfermedad.

El hecho de la implicación de VEGF en angiogénesis le hace ser una diana importante para el desarrollo de tratamientos anti-angiogénicos. La inhibición de la angiogénesis se presenta como una terapia prometedora, sin embargo, hay muchos pacientes que no responden al tratamiento o desarrollan resistencia

(Fakhrejahani y Toi, 2014; Sharma y cols., 2013). Un ejemplo lo encontramos con el bevacizumab, el cuál en combinación con quimioterapia mejora la supervivencia de pacientes de cáncer de colon metastásico. Sin embargo, en el caso del cáncer de mama no ha tenido tanto éxito y, tras la aprobación para su uso en este tipo de cáncer, la FDA recomendó eliminar su uso para el tratamiento del cáncer de mama metastásico (Guo y cols., 2012; Lindholm y cols., 2012). Por ello, es necesario el desarrollo de nuevos fármacos antiangiogénicos que mejoren este tipo de terapia y sobre todo sean capaces de evitar resistencias (Kerbel, 2012; Xynos y cols., 2014).

Considerando los resultados que hemos obtenido, creemos que meroxest es un candidato para este tipo de terapia en cáncer de mama, ya que consigue reducir de forma significativa la expresión de VEGF. Esto nos hace pensar que también podría ser útil en pacientes resistentes, ya que la mayoría de los inhibidores actúan sobre la proteína expresada mientras que meroxest interfiere directamente en la expresión de VEGF. Sin embargo, este es un aspecto que necesita ser estudiado en detalle.

Una cuestión muy importante y clave en el estudio del cáncer es su origen. Durante décadas los investigadores han buscado teorías para explicarlo, y en la actualidad la teoría más aceptada es la de las CSCs (Paduch, 2014). Según este modelo, las CSCs son las únicas células del tumor con capacidad proliferativa ilimitada, capaces de dividirse y diferenciarse para dar lugar al resto de células del tumor que no presentan esta capacidad. Numerosos estudios demuestran que estas células son responsables de la progresión tumoral, de la metástasis, de las recidivas y del fallo al tratamiento, lo que las asocia con un peor pronóstico (Baccelli y Trumpp, 2012; La Porta, 2012). Debido a ello, son numerosos los esfuerzos que se están realizando para desarrollar terapias más eficaces contra el cáncer, que vayan dirigidas específicamente frente a ellas.

La identificación y el aislamiento de las CSCs se hacen en base a la expresión de una serie de marcadores de membrana y de actividad celular. En el cáncer de

mama los marcadores más utilizados son CD44 y CD24 (CD44⁺/CD24^{-/low}) y la actividad aldehído deshidrogenasa, fenotipo que se asocia con un peor pronóstico (Iqbal y cols., 2013; de Mendonça Uchôa y cols., 2014). En el caso del cáncer de mama, la existencia de subtipos con diferente pronóstico hace muy interesante el estudio de la relación entre éstos y la presencia de CSCs. En este sentido, varios estudios demuestran que en los subtipos triple negativo, los de peor pronóstico, hay una mayor presencia de CSCs caracterizadas como CD44⁺/CD24^{-/low} y ALDH⁺, que en los subtipos luminales, que presentan mejor pronóstico (de Beça y cols., 2013; Ricardo y cols., 2011).

Sin embargo, el papel de CD24 como marcador de BCSCs es controvertido, ya que algunos ensayos asocian la presencia de este marcador con mal pronóstico y no su ausencia (Hosonaga y cols., 2014). Esto implica que son necesarios más estudios que nos permitan identificar bien la población de CSCs y así poder establecer una buena relación entre el pronóstico de los diferentes subtipos de cáncer de mama y la presencia de BCSCs. Esto nos abrirá nuevas puertas para encontrar dianas más eficaces para el tratamiento, y en especial en el caso de aquellos subtipos que no responden bien a las terapias actuales y que presentan peor pronóstico.

Las terapias actuales suelen actuar sobre la masa tumoral, pero no son capaces de eliminar a las CSCs (Zhang y cols., 2012). Por ello, es necesario el desarrollo de terapias dirigidas específicamente contra ellas. En el caso del cáncer de mama se ha demostrado que estas células son responsables de la resistencia que presentan muchos pacientes a los tratamientos con quimio y radioterapia (Lü y cols., 2011; Zhan y cols., 2011). Numerosos autores se encuentran investigando nuevas dianas específicas contra este tipo de células con el fin de desarrollar tratamientos más eficaces. Y aunque algunos de ellos parecen dar buenos resultados, la mayoría son ensayos *in vitro* muy preliminares.

El conocimiento de estas células parece darnos una esperanza en la cura del cáncer, pero no debemos olvidar que es un campo de investigación relativamente reciente, por lo que son necesarios más estudios para poder establecer su utilidad y seguridad antes de ser llevadas a la práctica clínica. Las CSCs representan un campo de estudio muy importante, tanto para el conocimiento del proceso carcinogénico, como para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer. Debido a ello, creemos que sería de gran interés estudiar el efecto de nuestros compuestos sobre las CSCs, y en especial de meroxest, dada la gran actividad antitumoral que presenta tanto *in vitro* como *in vivo*.

CONCLUSIONES

1. La nueva familia de merosesquiterpenos sintéticos, derivados del ácido trans-comúnico, presenta una potente actividad antiproliferativa en líneas celulares tumorales de mama, colon y pulmón.
2. Merosex est es el compuesto con mayor actividad, y además presenta especificidad selectiva frente a líneas celulares de cáncer de mama humano.
3. El mecanismo de acción de merosex est en células MCF-7 implica la producción de estrés oxidativo; bloqueo del ciclo celular en las fases G₀-G₁ mediada por disminución de la expresión de ciclina D1, hipofosforilación de pRb y sobreexpresión de p27; e inducción de apoptosis asociada a un aumento de la expresión de p53 y fraccionamiento de PARP.
4. Merosex est parece inhibir la transición epitelio-mesenquimal, ya que es capaz de promover la expresión de E-cadherina y de su proteína de unión, β-catenina.
5. El compuesto es capaz de inhibir parcialmente el desarrollo de tumores *in vivo* en un modelo murino inmunocompetente de aloinjerto, y de producir alteraciones en la estructura de los mismos.
6. El merosesquiterpeno mejora el pronóstico de los ratones en términos de reducción de la infiltración leucocitaria, y disminución de la expresión de los marcadores pronóstico Ki67 y VEGF.
7. Todos nuestros resultados sugieren que merosex est podría ser útil en el tratamiento del cáncer de mama en humanos, e incluso un buen candidato para la terapia antiangiogénica debido a sus efectos sobre la expresión VEGF.

8. El conocimiento y el desarrollo de tratamientos específicos dirigidos hacia las células madre tumorales se presenta como un prometedor abordaje para la lucha contra la enfermedad.

Perspectivas futuras

Valorar el efecto de los nuevos merosesquiterpenos sintéticos, y en especial de meroxest, sobre las células madre tumorales de mama tanto *in vitro* como *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- Adamowicz K, Marczevska M, Jassem J. Combining systemic therapies with radiation in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2009;35:409-416.
- Afify A, Purnell P, Nguyen L. Role of CD44s and CD44v6 on human breast cancer cell adhesion, migration, and invasion. *Exp Mol Pathol.* 2009;86:95-100.
- Aghbali A, Hosseini SV, Delazar A, Gharavi NK, Shahneh FZ, Orangi M, Bandehagh A, Baradaran B. Induction of apoptosis by grape seed extract (*Vitis vinifera*) in oral squamous cell carcinoma. *Bosn J Basic Med Sci.* 2013;13:186-191.
- Ahmed N, Abubaker K, Findlay J, Quinn M. Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2010;10:268-278.
- Akhtar J, Wang Z, Yu C, Li CS, Shi YL, Liu HJ. STMN-1 is a potential marker of lymph node metastasis in distal esophageal adenocarcinomas and silencing its expression can reverse malignant phenotype of tumor cells. *BMC Cancer.* 2014;14:28. a
- Akhtar MJ, Ahamed M, Alhadlaq HA, Alrokayan SA, Kumar S. Targeted anticancer therapy: Overexpressed receptors and nanotechnology. *Clin Chim Acta.* 2014;436:78-92. b
- Alanee SR, Glogowski EA, Schrader KA, Eastham JA, Offit K. Clinical features and management of BRCA1 and BRCA2-associated prostate cancer. *Front Biosci Elite Ed.* 2014;6:15-30.
- Alawadi S, Ghabreau L, Alsaleh M, Abdulaziz Z, Rafeek M, Akil N, Alkhalaf M. P53 gene polymorphisms and breast cancer risk in Arab women. *Med Oncol.* 2011;28:709-715.
- Alevizakos M, Kaltsas S, Syrigos KN. The VEGF pathway in lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013;72:1169-1181.
- Al-Foheidi M, Al-Mansour MM, Ibrahim EM. Breast cancer screening: review of benefits and harms, and recommendations for developing and low-income countries. *Med Oncol.* 2013;30:471.

- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:3983-3988.
- Alison MR, Lim SML, Nicholson LJ. Cancer stem cells: problems for therapy? *J Pathol*. 2011;223:147-161.
- Álvarez, P, Marchal, JA, Boulaiz, H, Carrillo, E, Vélez, C, Rodríguez-Serrano, F, Melguizo, C, Prados, J, Madeddu, R and Aranega, A. 5-Fluorouracil derivatives: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2012;22:107-123.
- An SM, Ding QP, Li L. Stem cell signaling as a target for novel drug discovery: recent progress in the WNT and Hedgehog pathways. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34:777-783.
- Ang SH, Haaland B, Acharyya S, Thu MMM, Krisna SS, Hwang SG, Tan PH, Ng QS, Tan DS, Tai WM, Tan EH, Lim WT, Ang MK. Interactions between clinical factors, p16, and cyclin-D1 expression and survival outcomes in oropharyngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2014.
- Anothaisintawee T, Wiratkapun C, Lerdsitthichai P, Kasamesup V, Wongwaisayawan S, Srinakaran J, Hirunpat S, Woodtichartpreecha P, Boonlikit S, Teerawattananon Y, Thakkinstian A. Risk Factors of Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asia Pac J Public Health*. 2013;25:368-387.
- Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y. The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat*. 2008;29:992-1006.
- Apostolou P, Fostira F. Hereditary Breast Cancer: The Era of New Susceptibility Genes. *BioMed Res Int*. 2013;2013:1-11.
- Aprioku JS. Pharmacology of Free Radicals and the Impact of Reactive Oxygen Species on the Testis. *J Reprod Infertil*. 2013;14:158-172.
- Are C, Rajaram S, Are M, Raj H, Anderson BO, Chaluvarya Swamy R, Vijayakumar M, Song T, Pandey M, Edney JA, Cazap EL. A review of global cancer burden:

- Trends, challenges, strategies, and a role for surgeons. *J Surg Oncol*. 2013;107:221-226.
- Aronowitz RA. *Unnatural History: Breast Cancer and American Society* (Cambridge Studies in the History of Medicine). Cambridge University Press. 2007.
- Auffinger B, Tobias AL, Han Y, Lee G, Guo D, Dey M, Lesniak MS, Ahmed AU. Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell Death Differ*. 2014;21:1119-1131.
- Avery SV. Oxidative Stress and Cell Function. En Laher I (Ed.). *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Berlin, Heidelberg: Springer. 2014;89-112.
- Avoranta ST, Korkeila EA, Ristamäki RH, Syrjänen KJ, Carpén OM, Pyrhönen SO, Sundström JT. ALDH1 expression indicates chemotherapy resistance and poor outcome in node-negative rectal cancer. *Hum Pathol*. 2013;44:966-974.
- Avril N, Sassen S, Roylance R. Response to Therapy in Breast Cancer. *J Nucl Med*. 2009;50:55S-63S.
- Ayiomamitis GD, Notas G, Zaravinos A, Zizi-Sermpetzoglou A, Georgiadou M, Sfakianaki O, Kouroumallis E. Differences in telomerase activity between colon and rectal cancer. *Can J Surg*. 2014;57:199-208.
- Azzoni C, Bottarelli L, Campanini N, Cola GD, Bader G, Mazzeo A, Salvemini C, Morari S, Di Mauro D, Donadei E, Roncoroni L, Bordi C, Sarli L. Distinct molecular patterns based on proximal and distal sporadic colorectal cancer: arguments for different mechanisms in the tumorigenesis. *Int J Colorectal Dis*. 2007;22:115-126.
- Bacelli I, Trumpp A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol*. 2012;198:281-293.
- Bafford AC, Burstein HJ, Barkley CR, Smith BL, Lipsitz S, Iglehart JD, Winer EP, Golshan M. Breast surgery in stage IV breast cancer: impact of staging and patient selection on overall survival. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;115:7-12.
- Bai L, Wang S. Targeting Apoptosis Pathways for New Cancer Therapeutics. *Annu Rev Med*. 2014 65:139-155.

-
- Balicki D. Moving forward in human mammary stem cell biology and breast cancer prognostication using ALDH1. *Cell Stem Cell* 2007;1:485-487.
- Banerjee S, Wang Z, Mohammad M, Sarkar FH, Mohammad RM. Efficacy of Selected Natural Products as Therapeutic Agents against Cancer. *J Nat Prod.* 2008;71:492-496.
- Banks KC, Moline JJ, Marvin ML, Newlin AC, Vogel KJ. 10 rare tumors that warrant a genetics referral. *Fam Cancer.* 2012;12:1-18.
- Baradaran A, Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *J Res Med Sci.* 2014;19:358-367.
- Basmadjian C, Zhao Q, Bentouhami E, Djehal A, Nebigil CG, Johnson RA, Serova M, de Gramont A, Faivre S, Raymond E, Désaubry LG. Cancer wars: natural products strike back. *Front Chem.* 2014;2:20.
- Basu S, Ma R, Moskal JR, Basu M, Banerjee S. Apoptosis of breast cancer cells: modulation of genes for glycoconjugate biosynthesis and targeted drug delivery. *Adv Exp Med Biol.* 2012;749:233-255.
- Bauer A, Brönstrup M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. *Nat Prod Rep.* 2014;31:35.
- Baychelier F, Vieillard V. The Modulation of the Cell-Cycle: A Sentinel to Alert the NK Cells of Dangers. *Front Immunol.* 2013;4:325.
- Beaver JA, Gustin JP, Yi KH, Rajpurohit A, Thomas M, Gilbert SF, Rosen DM, Ho Park B, Lauring J. PIK3CA and AKT1 mutations have distinct effects on sensitivity to targeted pathway inhibitors in an isogenic luminal breast cancer model system. *Clin Cancer Res.* 2013;19:5413-5422.
- Beelen K, Zwart W, Linn SC. Can predictive biomarkers in breast cancer guide adjuvant endocrine therapy? *Nat Rev Clin Oncol.* 2012;9:529-541.
- Bellenir K. Breast Health. En *Breast Cancer Sourcebook*. Detroit: Omnigraphics. 2009.

-
- Benazzi C, Al-Dissi A, Chau CH, Figg WD, Sarli G, de Oliveira JT, Gärtner F. Angiogenesis in Spontaneous Tumors and Implications for Comparative Tumor Biology. *Sci World J.* 2014;919570.
- Bernstein JM, Bernstein CR, West CML, Homer JJ. Molecular and cellular processes underlying the hallmarks of head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013;270:2585-2593.
- Bersini S, Jeon JS, Moretti M, Kamm RD. *In vitro* models of the metastatic cascade: from local invasion to extravasation. *Drug Discov Today.* 2014;19:735-742.
- Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RAM. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14:518-528.
- Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Dev Cell* 2008;14:159-169.
- Bi X, Wu C, Han M, Cai J. Correlations of ALDH1 expression with molecular subtypes and ABCG2 in breast cancer. *Gland Surg.* 2012;1:12-19.
- Blain S. Switching cyclin D-Cdk4 kinase activity on and off. *Cell Cycle* 2008;7:892-898.
- Blanchard JM. To be or not to be a proliferation marker? *Oncogene.* 2014;33:954-955.
- Blankenberg FG, Norfray JF. Multimodality molecular imaging of apoptosis in oncology. *Am J Roentgenol.* 2011;197:308-317.
- Blay JY. Going further in the knowledge of Yondelis®; what's new in clinical trials? *Future Oncol.* 2014;10:s7-s12.
- Blay JY, Casali P, Nieto A, Tanović A, Le Cesne A. Efficacy and safety of trabectedin as an early treatment for advanced or metastatic liposarcoma and leiomyosarcoma. *Future Oncol.* 2014;10:59-68.a
- Blay JY, Leahy MG, Nguyen BB, Patel SR, Hohenberger P, Santoro A, Staddon AP, Penel N, Piperno-Neumann S, Hendifar A, Lardelli P, Nieto A, Alfaro V, Chawla SP. Randomised phase III trial of trabectedin versus doxorubicin-

- based chemotherapy as first-line therapy in translocation-related sarcomas. *Eur J Cancer*. 2014;50:1137-1147.b
- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3:730-737.
- Bourgeais J, Gouilleux-Gruart V, Gouilleux F. Oxidative metabolism in cancer: A STAT affair? *JAKSTAT* 2013; 2(4):e25764.
- Bourgier C, Aimard L, Bodez V, Bollet MA, Cutuli B, Franck D, Hennequin C, Kirova YM, Azria D. Adjuvant radiotherapy in the management of axillary node negative invasive breast cancer: A qualitative systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;86:33-41.
- Boyle P, Levin B. World cancer report 2008. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2008.
- Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol*. 2012;13:790-801.
- Brandt Y, Mitchell T, Wu Y, Hartley RS. Developmental downregulation of Xenopus cyclin E is phosphorylation and nuclear import dependent and is mediated by ubiquitination. *Dev Biol*. 2011 355:65-76.
- Bridge G, Rashid S, Martin S. DNA Mismatch Repair and Oxidative DNA Damage: Implications for Cancer Biology and Treatment. *Cancers*. 2014;6:1597-1614.
- Bruun J, Kolberg M, Nesland JM, Svindland A, Nesbakken A, Lothe RA. Prognostic Significance of β -Catenin, E-Cadherin, and SOX9 in Colorectal Cancer: Results from a Large Population-Representative Series. *Front Oncol*. 2014;4:118.
- Bucher N, Britten CD. G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Br J Cancer*. 2008;98:523-528.
- Buck K, Hug S, Seibold P, Ferschke I, Altevogt P, Sohn C, Schneeweiss A, Burwinkel B, Jäger D, Flesch-Janys D, Chang-Claude J, Marmé F. CD24 polymorphisms in breast cancer: impact on prognosis and risk. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;137:927-937.

- Buess M, Rajski M, Vogel-Durrer BML, Herrmann R, Rochlitz C. Tumor-endothelial interaction links the CD44(+)/CD24(-) phenotype with poor prognosis in early-stage breast cancer. *Neoplasia*. 2009;11:987-1002.
- Bufill JA. Colorectal Cancer: Evidence for Distinct Genetic Categories Based on Proximal or Distal Tumor Location. *Ann Intern Med*. 1990;113:779-788.
- Butler EB, Zhao Y, Munoz-Pinedo C, Lu J, Tan M. Stalling the Engine of Resistance: Targeting Cancer Metabolism to Overcome Therapeutic Resistance. *Cancer Res*. 2013;73:2709-2717.
- Caba O, Díaz-Gavilán M, Rodríguez-Serrano F, Boulaiz H, Aránega A, Gallo MA, Marchal JA, Campos JM. Anticancer activity and cDNA microarray studies of a (RS)-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepine-3-yl]-6-chloro-9H-purine, and an acyclic (RS)-O,N-acetalic 6-chloro-7H-purine. *Eur J Med Chem*. 2011;46:3802-3809.
- Calegari F, Waskow C. *Stem Cells: From Basic Research to Therapy: Basic Stem Cell Biology, Tissue Formation during Development, and Model Organisms*. CRC Press. 2014.
- Caligiuri I, Toffoli G, Giordano A, Rizzolio F. pRb controls estrogen receptor alpha protein stability and activity. *Oncotarget* 2013;4:875-883.
- Callagy GM, Webber MJ, Pharoah PD, Caldas C. Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC Cancer*. 2008;8:153.
- Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* 2007;6:2332-2338.
- Cao JQ, Olson RA, Tyldesley SK. Comparison of recurrence and survival rates after breast-conserving therapy and mastectomy in young women with breast cancer. *Curr Oncol Tor Ont*. 2013;20:e593-e601.
- Carrasco E, Álvarez PJ, Melguizo C, Prados J, Alvarez-Manzaneda E, Chahboun R, Messouri I, Vázquez-Vázquez MI, Aránega A, Rodríguez-Serrano. Novel merosesquiterpene exerts a potent antitumor activity against breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Med Chem*. 2014;79:1-12. a

- Carrasco E, Álvarez PJ, Prados J, Melguizo C, Rama AR, Aránega A, Rodríguez-Serrano F. Cancer stem cells and their implication in breast cancer. *Eur J Clin Invest.* 2014;44:678-87. b
- Carrasco E, Garrido JM, Álvarez PJ, Álvarez-Manzaneda E, Chahboun R, Messouri I, Melguizo C, Aránega A, Rodríguez-Serrano F. Meroxest improves the prognosis of immunocompetent C57BL/6 mice with allografts of E0771 mouse breast tumor cells. *Arch Med Sci.* 2014. 10.5114/aoms.2014.45442. c
- Carvajal LA, Manfredi JJ. Another fork in the road-life or death decisions by the tumour suppressor p53. *EMBO Rep.* 2013;14:414-421.
- Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Bioenergetic Failure and Cell Death to Cardiomyopathy. *Med Res Rev.* 2014;34:106-135.
- Ciurea ME, Georgescu AM, Purcaru SO, Artene S-A, Emami GH, Boldeanu MV, Tache DE, Dricu A. Cancer Stem Cells: Biological Functions and Therapeutically Targeting. *Int J Mol Sci.* 2014;15:816-8185.
- Cohnheim J: *Vorlesungen uber ellgemine Pathologie.*, Berlin: Hirschwald. 1877.
- Colditz GA, Bohlke K, Berkey CS. Breast cancer risk accumulation starts early: prevention must also. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;145:567-579.
- Colditz G, Baer H, Tamimi R. Breast cancer. En Schottenfeld D, Fraumeni JJ (Eds.). *Cancer epidemiology and prevention.* New York: Oxford University Press. 2006;995-1012.
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009;30:1073-1081.
- Colvin CW, Abdullatif H. Anatomy of female puberty: The clinical relevance of developmental changes in the reproductive system. *Clin Anat.* 2013;26:115-129.
- Coronado GD, Beasley J, Livaudais J. Alcohol consumption and the risk of breast cancer. *Salud Pública México.* 2011;53:440-447.

- Cottu P. [Breast cancer adjuvant endocrine treatment]. *Rev Prat.* 2013;63:1404-1407.
- Crockford A, Jamal-Hanjani M, Hicks J, Swanton C. Implications of intratumour heterogeneity for treatment stratification. *J Pathol.* 2014;232:264-273.
- Crozier JA, Swaika A, Moreno-Aspitia A. Adjuvant chemotherapy in breast cancer: To use or not to use, the anthracyclines. *World J Clin Oncol.* 2014;5:529-538.
- Cuevas C, Pérez M, Martín MJ, Chicharro JL, Fernández-Rivas C, Flores M, Francesch A, Gallego P, Zarzuelo M, de La Calle F, García J, Polanco C, Rodríguez I, Manzanares I. Synthesis of ecteinascidin ET-743 and phthalascidin Pt-650 from cyanosafracin B *Org Lett.* 2000;2:2545-2548.
- Cuomo ME, Platt GM, Pearl LH, Mitnacht S. Cyclin-Cyclin-dependent Kinase Regulatory Response Is Linked to Substrate Recognition. *J Biol Chem.* 2011;286:9713-9725.
- Chandel NS, Tuveson DA. The Promise and Perils of Antioxidants for Cancer Patients. *N Engl J Med.* 2014;371:177-178.
- Chang J, Erler J. Hypoxia-Mediated Metastasis. En Koumenis C, Hammond E, Giaccia A (Eds.). *Tumor Microenvironment and Cellular Stress.* New York: Springer. 2014;55-81.
- Chang YF, Hsu YC, Hung HF, Lee HJ, Lui WY, Chi CW, Wang JJ. Quercetin Induces Oxidative Stress and Potentiates the Apoptotic Action of 2-Methoxyestradiol in Human Hepatoma Cells. *Nutr Cancer.* 2009;61:735-745.
- Charehbili A, Fontein DBY, Kroep JR, Liefers GJ, Mieog JS, Nortier JW, van de Velde CJ. Neoadjuvant hormonal therapy for endocrine sensitive breast cancer: A systematic review. *Cancer Treat Rev.* 2014;40:86-92.
- Charlot M, Béatrix O, Chateau F, Dubuisson J, Golfier F, Valette PJ, Réty F. Pathologies of the male breast. *Diagn Interv Imaging.* 2013;94:26-37.
- Chen SY, Huang YC, Liu SP, Tsai FJ, Shyu WC, Lin SZ. An overview of concepts for cancer stem cells. *Cell Transplant.* 2011;20:113-120.
- Chen T, Stephens PA, Middleton FK, Curtin NJ. Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discov. Today* 2012;17:194-202.

- Cherblanc FL, Davidson RWM, Di Fruscia P, Srimongkolpithak N, Fuchter MJ. Perspectives on natural product epigenetic modulators in chemical biology and medicine. *Nat Prod Rep*. 2013;30:605-624.
- Cheung KJ, Ewald AJ. Illuminating breast cancer invasion: diverse roles for cell-cell interactions. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2014;30:99-111.
- Chial H. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nat. Educ*. 2008;1:1-4.
- Choi H, Mazzone P. Radon and lung cancer: Assessing and mitigating the risk. *Cleve. Clin. J. Med*. 2014;81:567-575.
- Choi YH, Yu AM. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. *Curr Pharm Des*. 2014;20:793-807.
- Choi Y, Lee HJ, Jang MH, Gwak JM, Lee KS, Kim EJ, Kim HJ, Lee HE, Park SY. Epithelial-mesenchymal transition increases during the progression of in situ to invasive basal-like breast cancer. *Hum Pathol*. 2013;44:2581-2589.
- Chulu JLC, Liu HJ. Recent patents on cell cycle regulatory proteins. *Recent Pat Biotechnol*. 2009;3:1-9.
- Damgaard OE, Jensen MB, Kroman N, Tvedskov TF. Quantifying the number of lymph nodes identified in one-stage versus two-stage axillary dissection in breast cancer. *Breast Edinb Scotl*. 2013;22:44-46.
- Dang CV. MYC on the Path to Cancer. *Cell* 2012;149:22-35.
- Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*. 1995;61:1-31.
- Davies NJ, Batehup L, Thomas R. The role of diet and physical activity in breast, colorectal, and prostate cancer survivorship: a review of the literature. *Br J Cancer*. 2011;105:S52-S73.
- Dávila-Arias C, Ocón O, Fernández MF, Arrebola JP, Sánchez MJ, Aneiros J, Torné P, Olea N. Factores relacionados con la supervivencia libre de enfermedad en el cáncer de mama. *Med Clin (Barc)*. 2014;143:293-299.
- Dawson SJ, Rueda OM, Aparicio S, Caldas C. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *EMBO J*. 2013;32:617-628.

- De Beça FF, Caetano P, Gerhard R, Alvarenga CA, Gomes M, Paredes J, Schmitt F. Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types. *J. Clin Pathol.* 2013;66:187-191.
- De Jong M, Maina T. Of mice and humans: are they the same?--Implications in cancer translational research. *J Nucl Med.* 2010;51:501-504.
- De Mendonça Uchôa D, Graudenz MS, Callegari-Jacques SM, Hartmann CR, Ferreira BP, Fitarelli-Kiehl M, Edelweiss MI. Expression of cancer stem cell markers in basal and penta-negative breast carcinomas -- A study of a series of triple-negative tumors. *Pathol Res Pract.* 2014;210:432-439.
- De Pergola G, Silvestris F. Obesity as a Major Risk Factor for Cancer. *J Obes.* 2013;2013:1-11.
- Den Hollander P, Savage MI, Brown PH. Targeted therapy for breast cancer prevention. *Front Oncol.* 2013;3:250.
- Deng Y, Shipps Jr. GW, Zhao L, Siddiqui MA, Popovici-Muller J, Curran PJ, Duca JS, Hruza AW, Fischmann TO, Madison VS, Zhang R, McNemar CW, Mayhood TW, Syto R, Annis A, Kirschmeier P, Lees EM, Parry DA, Windsor WT. Modulating the interaction between CDK2 and cyclin A with a quinoline-based inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24:199-203.
- Dewson G, Kluck RM. Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health Cytoskelet.* 2010;2:9-22.
- Dezső Z, Oestreicher J, Weaver A, Santiago S, Agoulnik S, Chow J, Oda Y, Funahashi Y. Gene Expression Profiling Reveals Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Genes Can Selectively Differentiate Eribulin Sensitive Breast Cancer Cells. *PLoS ONE.* 2014;9:e106131.
- Diaz-Moralli S, Tarrado-Castellarnau M, Miranda A, Cascante M. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 2013;138:255-271.
- Diaz-Padilla I, Siu LL, Duran I. Cyclin-dependent kinase inhibitors as potential targeted anticancer agents. *Invest New Drugs* 2009;27:586-594.
- Dick JE. Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat Biotechnol.* 2009;27:44-46.

-
- Dimova I, Popivanov G, Djonov V. Angiogenesis in cancer-general pathways and their therapeutic implications. *J BUON*. 2014;19:15-21.
- D'Incalci M, Badri N, Galmarini CM, Allavena P. Trabectedin, a drug acting on both cancer cells and the tumour microenvironment. *Br J Cancer*. 2014;111:646-650.
- Ding L, Raphael BJ, Chen F, Wendl MC. Advances for studying clonal evolution in cancer. *Cancer Lett*. 2013;340:212-219.
- Diotti R, Loayza D. Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus* 2011;2:119-135.
- Donehower LA. Phosphatases reverse p53-mediated cell cycle checkpoints. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111:7172-7173.
- Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. *In vitro* propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*. 2003;17:1253-1270.
- Druesne-Pecollo N, Touvier M, Barrandon E, Chan DSM, Norat T, Zelek L, Hercberg S, Latino-Martel P. Excess body weight and second primary cancer risk after breast cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;135:647-654.
- Duffy MJ. Biochemical markers in breast cancer: which ones are clinically useful? *Clin. Biochem*. 2001;34:347-352.
- Durko L, Malecka-Panas E. Lifestyle Modifications and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2014;10:45-54.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J, Gray R, Pierce L, Whelan T, Wang Y, Peto R. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet* 2011;378:1707-1716.
- Eccles SA. The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *Int J Dev Biol*. 2011;55:685-696.

- Echalier A, Endicott JA, Noble MEM. Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804:511-519.
- Escudero M. Epidemiología. Situación actual del problema. Frecuencia. Mortalidad en nuestro país. Factores de riesgo. En Escudero M (Ed.). *Avances en cáncer de mama*. Real Academia Nacional de Medicina. 2006;9-24.
- Ewens A, Mihich E, Ehrke MJ. Distant metastasis from subcutaneously grown E0771 medullary breast adenocarcinoma. *Anticancer Res*. 2005;25:3905-3915.
- Fakhrejehani E, Toi M. Antiangiogenesis Therapy for Breast Cancer: An Update and Perspectives from Clinical Trials. *Jpn J Clin Oncol*. 2014;44:197-207.
- Fanale D, Amodeo V, Corsini LR, Rizzo S, Bazan V, Russo A. Breast cancer genome-wide association studies: there is strength in numbers. *Oncogene* 2011;31:2121-2128.
- Fang QX, Lü LZ, Yang B, Zhao ZS, Wu Y, Zheng XC. L1, β -catenin, and E-cadherin expression in patients with colorectal cancer: Correlation with clinicopathologic features and its prognostic significance. *J Surg Oncol*. 2010;102:433-442.
- Feldman ED, Oppong BA, Willey SC. Breast Cancer Screening: Clinical, Radiologic, and Biochemical. *Clin Obstet Gynecol*. 2012;55:662-670.
- Feng B. Euphol arrests breast cancer cells at the G1 phase through the modulation of cyclin D1, p21 and p27 expression. *Mol Med Rep*. 2013;8:1279-1285
- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*. 2010;46:765-781.a
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127:2893-2917.b
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France:

- International Agency for Research on Cancer; 2013. [13 Sep 2014] de <http://globocan.iarc.fr/Pages/references.aspx>.
- Fernández-Medarde A, Santos E. Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes Cancer* 2011;2:344-358.
- Filippova M, Filippov V, Williams VM, Zhang K, Kokoza A, Bashkirova S, Duerksen-Hughes P. Cellular levels of oxidative stress affect the response of cervical cancer cells to chemotherapeutic agents. 2014
- Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res. BCR* 2008;10:R25.
- Forget A, Ayrault O, den Besten W, Kuo ML, Sherr CJ, Roussel MF. Differential post-transcriptional regulation of two Ink4 proteins, p18Ink4c and p19Ink4d. *Cell Cycle*. 2008;7:3737-3746.
- Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, López AD, Murray CJL, Naghavi M. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2011; 378: 1461-1484.
- Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:298-306.
- Fritz MA, Speroff L. *Endocrinología ginecológica clínica y esterilidad / Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
- Gampenrieder SP, Rinnerthaler G, Greil R. Neoadjuvant Chemotherapy and Targeted Therapy in Breast Cancer: Past, Present, and Future. *J Oncol*. 2013; 2013:732047.
- Gemignani ML. Breast cancer screening: why, when, and how many? *Clin Obstet Gynecol*. 2011;54:125-132.
- Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko AJ, Los M. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet*. 2009;46:49-510.

-
- Giddings LA, Newman DJ. Microbial natural products: molecular blueprints for antitumor drugs. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2013;40:1181-1210.
- Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Sasiadek MM. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J Appl Genet*. 2008;49:193-199.
- Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:430-439.
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007;1:555-567.
- Gkogkou C, Frangia K, Saif MW, Trigidou R, Syrigos K. Necrosis and apoptotic index as prognostic factors in non-small cell lung carcinoma: a review. *SpringerPlus*. 2014;3:120.
- Glasauer A, Chandel NS. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochem Pharmacol*. 2014.
- Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol*. 2011;223:116-126.
- Goolsby C, Paniagua M, Tallman M, Gartenhaus RB. Bcl-2 regulatory pathway is functional in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005;63:36-46.
- Goyal A. Current Trends in Breast Surgery. *Indian J. Surg. Oncol*. 2012;3:287-291.
- Griffin JL, Pearlman MD. Breast cancer screening in women at average risk and high risk. *Obstet Gynecol*. 2010;116:1410-1421.
- Grimm D, Wehland M, Pietsch J, Infanger M, Bauer J. Drugs interfering with apoptosis in breast cancer. *Curr Pharm Des*. 2011;17:272-283.
- Gu D, Wang M, Wang S, Zhang Z, Chen J. The DNA Repair Gene APE1 T1349G Polymorphism and Risk of Gastric Cancer in a Chinese Population. *PLoS ONE* 2011;6:e28971. a

- Gu JW, Makey KL, Tucker KB, Chinchar E, Mao X, Pei I, Thomas EY, Miele L. EGCG, a major green tea catechin suppresses breast tumor angiogenesis and growth via inhibiting the activation of HIF-1 α and NF κ B, and VEGF expression. *Vasc Cell* 2013;5:9.
- Gu JW, Young E, Patterson SG, Makey KL, Wells J, Huang M, Tucker KB, Miele L. Postmenopausal obesity promotes tumor angiogenesis and breast cancer progression in mice. *Cancer Biol Ther.* 2011;11:910-917. b
- Gui T, Cao D, Yang J, Shen K. Tumor heterogeneity has important consequences for personalized medicine in ovarian cancer. *Histol Histopathol.* 2014.
- Guiu S, Michiels S, Andre F, Cortes J, Denkert C, Di Leo A, Hennessy BT, Sorlie T, Sotiriou C, Turner N, Van de Vijver M, Viale G, Loi S, Reis-Filho JS. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann Oncol.* 2012;23:2997-3006.
- Gujam FJA, Going JJ, Edwards J, Mohammed ZMA, McMillan DC. The role of lymphatic and blood vessel invasion in predicting survival and methods of detection in patients with primary operable breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014;89:231-241.
- Gunasinghe NPAD, Wells A, Thompson EW, Hugo HJ. Mesenchymal–epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2012;31:469-478.
- Guo S, Liu M, Gonzalez-Perez RR. Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1815:197-213.
- Guo Yt, Ding L, Li Th. [Application of bevacizumab on metastatic breast cancer]. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2012;44:708-714.
- Gupta S, Takebe N, LoRusso P. Review: Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2010;2:237-250.
- Gupte A, Mumper RJ. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat. Rev.* 2009;35:32-46.
- Hadzic T, Aykin-Burns N, Zhu Y, Coleman MC, Leick K, Jacobson GM, Spitz DR. Paclitaxel combined with inhibitors of glucose and hydroperoxide metabolism

- enhances breast cancer cell killing via H₂O₂-mediated oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2010;48:1024-1033.
- Hafidh RR, Abdulamir AS, Bakar FA, Jalilian FA, Abas F, Sekawi Z. Novel molecular, cytotoxic, and immunological study on promising and selective anticancer activity of Mung bean sprouts. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:208.
- Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science.* 1977;197:461-463.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011;144:646-674.
- Haque I, Banerjee S, De A, Maity G, Sarkar S, Majumdar M, Jha SS, McGragor D, Banerjee SK. CCN5/WISP-2 promotes growth arrest of triple-negative breast cancer cells through accumulation and trafficking of p27(Kip1) via Skp2 and FOXO3a regulation. *Oncogene.* 2014.
- Hasanali Z, Sharma K, Epner E. Flipping the cyclin D1 switch in mantle cell lymphoma. *Best Prac Res Clin Haematol.* 2012;25:143-152.
- Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *BioMed Res Int.* 2014;2014:e150845.
- Hassen S, Ali N, Chowdhury P. Molecular signaling mechanisms of apoptosis in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2012;3:71-79.
- Hassiotou F, Geddes D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat.* 2013;26:29-48.
- Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2008;359:1367-1380.
- Hermann PC, Bhaskar S, Cioffi M, Heeschen C. Cancer stem cells in solid tumors. *Semin Cancer Biol.* 2010;20:77-84.
- Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth

- and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007;1:313-323.
- Herruzo, A, Luján, S, Moreno, J. Cáncer de mama IV. Tratamiento locorregional del cáncer infiltrante de mama. Factores de pronóstico. Tratamiento adyuvante. En Cabero i Roura L, Cabrillo Rodríguez E, Bajo Arenas JM (Eds.). Tratado de ginecología y obstetricia. Madrid: Médica Panamericana. 2012;860-877.
- Hickey BE, Francis DP, Lehman M. Sequencing of chemotherapy and radiotherapy for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;4:CD005212.
- Hisanaga S, Endo R. Regulation and role of cyclin-dependent kinase activity in neuronal survival and death. *J Neurochem*. 2010;115:1309-1321.
- Holland JD, Klaus A, Garratt AN, Birchmeier W. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2013;25:254-264.
- Hole PS, Darley RL, Tonks A. Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias? *Blood*. 2011;117:5816-5826.
- Hori K, Akita H, Nonaka H, Sumiyoshi A, Taki Y. Prevention of cancer recurrence in tumor margins by stopping microcirculation in the tumor and tumor-host interface. *Cancer Sci*. 2014;105:1196-1204.
- Horne HN, Sherman ME, Garcia-Closas M, Pharoah PD, Blows FM, Yang XR, Hewitt SM, Conway CM, Lissowska J, Brinton LA, Prokunina-Olsson L, Dawson SJ, Caldas C, Easton DF, Chanock SJ, Figueroa JD. Breast cancer susceptibility risk associations and heterogeneity by E-cadherin tumor tissue expression. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;143:181-187.
- Hosonaga M, Arima Y, Sugihara E, Kohno N, Saya H. Expression of CD24 is associated with HER2 expression and supports HER2-Akt signaling in HER2-positive breast cancer cells. *Cancer Sci*. 2014;105:779-787.
- Hu X, Moscinski LC. Cdc2: a monopotent or pluripotent CDK? *Cell Prolif*. 2011;44:205-211.
- Hu Y, Fu L. Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. *Am J Cancer Res*. 2012;2:340-356.

-
- Huang L, Chen T, Chen C, Chen S, Liu Y, Wu J, Shao Z. Prognostic and predictive value of Phospho-p44/42 and pAKT in HER2-positive locally advanced breast cancer patients treated with anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy. *World J Surg Oncol*. 2013;11:307.
- Huang SM, Tsai CF, Chen D, Wang MY, Yeh WL. p53 Is a Key Regulator for Osteole-Triggered Cancer Pathogenesis. *BioMed Res Int*. 2014;2014:e175247.
- Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yeppez S, Livingston EH. Screening and Detection of Apoptosis. *J Surg Res*. 2007;139:143-156.
- Hunt KK, Newman LA, Copeland EM, Bland KI. La mama. En Schwartz SI, Brunnicardi FC, Andersen DK, Araiza Martínez ME (Eds.). *Principios de cirugía*. México: McGraw-Hill. 2011.
- Hunt KS, Ray JA, Jeter JM. Hereditary Risk for Cancer. En Alberts D, Hess LM (Eds.). *Fundamentals of Cancer Prevention*. Berlin Heidelberg; Springer. 2014;123-150.
- Hwang-Verslues WW, Lee WH, Lee EY. Biomarkers to Target Heterogeneous Breast Cancer Stem Cells. *J Mol Biomark Diagn*. 2012; Suppl 8: 6.
- Iqbal J, Chong PY, Tan PH. Breast cancer stem cells: an update. *J Clin Pathol*. 2013;66:485-490.
- Ismail IA, Kang HS, Lee HJ, Chang H, Yun J, Lee CW, Kim NH, Kim HS, Yook JI, Hong SH, Kwon BM. 2-Hydroxycinnamaldehyde inhibits the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;137:697-708.
- Ivanova D, Bakalova R, Lazarova D, Gadjeva V, Zhelev Z. The impact of reactive oxygen species on anticancer therapeutic strategies. *Adv Clin Exp Med*. 2013;22:899-908.
- Iyer DR, Rhind N. Checkpoint regulation of replication forks: global or local? *Biochem Soc Trans*. 2013;41:1701-1705.
- Jäkel H, Peschel I, Kunze C, Weinl C, Hengst L. Regulation of p27 (Kip1) by mitogen-induced tyrosine phosphorylation. *Cell Cycle*. 2012;11:1910-1917.

-
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69-90.
- Kapinas K, Grandy R, Ghule P, Medina R, Becker K, Pardee A, Zaidi SK, Lian J, Stein J, van Wijnen A, Stein G. The Abbreviated Pluripotent Cell Cycle. *J Cell Physiol.* 2013;228:9-20.
- Karamboulas C, Ailles L. Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830:2481-2495.
- Karikas GA. Anticancer and chemopreventing natural products: some biochemical and therapeutic aspects. *J BUON.* 2010;15:627-638.
- Karp G. *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos.* Madrid: McGraw Hill. 2014.
- Kasper M, Jaks V, Fiaschi M, Toftgård R. Hedgehog signalling in breast cancer. *Carcinogenesis.* 2009;30:903-911.
- Kaur R, Kaur J, Mahajan J, Kumar R, Arora S. Oxidative stress-implications, source and its prevention. *Environ Sci Pollut Res.* 2014;21:1599-1613.
- Kaviani A, Sodagari N, Sheikhabaei S, Eslami V, Hafezi-Nejad N, Safavi A, Noparast M, Fitoussi A. From radical mastectomy to breast-conserving therapy and oncoplastic breast surgery: a narrative review comparing oncological result, cosmetic outcome, quality of life, and health economy. *ISRN Oncol.* 2013;2013:742462.
- Kawano M, Mabuchi S, Kishimoto T, Hisamatsu T, Matsumoto Y, Sasano T, Takahashi R, Sawada K, Takahashi K, Takahashi T, Hamasaki T, Kimura T. Combination treatment with trabectedin and irinotecan or topotecan has synergistic effects against ovarian clear cell carcinoma cells. *Int J Gynecol Cancer.* 2014;24:829-837.
- Kelley MR, Georgiadis MM, Fishel ML. APE1/Ref-1 Role in redox signaling: translational applications of targeting the redox function of the dna repair/redox protein APE1/Ref-1. *Curr Mol Pharmacol.* 2012;5:36-53.

- Kerbel RS. Strategies for improving the clinical benefit of antiangiogenic drug based therapies for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2012;17:229-239.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-257.
- Khazaei-Pool M, Montazeri A, Majlessi F, Foroushani AR, Nedjat S, Shojaeizadeh D. Breast cancer-preventive behaviors: exploring Iranian women's experiences. *BMC Womens Health*. 2014;14:41.
- Kim KI, Lee KH, Kim TR, Chun YS, Lee TH, Park HK. Ki-67 as a Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. *J Breast Cancer*. 2014;17:40-46.
- Kim YW, Byzova TV. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood* 2014;123:625-631.
- Kinghorn AD, Chin YW, Swanson SM. Discovery of Natural Product Anticancer Agents from Biodiverse Organisms. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2009;12:189-196.
- Kirshner JR, He S, Balasubramanyam V, Kepros J, Yang CY, Zhang M, Du Z, Barsoum J, Bertin J. Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress. *Mol Cancer Ther*. 2008;7:2319-2327.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 2008;16:3-11.
- Kruger JA, Kaplan CD, Luo Y, Zhou H, Markowitz D, Xiang R, Reisfeld RA. Characterization of stem cell-like cancer cells in immune-competent mice. *Blood*. 2006;108:3906-3912.
- Krüger K, Mooren FC. Exercise-induced leukocyte apoptosis. *Exerc Immunol Rev*. 2014;20:117-134.

-
- Kuch V, Schreiber C, Thiele W, Umansky V, Sleeman JP. Tumor-initiating properties of breast cancer and melanoma cells *in vivo* are not invariably reflected by spheroid formation *in vitro*, but can be increased by long-term culturing as adherent monolayers. *Int J Cancer*. 2013;132:E94-105.
- Kumar S, Weaver VM. Mechanics, malignancy, and metastasis: The force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28:113-127.
- Kumar V. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. Barcelona: Elsevier España. 2010.
- Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and Kinases in a Death Grip. *Cell*. 2009;138:838-854.
- La Porta CA. Thoughts about cancer stem cells in solid tumors. *World J Stem Cells*. 2012;4:17-20.
- Laloo F, Evans DG. Familial Breast Cancer. *Clin. Genet*. 2012;82:105-114.
- Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358:15-16.
- Laso FJ. Introducción a la medicina clínica: fisiopatología y semiología. Barcelona: Masson. 2010.
- Lavender NA, Komolafe OO, Benford M, Brock G, Moore JH, Vancleave TT, States JC, Kittles RA, Kidd LC. No association between variant DNA repair genes and prostate cancer risk among men of African descent. *Prostate*. 2010;70:113-119.
- Lawenda BD, Kelly KM, Ladas EJ, Sagar SM, Vickers A, Blumberg JB. Should Supplemental Antioxidant Administration Be Avoided During Chemotherapy and Radiation Therapy? *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:773-783.
- Lee EYHP, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2:a003236.
- Lee HE, Kim JH, Kim YJ, Choi SY, Kim SW, Kang E, Chung IY, Kim IA, Kim EJ, Choi Y, Ryu HS, Park SY. An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer*. 2011;104:1730-1738.

-
- Lemaine V, Simmons PS. The adolescent female: Breast and reproductive embryology and anatomy. *Clin Anat.* 2013;26:22-28.
- Leong AS, Zhuang Z. The Changing Role of Pathology in Breast Cancer Diagnosis and Treatment. *Pathobiology* 2011;78:99-114.
- Lester, S. Mama. En Kumar V, Perkins JA (Eds.). *Patología estructural y funcional.* Barcelona: Elsevier. 2010;1065-1096.
- Levav-Cohen Y, Goldberg Z, Tan KH, Alsheich-Bartok O, Zuckerman V, Haupt S, Haupt Y. The p53-Mdm2 Loop: A Critical Juncture of Stress Response. *Subcell Biochem.* 2014;85:161-186
- Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev Cancer.* 2009;9:749-758.
- Li K, Yao L, Chen L, Cao ZG, Yu SJ, Kuang XY, Hu X, Shao ZM. ID2 predicts poor prognosis in breast cancer, especially in triple-negative breast cancer, and inhibits E-cadherin expression. *OncoTargets Ther.* 2014;7:1083-1094.
- Li SG, Li L. Targeted therapy in HER2-positive breast cancer. *Biomed Rep.* 2013;1:499-505.
- Liang J, Shang Y. Estrogen and cancer. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:225-240.
- Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development.* 2013;140:3079-3093.
- Lindqvist A, Rodríguez-Bravo V, Medema RH. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol.* 2009;185:193-202.
- Lindholm EM, Kristian A, Nalwoga H, Krüger K, Nygård S, Akslen LA, Mælandsmo GM, Engebraaten O. Effect of antiangiogenic therapy on tumor growth, vasculature and kinase activity in basal- and luminal-like breast cancer xenografts. *Mol Oncol.* 2012;6:418-427.
- Linjawi SAA, Khalil WKB, M.Hassanane M, Ahmed ES. Evaluation of the protective effect of *Nigella sativa* extract and its primary active component thymoquinone against DMBA-induced breast cancer in female rats. *Arch Med Sci.* 2013.

- Liu H, Patel MR, Prescher JA, Patsialou A, Qian D, Lin J, Wen S, Chang YF, Bachmann MH, Shimono Y, Dalerba P, Adorno M, Lobo N, Bueno J, Dirbas FM, Goswami S, Somlo G, Condeelis J, Contag CH, Gambhir SS, Clarke MF. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:18115-18120.a
- Liu W, Qian N, Li R, Dou K. Replacing Hoechst33342 with Rhodamine123 in isolation of cancer stem-like cells from the MHCC97 cell line. *Toxicol In Vitro*. 2010;24:538-545.b
- Lizarraga IM, Sugg SL, Weigel RJ, Scott-Conner CEH. Review of risk factors for the development of contralateral breast cancer. *Am J Surg*. 2013;206:704-708.
- Lodish H. *Molecular cell biology*. New York: W.H. Freeman and Co. 2013.
- Lof M, Weiderpass E. Impact of diet on breast cancer risk. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2009;21:80-85.
- Longo DL. *Harrison: principios de medicina interna*. México:McGraw-Hill. 2012.
- Longo DL. Estudio del paciente con cáncer. En Longo DL (Ed.). *Harrison hematología y oncología*. México: McGraw-Hill. 2013;320-331.
- López R, Agullo P, Lakshmanaswamy R. Links between obesity, diabetes and ethnic disparities in breast cancer among Hispanic populations: Obesity, diabetes and breast cancer. *Obes Rev*. 2013;14:679-691.
- Lü X, Deng Q, Li H, Suo Z. Altered characteristics of cancer stem/initiating cells in a breast cancer cell line treated with persistent 5-FU chemotherapy. *Exp Ther Med*. 2011;2:821-826.
- Lunardi A, Nardella C, Clohessy JG, Pandolfi PP. Of Model Pets and Cancer Models: An Introduction to Mouse Models of Cancer. *Cold Spring Harb Protoc*. 2014;2014:17-31.
- Lurje G, Lenz HJ. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology*. 2009;77:400-410.
- Lushchak VI, Gospodaryov DV. Introductory Chapter. En Lushchak V (Ed.). *Oxidative Stress and Diseases*. InTech. 2012.

- Ma H, Lu Y, Malone KE, Marchbanks PA, Deapen DM, Spirtas R, Burkman RT, Strom BL, McDonald JA, Folger SG, Simon MS, Sullivan-Halley J, Press MF, Bernstein L. Mortality risk of black women and white women with invasive breast cancer by hormone receptors, HER2, and p53 status. *BMC Cancer*. 2013;13:225.
- Ma Y, Qu L, Liu Z, Zhang L, Yang Z, Zhang L. Synthesis of Salinosporamide A and Its Analogs as 20S Proteasome Inhibitors and SAR Summarization. *Curr Top Med Chem*. 2011;11:2906-2922.
- MacKenzie SH, Clark AC. Death by caspase dimerization. *Adv Exp Med Biol*. 2012;747:55-73.
- Mackey JR, Kerbel RS, Gelmon KA, McLeod DM, Chia SK, Rayson D, Verma S, Collins LL, Paterson AH, Robidoux A, Pritchard KI. Controlling angiogenesis in breast cancer: A systematic review of anti-angiogenic trials. *Cancer Treat Rev*. 2012;38:673-688.
- Mandal A, Bhatia D, Bishayee A. Simultaneous disruption of estrogen receptor and Wnt/ β -catenin signaling is involved in methyl amooranin-mediated chemoprevention of mammary gland carcinogenesis in rats. *Mol Cell Biochem*. 2013;384:239-250.
- Manzano A, Pérez-Segura P. Colorectal cancer chemoprevention: is this the future of colorectal cancer prevention?. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:327341.
- Marchini S, D'Incalci M, Brogginini M. New Molecules and Strategies in the Field of Anticancer Agents. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2004;4:247-262.
- Marin JJ, Monte MJ, Blazquez AG, Macias RI, Serrano MA, Briz O. The role of reduced intracellular concentrations of active drugs in the lack of response to anticancer chemotherapy. *Acta Pharmacol Sin*. 2014;35:1-10.
- Márquez M, Ordi J. Histología de los órganos genitales y de la mama. En Cabero i Roura L (Eds.). *Tratado de Ginecología y Obstetricia. Ginecología y medicina de la reproducción*. Madrid: Médica Panamericana. 2012;187-196.
- Martínez-Rivera M, Siddik ZH. Resistance and gain-of-resistance phenotypes in cancers harboring wild-type p53. *Biochem Pharmacol*. 2012;83:1049-1062.

- Martín M, Arroyo M, Villalobos ML, Álvarez M. Cáncer de mama. *Medicine*. 2013;11:1629-1640.
- Masamha CP, Benbrook DM. Cyclin D1 degradation is sufficient to induce g1 cell cycle arrest despite constitutive expression of Cyclin E2 in ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 2009;69:6565-6572.
- Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, Doihara H, Hortobagyi GN, Ueno NT. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;136:331-345.
- Mayer AMS, Glaser KB, Cuevas C, Jacobs RS, Kem W, Little RD, McIntosh JM, Newman DJ, Potts BC, Shuster DE. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol Sci*. 2010;31:255-265.
- McKee TC, Wyk AWWV, Whitson EL. Natural Product Screening En Rudek MA, Chau CH, Figg WD, McLeod HL (Eds.). *Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. New York: Springer. 2014;39-67.
- Menezes ME, Mitra A, Shevde LA, Samant RS. DNAJB6 governs a novel regulatory loop determining Wnt/ β -catenin signaling activity. *Biochem J*. 2012;444:573-580.
- Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedè, Fabio. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *BioMed Res Int*. 2011;2011:e792362.
- Mikolcevic P, Rainer J, Geley S. Orphan kinases turn eccentric. *Cell Cycle* 2012;11:3758-3768.
- Millward M, Price T, Townsend A, Sweeney C, Spencer A, Sukumaran S, Longenecker A, Lee L, Lay A, Sharma G, Gemmill RM, Drabkin HA, Lloyd GK, Neuteboom ST, McConkey DJ, Palladino MA, Spear MA. Phase 1 clinical trial of the novel proteasome inhibitor marizomib with the histone deacetylase inhibitor vorinostat in patients with melanoma, pancreatic and lung cancer based on *in vitro* assessments of the combination. *Invest New Drugs*. 2012;30:2303-2317.
- Minami CA, Chung DU, Chang HR. Management options in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Basic Clin Res*. 2011;5:175-199.

- Miow QH, Tan TZ, Ye J, Lau JA, Yokomizo T, Thiery JP, Mori S. Epithelial-mesenchymal status renders differential responses to cisplatin in ovarian cancer. *Oncogene*. 2014.
- Mitchison TJ. The proliferation rate paradox in antimitotic chemotherapy. *Mol Biol Cell*. 2012;23:1-6.
- Moghbeli M, Moghbeli F, Forghanifard MM, Abbaszadegan MR. Cancer stem cell detection and isolation. *Med Oncol*. 2014;31:1-7.
- Mohammed ZMA, Going JJ, Edwards J, Elsberger B, Doughty JC, McMillan DC. The relationship between components of tumour inflammatory cell infiltrate and clinicopathological factors and survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer*. 2012;107:864-873.
- Mohan A, Ponnusankar S. Newer Therapies for the Treatment of Metastatic Breast Cancer: a Clinical Update. *Indian J Pharm Sci*. 2013;75:251-261.
- Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP. Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8:69-85.
- Morales P, Vara D, Gómez-Cañas M, Zúñiga MC, Olea-Azar C, Goya P, Fernández-Ruiz J, Díaz-Laviada I, Jagerovic N. Synthetic cannabinoid quinones: Preparation, *in vitro* antiproliferative effects and *in vivo* prostate antitumor activity. *Eur J Med Chem*. 2013;70:111-119.
- Moriya T, Kanomata N, Kozuka Y, Hirakawa H, Kimijima I, Kimura M, Watanabe M, Sasano H, Ishida T, Ohuchi N, Kurebayashi J, Sonoo H. Molecular morphological approach to the pathological study of development and advancement of human breast cancer. *Med Mol Morphol*. 2010;43:67-73.
- Munro S, Carr SM, La Thangue NB. Diversity within the pRb pathway: is there a code of conduct? *Oncogene*. 2012;31:4343-4352.
- Murillo G, Peng X, Torres KEO, Mehta RG. Deguelin inhibits growth of breast cancer cells by modulating the expression of key members of the Wnt signaling pathway. *Cancer Prev Res*. 2009;2:942-950.

- Murillo G, Salti GI, Kosmeder JW, Pezzuto JM, Mehta RG. Deguelin inhibits the growth of colon cancer cells through the induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Eur J Cancer*. 2002;38:2446-2454.
- Mylona E, Giannopoulou I, Fasomytakis E, Nomikos A, Magkou C, Bakarakos P, Nakopoulou L. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24(-/low) and CD44-/CD24+ tumor cells in invasive breast carcinomas. *Hum Pathol*. 2008;39:1096-1102.
- Nathwani SM, Hughes L, Greene LM, Carr M, O'Boyle NM, McDonnell S Meegan MJ, Zisterer DM. Novel cis-restricted β -lactam combretastatin A-4 analogues display anti-vascular and anti-metastatic properties *in vitro*. *Oncol Rep*. 2013;29:585-594.
- Niess H, Camaj P, Renner A, Ischenko I, Zhao Y, Krebs S, Mysliwietz J, Jäckel C, Nelson PJ, Blum H, Jauch KW, Ellwart JW, Bruns CJ. Side population cells of pancreatic cancer show characteristics of cancer stem cells responsible for resistance and metastasis. *Target Oncol*. 2014:1-13.
- Niewerth D, Jansen G, Riethoff LFV, Meerloo J van, Kale AJ, Moore BS, Assaraf YG, Anderl JL, Zweegman S, Kaspers GJ, Cloos J. Antileukemic Activity and Mechanism of Drug Resistance to the Marine *Salinispora tropica* Proteasome Inhibitor Salinosporamide A (Marizomib). *Mol Pharmacol*. 2014;86:12-19.
- Noatynska A, Tavernier N, Gotta M, Pintard L. Coordinating cell polarity and cell cycle progression: what can we learn from flies and worms? *Open Biol*. 2013;3:130083.
- Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, Capaccioli S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res*. 2009;59:365-378.
- Norum JH, Andersen K, Sørli T. Lessons learned from the intrinsic subtypes of breast cancer in the quest for precision therapy. *Br J Surg*. 2014;101:925-938.
- Nowak JZ. Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids-derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on age-related macular degeneration. *Pharmacol Rep*. 2013;65:288-304.

- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194:23-28.
- Nunes T, Bernardazzi C, de Souza HS. Cell Death and Inflammatory Bowel Diseases: Apoptosis, Necrosis, and Autophagy in the Intestinal Epithelium. *BioMed Res Int*. 2014;2014:e218493.
- Nwabo Kamdje AH, Muller JM, Lukong KE. Signaling pathways in breast cancer: Therapeutic targeting of the microenvironment. *Cell Signal*. 2014;26:2843-2856.
- Olivier M. TP53 somatic mutations: prognostic and predictive value in human cancers. En Hainaut P, Olivier M, Wiman KG (Eds.). *p53 in the Clinics*. New York; Springer. 2013;127-146.
- Orian-Rousseau V. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Eur. J. Cancer*. 2010; 46: 1271-1277.
- Paduch R. Theories of cancer origin. *Eur J Cancer Prev*. 2014;1.
- Pallis AG, Syrigos KN. Lung cancer in never smokers: Disease characteristics and risk factors. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88:494-503.
- Papanastasopoulos P. Advantages and disadvantages of targeting the c-erbB family of receptors in cancer treatment: a review. *Biol Med*. 2014;6:2.
- Parise CA, Caggiano V. Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers. *J Cancer Epidemiol*. 2014; 2014: e469251.
- Park HB, Kwon HC, Lee CH, Yang HO. Glionitrin A, an antibiotic-antitumor metabolite derived from competitive interaction between abandoned mine microbes. *J Nat Prod*. 2009;72:248-252.
- Passant H, Borley A, Adjuvant treatment for breast cancer. *Sur Oxf*. 2013;31:37-40.
- Patani N, Martin LA, Dowsett M. Biomarkers for the clinical management of breast cancer: International perspective. *Int J Cancer* 2013;133:1-13.
- Pathania D, Sechi M, Palomba M, Sanna V, Berrettini F, Sias A, Taheri L, Neamati N. Design and discovery of novel quinazolinone-based redox modulators as therapies for pancreatic cancer. *Biochim Biophys*. 2014;1840:332-343.

- Pathmanathan N, Balleine RL. Ki67 and proliferation in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2013;66:512-516.
- Paul A, Paul S. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2014;19:605-618.
- Paul I. Apoptosis block as a barrier to effective therapy in non small cell lung cancer. *World J Clin Oncol.* 2014;5:588-594.
- Perez-Sayans M, Suarez-Penaranda JM, Gayoso-Diz P, Barros-Angueira F, Gandara-Rey JM, Garcia-Garcia A. The role of p21Waf1/CIP1 as a Cip/Kip type cell-cycle regulator in oral squamous cell carcinoma (Review). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013;18:e219-e225.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen 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.* 2000;406:747-752.
- Petek B, Jones R. PM00104 (Zalypsis®): A Marine Derived Alkylating Agent. *Molecules.* 2014;19:12328-12335.
- Pfaff KL, King RW. Determinants of Human Cyclin B1 Association with Mitotic Chromosomes. *PLoS ONE* 2013;8:e59169.
- Pieme CA, Guru SK, Bathelemy N, Jeanne N, Bhushan S, Murayama T, Saxena AK. Ethyl acetate fraction of *Garcinia epunctata* induces apoptosis in human promyelocytic cells (HL-60) through the ROS generation and G0/G1 cell cycle arrest: A bioassay-guided approach. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013;36:865-874.
- Pinto CA, Widodo E, Waltham M, Thompson EW. Breast cancer stem cells and epithelial mesenchymal plasticity-implications for chemoresistance. *Cancer Lett.* 2013;341:56-62.
- Polager S, Ginsberg D. p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:738-748.
- Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:265-273.

-
- Pomerantz MM, Freedman ML. The genetics of cancer risk. *Cancer J*. 2011;17:416-422.
- Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*. 2005;65:5506-5511.
- Poon IKH, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:166-180.
- Porter PL. Global trends in breast cancer incidence and mortality. *Salud Pública México*. 2009;51:s141-s146.
- Powers J, Stopfer JE. Risk Assessment, Genetic Counseling, and Clinical Care for Hereditary Breast Cancer. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2014;43:361-373.
- Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. 2008;88:1243-1276.
- Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12: R68.
- Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011;5:5-23.
- Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med*. 2010;16:107-121.
- Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitman JS, Buttyan R. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis *in vitro* and confers resistance to androgen depletion *in vivo*. *Cancer Res*. 1995;55:4438-4445.
- Rahman MA, Sultan MT, Islam MR. Apoptosis and cancer: insights molecular mechanisms and treatments. *Int J Biomol Biomed*. 2012;2:1-16.
- Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasaiah U, Gopas J, Nishigaki I. Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta*. 2014;436:332-347.

- Ramanathan B, Jan KY, Chen CH, Hour TC, Yu HJ, Pu YS. Resistance to paclitaxel is proportional to cellular total antioxidant capacity. *Cancer Res.* 2005;65:8455-8460.
- Raza H, John A, Benedict S. Acetylsalicylic acid-induced oxidative stress, cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial dysfunction in human hepatoma HepG2 cells. *Eur J Pharmacol.* 2011;668:15-24.
- Rea D, Tomlins A, Francis A. Time to stop operating on breast cancer patients with pathological complete response? *Eur J Surg Oncol.* 2013;39:924-930.
- Reddy LR, Saravanan P, Corey EJ. A simple stereocontrolled synthesis of Salinosporamide A. *J Am Chem Soc.* 2004;126:6230-6231.
- Redondo M. Bcl-2, an Antiapoptotic Gene Indicator of Good Prognosis in Breast Cancer: The Paradox. *J. Carcinog Mutagen.* 2013;4:134.
- Reynolds P. Smoking and Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2013;18:15-23.
- Rhind N, Russell P. Signaling Pathways that Regulate Cell Division. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4:a005942.
- Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitão D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, Milanezi F, Schmitt F, Paredes J. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol.* 2011;64:937-946.
- Ridge CA, McErlean AM, Ginsberg MS. Epidemiology of Lung Cancer. *Semin. Interv Radiol.* 2013;30:93-98.
- Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene.* 2007;26:3291-3310.
- Robles-Fernández I, Rodríguez-Serrano F, Álvarez PJ, Ortiz R, Rama AR, Prados J, Melguizo C, Álvarez-Manzaneda E, Aránega A. Antitumor properties of natural compounds and related molecules. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* 2013;8:203-215.
- Roll JD, Rivenbark AG, Sandhu R, Parker JS, Jones WD, Carey LA, Livasy CA, Coleman WB. Dysregulation of the epigenome in triple-negative breast

- cancers: Basal-like and claudin-low breast cancers express aberrant DNA hypermethylation. *Exp Mol Pathol*. 2013;95:276-287.
- Romero Q, Bendahl P-O, Fernö M, Grabau D, Borgquist S. A novel model for Ki67 assessment in breast cancer. *Diagn Pathol*. 2014;9:118.
- Rosenberg L, Zhang Y, Coogan PF, Strom BL, Palmer JR. A case-control study of oral contraceptive use and incident breast cancer. *Am J Epidemiol*. 2009;169:473-479.
- Rozenberg S, Vandromme J, Antoine C. Postmenopausal hormone therapy: risks and benefits. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9:216-227.
- Russnes HG, Navin N, Hicks J, Borresen-Dale AL. Insight into the heterogeneity of breast cancer through next-generation sequencing. *J Clin Invest*. 2011;121:3810-3818.
- Russo J. Prevention of Breast Cancer Could Be a Consequence of Pregnancy: A Review. *J Gen Pract*. 2014;2:4.
- Russo J, Balogh GA, Heulings R, Mailo DA, Moral R, Russo PA, Sheriff F, Vanegas J, Russo IH. Molecular basis of pregnancy-induced breast cancer protection. *Eur J Cancer Prev*. 2006;15:306-342.
- Rustin GJ, Shreeves G, Nathan PD, Gaya A, Ganesan TS, Wang D, Boxall J, Poupard L, Chaplin DJ, Stratford MR, Balkissoon J, Zweifel M. A Phase Ib trial of CA4P (combretastatin A-4 phosphate), carboplatin, and paclitaxel in patients with advanced cancer. *Br J Cancer*. 2010;102:1355-1360.
- Saeidnia S, Abdollahi M. Antioxidants: friends or foe in prevention or treatment of cancer: the debate of the century. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;271:49-63.
- Sainz RM, Lombo F, Mayo JC. Radical decisions in cancer: redox control of cell growth and death. *Cancers*. 2012;4:442-474.
- Salazar R, Jones RJ, Oaknin A, Crawford D, Cuadra C, Hopkins C, Gil M, Coronado C, Soto-Matos A, Cullell-Young M, Iglesias Dios JL, Evans TR. A phase I and pharmacokinetic study of elisidepsin (PM02734) in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;70:673-681.

-
- Saleh EM, El-Awady RA, Anis N. Predictive markers for the response to 5-fluorouracil therapy in cancer cells: Constant-field gel electrophoresis as a tool for prediction of response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Oncol Lett.* 2013;5:321-327.
- Salnikov AV, Bretz NP, Perne C, Hazin J, Keller S, Fogel M, Herr I, Schlange T, Moldenhauer G, Altevogt P. Antibody targeting of CD24 efficiently retards growth and influences cytokine milieu in experimental carcinomas. *Br J Cancer.* 2013;108:1449-1459.
- Samuel ELG, Duong MT, Bitner BR, Marcano DC, Tour JM, Kent TA. Hydrophilic carbon clusters as therapeutic, high-capacity antioxidants. *Trends Biotechnol.* 2014; 32:501-505.
- Sánchez A, Garrido M, Abdulkader I, Gude F, León L, Ruibal Á. La expresión inmunohistoquímica de ciclina B1 conlleva mayores valores de SUV en la 18F-FDG-PET de pacientes con carcinomas no microcíticos de pulmón. Primeros resultados. *Rev Esp Med Nucl.* 2009;28:63-65.
- Sánchez DJ. *Biología celular y molecular.* México D.F: Alfil. 2006.
- Sánchez MJ, Payer T, Angelis RD, Larrañaga N, Capocaccia R, Martinez C. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981–2012. *Ann Oncol.* 2010; 21:iii30-iii36.
- Sankari SL, Masthan KMK, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M. Apoptosis in cancer--an update. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13:4873-4878.
- Santamaria D, Ortega S. Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. *Front Biosci.* 2006;11:1164-1188.
- Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene.* 2009;28:2925-2939.
- Sausville EA, Longo DL. Principios del tratamiento del cáncer. En Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J (Eds.). *Harrison: principios de medicina interna.* México: McGraw-Hill. 2012;689-711.
-

- Sayin VI, Ibrahim MX, Larsson E, Nilsson JA, Lindahl P, Bergo MO. Antioxidants Accelerate Lung Cancer Progression in Mice. *Sci Transl Med.* 2014;6:221ra15.
- Schmidt MM, Powers KJ. Breast Imaging: Screening and Evaluation. *Clin Obstet Gynecol.* 2011;54:103-109.
- Shah D, Mahajan N, Sah S, Nath SK, Paudyal B. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci.* 2014;21:23.
- Sharma T, Dhingra R, Singh S, Sharma S, Tomar P, Malhotra M, Bhardwaj TR. Aflibercept: A Novel VEGF Targeted Agent to Explore the Future Perspectives of Anti-Angiogenic Therapy for the Treatment of Multiple Tumors. *Mini Rev Med Chem.* 2013;13:530-540.
- Sheng Q, Liu J. The therapeutic potential of targeting the EGFR family in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer.* 2011;104:1241-1245.
- Sheppard KE, McArthur GA. The cell-cycle regulator CDK4: an emerging therapeutic target in melanoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19:5320-5328.
- Sheri A, Johnston S. New developments and future directions in systemic therapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2013;25:117-126.
- Shortt J, Johnstone RW. Oncogenes in Cell Survival and Cell Death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4:a009829.
- Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. En Sies H (Ed.). *Oxidative Stress.* London; Academic Press Inc. 1985;1-7.
- Singh B, Guru SK, Kour S, Jain SK, Sharma R, Sharma PR, Singh SK, Bhushan S, Bharate SB, Vishwakarma RA. Synthesis, antiproliferative and apoptosis-inducing activity of thiazolo [5,4-d]pyrimidines. *Eur J Med Chem.* 2013;70:864-874.
- Skidan I, Steiniger SCJ. *In vivo* models for cancer stem cell research: a practical guide for frequently used animal models and available biomarkers. *J Physiol Pharmacol.* 2014;65:157-169.
- Smith RA, Duffy SW, Tabár L. Breast cancer screening: the evolving evidence. *Oncology (Williston Park).* 2012;26:471-475, 479-481, 485-486.

- Smit MA, Peeper DS. Epithelial-mesenchymal transition and senescence: two cancer-related processes are crossing paths. *Aging*. 2010;2:735-741.
- Sobin L, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. Hoboken: Wiley-Blackwell. 2009.
- Song A, Ye J, Zhang K, Sun L, Zhao Y, Yu H. Lentiviral Vector-Mediated siRNA Knockdown of c-MYC: Cell Growth Inhibition and Cell Cycle Arrest at G2/M Phase in Jijoye Cells. *Biochem Genet*. 2013;51:603-617.
- Southam CM, Brunschwig A. Quantitative studies of autotransplantation of human cancer. Preliminary report. *Cancer*. 1961;14:971-978.
- Steinauer K, Huang DJ, Eppenberger-Castori S, Amann E, Güth U. Bone metastases in breast cancer: Frequency, metastatic pattern and non-systemic locoregional therapy. *J Bone Oncol*. 2014;3:54-60.
- Steinestel K, Eder S, Schrader AJ, Steinestel J. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Transl Med*. 2014;3:17.
- Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, Smith C. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:9118-9123.
- Stuart-Harris R, Davis A. Optimal adjuvant endocrine therapy for early breast cancer. *Womens Health (Lond Engl)*. 2010;6:383-398.
- Su Y, Pan L. Identification of Logic Relationships between Genes and Subtypes of Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* 2014;9:e94644.
- Sun W, Gaykalova DA, Ochs MF, Mambo E, Arnaoutakis D, Liu Y, Loyo M, Agrawal N, Howard J, Li R, Ahn S, Fertig E, Sidransky D, Houghton J, Buddavarapu K, Sanford T, Choudhary A, Darden W, Adai A, Latham G, Bishop J, Sharma R, Westra WH, Hennessey P, Chung CH, Califano JA. Activation of the NOTCH pathway in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2014;74:1091-1104.
- Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncol*. 2004;5:27-36.
- Swinney DC, Anthony J. How were new medicines discovered? *Nat. Rev. Drug Discov*. 2011;10:507-519.

- Tacar O, Dass CR. Doxorubicin-induced death in tumour cells and cardiomyocytes: is autophagy the key to improving future clinical outcomes?: Doxorubicin-induced autophagy. *J Pharm Pharmacol*. 2013;65:1577-1589.
- Tait JF. Imaging of Apoptosis. *J Nucl Med*. 2008;49:1573-1576.
- Takebe N, Ivy SP. Controversies in cancer stem cells: targeting embryonic signaling pathways. *Clin. Cancer Res*. 2010;16:3106-3112.
- Talbot LJ, Bhattacharya SD, Kuo PC. Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *Int J Biochem Mol Biol*. 2012;3:117-136.
- Talluri S, Dick FA. Regulation of transcription and chromatin structure by pRB: Here, there and everywhere. *Cell Cycle* 2012;11:3189-3198.
- Tanaka H, Nakamura M, Kameda C, Kubo M, Sato N, Kuroki S, Tanaka M, Katano M. The Hedgehog signaling pathway plays an essential role in maintaining the CD44+CD24-/low subpopulation and the side population of breast cancer cells. *Anticancer Res*. 2009;29:2147-2157.
- Tang L, Wang Y, Strom A, Gustafsson JÅ, Guan X. Lapatinib induces p27(Kip1)-dependent G₁ arrest through both transcriptional and post-translational mechanisms. 2013;12:2665-2674.
- Tarraga, Albero J, Montes J. Primary and Secondary Prevention of Colorectal Cancer. *Clin Med Insights Gastroenterol*. 2014;7:33-46.
- Tateishi Y, Matsumoto A, Kanie T, Hara E, Nakayama K, Nakayama KI. Development of mice without Cip/Kip CDK inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;427:285-292.
- Tavassoli FA, Devilee P. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC. 2003.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:231-241.
- Thomas S, Harding M, Smith SC, Overdevest JB, Nitz MD, Frierson HF, Tomlins SA, Kristiansen G, Theodorescu D. CD24 is an effector of HIF-1 driven primary tumor growth and metastasis. *Cancer Res*. 2012;72:5600-5612.

- Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21:440-446.
- Torres G, Echavarría I, Lobo M, Márquez-Rodas I, Martín M. Cyclin Kinase Inhibitors in Breast Cancer: From Bench to Bedside. *Curr Breast Cancer Rep*. 2014;6:79-87.
- Trosko JE. Review paper: cancer stem cells and cancer nonstem cells: from adult stem cells or from reprogramming of differentiated somatic cells. *Vet Pathol*. 2009;46:176-193.
- Tsang JYS, Hui S-W, Ni Y-B, Chan SK, Yamaguchi R, Kwong A, Law BK, Tse GM. Lymphocytic infiltrate is associated with favorable biomarkers profile in HER2-overexpressing breast cancers and adverse biomarker profile in ER-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;143:1-9.
- Tsang JYS, Ni YB, Chan SK, Yamaguchi R, Tanaka M, Tan PH, Tse GM. Increased lymphocytic infiltration in breast cancer correlated with molecular subtypes and HER2 gene amplification. *Histopathology* 2013; 62:963-965.
- Tsukamoto AS, Grosschedl R, Guzman RC, Parslow T, Varmus HE. Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. *Cell* 1988;55:619-625.
- Tu WB, Helander S, Pilstål R, Hickman KA, Lourenco C, Jurisica I, Raught B, Wallner B, Sunnerhagen M, Penn LZ. Myc and its interactors take shape. *Biochim Biophys Acta*. 2014.
- Uluer ET, Aydemir I, Inan S, Ozbilgin K, Vatansever HS. Effects of 5-fluorouracil and gemcitabine on a breast cancer cell line (MCF-7) via the JAK/STAT pathway. *Acta Histochem*. 2012;114:641-646.
- Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Koutsilieris M, Papavassiliou AG. Colorectal Cancer Stem Cells. *Stem Cells*. 2012;30:363-371.
- Valle L. Genetic predisposition to colorectal cancer: Where we stand and future perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014;20:9828-9849.

- Van Kesteren C, de Vooght MMM, López-Lazaro L, Mathot RAA, Schellens JHM, Jimeno JM, Beijnen JH. Yondelis(R) (trabectedin, ET-743): the development of an anticancer agent of marine origin. *Anti-Cancer Drugs*. 2003;14:487-502.
- Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10:671-684.
- Velasco-Velázquez MA, Homsí N, De La Fuente M, Pestell RG. Breast cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44:573-577.
- Venero JL, Burguillos MA, Joseph B. Caspases Playing in the Field of Neuroinflammation: Old and New Players. *Dev Neurosci*. 2013;35:88-101.
- Venkataraman K, Khurana S, Tai T. Oxidative Stress in Aging-Matters of the Heart and Mind. *Int J Mol Sci*. 2013;14:17897-17925.
- Vera-Ramirez L, Ramirez-Tortosa MC, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa CL, Granados-Principal S, Lorente JA, Quiles JL. Impact of Diet on Breast Cancer Risk: A Review of Experimental and Observational Studies. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013;53:49-75.
- Vera-Ramirez L, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC, Ramirez-Tortosa CL, Granados-Principal S, Lorente JA, Quiles JL. Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011;80:347-368.
- Verga Falzacappa MV, Ronchini C, Reavie LB, Pelicci PG. Regulation of self-renewal in normal and cancer stem cells. *FEBS J*. 2012;279:3559-3572.
- Vicente-Dueñas C, Romero-Camarero I, Cobaleda C, Sánchez-García I. Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm. *EMBO J*. 2013;32:1502-1513.
- Virchow R: Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Berlin: August Hirschwald. 1858.
- Virtamo J, Taylor PR, Kontto J, Männistö S, Utriainen M, Weinstein SJ, Huttunen J, Albanes D. Effects of α -tocopherol and β -carotene supplementation on cancer incidence and mortality: 18-Year postintervention follow-up of the Alpha-

- Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Int J Cancer*. 2014;135:178-185.
- Visvader JE. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev*. 2009;23:2563-2577.
- Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:755-768.
- Vriens BEPJ, Aarts MJB, de Vries B, van Gastel SM, Wals J, Smilde TJ, van Warmerdam LJ, de Boer M, van Spronsen DJ, Borm GF, Tjan-Heijnen VC. Doxorubicin/cyclophosphamide with concurrent versus sequential docetaxel as neoadjuvant treatment in patients with breast cancer. *Eur J Cancer*. 2013;49:3102-3110.
- Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch*. 2014;465:1-14.
- Waksman SA, Woodruff HB. *Actinomyces antibioticus*, a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. *J Bacteriol*. 1941;42:231-249.
- Wang YC, Yo YT, Lee HY, Liao YP, Chao TK, Su PH, Lai HC. ALDH1-bright epithelial ovarian cancer cells are associated with CD44 expression, drug resistance, and poor clinical outcome. *Am J Pathol*. 2012;180:1159-1169.
- Wang Y, Ma W, Zheng W. Deguelin, a novel anti-tumorigenic agent targeting apoptosis, cell cycle arrest and anti-angiogenesis for cancer chemoprevention. *Mol Clin Oncol*. 2013;1:215-219.
- Wang Y, Zhou BP. Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Progression and Metastasis. *Chin J Cancer*. 2011;30:603-611.
- Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956;124:269-270.
- Warfel NA, El-Deiry WS. p21WAF1 and tumorigenesis: 20 years after. *Curr Opin Oncol*. 2013;25:52-58.
- Watson J. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open Biol*. 2013;3:120144.

- Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer* 2010;17:R245-R262.
- Weis MC, Avva J, Jacobberger JW, Sreenath SN. A data-driven, mathematical model of mammalian cell cycle regulation. *PLoS ONE*. 2014;9:e97130.
- Wesierska-Gadek J, Gueorguieva M, Wojciechowski J, Horky M. Cell cycle arrest induced in human breast cancer cells by cyclin-dependent kinase inhibitors: a comparison of the effects exerted by roscovitine and olomoucine. *Pol J Pharmacol*. 2004;56:635-641.
- Welsch U. *Histología*. México: Médica Panamericana. 2014.
- Wesolowski R, Ramaswamy B. Gene Expression Profiling: Changing Face of Breast Cancer Classification and Management. *Gene Expr*. 2011;15:105-115.
- Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *J Pathol*. 2012;226:352-364.
- Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. *Exp Oncol*. 2012;34:255-262.
- Wolgemuth D, Manterola M, Vasileva A. Role of cyclins in controlling progression of mammalian spermatogenesis. *Int J Dev Biol*. 2013;57:159-168.
- Wong FC, Woo CC, Hsu A, Tan BKH. The Anti-Cancer Activities of Vernonia amygdalina Extract in Human Breast Cancer Cell Lines Are Mediated through Caspase-Dependent and p53-Independent Pathways. *PLoS ONE*. 2013;8:e78021.
- Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30:87.
- Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L. Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res*. 2008;10:R10.
- Wu W. Patents related to cancer stem cell research. *Recent Pat DNA Gene Seq*. 2010;4:40-45.
- Xercavin J, Córdoba O, Rubio IT. Cáncer de mama. Epidemiología y factores de riesgo. Prevención primaria. Diagnóstico precoz. Lesiones no palpables. Clínica y desarrollo. Clasificación TNM. Biología del carcinoma mamario

- (marcadores). En Cabero i Roura L, Cabrillo Rodríguez E, Bajo Arenas JM, (Eds.). Tratado de ginecología y obstetricia. Madrid: Médica Panamericana. 2012;829-840.
- Xu XL, Ling ZQ, Chen SZ, Li B, Ji WH, Mao WM. The impact of E-cadherin expression on the prognosis of esophageal cancer: a meta-analysis. *Dis Esophagus*. 2014;27:79-86.
- Xynos ID, Tanna N, Patten DK, Palmieri C. Prior exposure to chemotherapy: a marker of sensitivity and selection for antiangiogenic therapy in breast cancer? *Expert Rev Anticancer Ther*. 2014;14:163-172.
- Yago L, Noguero MR, Sancho B, Sanz C, Gallego M, Hernández JM. Influencia de las características tumorales del cáncer de mama en mujeres menores de 35 años en el pronóstico de la enfermedad. *Prog Obstet Ginecol*. 2010;53:431-438.
- Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1845:84-89.a
- Yang J, Chen L, Kong X, Huang T, Cai YD. Analysis of Tumor Suppressor Genes Based on Gene Ontology and the KEGG Pathway. *PLoS ONE*. 2014;9:e107202.b
- Yang JQ, Liu HX, Liang Z, Sun YM, Wu M. Over-expression of p53, p21 and Cdc2 in histologically negative surgical margins is correlated with local recurrence of laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7:4295-4302.c
- Yasutis KM, Kozminski KG. Cell cycle checkpoint regulators reach a zillion. *Cell Cycle*. 2013;12:1501-1509.
- Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*. 2014;5:412-424.
- Yin Y, Zeng K, Wu M, Ding Y, Zhao M, Chen Q. The Levels of Ki-67 Positive are Positively Associated with Lymph Node Metastasis in Invasive Ductal Breast Cancer. *Cell Biochem Biophys*. 2014;70:1145-1151.
- Yoon MK, Mitrea DM, Ou L, Kriwacki RW. Cell cycle regulation by the intrinsically disordered proteins p21 and p27. *Biochem Soc Trans*. 2012;40:981-988.

- Yoshida K, Miki Y. The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 2010;101:831-835.
- Yousefi R, Khalafi-Nezhad A, Soltani Rad MN, Behrouz S, Panahi, F, Esmaili M, Ghaffari SM, Niazi A, Moosavi-Movahedi AA. Structure–cytotoxicity relationship of a novel series of miconazole-like compounds. *Med Chem Res.* 2012;21:1921-1928.
- Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44:2144-2151.
- Zabalegui N, Zárate R, Catalán V, Honorato B, García F, Bandrés E, Hernández JL, García-Foncillas J. Susceptibilidad genética en cáncer de colon. *Rev Med Univ Navar.* 2003;47:20-23.
- Zamora, P, Espinosa, E, Redondo, A. Cáncer de mama localizado. En *Oncología Clínica. Momento Medico Iberoamericana.* 2010;341-366.
- Zhan JF, Chen LH, Yuan YW, Xie GZ, Sun AM, Liu Y, Chen ZX. STAT1 promotes radioresistance of CD44(+)/CD24(-/low) cells in breast cancer. *Exp Biol Med (Maywood).* 2011;236:418-422.
- Zhang Y, Zhang H, Wang X, Wang J, Zhang X, Zhang Q. The eradication of breast cancer and cancer stem cells using octreotide modified paclitaxel active targeting micelles and salinomycin passive targeting micelles. *Biomaterials.* 2012;33:679-691.
- Zhao W, Zhou SF, Zhang ZP, Xu GP, Li XB, Yan JL. Gambogic acid inhibits the growth of osteosarcoma cells *in vitro* by inducing apoptosis and cell cycle arrest. *Oncol Rep.* 2011;25:1289-1295.
- Zhong Z, Dang Y, Yuan X, Guo W, Li Y, Tan W, Cui J, Lu J, Zhang Q, Chen X, Wang Y. Furanodiene, a Natural Product, Inhibits Breast Cancer Growth Both *in vitro* and *in vivo*. *Cell Physiol Biochem.* 2012;30:778-790.
- Zhou B, Shan H, Su Y, Xia K, Shao X, Mao W, Shao Q. The association of APE1 - 656T > G and 1349 T > G polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis based on 37 case-control studies. *BMC Cancer.* 2011;11:521.

- Zhou C, Steplowski TA, Dickens HK, Malloy KM, Gehrig PA, Boggess JF, Bae-Jump VL. Estrogen Induction of Telomerase Activity through Regulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Dependent Pathway in Human Endometrial Cancer Cells. *PLoS ONE*. 2013;8:e55730.
- Zhou Y. The Potential Biomedical Application of Cyclopeptides from Marine Natural Products. *Curr Org Chem*. 2014;18:918-924.
- Zhu Z, Hao X, Yan M, Yao M, Ge C, Gu J, Li J. Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133+CD44+ population in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2010;126:2067-2078.
- Zielinski RR, Eigl BJ, Chi KN. Targeting the apoptosis pathway in prostate cancer. *Cancer J*. 2013;19:79-89.
- Zimonjic DB, Popescu NC. Role of DLC1 tumor suppressor gene and MYC oncogene in pathogenesis of human hepatocellular carcinoma: potential prospects for combined targeted therapeutics (review). *Int J Oncol*. 2012;41:393-406.
- Zinzi L, Capparelli E, Cantore M, Contino M, Leopoldo M, Colabufo NA. Small and innovative molecules as new strategy to revert MDR. *Front Oncol*. 2014;4:2.
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev*. 2014;94:909-950.
- Zujewski J, Liu ET. The 1998 St. Gallen's Consensus Conference: an Assessment. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:1587-1589.