

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA - CSIC

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN DE DETERMINANTES GENÉTICOS Y
MOLECULARES DE LA EVOLUCIÓN Y LA RESPUESTA A LA
QUIMIOTERAPIA DEL CÁNCER DE MAMA MEDIANTE EL
ANÁLISIS DE FENOTIPOS INTERMEDIOS**

MENCIÓN “DOCTORADO INTERNACIONAL”

ADRIÁN BLANCO GÓMEZ

Salamanca, 2017

JESÚS PÉREZ LOSADA, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado **“IDENTIFICACIÓN DE DETERMINANTES GENÉTICOS Y MOLECULARES DE LA EVOLUCIÓN Y LA RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA DEL CÁNCER DE MAMA MEDIANTE EL ANÁLISIS DE FENOTIPOS INTERMEDIOS”**, que presenta el doctorando D. Adrián Blanco Gómez, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca, y reúne, a su juicio, las condiciones de originalidad y rigor científico necesarias para ser presentado ante el correspondiente Tribunal y optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a 12 de julio de 2017.



Fdo.: Dr. D. Jesús Pérez Losada

La investigación en nuestro laboratorio ha estado financiada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), el Ministerio de Economía y Competitividad (MICINN) (PLE2009-119, SAF2014-56989-R), el Instituto de Salud Carlos III (PI07/0057, PI10/00328, PIE14/00066), Junta de Castilla y León (CSI034U13, BIO/SA31/15), "Proyectos Integrados IBSAL 2015" (IBY15/00003) y la "Fundación Sandra Ibarra de Solidaridad frente al Cáncer".

Durante el transcurso de este trabajo, he sido beneficiario de una ayuda destinada a financiar la contratación predoctoral de personal investigador de la Junta de Castilla y León cofinanciada por el Fondo Social Europeo (ORDEN EDU/1084/2012); y de una beca con cargo a la investigación (Contrato Art.83 LOU (GRIFOLS-USAL)) con referencia LBNL y de un contrato para titulado superior financiado por la asociación "We Can Be Heroes".

AGRADECIMIENTOS

Quisiera aprovechar la ocasión para expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido, de una u otra manera, a que este trabajo haya sido posible.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Jesús Pérez Losada, que me acogiera durante mi infancia (científicamente hablando) y me permitiera unirme a su equipo, donde se ha esforzado por proporcionarme una formación “holística”. No tengo más que palabras de admiración hacia él, tanto como científico como a nivel humano. Para mí no ha sido sólo mi director de tesis, sino mi maestro. Jesús, gracias por tu trabajo diario que hace que la gente a tu alrededor desee esforzarse para estar a la altura, por tus consejos y dirección, por hacerme sentir valorado, y por el aporte ocasional de libros “repetidos”.

Muchas gracias a todos mis compañeros del laboratorio 7, a los que me recibieron con los brazos abiertos cuando llegué, y a los que han ido viniendo después. A Andrés, que junto con Jesús ha formado el binomio determinante de mi formación. Es la persona de la que más he aprendido sobre ciencia. Admiro no sólo todo lo que sabe, sino también la facilidad y la generosidad con la que transmite ese conocimiento. Debo agradecerle, además, sus comentarios sobre este trabajo y todos sus consejos. A Sonia, que es todo un ejemplo de energía y motivación, por ser tan generosa con su tiempo, incluso cuando no lo tenía, para enseñarme y ayudarme. Fue un placer trabajar con ella y aprender de su forma eficiente y crítica de hacer las cosas. Gracias a la generación anterior de predoctorales, María y Lourdes, por abrir el camino a los que hemos llegado después, por ayudarme a dar mis primeros pasos en el laboratorio, y por estar siempre disponibles para echarme una mano cuando lo he necesitado. Gracias también a Mariluz e Isa, cuya ayuda con los ratones ha sido esencial para realizar este trabajo. A Javier, por mostrarme la investigación desde una perspectiva más clínica. Quisiera dar las gracias a Luis por haberme iniciado en el mundo de R, y por ser ejemplo de lucha y superación. A Elena por su asesoramiento con la estadística en este tramo final y por estar siempre dispuesta a prestarme su ayuda, dentro y fuera del laboratorio. Gracias también a las nuevas generaciones que han ido llegando después de mí y que hacen que el futuro del laboratorio esté garantizado. Debo agradecer a Aurora, Milena, Roberto y Natalia el buen ambiente que impera en el laboratorio, los buenos ratos que hemos pasado y su ayuda con los experimentos. Son todos grandísimas personas y me siento muy afortunado de haber compartido este tiempo con ellos.

Al Dr. Ashok Venkitaraman del *MRC Cancer Unit* en Cambridge, por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio y permitirme ver otra manera de hacer

ciencia, y por sus consejos y asesoramiento. Gracias a todos los miembros de su laboratorio por sus sugerencias durante los seminarios y por su ayuda con los experimentos, especialmente al Dr. David Perera por su implicación con el proyecto y por asistirme en todo lo que necesité durante mi estancia.

Al Dr. Isidro Sánchez García, por sus buenos consejos y comentarios durante los seminarios y por el apoyo mostrado; y a todos los miembros de su laboratorio con los que he tenido el placer de coincidir. Al Dr. Dionisio Martín Zanca, sus observaciones y sugerencias, siempre acertadas e instructivas. Al Dr. Rafael Jiménez por su ayuda y comentarios en los seminarios. Al Dr. Rogelio González Sarmiento por su apoyo durante las etapas iniciales del laboratorio. Al Dr. Javier García Criado y a la Dra. Begoña García Cenador del Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, por su ayuda y asesoramiento con la cirugía de los ratones utilizados en este estudio. Al Departamento de Estadística de la Universidad de Salamanca, por su colaboración en parte del análisis de los resultados. Al Dr. Manuel Sánchez Martín y al Dr. Juan Luis García Hernández, por su colaboración y asesoramiento. Quiero mostrar mi agradecimiento también a todo el personal de los servicios del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca. Para este trabajo ha sido especialmente importante la labor de los servicios de Patología Molecular Comparada, de Citometría de Flujo y de Bioinformática.

Finalmente, quiero dar las gracias a mi familia por creer en mí y haberme apoyado de manera incondicional durante todo el proceso que me ha conducido hasta aquí. A mis padres por su esfuerzo para darme todas las oportunidades a su alcance para que yo pudiera elegir libremente mi propio camino. A mis hermanos Fran y José, por servirme de espejo en el que mirarme en los momentos de duda. Y a Rocío, por ayudarme a diseñar y maquetar esta tesis y, mucho más importante, por la alegría e ilusión que lleva allí donde va.

INTRODUCCIÓN	1
1. CÁNCER DE MAMA	3
1.1 Epidemiología e impacto del cáncer de mama.....	3
1.2 Susceptibilidad al cáncer de mama.....	5
1.2.1 Factores genéticos asociados al cáncer de mama familiar.....	5
1.2.2 Factores genéticos asociados al cáncer de mama esporádico.....	8
1.2.3 Otros factores de riesgo del cáncer de mama	9
1.2.3.1 Edad.....	9
1.2.3.2 Factores hormonales y reproductivos.....	10
1.2.3.3 Antecedentes familiares y personales	14
1.2.3.4 Factores geográficos y ambientales	14
1.3 Biología celular y molecular del cáncer de mama.....	15
1.3.1 Aspectos básicos de la morfología y fisiología mamaria.....	15
1.3.2 Características biológicas adquiridas por las células tumorales	16
1.3.2.1 Mantenimiento de la señal proliferativa	16
1.3.2.2 Resistencia a las señales inhibitoras de la proliferación.....	17
1.3.2.3 Evasión de la muerte celular	18
1.3.2.4 Inmortalidad replicativa	19
1.3.2.5 Inducción de la angiogénesis.....	20
1.3.2.6 Invasión y metástasis	20
1.3.2.7 Inestabilidad genómica	21
1.3.2.8 Inflamación.....	23
1.3.3 Vías de señalización principales en el cáncer de mama.....	23
1.3.3.1 Vía del factor de crecimiento de tipo insulina	24
1.3.3.2 Vía del receptor de factor de crecimiento epidérmico	24
1.3.3.3 Vía del factor de crecimiento fibroblástico	27
1.3.3.4 Ruta de PI3K/AKT/mTOR.....	27
1.3.3.5 Ruta de proteína kinasas activadas por mitógenos.....	28
1.3.3.6 Vía del receptor de estrógenos.....	30
1.3.3.7 Ruta de JAK/STAT.....	31
1.3.3.8 Vía de SFK.....	31
1.4 Clasificación del cáncer de mama.....	32
1.4.1 Tumores luminales A y B.....	32
1.4.2 Tumores enriquecidos en ERBB2.....	33
1.4.3 Tumores basales	33
1.5 Tratamiento farmacológico del cáncer de mama	34
1.5.1 Terapia hormonal.....	34
1.5.2 Quimioterapia con agentes citotóxicos.....	35
1.5.3 Terapias dirigidas	36
1.5.4 Resistencia al tratamiento	38

1.5.5 Variantes génicas de resistencia a quimioterapia	40
1.5.5.1 Variantes génicas de resistencia a docetaxel.....	40
1.5.5.2 Variantes génicas de resistencia a doxorrubicina.....	42
2. ENFERMEDADES DE GÉNESIS COMPLEJA Y HEREDABILIDAD PERDIDA	43
2.1 El problema de la heredabilidad perdida	43
2.2 Fenotipos intermedios de los rasgos complejos.....	45
2.3 Parte de la heredabilidad perdida de los rasgos complejos podría explicarse a través de los determinantes genéticos de los fenotipos intermedios.....	45
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	49
MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
1. MODELO EXPERIMENTAL.....	57
1.1 Cepas de ratón	57
1.2 Generación de la primera cohorte con heterogeneidad genética y fenotípica mediante retrocruce o backcross.....	58
1.3 Aoinjerto de tumores generados en la cohorte F1BX1 en receptores F1.....	59
1.4 Generación de la segunda cohorte con heterogeneidad genética y fenotípica mediante retrocruce o backcross.....	60
2. DETERMINACIÓN DE LOS PATOFENOTIPOS RELACIONADOS CON EL COMPORTAMIENTO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD	60
2.1 Determinación de los patofenotipos en condiciones de libre evolución de la enfermedad.....	60
2.2 Caracterización de la respuesta al tratamiento	61
2.2.1 Administración de quimioterapia	61
2.2.1.1 Grupos de tratamiento.....	61
2.2.1.2 Protocolo de tratamiento.....	62
2.2.2 Determinación de los fenotipos de respuesta al tratamiento	62
3. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS TUMORALES.....	65
3.1 Cirugía y obtención de biopsia tumoral.....	65
3.2 Necropsia.....	65
3.3 Procesamiento de los tumores de mama	66
4. PROTOCOLOS GENERALES	67
4.1 Extracción de DNA de tejidos.....	67
4.2 Extracción de RNA de tumores.....	67
4.3 Cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos	68
4.4 Extracción de proteína de tumores.....	68
4.5 Cuantificación de la concentración de proteínas.....	69
5. PROTOCOLOS ESPECÍFICOS	69
5.1 Detección del transgén MMTV-ErbB2/Neu mediante PCR.....	69
5.2 Genotipado de genoma completo de los ratones backcross F1BX1 y F1BX2	70
5.3 Determinación de la longitud telomérica mediante PCR cuantitativa.....	70

5.4 Cuantificación de la expresión del transgén mediante PCR cuantitativa	73
5.5 Análisis de las mutaciones en Erbb2/Neu presentes en el tumor.....	74
5.6 Cuantificación del marcador de proliferación Ki67 mediante inmunohistoquímica en tissue array.....	75
5.7 Cuantificación de subpoblaciones celulares mediante citometría de flujo	77
5.8 Determinación de los niveles de proteína mediante ELISA.....	79
5.9 Determinación de los niveles de proteína mediante Luminex.....	79
6. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	82
6.1 Análisis de la distribución de las variables	82
6.2 Análisis univariante y bivariante de las asociaciones ente variables	82
6.3 Análisis multivariante de las asociaciones ente variables.....	83
6.3.1 HJ-Biplot.....	83
6.4 Análisis de ligamiento genético.....	85
RESULTADOS	89
INTRODUCCIÓN A LOS RESULTADOS	91
1. DETERMINANTES MOLECULARES Y GENÉTICOS DE LA SUSCEPTIBILIDAD Y LIBRE EVOLUCIÓN DEL CÁNCER DE MAMA SIN TRATAMIENTO.....	95
1.1 Susceptibilidad y evolución del cáncer de mama en la cohorte F1BX1	95
1.2 Identificación de regiones genómicas asociadas a los patofenotipos.....	97
1.3 Fenotipos tumorales intermedios asociados con el comportamiento clínico del tumor.....	99
1.3.1 Asociación entre patofenotipos tumorales y mutación activadora de Erbb2/Neu.....	99
1.3.2 Asociación entre patofenotipos y vías de señalización tumorales	102
1.3.3 Asociación entre patofenotipos tumorales y composición celular del tumor	104
1.3.4 Asociación entre patofenotipos tumorales y otros marcadores de la biología tumoral	107
1.4 Identificación de regiones genómicas asociadas a los fenotipos tumorales intermedios.....	110
1.5 QTL comunes a patofenotipos y fenotipos intermedios tumorales.....	113
2. DETERMINANTES INTRÍNSECOS TUMORALES DE LA RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA	116
2.1 Crecimiento de los tumores trasplantados	116
2.2 Evaluación de la respuesta a la quimioterapia de los tumores trasplantados	119
2.2.1 Efecto del tratamiento sobre la dinámica de crecimiento tumoral.....	119
2.2.2 Clasificación de los tumores en grupos de respuesta.....	120
2.2.3 Efecto del fin del tratamiento sobre la dinámica de crecimiento tumoral.....	123
2.2.4 Efecto del tratamiento sobre las metástasis.....	125
2.2.5 Efecto del tratamiento sobre otros patofenotipos tumorales a tiempo de muerte.....	129
2.3 Identificación de regiones genómicas asociadas a la respuesta al tratamiento	129

2.4. Características intrínsecas tumorales asociadas con la respuesta al tratamiento.....	132
2.4.1 Asociación entre la mutación activadora de Erbb2/Neu presente en la población tumoral inicial y la respuesta al tratamiento	132
2.4.2 Asociación entre la respuesta al tratamiento y las vías de señalización en la población tumoral que inició el alotrasplante	134
2.4.3 Asociación entre respuesta al tratamiento y organización de la jerarquía epitelial de las células alotrasplantadas	136
2.4.4 Asociación entre respuesta al tratamiento y otros marcadores de la biología tumoral en el tumor de origen.....	138
2.5 Identificación de QTL comunes entre patofenotipos en la cohorte F1BX1, fenotipos intrínsecos tumorales y la respuesta al tratamiento del aloinjerto.....	140
2.5.1 Regiones genómicas comunes entre patofenotipos en el tumor de origen y la respuesta al tratamiento del aloinjerto	140
2.5.2 Regiones genómicas comunes entre fenotipos intrínsecos a las células tumorales y la respuesta al tratamiento del aloinjerto	142
3. DETERMINANTES INTRÍNSECOS Y EXTRÍNSECOS DE LA RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA.....	144
3.1 Patofenotipos previos al inicio del tratamiento.....	144
3.1.1 Aparición y crecimiento de tumores en las cohortes FVB, F1 y F1BX2.....	144
3.1.2 QTL relacionados con fenotipos previos al inicio del tratamiento	146
3.2. Respuesta al tratamiento de los tumores en la F1BX2	147
3.2.1 Efecto del tratamiento sobre la dinámica de crecimiento tumoral.....	147
3.2.2 Efecto de la retirada del tratamiento sobre la dinámica de crecimiento tumoral	150
3.2.3 Efecto del tratamiento sobre las metástasis.....	151
3.2.4 Efecto del tratamiento sobre otros fenotipos a tiempo final	152
3.3. Efecto del fondo genético sobre la respuesta al tratamiento.....	153
3.3.1. Respuesta al tratamiento en cepas genéticamente homogéneas con diferente fondo genético.....	154
3.3.2 Identificación de regiones genómicas asociadas a la respuesta al tratamiento.....	158
3.4. Estudio de la señalización tumoral como fenotipo intermedio de la respuesta al tratamiento en la cohorte F1BX2.....	162
3.4.1 Asociación entre señalización tumoral y fenotipos previos al tratamiento.....	165
3.4.2 Asociación entre señalización tumoral y fenotipos de respuesta al tratamiento...	166
3.5. QTL asociados a los niveles tumorales de proteínas de señalización.....	170
3.6. Regiones genómicas comunes entre señalización tumoral y respuesta al tratamiento	173
3.6.1. Regiones genómicas comunes entre señalización tumoral y respuesta a docetaxel.....	173
3.6.2. Regiones genómicas comunes entre señalización tumoral y respuesta a doxorubicina.....	175

3.6.3. Regiones genómicas comunes entre señalización tumoral y respuesta a la terapia combinada	176
3.7. Regiones genómicas comunes entre InResQTL y ResQTL.....	177
RESUMEN DE LOS RESULTADOS	180
DISCUSIÓN	187
1. DETERMINANTES MOLECULARES Y GENÉTICOS DE LA SUSCEPTIBILIDAD Y EVOLUCIÓN DEL CÁNCER DE MAMA SIN TRATAMIENTO.....	189
1.1 Caracterización de la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama en la población F1BX1 mediante los patofenotipos	189
1.2 Análisis de los fenotipos intermedios intratumorales	190
1.2.1 Mutaciones en Erbb2/Neu.....	190
1.2.2 Niveles de proteínas de señalización tumoral.....	191
1.2.3 Composición celular del tumor	193
1.2.4 Otros marcadores de la biología tumoral.....	195
1.3 QTL asociados a la variabilidad en los patofenotipos y en los fenotipos intermedios intrínsecos tumorales	196
2. DETERMINANTES INTRÍNSECOS TUMORALES DE LA RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA	199
2.1 Caracterización de la respuesta al tratamiento de los aloinjertos.....	199
2.1.1 Crecimiento de los aloinjertos.....	199
2.1.2 Efecto del tratamiento sobre la dinámica de crecimiento tumoral.....	200
2.1.3 Efecto del tratamiento sobre el desarrollo de metástasis en los aloinjertos.....	201
2.2 Relación entre fenotipos intrínsecos de las células tumorales trasplantadas y la respuesta al tratamiento de los aloinjertos.....	203
2.2.1 Asociaciones entre la respuesta al tratamiento y la mutación de Erbb2/Neu	203
2.2.2 Asociaciones entre la respuesta al tratamiento y los niveles de proteínas de señalización tumoral	205
2.2.3 Asociaciones entre la respuesta al tratamiento y la composición celular de la población que inició el aloinjerto	207
2.2.4 Asociaciones entre la respuesta al tratamiento y otros marcadores de la biología tumoral en la población que inició el aloinjerto	208
2.3 QTL intrínsecos tumorales asociados a variabilidad en la respuesta al tratamiento y a fenotipos intermedios	209
3. DETERMINANTES INTRÍNSECOS Y EXTRÍNSECOS DE LA RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA.....	211
3.1 Caracterización de la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama en la cohorte F1BX2.....	211
3.1.1 Efecto del fondo genético sobre la susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama.....	211
3.1.2 Respuesta al tratamiento en la cohorte F1BX2	212
3.1.2.1 Efecto del tratamiento sobre la dinámica de crecimiento tumoral	212
3.1.2.2 Efecto del tratamiento sobre el desarrollo de metástasis en la cohorte F1BX2	213

3.1.2.3 Toxicidad de la quimioterapia en la cohorte F1BX2	214
3.2 Respuesta al tratamiento en las cepas genéticamente homogéneas.....	216
3.3 Fenotipos intermedios de la respuesta al tratamiento en la cohorte F1BX2.....	217
3.3.1 Asociaciones entre fenotipos intermedios tumorales y patofenotipos antes del tratamiento en la cohorte F1BX2.....	217
3.3.2 Asociaciones entre fenotipos intermedios tumorales y la respuesta al tratamiento	220
3.3.2.1 Fenotipos intermedios tumorales asociadas a la respuesta a docetaxel	220
3.3.2.2 Fenotipos intermedios tumorales asociadas a la respuesta a doxorubicina	222
3.4 QTL asociados a variabilidad en la respuesta al tratamiento y a fenotipos intermedios	225
4. IDENTIFICACIÓN DE GENES PREVIAMENTE RELACIONADOS CON LA EFICACIA DEL DOCETAXEL Y LA DOXORRUBICINA EN LOS QTL ASOCIADOS A LA RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA	228
CONCLUSIONES	231
BIBLIOGRAFÍA	239
APÉNDICE	261
1. TABLAS SUPLEMENTARIAS	263
2. ÍNDICE DE FIGURAS	289
3. ÍNDICE DE TABLAS	293
4. ABREVIATURAS.....	295
SUMMARY	299

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer de mama

1.1 Epidemiología e impacto del cáncer de mama

El cáncer de mama es el tipo de tumor más frecuente en mujeres en todo el mundo, y el que produce un mayor número de muertes al año en esta población¹. En el año 2012 se registraron 1,67 millones de casos nuevos, y se estima que el número de muertes causadas por esta enfermedad fue de 522.000². Además, debe considerarse el gran impacto que genera, tanto en la vida de las pacientes a las que se diagnostica y su entorno familiar como en la sociedad general. Esto es debido a que es uno de los tipos de cáncer más frecuentes en mujeres en edad laboral, y a que su tratamiento genera un gran gasto sanitario. A pesar de estos datos, el cáncer de mama no es una enfermedad necesariamente terminal, y la relación entre mortalidad e incidencia es de 0,31, mucho más favorable que en otros tipos de cáncer con alta mortalidad, como el de páncreas y el de hígado en los que este parámetro toma valores de 0,98 y 0,95, respectivamente².

Según datos recogidos por el programa de *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER) del *National Cancer Institute* de los Estados Unidos, la incidencia del cáncer de mama en ese país aumentó un 30% entre los años 1975 y 2010. Este aumento se debe principalmente al incremento del 62% que ha habido en los casos diagnosticados de cáncer de mama localizado³, el cual coincide con la implementación de los programas de detección precoz a finales de los años 80⁴ (**Figura 1A**). Aunque existe cierta controversia al respecto, parte del aumento en la incidencia se atribuye al sobre-diagnóstico de tumores en estadios tempranos de la enfermedad que quizá nunca llegarían a progresar. Se piensa que esto es así porque ese aumento del diagnóstico de casos incipientes en los programas de prevención no ha venido acompañado de una disminución equivalente del número de casos en fases más avanzadas⁵. A pesar del posible efecto del sobre-diagnóstico en países desarrollados, la incidencia del cáncer de mama está aumentando en la mayoría de los países, tanto en países que históricamente han tenido alta incidencia, por ejemplo muchos países europeos, como en otros en los que era baja, como ocurre en varios países de América Latina, Asia y África⁶. En los primeros, la alta incidencia histórica de cáncer de mama se debe en gran parte a factores asociados con el desarrollo económico y la urbanización, como describiremos detalladamente más adelante. En cuanto al incremento en la incidencia observado en países en vías de desarrollo este es probablemente debido a la incorporación del modo de vida propio de los países desarrollados, que trae consigo estos factores de riesgo.

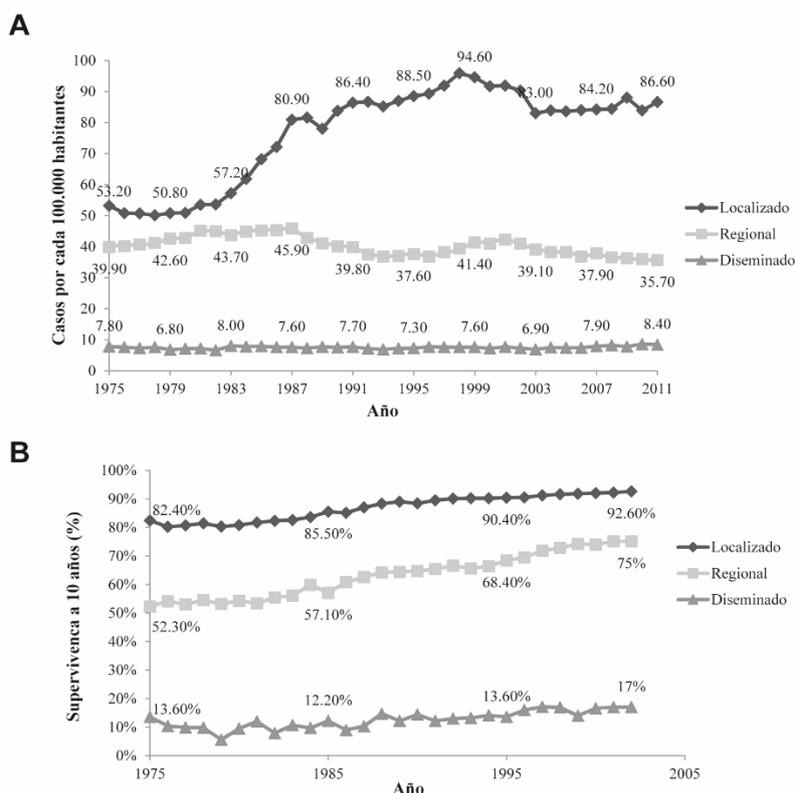


Figura 1. Incidencia y supervivencia del cáncer de mama. (A) Incidencia corregida por la edad. (B) Supervivencia a 10 años de cáncer de mama localizado, regional y diseminado en mujeres blancas en los Estados Unidos. Figura modificada de Narod et al. (2015)³.

Por otro lado, según datos del programa SEER, la supervivencia a 10 años aumentó un 28% en el periodo comprendido entre 1975 y 2002. Sin embargo, en el caso del cáncer de mama diseminado al diagnóstico, la supervivencia aumentó sólo entre 3 y 4 puntos porcentuales (**Figura 1B**). Aunque hay que tener en cuenta que estos datos no reflejan el efecto de los últimos avances en terapias dirigidas, lo cierto es que los progresos conseguidos hasta el momento en el tratamiento del cáncer de mama diseminado han sido discretos. Por ejemplo, el incremento en la supervivencia libre de enfermedad en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo con trastuzumab solo o combinado con diferentes protocolos de quimioterapia ha sido de 7 meses en el mejor de los casos⁷.

Todos estos datos ponen de manifiesto la necesidad de seguir trabajando para reducir la incidencia de la enfermedad, y para mejorar la evolución clínica una vez ésta ha sido diagnosticada. Para alcanzar estos objetivos, es fundamental comprender los factores que determinan las diferencias en susceptibilidad y evolución del cáncer de mama entre individuos, así como de los mecanismos por los que dichos factores actúan. El conocimiento profundo de estos mecanismos permitirá el desarrollo de nuevas estrategias preventivas.

1.2 Susceptibilidad al cáncer de mama

La variabilidad en la susceptibilidad individual al desarrollo del cáncer de mama, así como de cualquier enfermedad de génesis compleja, es consecuencia de las interacciones entre factores genéticos y ambientales. Respecto al componente genético, podemos diferenciar dos tipos de genes, según la intensidad de su efecto sobre esta susceptibilidad sea mayor o menor. En primer lugar, se han descrito un pequeño número de genes en los que la herencia de una variante mutada confiere un elevado riesgo a desarrollar la enfermedad. En contraposición, la mayoría de los genes que modifican la susceptibilidad tienen un efecto discreto sobre ésta. Teniendo en cuenta esta distinción, podemos clasificar el cáncer de mama en familiar y esporádico.

1.2.1 Factores genéticos asociados al cáncer de mama familiar

El cáncer de mama familiar o hereditario se debe a la herencia de variantes mutadas de genes que tienen un fuerte efecto sobre el riesgo a desarrollar cáncer de mama. Como consecuencia, los portadores de estas mutaciones tienen un alto riesgo de desarrollar la enfermedad, que además suele aparecer a edad temprana. Este tipo de cáncer de mama con un fuerte componente hereditario supone entre el 5% y el 10% de los casos totales; sin embargo, tan sólo el 5% de estos casos se explican por mutaciones en genes de alta penetrancia que se transmiten siguiendo un patrón de herencia autosómico dominante⁸. La baja frecuencia con que el elevado riesgo puede atribuirse a un único gen, pone de manifiesto que, incluso en estos casos en los que la contribución del componente genético es muy fuerte, la susceptibilidad al cáncer de mama es un fenotipo complejo resultado de la actividad de muchos genes modificadores. Los genes más frecuentemente mutados en el cáncer de mama familiar son *BRCA1* y *BRCA2*, aunque están emergiendo nuevos genes asociados al cáncer de mama familiar. A continuación, realizamos una breve revisión de estos genes.

- *BRCA1*: Es un gen supresor tumoral implicado en el mantenimiento de la estabilidad genómica, ya que participa en las vías de señalización de respuesta a daño al DNA^{9,10}. Codifica una proteína nuclear que interacciona con otros supresores tumorales, sensores de daño al DNA, y transductores de la señal, formando el complejo denominado *BRCA1-associated genome surveillance complex* o BASC¹¹. En mujeres, la herencia de variantes mutadas de *BRCA1* confiere un alto riesgo a desarrollar cáncer de mama y de ovario a edades tempranas. El riesgo de cáncer de mama a lo largo de la vida de portadoras de mutación es variable entre poblaciones, dependiendo de la mutación heredada, y de otros factores ambientales y genéticos, y puede llegar a ser del

80%¹². Se han descrito diferentes mutaciones en la región codificante de este gen, y estudios poblacionales han permitido la identificación de mutaciones fundadoras y la caracterización de las más frecuentes en distintas poblaciones¹³⁻¹⁵. Así se ha observado que ciertas mutaciones tienen una elevada frecuencia en poblaciones determinadas, como en el caso de las mujeres de etnia judía asquenazi, de las que un 1,09% son portadoras de la delección de AG en la posición 185 en el gen *BRCA1*¹⁴.

- *BRCA2*: Participa en la reparación de roturas de doble cadena del DNA mediante el proceso de recombinación homóloga, por lo que está implicado en el mantenimiento de la estabilidad genómica. La mutación en este gen tiene la particularidad de que confiere riesgo a cáncer de mama tanto en mujeres como en hombres. Se ha calculado que el riesgo de desarrollar cáncer de mama durante la vida varía entre el 26% y el 84% en mujeres, y es del 6% en hombres¹⁶. Se trata de un gen de gran tamaño, compuesto por 27 exones en el que la mayoría de las mutaciones asociadas a un incremento de riesgo de cáncer producen cambios en la fase de lectura. Los tumores desarrollados en portadoras de mutación en *BRCA2*, a diferencia de lo que ocurre con *BRCA1*, normalmente expresan el receptor de estrógenos y de progesterona, y muestran características similares a las del cáncer de mama esporádico¹⁷.

Aquellas familias con un alto número de casos de cáncer de mama y ovario entre parientes cercanos son candidatas para entrar en estudios genéticos. En estos estudios se buscan mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, a las que pueda atribuirse esta agregación familiar y que permitan identificar a los individuos portadores. Una limitación importante de estos estudios genéticos es la existencia de mutaciones en estos genes sin un efecto patogénico descrito, son las *variantes de significación desconocida*. Estas variantes suelen ser mutaciones con cambio de sentido, o que afectan a sitios de procesamiento del RNA, o incluso mutaciones silenciosas¹⁸. Cuando el estudio genético da como resultado una de estas mutaciones para las que no existe evidencia acerca de su papel patogénico, el resultado del estudio no es concluyente. Las implicaciones de este resultado en el manejo del riesgo de las personas en que se detecta la mutación son complejas.

Cuando se detecta una mutación descrita como patogénica, las portadoras entran en programas de vigilancia para la detección precoz de la enfermedad. Aparte de estos programas, sólo existen dos tipos de estrategias para reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad: la terapia hormonal y la cirugía preventiva. El tratamiento hormonal consiste en la administración durante 5 años de tamoxifeno o raloxifeno, moduladores selectivos de los receptores de estrógenos. Esta terapia produce una reducción del riesgo de las portadoras de mutación en *BRCA1/2* de un 40%-50%¹⁹, pero también pro-

duce numerosos efectos secundarios como sofocos, sudores nocturnos, sequedad vaginal, pérdida ósea y aumento del riesgo de trombosis por un efecto procoagulante, infarto y cáncer de endometrio^{20, 21}. La cirugía preventiva más común es la mastectomía bilateral, que puede ser subcutánea o total. En la mastectomía subcutánea se elimina tanto tejido mamario como resulta posible, manteniendo intacto el pezón, mientras que en la mastectomía total se elimina la mama completamente, pezón incluido²². La reducción del riesgo es mayor en el caso de la mastectomía total, pero, incluso con este procedimiento, el riesgo a desarrollar cáncer de mama no desaparece por completo, ya que es imposible eliminar todo el tejido que puede volverse tumoral. La otra cirugía preventiva que se utiliza y puede combinarse con la mastectomía es la salpingo-ooforectomía, que consiste en la extirpación de los ovarios y las trompas de Falopio. Estas intervenciones, además de las posibles complicaciones derivadas de la cirugía, tienen un fuerte impacto psicológico en las pacientes en las que se llevan a cabo y, en el caso de la ooforectomía, produce los efectos secundarios de una menopausia precoz.

- *TP53*: Es un gen supresor cuya mutación produce el *síndrome de Li-Fraumeni*, que consiste en una predisposición genética a un amplio espectro de tumores, incluyendo sarcomas, carcinomas adrenocorticales, cáncer cerebral y cáncer de mama a edades muy tempranas²³. El riesgo de los portadores de mutación en *TP53* de desarrollar cáncer durante su vida es superior al 90%, y el beneficio clínico de someter a estos individuos a programas de vigilancia resulta incierto²⁴. En las mujeres portadoras de mutación en *TP53*, el cáncer de mama es el tumor más frecuente y el 50% de estos casos se diagnostican antes de los 30 años de edad. Se ha estimado que el riesgo de desarrollar cáncer de mama antes de los 45 años en estas mujeres es entre 18 y 60 veces mayor que el de la población general. A pesar de este elevado riesgo, el síndrome de Li-Fraumeni es responsable de tan sólo aproximadamente el 0.1% de los casos totales de cáncer de mama.

- *PTEN*: La mutación de *PTEN* en la línea germinal produce el *síndrome de Cowden*, caracterizado por la formación de hamartomas múltiples y tumores benignos y malignos de tiroides, mama y endometrio. El riesgo de cáncer de mama durante la vida en mujeres afectadas por este síndrome es del 50%²⁵.

- *STK11*: Es otro gen supresor de tumores que, cuando se hereda mutado, produce el *síndrome de Peutz-Jeghers*, que se caracteriza por pigmentación mucocutánea y poliposis hamartomatosa. Este síndrome produce un alto riesgo de cáncer gastrointestinal, pero también de otros tipos de cáncer, incluido el de mama²⁶.

- *CDH1*: El gen de la E-cadherina codifica una proteína de adhesión intercelular que se localiza en uniones entre células epiteliales. Mutaciones en *CDH1* en la línea germinal producen un elevado riesgo de cáncer gástrico y carcinoma lobular de mama. Las mujeres portadoras de mutaciones en este gen tienen un riesgo de desarrollar este tipo de cáncer de mama a lo largo de su vida que varía entre el 45% y el 54%²⁷.

Todas las mutaciones en los genes descritos anteriormente se caracterizan por presentar una alta penetrancia, de manera que confieren un riesgo de cáncer de mama al menos 5 veces superior al de la población general. Se han descrito además otros genes con un efecto más moderado sobre la susceptibilidad a esta enfermedad, pero que se encuentran mutados en la población con mayor frecuencia. Este es el caso de *CHK2*, *ATM*, *PALB2*, *BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D*, *XRCC2*, *NBS1*, *RAD50*, *MRE11*, *BARD1* y *ABRAXAS*, genes que participan en los procesos de reparación de daño al DNA, y que en muchos casos interaccionan con *BRCA1* o *BRCA2*⁸.

Es importante señalar que, incluso en los casos en los que se hereda una mutación en uno de los genes de alta penetrancia, ésta no es completa y se encuentra modificada por otros factores tanto ambientales como genéticos. La importancia del fondo genético en el que se encuentran estas mutaciones se pone de manifiesto en estudios que muestran que la presentación de la enfermedad es más similar entre gemelos que entre miembros más alejados de la misma familia portadores de la misma mutación²⁸. Podemos decir entonces que la susceptibilidad al cáncer de mama nunca es consecuencia de un único *locus*, sino que es producto de la interacción entre diversos factores genéticos del individuo, y de éstos con los factores ambientales.

1.2.2 Factores genéticos asociados al cáncer de mama esporádico

Como ya hemos descrito, el cáncer de mama familiar no supone más del 5-10% de los casos totales, de modo que la inmensa mayoría de los casos son de origen esporádico. El cáncer de mama esporádico se desarrolla como consecuencia de la adquisición de alteraciones genéticas en células somáticas. Estas alteraciones pueden producirse en los genes que cuando se heredan mutados producen cáncer de mama familiar. Por ejemplo *TP53* se encuentra mutado en el 30% de los carcinomas de mama²⁹. Sin embargo, la aparición del cáncer no es únicamente resultado de la acumulación estocástica de estas alteraciones en las células a lo largo de sus divisiones, y son numerosos los estudios que ponen de manifiesto la existencia de genes modificadores de la susceptibilidad del cáncer de mama esporádico. Por ejemplo, Lichtenstein *et al.*³⁰ llevaron a cabo estudios en gemelos para determinar la contribución del componente genético hereditario a la susceptibilidad a diferentes tipos de cáncer. Calcularon que la probabilidad de

que un gemelo desarrollara el mismo tipo de cáncer que su hermano era del 42% para el cáncer de próstata, del 35% para el cáncer colorrectal y del 27% en el caso del cáncer de mama.

A diferencia de los genes descritos asociados al cáncer de mama familiar, los genes modificadores de la susceptibilidad al cáncer de mama esporádico son genes de baja penetrancia, con un efecto discreto sobre el fenotipo, y con polimorfismos en su secuencia comunes en la población. Se han descrito un cierto número de *loci* de susceptibilidad al cáncer de mama, en los que la presencia de diferentes variantes polimórficas se ha asociado con variaciones discretas en el riesgo a la enfermedad. La mayoría de estas regiones se han encontrado por medio de *estudios de asociación de genoma completo* (GWAS). Algunos de los genes en los que se han encontrado *polimorfismos de un solo nucleótido* (SNPs) comunes asociados con el riesgo son *MAP3K1*, *FGFR2*, *LSP1*, *TNRC19*, *H19* y *CASP8*³¹⁻³³.

1.2.3 Otros factores de riesgo del cáncer de mama

La contribución de los factores genéticos al riesgo de desarrollar cáncer de mama es, como hemos visto, mayoritariamente desconocida, y sólo una pequeña parte del riesgo puede atribuirse al efecto de los genes identificados. Aparte de estos factores genéticos, los estudios epidemiológicos de la enfermedad han revelado diferentes factores de riesgo de desarrollar la enfermedad. El estudio de estos factores y de los mecanismos por los que modifican la susceptibilidad es fundamental para conocer el proceso patológico de la enfermedad y para el desarrollo de nuevas aproximaciones preventivas. Es especialmente importante la identificación de los factores de riesgo relacionados con factores ambientales y el modo de vida, ya que éstos pueden evitarse. Se ha estimado que el 70% de los casos de cáncer de mama que se dan en la actualidad se deben a factores de riesgo que podrían cambiarse o evitarse³⁴.

1.2.3.1 Edad

La edad es el principal factor de riesgo de desarrollar cáncer de mama. Esta enfermedad es poco frecuente en mujeres jóvenes, y su incidencia aumenta con la edad, doblándose cada 10 años hasta la menopausia. Tras la menopausia, la tasa de aumento de la incidencia se reduce drásticamente, y a partir de los 80 años se mantiene^{35, 36}. Además, la edad no sólo afecta a la incidencia de la enfermedad, sino que el comportamiento de la misma es diferente cuando aparece en mujeres jóvenes o a edades avanzadas. De manera general, cuando la enfermedad se presenta antes de los 40-45 años lo hace de manera más agresiva y tiene peor pronóstico que cuando se desarrolla en mujeres de

más de 65 años. Los tumores de mujeres jóvenes suelen ser negativos para el receptor de estrógenos (ER), de mayor tamaño, alto grado y más indiferenciados e invasivos, por lo que suelen presentar afectación ganglionar³⁷.

1.2.3.2 Factores hormonales y reproductivos

Los primeros factores de riesgo en identificarse y que han sido más estudiados son los factores hormonales y reproductivos. Ya en 1713 Bernardino Ramazzini, considerado el padre de la medicina ocupacional, se percató de que la incidencia del cáncer de mama era superior en las monjas italianas que entre las mujeres casadas³⁸. Ramazzini especuló que este efecto se debía al deterioro de los órganos reproductores, entre ellos la mama, como consecuencia de la ausencia de relaciones sexuales impuesta por el celibato. En los años 30 del siglo XX, Elizabeth Lane-Claypon realizó el primer estudio moderno de casos y controles³⁹. El objetivo de este estudio era identificar los factores de riesgo de cáncer de mama y sus resultados apuntaron nuevamente hacia la importancia de la historia reproductiva, ya que encontró como factores de riesgo la paridad, el número de hijos, la duración de la lactancia, la edad a la que la mujer contrajo matrimonio y la edad a la que apareció la menopausia. Estos factores de riesgo siguen siendo válidos hoy en día.

Numerosos estudios posteriores confirmaron la estrecha relación existente entre el cáncer de mama y los factores hormonales. Se han identificado varios factores de riesgo que modifican los niveles endógenos de estrógenos y progesterona:

- Edad a la que se presenta la menarquia y la menopausia: Se ha descrito que el riesgo de cáncer de mama es mayor en mujeres con una menarquia temprana o con una menopausia tardía³⁹. Parece existir una relación entre el número de ciclos menstruales experimentados por la mujer a lo largo de su vida y el riesgo de cáncer de mama. El riesgo en mujeres a las que se practica una ooforectomía antes de los 35 años es un 40% menor que en mujeres con menopausia natural, y el riesgo se duplica cuando la menopausia llega después de los 55 años con respecto a las mujeres que la experimentaron antes de los 45³⁵. Una revisión sistemática con meta-análisis reciente combinó los resultados de 117 estudios epidemiológicos y observó que el riesgo de cáncer de mama por cada año que se adelanta la menarquia aumenta con un factor de 1,050, mientras que por cada año que se retrasa la menopausia el factor de incremento del riesgo es menor, de 1,029⁴⁰. Ambos factores modifican el riesgo de manera independiente, y el diferente incremento de riesgo causado por el mismo tiempo en que la menarquia se adelanta o la menopausia se retrasa sugiere que el efecto de este factor puede no deberse únicamente al aumento del número de ciclos menstruales, o a la duración de sus

años reproductivos. Otra observación que apunta en esta dirección es que al retrasar la menopausia aumenta en mayor medida el riesgo de cáncer de mama positivo para el receptor de estrógenos que para el cáncer de mama negativo para este receptor; en cambio, el adelantamiento de la menarquia aumenta en igual medida el riesgo de ambos tipos de cáncer⁴⁰. Una de las posibles causas de estas diferencias podría estar en los elevados niveles de estrógenos presentes en las adolescentes en que se adelanta la menarquia⁴¹, aumentando la exposición a estas hormonas de la mama en etapas iniciales del desarrollo de la mama, cuando la respuesta a estas hormonas está agudizada⁴². Puesto que la edad de la menarquia se está adelantando por razones no bien conocidas, posiblemente ambientales⁴³, sería previsible un aumento de la incidencia de cáncer de mama en el futuro próximo como consecuencia de esta tendencia.

- Paridad y lactancia: El embarazo a una edad anterior a los 24 años tiene un efecto protector frente al cáncer de mama que se ve aumentado por embarazos adicionales y por la duración de la lactancia. Además, el riesgo aumenta con la edad a la que se produce el primer embarazo a término, de manera que el riesgo de mujeres que tienen su primer hijo pasados los 30 años duplica el de las mujeres que lo tienen antes de los 20 años, y las mujeres que tienen su primer hijo pasados los 35 tienen mayor riesgo que las mujeres nulíparas³⁵. Este efecto del embarazo y la lactancia era el responsable de las observaciones de Ramazzini en las monjas italianas, y de la edad de matrimonio como factor de riesgo encontrado en los estudios de Lane-Clayton. Pese a este efecto protector del embarazo, se produce un aumento temporal del riesgo durante los 3 años siguientes al parto. Este fenómeno se conoce como *cáncer de mama asociado al embarazo*, y hace que el riesgo de cáncer de mama durante este periodo en mujeres que han dado a luz sea 3 veces superior al de mujeres de la misma edad y número de hijos, para las que han transcurrido 10 años desde el último embarazo.

En referencia al efecto de la lactancia, se ha estimado una disminución en el riesgo del 4.3% por cada año de lactancia⁴⁴, que actúa como factor independiente de la paridad y de la edad a la que se produce. Este efecto de la lactancia se atribuye, al menos en parte, a que alarga la interrupción de los ciclos menstruales producida por el embarazo, de manera que se reduce la exposición a los estrógenos.

- Obesidad y ejercicio físico: La obesidad y el ejercicio físico son dos factores relacionados que pueden modificar los niveles circulantes de estrógenos y progesterona, modificando el riesgo de cáncer de mama. El efecto de la obesidad es opuesto antes y después de la menopausia. En mujeres premenopáusicas, la obesidad produce alteraciones neuroendocrinas y hormonales que alteran los ciclos menstruales, de modo

que se asocia con ciclos anovulatorios e infertilidad. La disminución de los niveles circulantes de estrógenos y progesterona en mujeres obesas en edad reproductiva podrían tener un efecto protector frente al cáncer de mama. En cambio, tras la menopausia, la producción de estrógeno en los ovarios disminuye y el tejido adiposo se convierte en la fuente principal de estas hormonas en el organismo. En consecuencia, la obesidad se asocia con mayores niveles de estrógenos y mayor riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas⁴⁵.

La actividad física tiene un efecto protector frente al cáncer de mama, aunque por mecanismos distintos en mujeres jóvenes y después de la menopausia. El ejercicio físico intenso durante la juventud se asocia con retraso en la menarquia y con mayor frecuencia de ciclos anovulatorios, de manera que se reducen los niveles de estrógenos y progesterona. En cambio, tras la menopausia el ejercicio ayuda a mantener un porcentaje bajo de grasa corporal y, en consecuencia, niveles bajos de estrógenos circulantes⁴⁵.

- Consumo de alcohol: Se ha estimado que el riesgo de cáncer de mama aumenta entre un 7% y un 10% por cada 10 gramos de alcohol consumido diariamente, aproximadamente la cantidad equivalente a una bebida, tanto en mujeres premenopáusicas como postmenopáusicas⁴⁶. Se ha estimado que entre el 4% y el 10% de los casos de cáncer de mama en los EEUU se deben al consumo de alcohol. La ventana temporal entre la menarquia y el primer embarazo constituye un periodo en el que la mama es especialmente sensible a los efectos cancerígenos del alcohol. Los mecanismos por los que el alcohol aumenta el riesgo de cáncer de mama no se conocen por completo, pero se ha visto que alteran los niveles de estrógenos circulantes, y que el metabolismo del etanol genera acetaldehído, con efecto carcinogénico, y especies reactivas de oxígeno, que pueden causar daño oxidativo en el DNA.

- Hormonas exógenas: Además de estos factores que modifican los niveles de hormonas producidas por el organismo, se ha visto que la administración de hormonas exógenas también puede modificar la susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama. Estas hormonas exógenas se usan de forma extendida en la población como método anticonceptivo y en terapia de reemplazamiento hormonal.

El posible efecto de los *contraceptivos orales clásicos*, que contienen estrógenos y progestina, sobre el riesgo de cáncer de mama ha sido objeto de numerosos estudios, algunos de ellos con resultados opuestos^{47, 48}. Pese a la controversia, los resultados de grandes estudios prospectivos y meta-análisis que combinan resultados de varios estudios^{49, 50} parecen señalar que estos contraceptivos producen un pequeño aumento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama durante su administración y durante los 10 años

posteriores. Este aumento del riesgo es mayor cuando empezaron a consumirse a edades anteriores a los 20 años. En el caso de los anticonceptivos orales formulados únicamente con progestina, los estudios realizados no han encontrado indicios de que aumenten el riesgo⁵¹.

La *terapia de reemplazamiento hormonal* consiste en la administración de hormonas exógenas para compensar el descenso en los niveles de estrógenos y progesterona que se produce como consecuencia de la menopausia y, de esta manera, aliviar sus síntomas. El uso de hormonas en terapia de reemplazamiento aumenta el riesgo de cáncer de mama de manera dependiente de la duración del tratamiento y de las hormonas utilizadas. La administración de estrógenos produce un aumento del riesgo del 2,2% por año de tratamiento⁵², mientras que cuando se combinan con progestina el aumento del riesgo es mayor, y su administración durante 5 años se asocia con un incremento del riesgo del 30%⁵³. De hecho, en 2003 se observó en EEUU un descenso en la incidencia de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas que se atribuye a un descenso en el uso de la terapia de reemplazamiento hormonal⁵⁴.

- Disruptores endocrinos: Son un grupo de compuestos químicos exógenos que afectan al equilibrio hormonal del organismo. Hay autores que atribuyen el aumento de la incidencia de cáncer de mama en países desarrollados, junto con la de otros cánceres de órganos sensibles a las hormonas como el de próstata y testículos, a un aumento de la exposición a estos compuestos que forman parte de productos de uso cotidiano como detergentes, plásticos y cosméticos. Se ha sugerido que estos compuestos podrían ser responsables del adelantamiento en la edad a la que aparece la menarquia que se ha observado en estos países⁴³. El estudio del efecto de estos compuestos es complicado, debido a la dificultad para cuantificar la exposición a éstos y a que, en la mayoría de los casos, no presentan una curva dosis-respuesta lineal, sino en forma de U⁵⁵.

Los compuestos de este tipo que se han relacionado con la incidencia del cáncer de mama incluyen el dietilestilbestrol, el bisfenol A, las dioxinas y algunos metales pesados como el cadmio. El dietilestilbestrol es un fármaco que se administró entre 1949 y 1971 a cuatro millones de embarazadas para prevenir el aborto espontáneo y el parto prematuro⁵⁶. En 1971 se encontró una asociación entre la exposición prenatal a este compuesto y el desarrollo de adenocarcinoma de células claras de la vagina durante la juventud⁵⁷. El dietilestilbestrol produjo un aumento del 30% en el riesgo de cáncer de mama en las mujeres a las que se administró el fármaco y, en el caso de las mujeres que estuvieron expuestas de forma intrauterina, duplicó y triplicó el riesgo de cáncer de mama antes de los 40 y 50 años, respectivamente⁵⁸.

El bisfenol A (BPA) es un compuesto sintético que se utiliza en la fabricación de policarbonatos y resinas epoxifenólicas que se encuentran en muchos productos cotidianos como envases de comida y bebida, y material de oficina, laboratorio y hospitalario. El BPA puede detectarse en los fluidos corporales del 90% de la población de los EEUU⁵⁹. Su actividad como disruptor endocrino se produce a concentraciones más bajas de las que son consideradas seguras en humanos y se debe a que se une a los receptores de estrógenos ER α y ER β . Este compuesto es capaz de producir alteraciones en el sistema reproductivo, sistema inmune y cerebro de animales adultos y fetos expuestos. En cuanto a su efecto sobre el riesgo de cáncer de mama, no está claro que tenga un efecto directo, pero se ha propuesto como uno de los posible causantes del adelantamiento de la edad de menarquia, ya que la exposición perinatal a BPA provoca en ratones una aceleración de la pubertad⁶⁰.

1.2.3.3 Antecedentes familiares y personales

Los antecedentes familiares están relacionados con la susceptibilidad de origen genético. Como ya hemos comentado previamente, se desconoce cuál puede ser el número de genes que determinan la susceptibilidad de un individuo a desarrollar cáncer de mama. Incluso cuando se produce agregación familiar, muchas veces los factores genéticos responsables de esta agregación son desconocidos. A pesar de no conocer los genes que permitan predecir el riesgo de cáncer de mama, se ha estimado que el riesgo de una mujer se duplica si tiene un pariente de primer grado (madre, hermana o hija) que lo desarrolle antes de los 50 años, siendo este incremento mayor cuanto menor es la edad a la que apareció la enfermedad. Si el número de familiares de primer grado con cáncer de mama antes de los 50 años es de dos, entonces el riesgo aumenta entre 4 y 6 veces³⁵.

En cuanto a los antecedentes personales, el riesgo es mayor en mujeres que han tenido lesiones benignas de la mama. Por ejemplo, mujeres con hiperplasias epiteliales atípicas severas tienen un riesgo 4 o 5 veces superior al de la población general. En el caso de otras lesiones como fibroadenomas, quistes palpables, papilomas ductales, esclerosis adenosas e hiperplasias epiteliales moderadas o floridas, el incremento del riesgo es algo menor, entre 1,5 y 3 veces el de la población general³⁵.

1.2.3.4 Factores geográficos y ambientales

El riesgo de cáncer de mama no se distribuye homogéneamente entre países, y la incidencia de esta enfermedad es cuatro veces superior en países desarrollados que en países en vías de desarrollo. Un ejemplo que pone de manifiesto la importancia de los factores ambientales en el riesgo de cáncer de mama es el estudio realizado por Kolonel

*et al.*⁶¹ sobre la incidencia de esta enfermedad en mujeres japonesas que viven Japón y en inmigrantes japonesas que viven en Hawaii. Los resultados de su estudio mostraron que la incidencia de cáncer de mama era menor en las mujeres japonesas que vivían en Japón que en las que habían emigrado a Hawaii, y la incidencia en las hijas de las últimas era todavía mayor. Este cambio en la incidencia del cáncer de mama vino acompañado de un adelantamiento en la edad de menarquia de las hijas de inmigrantes japonesas con respecto a las sus madres y las mujeres en Japón, acercándose a la edad de menarquia las mujeres estadounidenses que vivían en Hawaii.

Parte de la mayor incidencia observada en los países desarrollados se atribuye a los hábitos relacionados con el modo de vida occidental: sedentarismo, obesidad, dieta, retraso de la maternidad y descenso en el número de hijos, menor duración de la lactancia y exposición a disruptores endocrinos y otros carcinógenos; de hecho, ya se está observando un aumento en la incidencia en países en vías de desarrollo que se relaciona con la adopción de estas costumbres⁶.

1.3 Biología celular y molecular del cáncer de mama

El cáncer de mama se produce como consecuencia de alteraciones genéticas que originan cambios en las vías de señalización responsables de la regulación de funciones celulares básicas. En consecuencia, las células malignas adquieren una serie de características que hacen que la enfermedad se manifieste y evolucione. En este apartado revisamos las principales vías de señalización que se ven afectadas en el cáncer de mama y las características consideradas propias de las células cancerosas que se adquieren como consecuencia de estas alteraciones. Pero antes describimos algunos de los aspectos básicos de la biología celular y la fisiología de la mama normal.

1.3.1 Aspectos básicos de la morfología y fisiología mamaria

La mama está constituida por dos compartimentos tisulares: epitelio y estroma. Se caracteriza por ser un órgano muy dinámico que pasa por ciclos de proliferación, diferenciación y apoptosis en respuesta a señales locales y endocrinas. La función de la mama es la producción de leche, pero ésta sólo sucede cuando el epitelio mamario se diferencia de forma terminal durante el embarazo y durante el tiempo que dura la lactancia. El epitelio mamario está constituido por dos linajes celulares diferentes: luminal y mioepitelial. Las células luminales son las que están en contacto con la luz de los conductos mamarios y pueden distinguirse dos tipos según su localización y función: ductales y alveolares. Las células alveolares forman los alveolos y son las que secretan leche

cuando se produce su diferenciación terminal, mientras que las células ductales se encuentran formando los ductos mamarios que conducen la leche desde los alveolos hasta el pezón. Por su parte, las células mioepiteliales se encuentran rodeando las células luminales y, mediante su actividad contráctil, dirigen el flujo de leche. Además de estas células diferenciadas, en la mama hay células madre o *stem* que, bajo una estrecha regulación, son capaces de originar todos los elementos celulares que constituyen el epitelio mamario. Por esta razón, estas células madre mamarias tienen un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de la mama⁶². El estroma mamario es un tejido conectivo constituido principalmente por adipocitos, fibroblastos y células endoteliales.

El desarrollo completo de la mama se produce en una serie de etapas, la mayoría de las cuales tienen lugar de manera postnatal y están controladas por hormonas esteroideas y peptídicas. Durante la pubertad, la producción cíclica de estrógenos y progesterona produce el crecimiento y ramificación de los ductos mamarios. Más adelante, durante el embarazo, la prolactina y el lactógeno placentario controlan la proliferación y maduración de los alveolos mamarios. Finalmente, el descenso en la concentración sistémica de prolactina y de hormona del crecimiento, que se produce al finalizar la lactancia, dispara el proceso de muerte celular y remodelación tisular conocido como involución postlactancia⁶³.

1.3.2 Características biológicas adquiridas por las células tumorales

En el proceso de carcinogénesis, las células de la mama que originan el tumor adquieren alteraciones en los mecanismos que regulan múltiples procesos celulares, de forma que las células tumorales adquieren una serie de características funcionales que les permiten proliferar, sobrevivir y diseminar. Estas funciones pueden adquirirse mediante diferentes mecanismos moleculares que se producen en procesos multietapa durante la iniciación y progresión tumoral. Según Hanahan y Weinberg⁶⁴, las características que deben ser adquiridas por las células tumorales incluyen las siguientes:

1.3.2.1 Mantenimiento de la señal proliferativa

La proliferación de las células de la mama, y de cualquier tejido, es un proceso regulado que requiere de señales externas a las células, los factores de crecimiento. Estos factores de crecimiento se unen a receptores de membrana que, típicamente, tienen un dominio tirosina kinasa intracelular. Cuando estos receptores se activan emiten señales moleculares al interior de la célula que regulan el crecimiento y el ciclo celular. Las células cancerosas no requieren de estas señales externas, ya que son capaces de gene-

rar su propia señal proliferativa mediante diferentes mecanismos como la sobreexpresión de los receptores de factores de crecimiento o la mutación de proteínas de señalización intracelular.

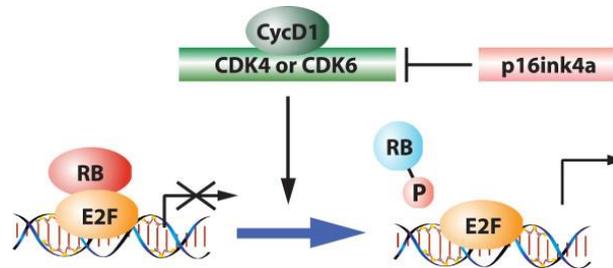


Figura 2. Vía de señalización de retinoblastoma (RB). RB interacciona con factores de transcripción de la familia E2F, inhibiendo la expresión de genes necesarios para entrar en fase S. Las señales mitogénicas producen la expresión de ciclinas de tipo D, que activan a CDK4/CDK6. La actividad de CDK4/6 está controlada a su vez por P16INK-4A, que se induce en situaciones de estrés oncogénico o en respuesta a daño al DNA. Figura tomada de Witkiewicz et al. (2014)⁶⁵.

1.3.2.2 Resistencia a las señales inhibitoras de la proliferación

Las células epiteliales de la mama reciben constantemente señales del estroma y de las células epiteliales vecinas que actúan de manera paracrina deteniendo el ciclo celular en la interfase⁶⁶. Estas señales inhibitorias de la proliferación confluyen en la proteína del retinoblastoma (RB), que previene que la célula pase de la fase G1 a la fase S mediante el secuestro de los factores de transcripción de la familia de E2F, inhibiendo así la expresión de genes necesarios para progresar en el ciclo celular (**Figura 2**)⁶⁵. Las células tumorales tienen diferentes maneras de interferir con la vía de RB, y los diferentes tipos de tumores muestran preferencia por un mecanismo u otro. En el cáncer de mama, uno de los mecanismos más frecuentes es la sobreexpresión de ciclina D1, que ocurre en el 50% de los casos, y que además, en un 30-40% de estos casos, es consecuencia de la amplificación del gen que la codifica, *CCDN1*⁶⁷. En cambio, en el caso de los tumores triple negativos el mecanismo más frecuente es la pérdida de *RB*⁶⁸.

En relación con la inhibición de la proliferación, la vía de TGF β es una de las vías antiproliferativas principales en el epitelio mamario. Sin embargo, de forma aparentemente contradictoria, la expresión de TGF β está aumentada en muchos tumores de mama. Ello se debe a que esta vía produce un efecto dual sobre la tumorigénesis, cambiando a medida que este proceso avanza. Así, durante las fases iniciales del desarrollo tumoral, TGF β funciona como un supresor de tumores ya que inhibe la proliferación, induce la apoptosis y la senescencia, participa en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica e interfiere con el proceso de immortalización celular. En cambio, en

estadios avanzados de la enfermedad la expresión de TGF β se asocia con un peor pronóstico ya que aumenta la capacidad invasiva de las células tumorales y promueve la angiogénesis⁶⁹.

1.3.2.3 Evasión de la muerte celular

En condiciones normales, la apoptosis se activa en respuesta a situaciones de estrés celular que ocurren durante el proceso de tumorigénesis, como son el exceso de señalización oncogénica o el daño al DNA como consecuencia de la proliferación excesiva. La maquinaria apoptótica puede dividirse en reguladores y efectores. Los *reguladores* a su vez se dividen en dos circuitos, uno extrínseco y otro intrínseco. El *circuito extrínseco* recibe y procesa las señales apoptóticas procedentes del exterior celular, por ejemplo, a través de la unión del receptor FAS a su ligando FASL. En cambio, el *circuito intrínseco* se activa en respuesta a señales procedentes del interior celular. Ambos programas culminan con la activación de las proteasas latentes caspasa-8 y caspasa-9, respectivamente. Así se inicia una cascada de proteólisis hasta las caspasas efectoras, responsables de la ejecución del programa de apoptosis. Este “gatillo apoptótico”, en el que la señal procedente de los reguladores genera una respuesta de los efectores, está controlado por un equilibrio entre los niveles de proteínas de la familia BCL-2, entre los que hay miembros proapoptóticos (la subfamilia BAX-LIKE y la subfamilia BH3-only) y miembros antiapoptóticos (el BCL-2 arquetípico, además de BCL-XL, BCL-W, MCL-1, A1 y BCL-B)⁷⁰.

Entre los *sensores* que pueden desencadenar la apoptosis está la proteína supresora de tumores P53 que activa el programa de muerte celular en respuesta a daño al DNA. El “gatillo apoptótico” también puede activarse ante la falta de suficientes señales que estimulen la supervivencia, como ocurre en linfocitos ante niveles bajos de interleucina 3, o en células epiteliales con niveles inadecuados de factor de crecimiento de tipo insulina (*insuline-like growth factor 1/2* o IGF1/2). Otro mecanismo que puede activar la apoptosis es un exceso de actividad por parte de algunas proteínas oncogénicas, como ocurre en el caso de RAS, MYC y RAF.

Se ha comprobado que las células tumorales pueden desarrollar diferentes mecanismos para evadir la apoptosis. El mecanismo más frecuente es la pérdida de función de P53, que se encuentra mutado frecuentemente en tumores de mama. Otros mecanismos alternativos son la inducción de reguladores antiapoptóticos (BCL-2, BCL-XL) o de señales de supervivencia (IGF1/2), la reducción de los niveles de factores proapoptóticos (BAX-like y BH3-only), o alteraciones en la vía extrínseca activada por la unión de ligando.

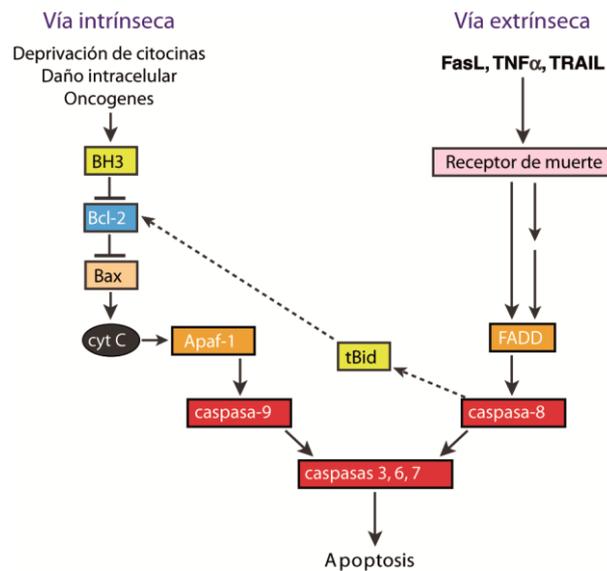


Figura 3. Vías de señalización de la apoptosis. La vía intrínseca se inicia por las proteínas de la familia BH3-only ("BH3") que inactiva a proteínas BCL2-like ("BCL2"), evitando que secuestren a BAX y BAK. BAX o BAK pueden permeabilizar la membrana externa mitocondrial y provocar la liberación de citocromo c al citosol, lo que dispara la activación de la caspasa-9. La vía extrínseca se activa por la unión de ligandos de la familia de $TNF\alpha$ a receptores de la membrana celular, y produce la activación de la caspasa-8. Las dos vías son mayoritariamente independientes, pero en ocasiones la vía extrínseca puede activar la vía intrínseca por medio de tBid. Figura modificada de Adams et al. (2007)⁷⁰.

Otras vías de señalización inhibitorias de la apoptosis destacables en el cáncer de mama son la ruta de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y la de $NF\kappa B$. En la primera de ellas, la activación de la vía produce la fosforilación de AKT y de SGK, proteínas que se encuentran fosforiladas en aproximadamente la mitad de los tumores de mama⁷¹. Por otra parte, $NF\kappa B$ se sobreexpresa frecuentemente en tumores ERBB2 positivos que no expresan receptor de estrógenos (ER) y, como consecuencia, estimula la proliferación y bloquea la apoptosis⁷².

1.3.2.4 Inmortalidad replicativa

Las células normales de mamíferos tienen un programa intrínseco, el *límite de Hayflick*, que limita el número de veces que pueden dividirse a unas 60 o 70 veces. Al llegar a este límite las células entran en senescencia, un estado irreversible de inactividad proliferativa, o sufren una crisis que termina con la muerte celular. Los telómeros que protegen el final de los cromosomas se acortan como consecuencia de cada división celular y llega un momento en que dejan de cumplir su función protectora del DNA cromosómico⁷³. En consecuencia, se activan los mecanismos que conducen a la senescencia o a la muerte celular. En células cancerosas, esta barrera se supera mediante la supresión

de las vías de RB y P53. Además, muchas células malignas expresan la telomerasa, enzima que es capaz de contrarrestar la erosión de los telómeros. Sin embargo, las lesiones premalignas de la mama no expresan niveles significativos de telomerasa y presentan acortamiento telomérico y aberraciones cromosómicas no clonales⁷⁴. Estas observaciones sugieren que en estas lesiones premalignas se ha producido la inactivación de P53, de modo que el acortamiento telomérico y el daño genómico que se produce como consecuencia de éste, no activan las rutas de senescencia y de muerte celular. Así, el acortamiento telomérico promueve la inestabilidad genómica y la adquisición de nuevas alteraciones en estas lesiones premalignas. Sin embargo, posteriormente, en las células en las que se activa la telomerasa se estabilizan las alteraciones que se han producido con anterioridad y estas células adquieren la capacidad proliferativa ilimitada que necesitan para su expansión clonal.

1.3.2.5 Inducción de la angiogénesis

Los tumores promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos que les suministren nutrientes y oxígeno. Los vasos formados por la activación crónica de la angiogénesis tienen formas aberrantes, con ramificaciones excesivas y otros problemas que provocan flujo sanguíneo errático, debilidad de los vasos y microhemorragias, y se acompañan de niveles anormales de proliferación y apoptosis de las células endoteliales⁷⁵.

Como ocurre con tantos otros procesos biológicos, la angiogénesis está regulada por un balance entre factores estimuladores e inhibidores. Algunos de estos reguladores de la angiogénesis son proteínas de señalización que se unen a receptores presentes en la membrana de las células endoteliales. Entre las proteínas que estimulan la angiogénesis podemos destacar a VEGF y FGF, mientras que un ejemplo de proteína inhibidora es trombospondina-1 o TSP1.

1.3.2.6 Invasión y metástasis

La mama es un órgano fácilmente accesible y no vital. Por esta razón, la metástasis, y no el tumor primario, es la causa de la mayoría de los casos de muerte por cáncer de mama. La capacidad de invasión incluye la habilidad para romper barreras tisulares normales, como la membrana basal, transportarse a través del sistema circulatorio y colonizar los tejidos a distancia.

La transición epitelio-mesénquima, un programa que se activa durante el desarrollo embrionario, ha adquirido un papel principal como mecanismo por el que las células epiteliales adquieren las capacidades necesarias para la invasión⁷⁶. Durante el desarrollo normal, este proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT), y otros procesos

de migración celular relacionados, están regulados por una serie de factores de transcripción pleiotrópicos: SNAI1/SNAIL, SNAI2/SLUG, TWIST y ZEB1/2. Diferentes tipos de tumores expresan estos factores de transcripción en distintas combinaciones, y se han relacionado con la adquisición de capacidad de invasión por las células tumorales⁷⁷. La EMT no es un proceso del tipo “todo o nada” y las células invasivas lo presentan en grado variable. Durante el proceso de colonización o “homing” se ha descrito el fenómeno contrario o transición mesénquima-epitelio (MET)⁷⁸.

1.3.2.7 Inestabilidad genómica

Durante la progresión tumoral, las células adquieren mutaciones y anomalías cromosómicas. Estos defectos genómicos se ven favorecidos por el mal funcionamiento de la maquinaria de reparación del DNA. En condiciones normales, esta maquinaria permite a la célula detectar adecuadamente el daño en el DNA, activar los mecanismos de respuesta y reparar el daño. También son responsables de inactivar o interceptar las moléculas que causan el daño antes de que lo produzcan⁷⁹. De esta manera, los genes de la maquinaria de reparación del DNA funcionan como genes supresores tumorales.

Esta maquinaria de reparación está constituida por varias vías que interaccionan entre sí, formando una compleja red de señalización, y garantiza el mantenimiento de una baja tasa de mutación en condiciones normales. Además, en células no cancerosas, cuando la célula sufre un daño masivo en su DNA y no es capaz de repararlo, estos mecanismos activan respuestas como la muerte celular, de forma que se previene que las células dañadas puedan suponer una amenaza para el organismo. Existen varias vías de respuesta a daño al DNA que se activan ante distintos tipos de daño. Las proteínas que participan en estas vías pueden dividirse, según la fase en la que actúan, en tres grupos: las que participan en la detección del daño al DNA, en la señalización de este daño y en la activación de la respuesta adecuada. Entre estas respuestas están la parada temporal del ciclo celular y reparación del DNA, la muerte celular, la diferenciación terminal y la entrada en senescencia.

Hay diferentes moléculas que cumplen la función de *sensores de daño al DNA*, y están especializadas en reconocer un tipo específico de lesión. Las roturas de doble cadena (DSB, de *double strand breaks*) son reconocidas por el complejo MRN⁸⁰. Este complejo es reclutado a los sitios de rotura y produce la activación de ATM, una kinasa de *checkpoint* que fosforila a la histona H2AX en el residuo de serina 139, generando la forma conocida como γ H2AX en las regiones cercanas a los sitios de rotura de doble hebra. La formación de γ H2AX extiende la señal de daño a través de la cromatina y recluta a otros mediadores como MDC1 y NBS1 que activan a su vez a ATM, produciendo una retroalimentación positiva de la vía. ATM fosforila a numerosos sustratos,

extendiendo la señal de daño a través de diferentes vías de señalización⁸¹. El mecanismo más frecuente de reparación de las DSB cuando ATM se activa es mediante recombinación homóloga. La recombinación homóloga es un mecanismo conservativo que genera pocas mutaciones durante el proceso de reparación y que parece ser el más favorecido en células que están proliferando, en las fases S y G2 del ciclo celular⁸². Otras proteínas cruciales en el proceso de reparación de las DSB por recombinación homóloga son las codificadas por los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51* y *PALB2*. Las células pueden reparar las DSB mediante otro mecanismo más rápido y más propenso al error, la *recombinación no homóloga* (NHEJ, de *non-homologous end joining*) que se produce como consecuencia de la activación de la DNA-PK, que es reclutada a los sitios de rotura por el complejo Ku70/Ku80 que se une a los extremos libres de DNA en los sitios de rotura⁸².

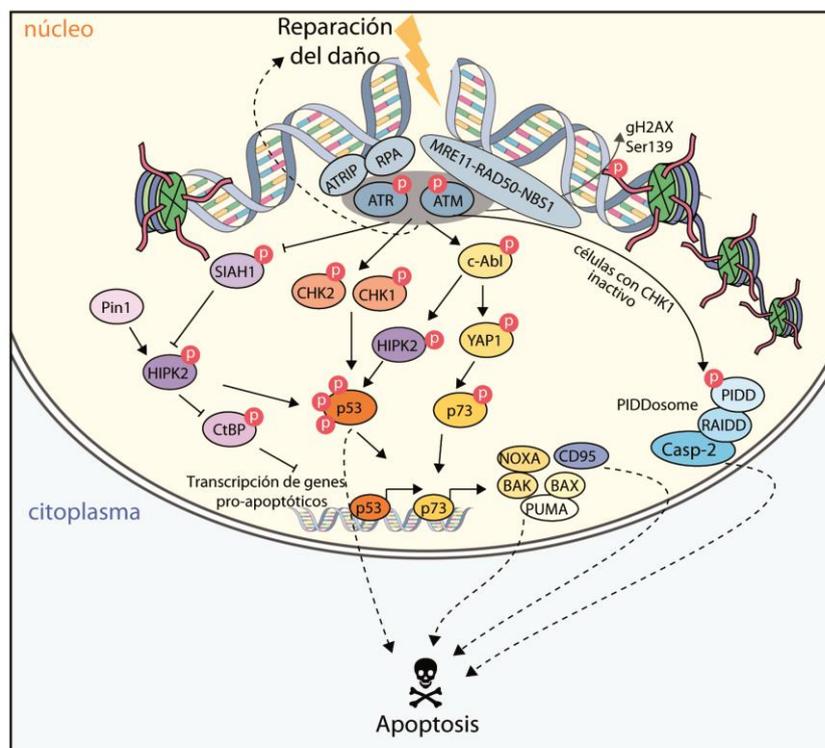


Figura 4. Esquema de las vías de respuesta a daño al DNA y los mecanismos por los que pueden conducir a la muerte celular. Figura modificada de Matt & Hofmann (2016)⁸³.

Por otro lado, las roturas de cadena sencilla (SSB de *single strand breaks*) o errores durante la replicación del DNA producen la activación de ATR, una kinasa de la familia de ATM y DNA-PK. Las roturas de cadena de sencilla son detectadas por la proteína RPA, que se une al DNA de cadena sencilla. La proteína adaptadora ATRIP se une al DNA de cadena sencilla al que se ha unido RPA y recluta a ATR, que puede

autofosforilarse tras ser activada por TopBP1⁸⁴. Aunque en el modelo clásico ATM se activa en respuesta a las roturas de cadena doble y ATR lo hace ante las de cadena sencilla, varios estudios han demostrado que existen interacciones entre las dos rutas y que ambas participan en la reparación de roturas de doble cadena⁸³.

Tras la activación de las kinasas ATR, ATM y DNA-PK en respuesta al daño al DNA, se produce la transducción de la señal a través de cascadas de kinasas que en el caso de ATM conducen a la fosforilación de CHK2, y en el de ATR a la de CHK1. Ambas kinasas estabilizan mediante fosforilación a proteínas efectoras como P53 y CDC25, y se produce la activación de genes que coordinan la parada del ciclo, la reparación del daño, la apoptosis y la senescencia (**Figura 4**)⁸³.

1.3.2.8 Inflamación

En los tumores se produce una respuesta inflamatoria crónica similar a la que se produce en tejidos no neoplásicos, por lo que los tumores han sido clásicamente descritos como “heridas que nunca sanan”⁸⁵. Las células necróticas liberan factores proinflamatorios que atraen a células del sistema inmune que, en consecuencia, infiltran el tumor⁸⁶. Por esta razón, tolerar cierto grado de necrosis puede ser ventajoso para el tumor, ya que la inflamación genera un ambiente que promueve la progresión tumoral. Ello es así porque como consecuencia de la inflamación se acumulan moléculas de señalización en el microambiente tumoral, como factores de crecimiento que promueven la proliferación y señales que favorecen la supervivencia celular y que estimulan la angiogénesis, la invasión y la metástasis, incluyendo señales que conducen a la activación de la transición epitelio-mesénquima⁸⁶. Es especialmente importante el papel de los macrófagos asociados a tumores, que producen enzimas que degradan la matriz extracelular, como metaloproteinasas, y que secretan EGF que promueve la proliferación de las células tumorales epiteliales⁸⁷.

1.3.3 Vías de señalización principales en el cáncer de mama

Hay una serie de vías de señalización que participan en la adquisición de las características fenotípicas que acabamos de describir por parte de las células tumorales. A continuación describiremos algunas de estas vías implicadas en el desarrollo y progresión del cáncer de mama (**Figura 5**).

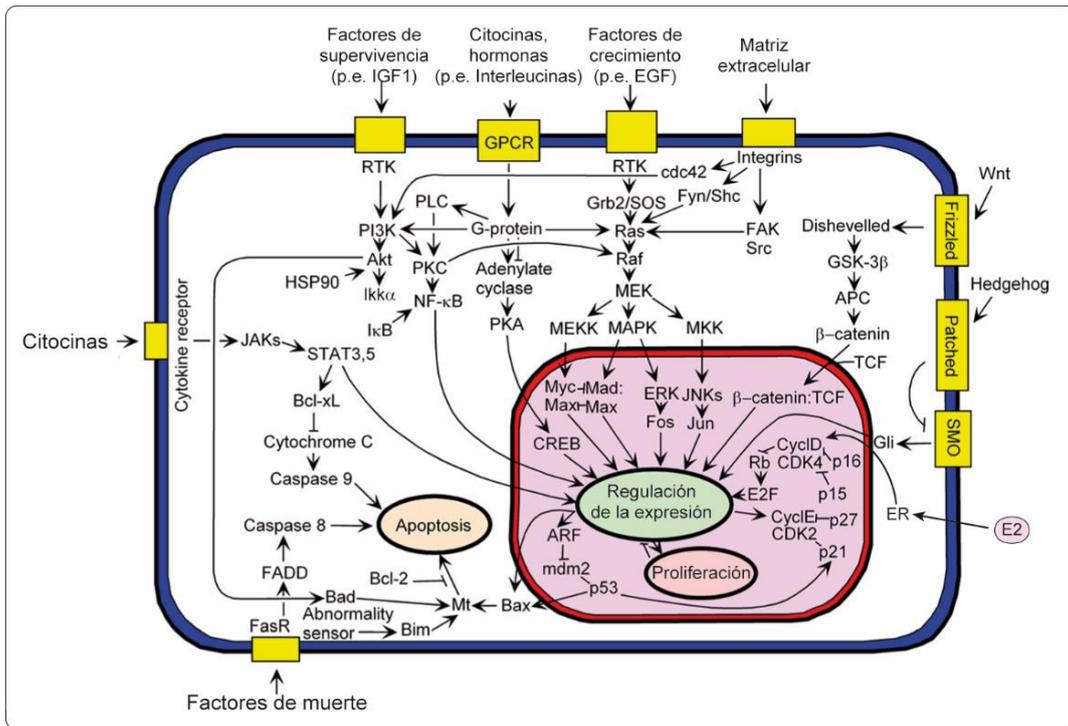


Figura 5. Principales vías de señalización implicadas en el desarrollo y progresión del cáncer de mama. Figura modificada de Carels et al. (2016)⁸⁸.

1.3.3.1 Vía del factor de crecimiento de tipo insulina

La vía del factor de crecimiento de tipo insulina (IGF) y sus receptores regula el crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis, la transformación y otros procesos celulares importantes. La vía está constituida por tres receptores transmembrana (IGF-1R, IR α e IR β), tres ligandos (IGF-I, IGFII e insulina) y seis proteínas reguladoras (IGFBP1-6). El receptor IGF-1R activa principalmente las vías de RAS/MAPK y de PI3K/AKT, aunque también interacciona con la ruta de EGFR. En cáncer de mama, esta vía se encuentra activada en más del 90% de los casos y es una diana potencial para el tratamiento del cáncer de mama metastásico⁸⁹.

1.3.3.2 Vía del receptor de factor de crecimiento epidérmico

La familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un grupo de receptores tirosina kinasa que conforman el primer elemento de complejas cascadas de señalización intracelular que modulan la proliferación, supervivencia, diferenciación, adhesión y migración celular. La familia está compuesta por cuatro miembros EGFR/ERBB1, HER2/ERBB2, HER3/ERBB3, y HER4/ERRB4. Son receptores transmembrana con un dominio extracelular de unión a ligando y una región citoplasmática con actividad enzimática tirosina kinasa⁹⁰. Estos receptores permanecen en la membrana plasmática en forma de monómeros inactivos. Diferentes ligandos, entre los que

se incluyen EGF, TGF α y neurorregulinas, se unen a la región extracelular de los receptores e inducen la formación de homodímeros y heterodímeros. En su forma dimérica, adquieren fosforilaciones en residuos de tirosina de su región citoplasmática, y esta modificación les permite interactuar con otras proteínas que propagan la cascada de señalización hacia el interior de la célula a través de rutas de señalización como la de PI3K/AKT/mTOR, la de MAPK y la de SRC.

Hay diferencias importantes entre los cuatro receptores de la familia. ERBB2 es el que tiene mayor actividad kinasa, pero no se ha observado que se una a ningún ligando, sino que su dominio extracelular está de manera constitutiva en su conformación activa⁹¹. Así pues, es un receptor huérfano que no forma homodímeros en respuesta a ligando, y en condiciones fisiológicas funciona principalmente formando heterodímeros con otros receptores que sí se unen a ligando⁹². Sin embargo, sí puede formar homodímeros cuando se sobreexpresa⁹³. Por otra parte, ERBB3 presenta diferencias en su dominio catalítico con respecto al resto de los miembros de la familia que hacen que tenga muy poca o ninguna actividad tirosina kinasa⁹⁴, de modo que para activarse depende de la actividad catalítica de otros receptores de la familia con los que forma heterodímeros. Pese a que ERBB2 y ERBB3 individualmente son moléculas de señalización incompletas, se ha observado que los dímeros ERBB2-ERBB3 son los que producen una mayor activación de la señalización⁹⁵. Los receptores de la familia de EGFR se expresan en diferentes tejidos y todos ellos son esenciales para el correcto desarrollo en mamíferos.

El miembro de la familia más relevante en cáncer de mama es ERBB2, el cual se encuentra sobreexpresado, principalmente como consecuencia de su amplificación génica, en aproximadamente el 20% de los casos de cáncer de mama, definiendo un subtipo de tumores y asociándose a mal pronóstico antes de la aparición de tratamientos específicos frente a él⁹⁶. El papel oncogénico de ERBB2 se describió por primera vez en un neuroblastoma de rata generado mediante la exposición de ratas preñadas a etilnitrosourea, en un *screening* para buscar genes con capacidad transformante⁹⁷. El gen encontrado se denominó *Neu*, y al compararlo con la versión silvestre (*c-Neu*, ortólogo del *ERBB2* humano) se determinó que la actividad oncogénica del *Neu* tumoral (*neuT*) se debía a la mutación V664E en la región transmembrana. Experimentos posteriores con ratones transgénicos demostraron que la sobreexpresión de *neuT* en el epitelio mamario dirigida por el promotor MMTV (de *mouse mammary tumor virus*) induce la formación de adenocarcinomas⁹⁸. Al seguir la misma estrategia para sobreexpresar la versión silvestre *c-Neu*, también se forman adenocarcinomas de mama, aunque con un mayor tiempo de latencia⁹⁹. En la mayoría de las ocasiones la formación de tumores ocurre tras la adquisición de mutaciones en *c-Neu* diferentes de la encontrada en *neuT*. Las

alteraciones más frecuentes son deleciones en la región extracelular más próxima a la membrana plasmática, una región rica en cisteínas (CR2, **Figura 6**). Estas mutaciones favorecen la formación de dímeros, ya que afectan el balance de cisteínas que normalmente forman puentes disulfuro intramoleculares. Al quedar desemparejada alguna de estas cisteínas, ésta puede formar puentes disulfuro con residuos de cisteína de otras moléculas, de manera que se forman dímeros y se produce la activación de la señalización¹⁰⁰.

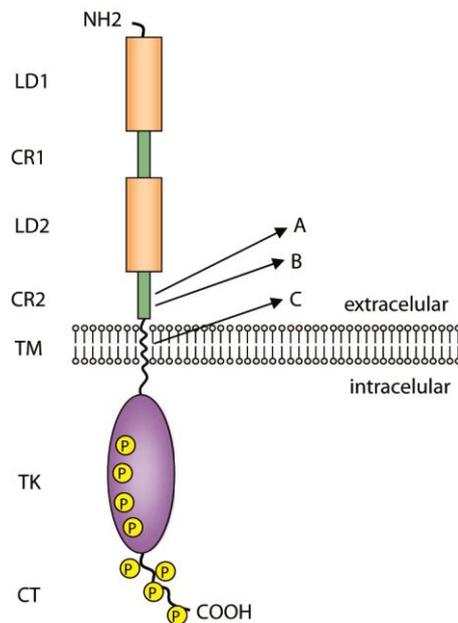


Figura 6. Estructura del receptor ERBB2 y sitios de mutación. En la región extracelular ERBB2 tiene dos dominios de unión a ligando (LD1 y LD2), dos regiones ricas en cisteínas (CR1 y CR2), un dominio transmembrana (TM) y en la región intracelular presenta un dominio catalítico tirosina quinasa (TK) y una cola carboxilo-terminal (CT). En esta región terminal existen numerosos sitios de fosforilación en residuos de tirosina. (A) Sitio de mutación somática más frecuente en los tumores desarrollados en ratones MMTV-Neu. (B) Sitio de deleción por procesamiento alternativo del RNA mensajero que origina la variante ERBB2 Δ Ex16, producida de manera natural en humanos. (C) Sitio de mutación en el modelo neuT por carcinogénesis química.

En tumores de mama humanos, éstas y otras mutaciones en el dominio tirosina quinasa se han encontrado con baja frecuencia (<2%)¹⁰¹, ya que el mecanismo más frecuente de activación es la sobreexpresión mediada por amplificación génica. Además, en humanos se expresan dos isoformas de ERBB2 con actividad oncogénica: ERBB2 Δ Ex16 y p95ERBB2. La isoforma ERBB2 Δ Ex16 se genera mediante procesamiento alternativo del RNA mensajero. Esta isoforma tiene una deleción de los 16 aminoácidos del exón 16 en la región yuxtamembranal, similar a las que se producen de manera espontánea en los tumores generados en el modelo MMTV-Neu. De igual manera que lo que ocurre como consecuencia de estas mutaciones, la isoforma ERBB2 Δ Ex16 está activada de manera constitutiva, debido a su capacidad para formar

dímeros mediante puentes disulfuro¹⁰². La expresión inducible de ERBB2 Δ Ex16 en ratones transgénicos produce el rápido desarrollo de tumores multifocales y metastásicos¹⁰³. La isoforma p95ERBB2 es una variante truncada que carece de la región extracelular del receptor. Puede generarse mediante traducción alternativa del RNA mensajero o mediante proteólisis. La isoforma p95ERBB2 tiene actividad tirosina kinasa, se expresa en el 30% de los tumores que sobreexpresan ERBB2 y se ha asociado con el desarrollo de metástasis y mal pronóstico¹⁰⁴.

1.3.3.3 Vía del factor de crecimiento fibroblástico

El factor de crecimiento fibroblástico (FGF) induce la proliferación celular, inhibe la apoptosis, promueve la invasión y estimula la angiogénesis. Se han descrito 18 ligandos y 4 receptores (FGFR1-4). Como consecuencia de la activación de esta ruta se produce un aumento de la señalización de las vías de PI3K/AKT/mTOR, de MAPK, de STAT y de RSK2. La vía de FGF participa en numerosas enfermedades humanas y promueve la progresión tumoral cuando se produce la mutación o amplificación de FGF o FGFR¹⁰⁵.

1.3.3.4 Ruta de PI3K/AKT/mTOR

Esta vía de señalización es un nodo en el que interaccionan las señales procedentes de diferentes receptores tirosina kinasa y otros agentes oncogénicos. Los receptores tirosina kinasa, entre los que se incluyen ERBB2, FGF1-R e IGF1-R, activan PI3K mediante la unión de la subunidad reguladora p85 α de PI3K al receptor a través de los dominios SH2 de esta subunidad. Esta unión provoca que la subunidad catalítica p110 transfiera grupos fosfato a fosfolípidos de la membrana plasmática, generando fosfatidil-inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) que atrae a distintas kinasas a la membrana, activando la cascada de señalización. La primera molécula efectora de esta cascada es AKT, que se activa parcialmente mediante la fosforilación en el residuo T308 por las kinasas dependientes de fosfatidilinositol (PDK). La activación completa de AKT se produce cuando se fosforila en el residuo S473, que es sustrato de mTORC2 y de kinasas de la familia PIKK. Por otro lado, AKT está regulado negativamente por el supresor de tumores PTEN que desfosforila a PIP3, y por las fosfatasa PP2A y PHLPP1/2 que desfosforilan directamente a AKT. AKT activado tiene numerosos sustratos a través de los cuales regula procesos tan variados como el crecimiento, la proliferación celular, la supervivencia, el metabolismo, la angiogénesis o la transición epitelio-mesénquima¹⁰⁶. Además, AKT regula la actividad de mTOR a través de la fosforilación de TSC2, lo cual resulta en un aumento de la actividad kinasa de mTOR en el complejo mTORC1, que a su vez inhibe a AKT mediante un proceso de retroalimentación negativa. De esta manera, mTOR se encuentra tanto por debajo como por encima de AKT en esta vía de señalización.

Hay tres isoformas de AKT estrechamente relacionadas (AKT1, AKT2 y AKT3) que comparten muchos sustratos, pero para las que también se han descrito sustratos específicos de isoforma¹⁰⁶. La regulación de la vía de PI3K/AKT está alterada en varias enfermedades, incluyendo cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares y neurológicas. En cáncer se producen con frecuencia mutaciones activadoras de PI3K y de AKT, así como la pérdida de función de PTEN. En el caso de los tumores de mama, esta vía está activada en el 70% de los casos mediante mutaciones en los genes *PI3KCA*, *PI3KCB*, *PI3KR1*, *AKT1*, *AKT2*, *PDK1* y *PTEN*^{107, 108}. En el caso de *PTEN*, como ya hemos visto, la herencia de una mutación en este gen causa *síndrome de Cowden* y aumenta el riesgo de cáncer de mama; pero la mutación es más rara en tumores esporádicos (<5%), y parece que el mecanismo más frecuente para inactivar el gen es su pérdida, que ocurre en el 30%-40% de estos tumores¹⁰⁹.

En cuanto a mTOR, es un coordinador del crecimiento y el metabolismo celular que, como ya hemos comentado, es tanto diana como regulador de AKT, y su activación produce la inhibición de la vía de PI3K mediante retroalimentación negativa. mTOR actúa como un sensor de diversas señales nutricionales y ambientales, que incluyen factores de crecimiento, niveles energéticos, estrés celular y concentración intracelular de aminoácidos¹¹⁰. Lleva a cabo su función mediante la fosforilación de sustratos que estimulan procesos anabólicos, como la traducción del RNA mensajero y la síntesis de lípidos, y que inhiben procesos catabólicos, como la autofagia. Se han descrito dos complejos de los que mTOR forma parte: mTORC1 y mTORC2. El complejo mTORC1 es sensible a rapamicina, y responde a nutrientes y factores de crecimiento regulando el crecimiento celular y la proliferación a través de P70S6K y 4EBPs. Este complejo además es el responsable de la retroalimentación negativa sobre AKT. Por otra parte, el complejo mTORC2 es insensible a rapamicina, regula la polaridad celular y el citoesqueleto, y activa a AKT. Alteraciones en la regulación de mTOR favorecen el desarrollo de enfermedades metabólicas, cáncer y envejecimiento¹¹¹.

1.3.3.5 Ruta de proteína kinasas activadas por mitógenos

Las proteína kinasas activadas por mitógenos (MAPK, de *mitogen-activated protein kinases*) son kinasas específicas de serina/treonina. Se han descrito siete cascadas de señalización intracelular de este tipo, y cuatro de ellas se han visto implicadas en cáncer de mama: la vía de ERK1/2, la vía de JNK, la vía de P38 y la vía de ERK5¹¹². En particular, se ha observado que la vía de ERK1/2 juega un papel especialmente importante en varios tipos de tumores de mama y en modelos experimentales de progresión de la enfermedad. La señalización a través de estas rutas se produce mediante la activación

secuencial de una MAPK kinasa kinasa (MAPKKK), de una MAPK kinasa (MAPKK) y una MAPK.

Considerando la vía de ERK1/2, ésta puede activarse como consecuencia de la señalización procedente de receptores tirosina kinasa, receptores acoplados a proteína G, y receptores no nucleares de hormonas esteroideas¹¹². El activador primario de la vía es RAS, una GTPasa de pequeño tamaño que activa a RAF1 (MAPKKK) que entonces fosforila y activa a MEK1/2 (MAPKK), que finalmente activa a ERK1/2. Las dos isoformas de ERK, ERK1 y ERK2, se expresan de manera ubicua y parecen presentar redundancia funcional. Al ser fosforilado por MEK, ERK dimeriza y se distribuye por toda la célula. En estudios proteómicos se han identificado al menos 270 sustratos de ERK, distribuidos en distintos compartimentos celulares, que incluyen reguladores de la transcripción, reguladores de la apoptosis y receptores de hormonas esteroideas, por ejemplo ER α ¹¹³.

Las consecuencias biológicas de la activación de los sustratos de ERK1/2 incluyen la estimulación de la proliferación y de la diferenciación, la promoción de la supervivencia celular¹¹⁴, el impulso de la motilidad celular¹¹⁵, la invasión y la angiogénesis¹¹⁶. Esta vía se encuentra mutada en el 30% de los casos de cáncer de mama, aunque parece que la alteración de la vía de ERK1/2 no es suficiente por sí sola para provocar el cáncer y aparece junto con otras mutaciones o alteraciones en los niveles de otras proteínas de señalización como ERBB2, c-MYC y P53. ERK1/2 y sus dianas se encuentran hiperactivadas con frecuencia en los tumores de mama, especialmente en casos de tumores que han infiltrado los ganglios linfáticos, sugiriendo que participa en el proceso de metástasis¹¹⁷. Sin embargo, algunos estudios clínicos encontraron que niveles elevados de ERK1/2 totales y/o ERK1/2 fosforilado se asociaron con buen pronóstico¹¹⁸.

Por otro lado, la MAPK P38 regula la diferenciación, inhibe el crecimiento y favorece la apoptosis. Se activa en respuesta a señales de estrés, factores de crecimiento, citocinas inflamatorias, radiación ultravioleta y choque térmico y osmótico. Esta activación conduce muchas veces a la muerte celular. Más recientemente, se han descrito otras funciones de P38 en el *ckeckpoint* de mitosis y como promotor de la supervivencia celular¹¹⁹.

Otra de las MAPK, JNK, tiene un amplio espectro de funciones, en ocasiones opuestas, pero su papel más conocido es como activador de la apoptosis en respuesta a estrés ambiental o intracelular¹²⁰. Además, induce la proliferación celular a través de la fosforilación de su sustrato c-JUN, el cual, una vez fosforilado, se une a c-FOS y produce la activación de la proteína activadora 1 (AP-1), que promueve la proliferación¹²¹.

En cuanto a ERK5, se activa en respuesta a factores de crecimiento, a la unión de integrinas y al estrés celular. Como consecuencia de su activación se induce la transcripción de c-JUN y c-FOS y se activan factores de transcripción de la familia *myocyte enhancer family* (como MEF2C) y c-MYC¹¹².

1.3.3.6 Vía del receptor de estrógenos

En las células tumorales de mama que expresan este receptor, los estrógenos estimulan la proliferación celular mediante la actividad de sus dos receptores nucleares clásicos, ER α y ER β , y del receptor acoplado a proteína G GPER, también conocido como GPR-30. Los genes que codifican ER α y ER β son *ESR1* y *ESR2*, respectivamente. De entre los receptores de estrógenos, ER α es el que participa en mayor medida en el cáncer de mama¹²², mientras que ER β tiene un papel más prominente en cáncer de próstata¹²³. En cuanto a GPER, algunos estudios sugieren que promueve la migración y la proliferación celular en carcinomas de mama, pero su función es aún controvertida¹²⁴.

ER α es un receptor nuclear dependiente de ligando, cuyas funciones se han dividido en genómicas y no genómicas. Para llevar a cabo sus funciones genómicas, ER α se une al ligando en el citoplasma y se activa, entonces se trasloca al núcleo donde se une a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE), presentes en sus genes diana. Entre estos se incluyen factores de crecimiento y receptores de los mismos, factores de transcripción como c-MYC, c-FOS y c-JUN, y proteínas de ciclo celular como ciclina D1 y P21. Estos genes diana promueven la proliferación y la supervivencia. Además, las funciones genómicas de ER α pueden activarse de manera independiente de ligando, por ejemplo, a través de su fosforilación como consecuencia de la activación de las vías de PI3K/AKT y MAPK¹²⁵. La actividad transcripcional de ER α está regulada por coactivadores y por correpresores, de tal manera que el balance entre éstos modifica su actividad. Además, ER α puede unirse a AP-1 y SP-1 para regular la transcripción de genes que no tienen sitios ERE, como IGF1¹²⁶. Las acciones no genómicas de ER α son más transitorias que las genómicas. ER α interacciona fuera del núcleo con componentes de otras vías de señalización, entre ellos ERBB2 e IGF-1R, y regula así la proliferación celular y la supervivencia^{127, 128}. Como vemos, gran parte de las funciones ER α están determinadas por su localización subcelular, y las proteínas de señalización con las que interacciona modulan esta localización.

1.3.3.7 Ruta de JAK/STAT

Esta vía de señalización es esencial para la hematopoyesis normal, y se encuentra alterada en enfermedades hematológicas e inflamatorias, pero también en tumores sólidos. La familia de kinasas JAK está compuesta por JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. La unión de un ligando, normalmente citocinas, al receptor al que se encuentran asociadas las JAK, produce la fosforilación en la región citosólica del receptor y, como consecuencia, la activación de las JAK¹²⁹. La eritropoyetina, la trombopoyetina, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), la interleucina (IL) 3 (IL-3) y la IL-5, entre otros, activan la señalización a través de JAK2; mientras que las IL-6, IL-10, IL-11, IL-19, IL-20, IL-22 y el interferón- γ (IFN γ) lo hacen a través de JAK1 y JAK2. La activación de JAK2 hace que se recluten los factores de transcripción STAT3 y STAT5 al complejo del receptor, donde son fosforiladas por JAK2. La fosforilación de las proteínas STAT permite que éstas formen homodímeros y heterodímeros estables que se traslocan al núcleo y regulan la transcripción de genes diana que codifican proteínas implicadas en proliferación, diferenciación y apoptosis como BCL-XL, ciclina D1, survivina, c-MYC y PIM1¹²⁹. También activan la expresión de genes que controlan la angiogénesis, como HIF1 α y VEGF, y relacionados con la transición epitelio-mesénquima, como son vimentina, TWIST, MMP-9 y MMP-7. Además de proteínas STAT, las JAK fosforilan otras proteínas de señalización celular, como PI3K y RAS, por lo que son un punto de interacción entre estas vías.

Respecto a su papel en tumores sólidos, se ha observado que STAT1, STAT3 y STAT5 están fosforiladas de forma persistente en cáncer de mama, pulmón y de cabeza y cuello. Su activación está inducida por un incremento en los niveles de citocinas, tanto de manera autocrina como paracrina, y por un aumento en la expresión de los receptores de citocinas¹³⁰. De manera más específica en mama, se ha visto que STAT3 se encuentra activado de manera constitutiva en el 40% de los tumores de mama¹³¹.

1.3.3.8 Vía de SFK

SRC es el miembro prototípico de la familia de tirosina kinasas no receptoras SFKs, que consta de 9 miembros (SRC, YES, FYN, FGR, LYN, HCK, LCK, YRK y BLK). Esta familia de proteínas tiene una estructura modular conservada, con una señal de acetilación en su extremo amino-terminal que les permite interactuar con la membrana plasmática. Su actividad se regula mediante fosforilación y defosforilación de residuos de tirosina. Por un lado, la fosforilación en la tirosina 530 por CSK produce una conformación inactiva de SRC, mientras que la autofosforilación en la tirosina 419 induce su conformación más activa. Las SFKs se activan por medio de su interacción con diferentes receptores

de factores de crecimiento, citocinas y hormonas; transmiten la señal hacia el interior de la célula, y regulan numerosos procesos como la división, la diferenciación, la supervivencia y la angiogénesis^{132, 133}. SRC también puede activarse mediante su interacción con integrinas cuando forma parte del complejo FAK/SRC, de manera que participa en procesos de adhesión celular, migración e invasión¹³⁴. SRC se expresa de manera ubicua, pero se ha observado que su expresión y actividad se encuentran elevadas en varios tipos de tumores. En cáncer de mama se ha asociado con la incidencia de metástasis y menor supervivencia de pacientes con tumores positivos para ER tratados con tamoxifeno¹³⁵. Sin embargo, no hay evidencia de que estas alteraciones se produzcan por mutación de SRC, sino que se producen como consecuencia de alteraciones en la actividad de la CSK que fosforila la tirosina 530 y las fosfatasas que la desfosforilan^{136, 137}.

1.4 Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama no es una única enfermedad, sino una entidad clínica que agrupa diversas enfermedades que muestran gran heterogeneidad tanto en las alteraciones moleculares que participan en su patogenia como en sus características clínicas. Debido a esta gran heterogeneidad, resulta fundamental agrupar la enfermedad observada en distintos pacientes en grupos que tengan características biológicas y clínicas similares.

En la práctica clínica actual, se realiza una clasificación histopatológica basada en criterios morfológicos y la expresión de algunos marcadores. Parámetros tumorales clásicos como el tipo histopatológico, el tamaño tumoral, el grado histopatológico y la afectación de los ganglios linfáticos correlacionan con la evolución clínica y son la base para definir el pronóstico¹³⁸. Los marcadores que se avalúan por inmunohistoquímica incluyen el receptor de estrógenos (ER), el receptor de progesterona (PR), ERBB2 y el marcador de proliferación celular Ki67. Estos marcadores aumentan el valor pronóstico de la clasificación y sirven de guía para seleccionar el tratamiento.

Posteriormente, el análisis de la expresión mediante *microarrays* permitió clasificar los tumores según su perfil de expresión en 4 grupos principales, los llamados subtipos intrínsecos: luminal A, luminal B, enriquecido en ERBB2 y basal^{139, 140}.

1.4.1 Tumores luminales A y B

Una de las principales características de los tumores luminales es que ambos subtipos expresan el receptor de estrógenos y las citoqueratinas luminales 8 y 18. Son los tumores con mejor pronóstico, aunque los luminales B tienen peor pronóstico que los luminales A y es posible que incluyan diferentes subgrupos. Los luminales B se caracterizan

por tener un mayor índice proliferativo, expresar niveles más altos de genes de proliferación y de ciclo celular como *AURKA*, y niveles más bajos de marcadores luminales como *FOXA1* o *PR*, siendo frecuentemente negativos para éste último¹⁴¹. Además, sobreexpresan *ERBB2* con mayor frecuencia que los del subtipo luminal A (18% frente a 7%). A nivel de DNA, los tumores luminal A tienen un menor número de alteraciones a lo largo del genoma, menos mutaciones en *TP53*, y más mutaciones en *PI3KCA* y *MAP3K1*¹⁴². Son el subtipo intrínseco más frecuente, de manera que entre el 60 y el 70% de los carcinomas ductales invasivos son de tipo luminal¹⁴³.

1.4.2 Tumores enriquecidos en ERBB2

Suponen entre el 10 y el 15% de todos los tumores de mama. Su perfil transcripcional se caracteriza por la sobreexpresión de genes relacionados con *ERBB2*, junto con niveles intermedios de genes relacionados con diferenciación luminal como *ESR1* y *PGR*, y baja expresión de genes basales como citoqueratina 5 y *FOXC1*. Suelen ser negativos para *ER* y *PR*. No todos los tumores con amplificación y sobreexpresión de *ERBB2* presentan el perfil de expresión que define a este grupo, y la mitad de ellos tienen elevados tanto los genes relacionados con *ERBB2* como genes asociados con diferenciación luminal y, en consecuencia, se clasifican como luminales. Estos tumores luminales que sobreexpresan *ERBB2* tienen peor pronóstico que los que no lo sobreexpresan. Debido a que hay tumores de varios subtipos intrínsecos que sobreexpresan *ERBB2*, el porcentaje que representan del total de casos está alrededor del 20-25%¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. A nivel genómico, el subtipo intrínseco enriquecido en *ERBB2* es el subgrupo que tiene un mayor número de alteraciones. Son frecuentes las mutaciones en *TP53* y *PI3KCA*, que se encuentran en el 72% y el 39% de los casos, respectivamente^{147, 148}.

1.4.3 Tumores basales

Su frecuencia está entre el 15 y el 20 % sobre el total de tumores de mama y estos tumores se caracterizan por la expresión de las citoqueratinas basales 5, 6, 14 y 17, niveles elevados de genes relacionados con la proliferación celular y niveles intermedios de genes relacionados con *ERBB2*. La mayoría de ellos no expresan *ER* ni *PR* y no sobreexpresan *ERBB2*, por lo que se clasifican histopatológicamente como *tumores triple negativos*. Sin embargo, entre el 2.1% y el 17.4% de los tumores de mama con perfil de expresión basal sobreexpresa *ERBB2*. Este tipo de tumor parece asociarse con la mutación en *BRCA1*¹⁴⁹, y es el segundo tipo que más alteraciones genómicas acumula. En cuanto al pronóstico, los tumores basales tienen inicialmente peor pronóstico que los tumores luminales, aunque el seguimiento de la supervivencia a largo plazo muestra

que las curvas de supervivencia de los tumores luminales B y basales se cruzan a los 10 años tras el diagnóstico¹⁴¹.

De esta manera, el análisis de la expresión génica ha mostrado ser una herramienta capaz de clasificar, de manera robusta, los tumores de mama en grupos relevantes desde el punto de vista pronóstico. Pese a ello, en la práctica clínica no resulta posible realizar *arrays* de expresión de todos los tumores que se diagnostican y la clasificación inmunohistológica es el criterio dominante para la definición del pronóstico y guiar las decisiones terapéuticas. Sin embargo, se han desarrollado ensayos para la clasificación de los tumores en los subtipos intrínsecos mediante el análisis de la expresión de un panel limitado de genes. Este tipo de ensayos tienen un gran potencial clínico, y de hecho su uso está recomendado por las guías de *Sociedad Americana de Oncología Clínica*, pero existen problemas de clasificación discordante entre las diferentes plataformas propuestas como *Oncotype*, *Prosigna*, *Blueprint* y *MammaTyper*¹⁵⁰.

Más recientemente, la integración de los perfiles de expresión y de las alteraciones genómicas presentes en un elevado número de tumores de mama permitió definir una nueva clasificación de los tumores en 10 grupos denominados *clusters integrativos*¹⁵¹. Esta clasificación añade un nivel más de complejidad, discrimina entre tumores con diferente pronóstico, y constituye un nuevo marco de trabajo en el que estudiar la biología de cada uno de los 10 subtipos definidos.

1.5 Tratamiento farmacológico del cáncer de mama

Las estrategias farmacológicas para tratar el cáncer de mama pueden dividirse en tres tipos: terapia hormonal, quimioterapia con agentes citotóxicos y terapia dirigida.

1.5.1 Terapia hormonal

La terapia hormonal se usa en el tratamiento de tumores que expresan receptores hormonales, y se basa en reducir el efecto que las hormonas producidas por el paciente tienen sobre las células tumorales. Para conseguir este objetivo hay tres estrategias posibles:

1. Supresión de la producción de hormonas por el ovario. El ovario es la fuente principal de estrógenos en mujeres premenopáusicas, de manera que la supresión temporal o permanente de su función produce un descenso en los niveles de estrógenos en estas mujeres. Además de la ooforectomía, hay fármacos con los que se puede conseguir esta supresión. Se utilizan agonistas de la *hormona liberadora de gonadotropina coriónica* (GnRH) que interrumpen el mecanismo de retroalimentación de la glándula

pituitaria que estimula la producción de estrógenos en el ovario. La goserelina y el leuprolide son ejemplos de fármacos con este efecto usados en terapia adyuvante de mujeres premenopáusicas con cáncer de mama positivos para receptores hormonales¹⁵².

2. Inhibición de la síntesis de estrógenos. Se usan *inhibidores de la aromatasas*, la enzima que convierte la testosterona en estradiol. Según su estructura química, estos fármacos se clasifican en inhibidores esteroideos, como el exemestano, e inhibidores no esteroideos como el letrozol y el anastrozol. Son los fármacos usados en primera línea de cáncer de mama postmenopáusico positivo para receptores hormonales¹⁵³.

3. Bloqueo de la unión del receptor de estrógeno a su ligando. En primera línea de tratamiento de mujeres premenopáusicas con cáncer de mama positivo para receptores hormonales se administra tamoxifeno, un modulador selectivo del receptor de estrógenos. Para el tratamiento de tumores que no responden a tamoxifeno o a otras terapias hormonales se usa fulvestrant, un antagonista puro del receptor de estrógenos que se une a éste impidiendo su dimerización, y además promueve su rápida degradación¹⁵⁴.

1.5.2 Quimioterapia con agentes citotóxicos

Estos agentes citotóxicos han constituido la herramienta clásica para el tratamiento del cáncer. Son fármacos que interfieren con procesos celulares esenciales para que las células que están proliferando completen su división celular con éxito, y en consecuencia, hacen que la célula sobre la que actúan muera o detenga su ciclo. Su eficacia antitumoral se debe a que los tumores, o al menos la mayoría de las células que los forman y que sostienen su rápido crecimiento, tienen un alto índice proliferativo. Sin embargo, al no actuar de manera específica sobre las células tumorales causan importantes daños en otros tejidos sanos, especialmente en aquellos con alta proliferación celular como las mucosas de la boca, faringe e intestino o la médula ósea. Por esta razón, estos fármacos producen importantes efectos secundarios. Actualmente, existe una gran variedad de agentes citotóxicos que actúan sobre procesos que tienen lugar durante las distintas fases del ciclo celular. Entre las mayores familias de estos fármacos podemos encontrar:

- Agentes alquilantes: fueron los primeros fármacos no hormonales utilizados en el tratamiento del cáncer. Son compuestos que se unen covalentemente al DNA e impiden su correcta replicación. Algunos ejemplos son las mostazas nitrogenadas, los alquil-sulfonatos, los platinos o las nitrosoureas.

- Antimetabolitos: son compuestos con estructura similar a la de moléculas que se utilizan en la síntesis de DNA y RNA, de manera que desplazan a los compuestos

naturales en las reacciones de síntesis y bloquean el funcionamiento normal de la célula. Pertenecen a este grupo los análogos de purinas y pirimidinas, y los antagonistas del folato.

- Agentes antimicrotúbulos: interfieren con la dinámica de los microtúbulos, que resulta esencial en el proceso de separación de los cromosomas durante la división celular. Los taxanos y los alcaloides de la vinca tienen este mecanismo de acción.

- Inhibidores de la topoisomerasa II: llevan a cabo su acción mediante dos posibles mecanismos. Algunos de estos agentes, llamados *venenos de la topoisomerasa II* estabilizan las uniones covalentes entre la enzima y el DNA, bloqueando la transcripción y la replicación. Otros compuestos son *inhibidores catalíticos* de la actividad de esta enzima, que resulta esencial para las células proliferativas¹⁵⁵. A este grupo pertenecen las antraciclinas, las antracenedionas, las bisdioxopiperazinas y las epipodofilotoxinas.

Entre los fármacos más utilizados en terapia adyuvante del cáncer de mama están las antraciclinas y los taxanos, y son una de las opciones preferidas en cáncer de mama metastásico negativo para receptores hormonales y aquellos que progresan tras terapia hormonal y nunca han sido expuestos a estos agentes^{146, 156}. La combinación de doxorrubicina y docetaxel es uno de los protocolos aprobados y ha sido ampliamente utilizado desde hace 20 años^{157, 158}.

1.5.3 Terapias dirigidas

El estudio de la biología del cáncer ha conducido a la identificación de numerosas alteraciones moleculares que se producen durante el desarrollo tumoral. Algunas de las moléculas más frecuentemente alteradas, y que parecen responsables de mantener la señalización aberrante característica de las células tumorales, se han propuesto como dianas terapéuticas. Las terapias dirigidas son aquellas en las que se usan fármacos que actúan de forma más o menos específica sobre estas moléculas diana e interfieren con su actividad en procesos importantes para las células tumorales. Al ir dirigidas frente a dianas específicamente alteradas en los tumores, estos fármacos no causan tantos daños en los tejidos no tumorales, de modo que, en principio, los efectos secundarios de las terapias dirigidas son menores que los producidos por la quimioterapia con agentes citotóxicos.

Como hemos visto, existen diferencias en las alteraciones moleculares y la frecuencia con la que éstas ocurren entre los distintos tipos de cáncer de mama. Puesto que estas terapias van dirigidas a una diana específica, sólo aquellos pacientes en los que la proteína o vía a la que va dirigida esté alterada van a beneficiarse del fármaco. A

continuación describimos algunas de las terapias dirigidas aprobadas para el tratamiento del cáncer de mama:

- Terapia dirigida frente a tumores positivos para el receptor de estrógenos (ER). Además de la hormonoterapia que ya hemos descrito, hay dos fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer de mama ER positivo-ERBB2 negativo: el inhibidor de CDK4/6 palbociclib y el inhibidor de mTOR everolimus¹⁵⁹.

- Terapia dirigida frente a tumores ERBB2 positivos. El primer anticuerpo recombinante aprobado por la FDA dirigido frente a este tipo de tumores fue trastuzumab, al que siguieron otro anticuerpo, pertuzumab, y el inhibidor de tirosina kinasa lapatinib. Tanto trastuzumab como pertuzumab son anticuerpos monoclonales humanizados, dirigidos frente a diferentes epítomos de la región extracelular de ERBB2. Una estrategia más reciente consiste en el uso de *inmunoconjugados*. Éstos son combinaciones de anticuerpos unidos a un agente citotóxico, de modo que el anticuerpo funciona como vehículo para dirigir la acción de estos compuestos citotóxicos a las células que expresan la proteína diana reconocida por el anticuerpo. En cáncer de mama ERBB2 positivo se ha aprobado T-DM1, que combina trastuzumab con el inhibidor de microtúbulos emtansina¹⁶⁰.

- Terapia dirigida frente al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Esta estrategia terapéutica también se conoce como *terapia antiangiogénica*. El primer fármaco diseñado para interferir con la función de VEGF fue el anticuerpo monoclonal humanizado bevacizumab, que se une a VEGF y bloquea su unión a los receptores celulares. Bevacizumab es el único fármaco dirigido que ha sido aprobado para el tratamiento de tumores triple negativos, ya que son tumores muy proliferativos que requieren un alto aporte de nutrientes y oxígeno. Sin embargo, fue retirado para esta indicación debido al escaso efecto sobre la supervivencia global en combinación con quimioterapia convencional^{161, 162}. Otros fármacos antiangiogénicos son ramucirumab, un anticuerpo dirigido frente al receptor de VEGF, y los inhibidores de la actividad tirosina kinasa de éste sunitinib y sorafenib. Sin embargo, los ensayos clínicos en fase III no han mostrado que el tratamiento con ramucirumab ni con estos inhibidores de tirosina kinasa produzcan una mejora significativa en la supervivencia libre de enfermedad ni en la supervivencia global¹⁶³⁻¹⁶⁶.

- Terapia dirigida frente a la vía de PI3K/AKT/mTOR. Como ya hemos visto, esta vía se encuentra activada en el 70% de los tumores de mama, por lo que algunas de las proteínas más importantes para su activación se han propuesto como posibles dianas terapéuticas. El uso de everolimus, un inhibidor de mTOR, ya ha sido aprobado por la

FDA¹⁶⁷. Además, los resultados de los ensayos clínicos con el inhibidor de PI3K pictilisib sugieren su utilidad terapéutica¹⁶⁸, y se están desarrollando estudios sobre la eficacia clínica de inhibidores de AKT¹⁶⁹.

- Terapia dirigida frente a mutaciones en *BRCA1/2*. Alrededor del 20% de los tumores de mama triple negativos tienen mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2*, y estos tumores son sensibles a inhibidores de la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP) debido a un efecto de letalidad sintética. La PARP es una enzima esencial en el proceso de reparación de las roturas de cadena sencilla en el DNA, que si no se reparan progresan y generan roturas de doble cadena. Las células que no tienen *BRCA1* o *BRCA2* no son capaces de reparar estas roturas de doble cadena y mueren¹⁷⁰. Un ejemplo de estos inhibidores que está siendo evaluado en ensayos clínicos es iniparib¹⁷¹.

1.5.4 Resistencia al tratamiento

El principal problema del tratamiento farmacológico del cáncer de mama es el desarrollo de resistencias. Este fenómeno ocurre en todos los tipos de cáncer y se da tanto frente a la quimioterapia con agentes citotóxicos como con terapia hormonal y terapia dirigida.

En el caso de los tumores positivos para receptores hormonales, entre el 20% y el 30% de ellos son resistentes a la terapia hormonal, ya sea esta resistencia intrínseca al tumor o desarrollada tras la exposición prolongada al tratamiento¹⁴⁶. Entre los mecanismos de resistencia descritos se encuentran las mutaciones en el gen *ESR1* o sus efectores¹⁷², y la utilización de mecanismos que compensan la inhibición de la vía de señalización de ER, como el descenso en los niveles de PTEN¹⁷³ y el incremento en la actividad de AKT¹⁷⁴. Además, en el caso del tratamiento con tamoxifeno se ha observado que la resistencia puede desarrollarse como consecuencia de cambios en el metabolismo del fármaco que reducen la concentración de su forma activa, el 4-OH tamoxifeno¹²².

En cuanto los agentes citotóxicos, además de la mutación o la sobreexpresión de la diana del fármaco o la inactivación de éste, el mecanismo de resistencia más estudiado consiste en la expulsión de los fármacos al exterior de la célula¹⁷⁵. Las células disponen de varios mecanismos naturales para eliminar sustancias tóxicas de su interior. Uno de los principales mecanismos protectores está constituido por los transportadores de la familia ABC (*ATP binding cassette*) de la membrana celular. Estas proteínas se expresan a niveles elevados en células *stem* y en barreras fisiológicas, y las protegen de xenobióticos y toxinas. Son proteínas transportadoras que expulsan de la célula numerosos sustratos con diferentes estructuras en un proceso de transporte activo, me-

dian­te consumo de ATP. Las células tumorales resis­ten­tes a los fármacos también sobreexpresan estas proteínas transportadoras que les permiten expulsar el agente citotóxico, de forma que adquieren un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos conocido como MDR (de *Multidrug Resistance*). Esta sobreexpresión puede ocurrir en cualquier tipo de cáncer y correlaciona con mal pronóstico¹⁷⁶.

Entre las proteínas de la familia ABC, la más estudiada es la glicoproteína-P (P-gp), codificada por el gen *ABCB1*. En la mama normal, esta proteína se expresa a niveles muy bajos, pero se sobreexpresa en el 40% de los tumores de este órgano¹⁷⁷. Además, la exposición a agentes citotóxicos puede inducir la expresión de P-gp en células tumorales de la mama¹⁷⁸, produciendo resistencia a diferentes fármacos incluyendo alcaloides, antraciclinas, podofilotoxinas y taxanos¹⁷⁹. Otros transportadores de la familia ABC relacionados con la resistencia a quimioterapia en cáncer de mama son la proteína asociada a MDR (MRP) y la proteína de resistencia en cáncer de mama (BCRP). Los sustratos de MRP son aniones orgánicos, y tiene la particularidad de que no sólo puede bombear estos compuestos cuando están cerca de la membrana, sino que es capaz de capturarlos en el citoplasma y expulsarlos de la célula¹⁸⁰. Entre los fármacos a los que confiere resistencia la sobreexpresión de MRP se encuentran las antraciclinas, el etopósido, los alcaloides de la vinca y el metotrexato. De manera similar a P-gp y MRP, los tumores de mama pueden sobreexpresar BCRP, y ésta se asocia con resistencia a antraciclinas, camptotecina, metotrexato y mitoxantrona¹⁷⁹.

Las terapias dirigidas no superan el problema del desarrollo de resistencias. En el caso del trastuzumab, el 65% de los pacientes presenta resistencia inicial, y el 70% de los que responden inicialmente al tratamiento desarrolla resistencias más tarde¹⁸¹. Se ha descrito que la resistencia inicial puede deberse a mutaciones en *PI3KCA*, *PTEN*, *IGF1*, *CCNE1* y *AXL*¹⁸². Los mecanismos de resistencia adquirida a trastuzumab incluyen el aumento de la expresión de variantes que han perdido el fragmento extracelular al que se une el anticuerpo, como la isoforma p95ERBB2, el enmascaramiento del epítopo por la mucina 4 o por CD44, y alteraciones en las vías de señalización por debajo del receptor, como la de PI3K/AKT/mTOR, que proporcionen independencia de la señalización procedente de ERBB2¹⁴⁶. Los tumores también desarrollan resistencia frente a los inhibidores de la actividad tirosina kinasa como lapatinib, que es un inhibidor combinado de la EGFR y ERBB2. Se ha descrito resistencia a lapatinib como consecuencia del aumento de la expresión de ER α en respuesta al descenso producido en la activación de AKT. Otros mecanismos observados incluyen mutaciones en ERBB2, aumento de la expresión de ERBB3, de AXL o de SRC^{91, 183}. Los tumores también desarrollan resistencia frente a la terapia antiangiogénica debido a la gran variedad de señales

proangiogénicas que pueden producir las células tumorales y a que las condiciones de hipoxia producidas por esta terapia inducen mecanismos de escape¹⁸⁴.

1.5.5 Variantes génicas de resistencia a quimioterapia

Además de la resistencia nativa o adquirida al tratamiento como consecuencia de alteraciones adquiridas en el tumor, existen diferencias en la respuesta al tratamiento entre individuos debidas a la existencia en la población de variantes génicas en la línea germinal. Estas variantes génicas afectan frecuentemente a genes implicados en el metabolismo o el transporte de los fármacos, y no sólo modifican la eficacia terapéutica de éstos, sino también su toxicidad y la susceptibilidad individual a desarrollar efectos adversos concretos. La farmacogenómica se ocupa del estudio de estas variantes heredables que contribuyen a la heterogeneidad en la respuesta y la toxicidad de los fármacos, y deben tenerse en cuenta en el desarrollo de la medicina personalizada.

En este trabajo seguimos una estrategia para buscar determinantes genéticos de la respuesta al taxano docetaxel y a la antraciclina doxorubicina. A continuación presentamos una breve revisión de las variantes génicas implicadas en la eficacia y toxicidad de estos fármacos que se han descrito en la bibliografía.

1.5.5.1 Variantes génicas de resistencia a docetaxel

El docetaxel es un análogo semisintético del paclitaxel y pertenece a la familia de los taxanos. Como ya hemos mencionado anteriormente, su efecto citotóxico se debe a que altera la dinámica de polimerización de los microtúbulos, de forma que interfiere con el proceso de mitosis, provoca la parada del ciclo celular y, en respuesta a esta parada, la muerte celular¹⁸⁵. La respuesta clínica al docetaxel y la incidencia de efectos adversos varían considerablemente entre pacientes, y parte de esta variabilidad se debe a diferencias en la farmacocinética del fármaco.

La detoxificación del docetaxel se produce en el hígado, donde las enzimas hepáticas CYP3A4 y CYP3A5 lo convierten en metabolitos no tóxicos¹⁸⁶. De hecho, se ha detectado RNA mensajero de estas enzimas en tumores, de modo que su expresión podría asociarse con la resistencia al fármaco¹⁸⁷. Así, se ha propuesto que polimorfismos en *CYP3A4* y *CYP3A5* podrían afectar al metabolismo del docetaxel, de modo que generarían diferencias en su farmacocinética entre individuos que podrían influir en la respuesta clínica. Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha han obtenido resultados controvertidos sobre el efecto de polimorfismos en estas enzimas sobre la farmacocinética del docetaxel, y ninguno de estos estudios ha observado influencias significativas de éstos en su toxicidad¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Una posible limitación de estos estudios es el

pequeño tamaño de muestra. Además de las enzimas metabolizadoras, las proteínas transportadoras localizadas en la membrana de los hepatocitos también pueden afectar a la farmacocinética del docetaxel. Las proteínas localizadas en la superficie del polo biliar que se encargan de la excreción y eliminación del docetaxel son ABCB1/P-gp, ABCG2, ABCC1 y ABCC2, y los genes que codifican estas enzimas son muy polimórficos. De hecho, como ya mencionamos anteriormente, estos transportadores se sobreexpresan en diferentes tipos de tumores, de manera que bombean los fármacos al exterior celular e inducen el desarrollo de resistencia a la quimioterapia. Por otro lado, las proteínas transportadoras SLCO1B1 y SLCO1B3 se localizan en la superficie del polo vascular, tienen alta afinidad por el docetaxel y lo introducen en los hepatocitos¹⁹⁰.

La presencia de diferentes polimorfismos en el gen *ABCB1* se ha asociado con diferencias en la respuesta al tratamiento con docetaxel de los pacientes con cáncer de mama^{191, 192}. De manera similar, algunos estudios han observado que variantes polimórficas en este gen determinan diferencias en la incidencia de neutropenia febril, y aunque las diferencias observadas no alcanzaron la significación estadística, el genotipo TT o TC en rs1128503 podría incrementar el riesgo a desarrollar neuropatía periférica^{187, 193}. De manera similar, Kiyotani *et al.* encontraron que el polimorfismo rs12762549 localizado en *ABCC2* se encuentra asociado al riesgo de leucopenia de grado 3-4 en población japonesa¹⁹⁴. Este mismo SNP se ha relacionado con diferencias en el aclaramiento del docetaxel en pacientes caucásicos¹⁹⁵.

En relación con los transportadores hepáticos SLCO1B1 y SLCO1B3, también se han encontrado polimorfismos que podrían modificar la farmacocinética y la toxicidad del docetaxel. Se ha visto que variantes en SLCO1B1 determinan diferencias en la captación del docetaxel por las células hepáticas *in vitro*. Sin embargo, no se ha visto que estas variantes determinen diferencias clínicas¹⁹⁶. En el caso de SLCO1B3, Chew *et al.* identificaron SNPs y haplotipos asociados con diferencias en el aclaramiento del docetaxel^{189, 197}. Algunas de las variantes en este gen también podrían aumentar el riesgo de desarrollar leucopenia o neutropenia.¹⁹⁴ Además, en un estudio de asociación de genoma completo (GWAS) realizado por Callens *et al.* en 2015, encontraron dos polimorfismos intrónicos en *SLCO1A2* asociados al riesgo de neutropenia febril¹⁹⁸.

Además de las proteínas transportadoras se han encontrado otras variantes que pueden modificar la toxicidad del docetaxel. Por ejemplo, Hertz *et al.* identificaron mediante GWAS un polimorfismo en *VAC14* asociado con el desarrollo de neuropatía durante el tratamiento con docetaxel¹⁹⁹. En otro GWAS llevado a cabo por Schneider *et al.* detectaron el polimorfismo rs3125923, localizado en una región no codificante del cromosoma 1, asociado con el desarrollo de neuropatía periférica²⁰⁰.

1.5.5.2 Variantes génicas de resistencia a doxorrubicina

La doxorrubicina pertenece a la familia de las antraciclinas. Aunque no se conocen por completo todos los mecanismos a los que debe su actividad citotóxica, su principal efecto es a través de su acción sobre la topoisomerasa II y la generación de daño en el DNA. Entre los efectos secundarios que produce destacan la toxicidad hematológica y cardíaca, pero también puede producir daños en riñón, hígado y cerebro²⁰¹.

De igual manera que en el caso del docetaxel, la doxorrubicina se metaboliza en el hígado y se excreta principalmente en heces. Es sustrato de las carbonil-reductasas CBR1 y CBR3, que participan en la reducción de la doxorrubicina a doxorrubicinol. La enzima que participa en mayor medida en este proceso en el hígado es CBR1²⁰². El doxorrubicinol tiene un efecto inhibitorio de la contracción de las células cardíacas diez veces superior al de la doxorubicina, y se ha visto que la sobreexpresión de carbonil-reductasa en el corazón acelera el desarrollo de cardiotoxicidad inducida por doxorrubicina en ratones transgénicos²⁰³. *In vitro* se ha observado que polimorfismos en *CBR3* producen cambios funcionales en la actividad enzimática del producto génico, por lo que estos polimorfismos podrían modificar la farmacocinética de la doxorrubicina y sus metabolitos. Sin embargo, los estudios realizados al respecto no han generado resultados consistentes¹⁹⁰.

Los transportadores ABC como ABCB1/P-gp, ABCC1, ABCC2 y ABCG2 participan en el transporte celular de la doxorrubicina para su eliminación²⁰⁴, y uno de los transportadores que median su entrada en la célula es SLC22A16²⁰⁵. En el caso de *ABCB1*, se han detectado al menos dos polimorfismos asociados con la supervivencia global en pacientes con cáncer de mama: rs2235047 en población asiática²⁰⁶ y rs2032582 en europeos caucásicos²⁰⁷. Estos dos polimorfismos se encontraron además asociados con la variable toxicidad hematológica de la doxorrubicina^{206, 207}. Wojnowski *et al.* estudiaron una cohorte de 537 casos de linfoma no Hodgkin tratados con doxorrubicina y observaron que el polimorfismo rs45511401 en *ABCC1* se asoció con el riesgo de cardiotoxicidad aguda²⁰⁸. Este mismo estudio encontró otros dos polimorfismos en *ABCC2*, rs8187694 y rs8187710, asociados con la cardiotoxicidad aguda inducida por doxorrubicina, pero al realizar la corrección para comparaciones múltiples esta asociación no era estadísticamente significativa. En cuanto a *SLC22A16*, aunque se han descrito variantes de que determinan diferencias en la exposición a doxorrubicina y doxorrubicinol, y se han encontrado polimorfismos en este gen asociados con leucopenia, no se ha visto que tengan un efecto significativo sobre la supervivencia de los pacientes²⁰⁷.

Además, estudios genéticos en ratón han permitido identificar variantes génicas en otros genes que podrían estar implicadas en la respuesta a doxorubicina y su toxicidad. Recientemente, Song *et al.* publicaron un estudio de ligamiento en ratón en el que mapearon una región genómica asociada a diferencias en el aclaramiento de la doxorubicina pegilada. Mediante refinamiento de la región identificaron *Gulp1*, gen que codifica una proteína que participa en el proceso de fagocitosis²⁰⁹. En otro estudio en el que utilizaron cruces experimentales para identificar determinantes genéticos de la susceptibilidad a la nefropatía inducida por doxorubicina, Zheng *et al.* identificaron un *locus* de susceptibilidad localizado en el cromosoma 16 al que denominaron *DOXNPH²10*.

2. Enfermedades de génesis compleja y heredabilidad perdida

Como ya hemos expuesto en la sección dedicada a la genética del cáncer de mama, la susceptibilidad a esta enfermedad no está determinada por el efecto de un único gen, sino por la suma de los efectos de múltiples genes que tienen un efecto discreto. Incluso en aquellos casos de cáncer familiar en los que se hereda una mutación en un gen que confiere un elevado riesgo de desarrollar la enfermedad, la penetrancia es incompleta y el riesgo se ve modificado por otros genes. En este sentido, el cáncer de mama es una enfermedad de génesis compleja, y la susceptibilidad a desarrollarlo puede entenderse como un rasgo complejo. De la misma manera que la susceptibilidad, otros aspectos de la enfermedad como la velocidad del crecimiento del tumor, el desarrollo de metástasis, la respuesta al tratamiento y la toxicidad asociada a éste también son fenotipos complejos determinados por el efecto de genes que regulan varios procesos a distintos niveles de organización biológica.

2.1 El problema de la heredabilidad perdida

Parte de la variabilidad fenotípica observada en un rasgo complejo dentro de una población tiene origen genético, determinado por las diferencias genéticas entre los individuos de la población, y otra parte se debe a la influencia del ambiente. La *heredabilidad en sentido amplio* se define como la proporción de la varianza fenotípica explicada por la varianza genotípica, mientras que la *heredabilidad en sentido estricto* es la proporción de esta variabilidad fenotípica debida a la varianza genética aditiva, es decir, al efecto de determinantes genéticos con efecto aditivo, excluyendo los determinantes genéticos

con dominancia y epistasia²¹¹. En estudios de ligamiento, las regiones genómicas asociadas con la variabilidad en un fenotipo complejo se llaman *loci* de rasgo cuantitativo, o QTL (de *quantitative trait loci*).

Existen rasgos para los que la proporción de la varianza fenotípica explicada por el componente genético es muy grande. Por ejemplo, en el caso de la altura se ha estimado que el 80-90% de la varianza se explica por el componente genético heredable²¹². Sin embargo, aunque se han identificado numerosas variantes genéticas asociadas con la variabilidad en la altura, todas ellas no explican más que el 5-10% de la varianza de este fenotipo. Y este no es un problema específico de la altura, sino que, en general, hay una gran discrepancia entre la proporción de la variabilidad fenotípica que se estima que se debe a diferencias genéticas, y la proporción de la esta variabilidad que es atribuible a las variantes genéticas que se han encontrado asociadas con ese fenotipo. Esta discrepancia es lo que se conoce como *heredabilidad perdida*^{213, 214}.

Con respecto a las enfermedades de génesis compleja, se han propuesto dos teorías sobre la forma en que están determinadas por el componente genético. Inicialmente se pensaba que el componente genético de enfermedades de génesis compleja como el cáncer esporádico, la enfermedad de Alzheimer o la diabetes era el resultado de la suma de los efectos de variantes alélicas que se encuentran en la población con una alta frecuencia. Esta es la hipótesis denominada “variante común-enfermedad común”. Los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) se concibieron como una herramienta que permitiría identificar las variantes genéticas que contribuyen a la patogénesis de estas enfermedades y, de hecho, gracias a estos estudios se han identificado numerosos QTL y variantes de secuencia asociados a fenotipos complejos. Sin embargo, el efecto de cada una de las variantes identificadas típicamente explica sólo el 1-2% de la varianza del fenotipo, y todas juntas no explican más del 30%²¹⁵. De esta manera, los GWAS tampoco permitieron resolver el problema de la *heredabilidad perdida*²¹⁶.

Por esta razón se planteó la hipótesis de “variante rara-enfermedad común”, que plantea que parte de la contribución genética a estas enfermedades complejas procede de variantes raras, presentes en la población con una baja frecuencia²¹⁷. Los GWAS no son adecuados para detectar estas variantes raras, pero las técnicas de secuenciación masiva sí lo son y han permitido identificar algunas de estas variantes raras que contribuyen a fenotipos complejos^{218, 219}. Sin embargo, aunque estos estudios prueban que la hipótesis “variante rara-enfermedad común” es cierta, tampoco han conseguido resolver el problema de la *heredabilidad perdida*, ya que el efecto de las variantes encontradas sigue sin explicar una proporción considerable de la heredabilidad esperada.

2.2 Fenotipos intermedios de los rasgos complejos

Cualquier fenotipo complejo es el resultado del efecto de otros fenotipos intermedios o subfenotipos, es decir, fenotipos de segundo orden que actúan a un nivel inferior de organización biológica. Las enfermedades de génesis compleja como el cáncer esporádico, la diabetes, la cardiopatía isquémica y otras muchas son consecuencia de estos fenotipos intermedios que están causalmente relacionados con estas enfermedades y participan en la patogénesis de las mismas. Además, muchas veces los fenotipos de segundo orden son a su vez fenotipos complejos que se ven modificados por la acción de fenotipos de orden inferior, y así sucesivamente, generando complejas redes de interacción entre procesos a distintos niveles que determinan finalmente el fenotipo principal. De esta manera, la variabilidad en cada uno de los fenotipos intermedios tiene un efecto sobre la variabilidad en los fenotipos de niveles superiores, y el fenotipo principal es el resultado de la contribución de todos los fenotipos intermedios de niveles inferiores.

La estrategia de diseccionar la enfermedad en fenotipos intermedios para estudiar la contribución del componente genético de los mismos al de la enfermedad se ha usado principalmente en psiquiatría²²⁰. Las enfermedades psiquiátricas son fenotipos complejos cuyo diagnóstico y definición se basan en características difíciles de cuantificar. Por esta razón, resulta difícil encontrar determinantes genéticos asociados con este tipo de enfermedades. Para solucionar este problema, se caracterizaron fenotipos intermedios asociados con la enfermedad que fueran más fáciles de cuantificar utilizando técnicas de imagen o determinaciones analíticas, por ejemplo, los niveles de neurotransmisores²²⁰. El uso de fenotipos intermedios para identificar determinantes genéticos de rasgos complejos se ha usado con éxito no sólo en psiquiatría, sino también en el estudio de otras enfermedades como el síndrome de QT largo²²¹, la hemocromatosis idiopática²²², la epilepsia mioclónica juvenil²²³ o la poliposis adenomatosa familiar²²⁴.

2.3 Parte de la heredabilidad perdida de los rasgos complejos podría explicarse a través de los determinantes genéticos de los fenotipos intermedios

Si consideramos un rasgo complejo como consecuencia de sus fenotipos intermedios, los determinantes genéticos que se identifican asociados directamente con el fenotipo principal en realidad contribuyen a la variabilidad en este fenotipo a través de su efecto sobre alguno de los fenotipos intermedios. De esta manera, sólo detectaremos aquellos

determinantes genéticos que tengan un efecto sobre el fenotipo principal lo suficientemente fuerte como para ser detectados directamente. Por ejemplo, al realizar el análisis de ligamiento directamente sobre el rasgo complejo objeto de estudio, sólo detectaremos aquellos QTL que contribuyan con suficiente fuerza como para que la asociación sea directamente detectable. Teniendo en cuenta la cantidad de fenotipos intermedios que contribuyen a la variabilidad en el fenotipo complejo, es posible que muchos QTL ligados a fenotipos intermedios no sea detectables al nivel del fenotipo principal. Sin embargo, todos aquellos determinantes genéticos que tengan algún efecto sobre los fenotipos intermedios contribuyen a la variabilidad en el fenotipo principal, y aquellos que no sean detectables directamente asociados a éste podrían contribuir a la *heredabilidad perdida* (**Figura 7**).

Por esta razón, recientemente hemos propuesto que una posible estrategia para identificar parte de la *heredabilidad perdida* relacionada con las enfermedades de génesis compleja sería el estudio de la heredabilidad de los fenotipos intermedios que participan directamente en la patogénesis de la enfermedad²²⁵.

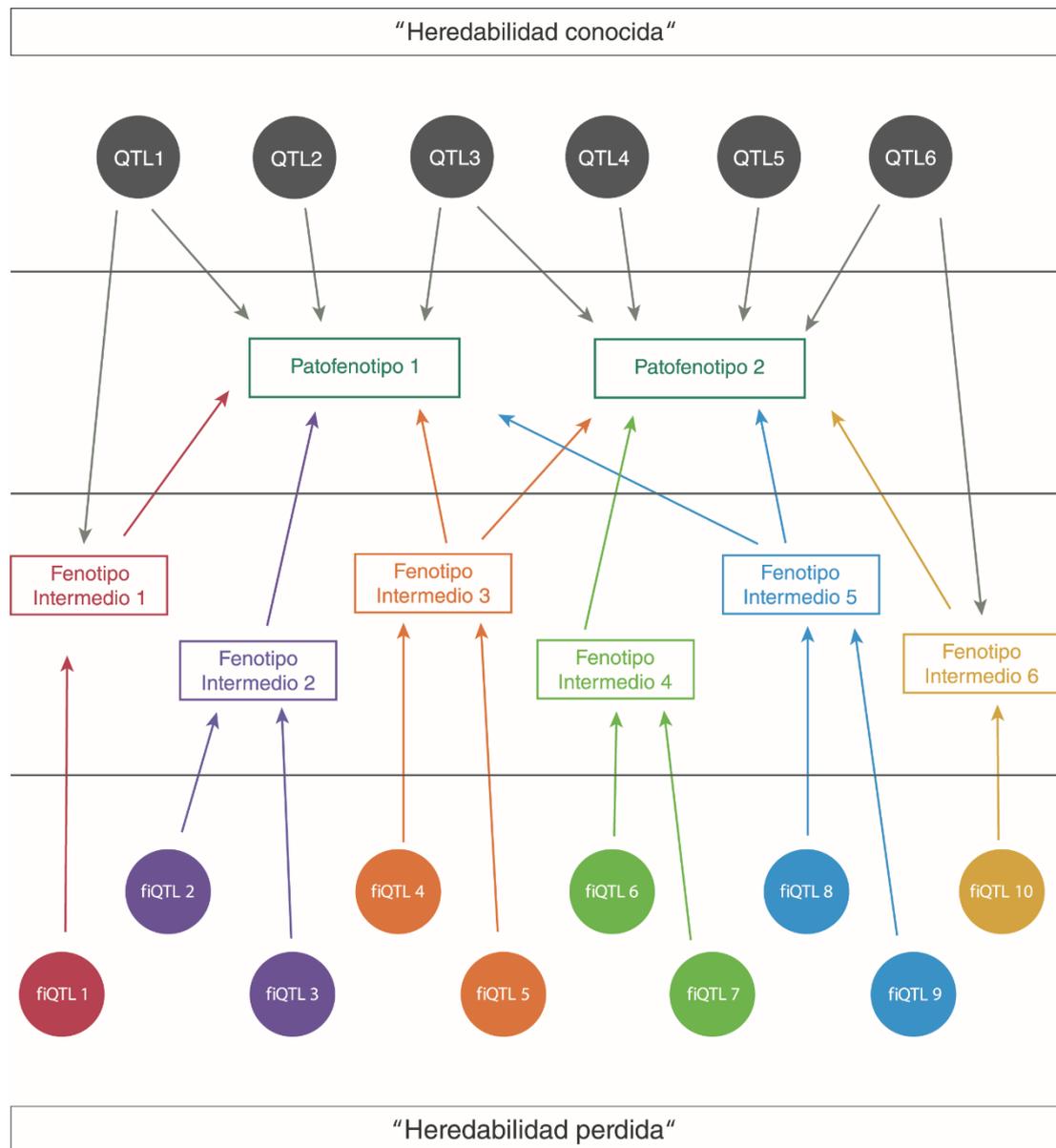


Figura 7. Esquema que explica la posible localización de la hereditabilidad perdida de las enfermedades de génesis compleja. Es posible diseccionar la enfermedad en diferentes patofenotipos que caracterizan diferentes aspectos de ésta. Los QTL ligados a estos patofenotipos en una población constituyen la hereditabilidad conocida para esa enfermedad. Sin embargo, hay una serie de fenotipos intermedios que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad. La identificación de determinantes genéticos que contribuyen a la variabilidad en estos fenotipos intermedios (fiQTL de fenotipo intermedio-QTL) puede ser una estrategia para identificar parte de la hereditabilidad perdida, por medio de la identificación de determinantes genéticos no detectables directamente asociados a los patofenotipos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo

El cáncer de mama es una enfermedad de génesis compleja. La diferente susceptibilidad y evolución entre pacientes que aparentemente tienen la misma enfermedad estarían determinadas por la interacción entre el ambiente y el fondo genético, con una influencia poligénica²²⁶. Además, los rasgos complejos son consecuencia de la interacción entre múltiples fenotipos intermedios que actúan a distintos niveles de organización biológica²²⁵. Así, la variabilidad de expresión fenotípica del cáncer de mama, como rasgo complejo, estaría determinada por diferencias en los fenotipos intermedios que influyen sobre diferentes aspectos de la enfermedad. Según el compartimento en el que se localizan, podemos diferenciar entre fenotipos intermedios intrínsecos a las células tumorales, como la proliferación, la apoptosis, la invasión celular, etc.; y extrínsecos a las células tumorales, presentes en otros compartimentos como el estroma tumoral y factores locales y sistémicos.

En este trabajo planteamos que parte de la variabilidad en la susceptibilidad y la evolución del cáncer de mama entre individuos, tanto en ausencia de tratamiento como en presencia del mismo, podría explicarse mediante diferencias en fenotipos intermedios intrínsecos y extrínsecos de la enfermedad. Comprobar esta hipótesis en la población humana es muy difícil debido a la elevada heterogeneidad genética de la misma y a la complejidad de su interacción con el ambiente^{227, 228}. Por ello, para nuestro estudio utilizamos cohortes de ratones de heterogeneidad genética simplificada y condiciones ambientales controladas.

Para validar esta hipótesis, en un primer estudio, caracterizamos el distinto comportamiento del cáncer de mama en condiciones de libre evolución, sin tratamiento, en una corte de ratones con heterogeneidad genética (F1BX1). En este estudio, analizamos en qué medida distintos fenotipos intermedios intrínsecos al tumor ayudaron a definir el comportamiento heterogéneo de la enfermedad. De manera análoga, llevamos a cabo un segundo estudio sobre fenotipos intermedios de la respuesta a la quimioterapia, el cual se realizó en dos experimentos complementarios. Primero, para facilitar el análisis de fenotipos intermedios intrínsecos a las células tumorales, se realizó el aloinjerto de tumores generados en la cohorte genéticamente heterogénea F1BX1 en receptores F1, genéticamente homogéneos, que se trataron con quimioterapia. De esta manera, se minimizó la contribución del componente extrínseco a la variabilidad en la respuesta del tumor. En segundo lugar, para completar este estudio, se caracterizó la respuesta a la quimioterapia de una segunda cohorte de ratones genéticamente heterogénea (F1BX2), en la que, por definición, la variabilidad genética contribuyó a la diferente respuesta a la

quimioterapia y a la variabilidad en los fenotipos intermedios, tanto intrínsecos como extrínsecos a las células tumorales.

Objetivo global

El objetivo global de este trabajo fue identificar determinantes genéticos y moleculares de la evolución y la respuesta a la quimioterapia del cáncer de mama mediante el análisis de fenotipos intermedios.

Objetivos específicos

Para alcanzar este objetivo global, se plantearon tres objetivos específicos:

Objetivo 1: Caracterizar la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama sin tratamiento en función de fenotipos intermedios intrínsecos al tumor y determinantes genéticos.

Objetivo 2: Definir la respuesta variable a la quimioterapia con doxorubicina o docetaxel en función de fenotipos intermedios intrínsecos al tumor, en un contexto de homogeneidad genética extrínseca al mismo.

Objetivo 3: Explicar la respuesta variable a la quimioterapia con doxorubicina y/o docetaxel del cáncer de mama en función de la señalización tumoral y en un contexto de heterogeneidad genética.

En la **Figura 8** se presenta un mapa conceptual de la hipótesis que sirve de base para este trabajo, los objetivos específicos planteados y el modelo en el que se desarrolló cada objetivo.

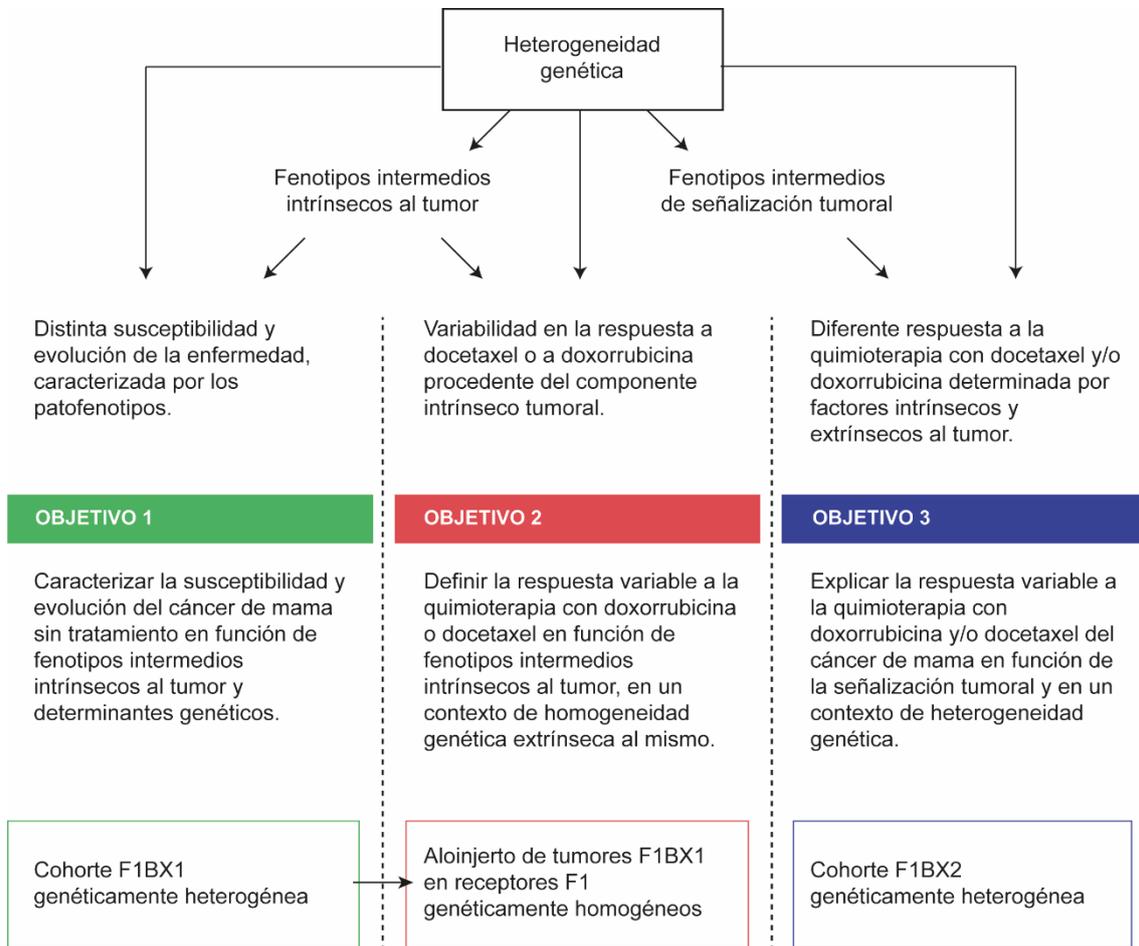


Figura 8. Mapa conceptual de la hipótesis, los objetivos específicos planteados y los modelos experimentales en los que se desarrollaron.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Modelo experimental

1.1 Cepas de ratón

Las cepas singénicas o *inbred* utilizadas en este estudio fueron:

- C57BL/6J: cepa que, entre otras características, presenta resistencia al desarrollo del cáncer de mama²²⁹, procedente de los *Laboratorios Charles River España*.

- FVB/NJ: cepa susceptible a desarrollar cáncer de mama²³⁰, que se obtuvo de los *Laboratorios Charles River España*.

- FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J: Ratón transgénico en fondo genético FVB portador del proto-oncogén *ErbB2/Neu* bajo el promotor LTR del *Mouse Mammary Tumor Virus* (MMTV), procedente de los *Laboratorios Jackson*. Este transgénico se generó en el laboratorio del Dr. Muller⁹⁹. El transgén consiste en la secuencia de cDNA de la versión silvestre del gen *ErbB2/Neu* de rata, a la que se ha añadido la región promotora mencionada del MMTV y secuencias de *splicing* alternativo y poliadenilación procedentes del SV40 que confieren estabilidad al transcrito. El transgén no produce cambios fenotípicos en los ratones macho y se expresa a niveles bajos en el epitelio mamario normal, en la glándula salival, bazo, timo y pulmón, y a niveles elevados en el tejido tumoral⁹⁹. La expresión del transgén en hembras con fondo genético FVB induce la aparición de adenocarcinomas focales rodeados de epitelio mamario hiperplásico a partir de los cuatro meses de edad, y con una mediana de edad de aparición de tumores de 7 meses. Además, más del 70% de los ratones desarrollan metástasis multifocales en el pulmón cuando superan los ocho meses de edad. Debemos diferenciar este modelo *MMTV-ErbB2/Neu* con la versión silvestre proto-oncogénica de *ErbB2/Neu*, del transgénico desarrollado por el grupo del Dr. Leder que expresa la versión mutada oncogénica de *ErbB2/Neu* (o *NeuT*) bajo el control del mismo promotor del MMTV. Los ratones *MMTV-NeuT* desarrollan tumores multifocales, que afectan a todo el epitelio mamario, y que aparecen mucho antes. Incluso los machos pueden desarrollar tumores de mama en el modelo con la versión oncogénica de *ErbB2/Neu*.

Los animales se estabularon en el *Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca* en condiciones libres de patógenos (SPF). Las prácticas a las que se les sometió estuvieron de acuerdo con las disposiciones de la Unión Europea recogidas en el *Real Decreto 1201/2005 del 10 de octubre del Ministerio de Agricultura, Pesca y Ganadería* sobre la "Protección de los animales utilizados para experimentación

y otros fines específicos”. El proyecto fue evaluado positivamente por el *Comité de Bio-ética de la Universidad de Salamanca*.

1.2 Generación de la primera cohorte con heterogeneidad genética y fenotípica mediante retrocruce o *backcross*

La cohorte en la que estudiamos la susceptibilidad y la libre evolución de la enfermedad, sin tratamiento, se generó siguiendo la estrategia de retrocruce o *backcross* entre dos cepas consanguíneas o singénicas (*inbred*), que presentan diferente comportamiento en cuanto al fenotipo que se quiere estudiar, en este caso, susceptibilidad al cáncer de mama. Como parentales, se seleccionaron la cepa resistente C57BL/6J y la cepa susceptible FVB/NJ, portadora del proto-oncogén inductor de cáncer de mama *ErbB2/Neu*, bajo el promotor LTR del MMTV (FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J). Estos ratones FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J son portadores del transgén en sus dos cromosomas, en homocigosis, de manera que lo transmitieron en heterocigosis a toda su progenie. Mediante el cruce entre estas dos cepas se obtuvo la primera generación filial, *B6FVBF1-Tg(MMTVneu)* (F1, a partir de ahora), cuyos individuos son genéticamente idénticos entre sí, y son heterocigotos en todos los *loci* diferentes entre C57/BL6J y FVB/NJ, de modo que portan un alelo procedente de cada una de las cepas parenterales.

Los ratones F1 se retrocruzaron con ratones de la cepa parental FVB/NJ, y se generaron así los ratones (*FVB x B6FVBF1*)-Tg(MMTVneu), a los que nos referiremos como F1BX1 a partir de ahora (**Figura 9**). Como consecuencia de esta estrategia de cruce, cada ratón fue portador de una combinación única de alelos procedentes de las dos cepas parentales en una proporción variable. Así, estos ratones pudieron ser, en cada *locus*, homocigotos para el alelo FVB (F/F) o heterocigotos, con un alelo de FVB y otro de C57BL/6 (F/B). En dicha combinación, el componente genético procedente de la cepa FVB fue mayoritario, ya que fue con la que se realizó el retrocruce, mientras que el componente C57BL/6 quedó reducido. Esto se hizo así deliberadamente para enriquecer la cohorte *backcross* en alelos de susceptibilidad a cáncer de mama. Mediante esta estrategia se generó un modelo de variabilidad genética controlada a partir de dos genomas homogéneos conocidos.

Puesto que la cohorte F1BX1 se generó mediante cruce entre ratones F1 portadores del transgén en heterocigosis y FVB/NJ no transgénicos, sólo aproximadamente la mitad de ellos heredaron el transgén *MMTV-ErbB2/Neu*. En este trabajo sólo presentaremos resultados de los estudios realizados con las hembras F1BX1 transgénicas.

Identificamos a los ratones transgénicos mediante PCR en DNA genómico extraído de un fragmento de cola obtenido al destetar a los ratones.

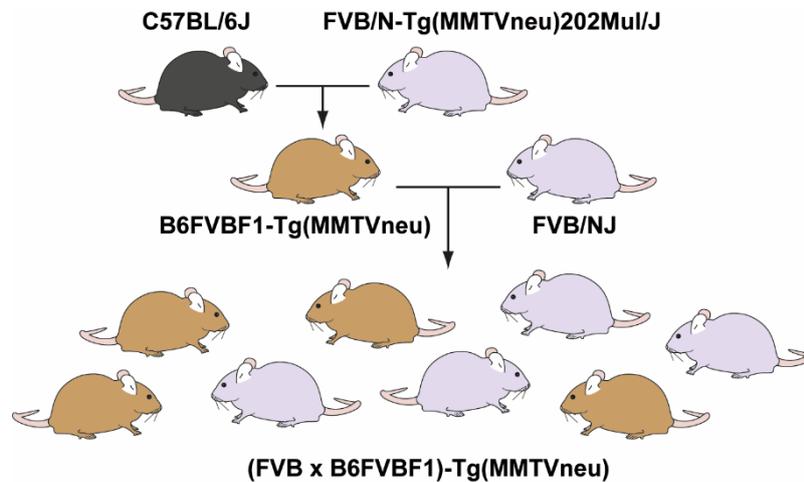


Figura 9. Esquema de la estrategia seguida para generar los ratones F1BX1.

1.3 Aloinjerto de tumores generados en la cohorte F1BX1 en receptores F1

El estudio de la respuesta al tratamiento de los tumores desarrollados en la cohorte F1BX1 se realizó mediante aloinjerto de estos tumores en receptores F1. Se trasplantaron células derivadas de tumores de animales F1BX1 en hembras receptoras F1 transgénicas. Para ello, las células conservadas en suero bovino fetal al 6% de dimetil-sulfóxido (DMSO) fueron descongeladas en un baño a 37°C, se pasaron a un tubo de 15 ml de centrífuga (*Falcon*) con 5 ml de DMEM/F12 y se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 revoluciones por minuto (rpm). A continuación, se realizaron 2 ciclos de lavado con PBS y centrifugación durante 5 minutos a 1200 rpm, y se resuspendieron en PBS para obtener la suspensión celular que se inyectó. Se inyectaron 100 μ l de esta suspensión, que contenían entre 2 y 5 millones de células, en cada flanco del receptor. El número de células inyectadas no se cuantificó de manera precisa, ya que el número real de células viables capaces de reproducir el tumor en el ratón receptor es, en cualquier caso, desconocido. Esta variabilidad se compensó iniciando el tratamiento de los tumores cuando éstos alcanzaron aproximadamente el mismo volumen en todos los animales y, con ello, cuando tenían una masa tumoral similar.

1.4 Generación de la segunda cohorte con heterogeneidad genética y fenotípica mediante retrocruce o *backcross*

La cohorte de ratones genéticamente heterogénea en la que estudiamos la respuesta a la quimioterapia se generó siguiendo una estrategia prácticamente idéntica a la usada para generar los ratones F1BX1. La única diferencia fue que, en vez de usar como parentales ratones transgénicos FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J, utilizamos FVB/NJ no transgénicos. De esta manera, los ratones de la primera generación filial F1 tampoco fueron transgénicos. Estos ratones F1 se cruzaron con FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J para generar la segunda cohorte (*FVB x B6FVBF1*)-Tg(MMTVneu) a la que nos referiremos como F1BX2 de ahora en adelante. A diferencia de la F1BX1, todos los animales de la F1BX2 heredaron el transgén *MMTV-ErbB2/Neu* en heterocigosis. Confirmamos la presencia del transgén por PCR.

2. Determinación de los patofenotipos relacionados con el comportamiento clínico de la enfermedad

2.1 Determinación de los patofenotipos en condiciones de libre evolución de la enfermedad

Se consideraron distintos patofenotipos para caracterizar la susceptibilidad y evolución de la enfermedad en la cohorte F1BX1²³¹. Distinguimos entre dos tipos de patofenotipos:

Patofenotipos temporales:

- *Latencia tumoral*: se define como el tiempo transcurrido desde el nacimiento del ratón hasta la aparición del primer tumor.
- *Duración de la enfermedad*: tiempo comprendido entre el momento en que se detectó el primer tumor de mama y el momento de su muerte.
- *Supervivencia*: es el tiempo de vida de cada ratón, y corresponde a la suma de la latencia y la duración de la enfermedad.

Patofenotipos de progresión tumoral:

- *Incidencia tumoral*: es el porcentaje de ratones que desarrollaron tumor con respecto al total de ese grupo.
- *Multiplicidad tumoral*: definida como el porcentaje de ratones que desarrollaron más de un tumor con respecto al total de ratones que presentaron tumor.

- *Tasa de crecimiento*: es la pendiente de la recta que se ajusta a la curva de crecimiento tumoral resultante de representar el logaritmo del volumen tumoral en el eje de ordenadas y el tiempo en el eje de abscisas.
- *Velocidad media de crecimiento*: se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Velocidad media de crecimiento} = \frac{\text{Volumen tumoral final} - \text{Volumen tumoral inicial}}{\text{Duración de la enfermedad}}$$

- *Incidencia de metástasis pulmonares*: porcentaje de ratones que desarrollaron metástasis pulmonares con respecto al total de ratones con tumor.
- *Multiplicidad de metástasis*: porcentaje de ratones con dos o más impactos pulmonares con respecto al total de ratones con metástasis.
- *Peso tumoral*: peso del tumor en la necropsia.

Los ratones de la cohorte F1BX1 se revisaron semanalmente para detectar, mediante palpación, la aparición de tumores de mama a partir de los 3 meses de edad, que es cuando aparecen los primeros tumores en el fondo genético FVB⁹⁹. De esta manera, se determinó la latencia, la incidencia y la multiplicidad tumorales. Se siguió el crecimiento de los tumores mediante la medida semanal de su tamaño con un calibrador digital. El volumen tumoral se calculó con la fórmula²³²:

$$\text{Volumen tumoral} = \frac{(\text{largo} \times \text{ancho}^2)}{2}$$

2.2 Caracterización de la respuesta al tratamiento

2.2.1 Administración de quimioterapia

El tratamiento se inició cuando el tumor alcanzó los 12 mm de diámetro mayor en el caso de los aloinjertos, y, en el caso de la cohorte F1BX2, 10 días después de la cirugía que se llevó a cabo cuando el tumor alcanzó este tamaño para obtener una biopsia tumoral previa al tratamiento.

2.2.1.1 Grupos de tratamiento

Los ratones incluidos en los estudios de respuesta a la quimioterapia fueron asignados *a priori* a un grupo de tratamiento.

- En el estudio de la respuesta a la quimioterapia en los aloinjertos se incluyeron 250 ratones F1 que se dividieron en dos grupos de tratamiento con monoterapia con docetaxel o con doxorubicina. Se trasplantaron células de un mismo tumor procedente

de la F1BX1 en un animal F1 asignado a cada grupo de tratamiento. Se administraron hasta 5 ciclos de quimioterapia.

- En el estudio de respuesta al tratamiento de los tumores en el mismo animal en el que se generaron se incluyeron 462 ratones de la cohorte F1BX2, 37 ratones FVB y 54 ratones F1. Estos ratones fueron divididos en tres grupos, dos de ellos tratados con monoterapia con docetaxel o doxorubicina, y el tercero al que se administró la combinación de ambos fármacos. Se administraron hasta 6 ciclos de quimioterapia.

En ambos estudios, cuando los ratones presentaron signos de deterioro durante la administración de la quimioterapia, se cancelaron los ciclos de tratamiento correspondientes hasta que el ratón se recuperó.

2.2.1.2 Protocolo de tratamiento

El tratamiento se administró por vía intraperitoneal. A continuación se describen las dosis y el esquema de tratamiento seguido en cada uno de los grupos:

1. Monoterapia con docetaxel (Taxotere®, Sanofi Aventis): La dosis administrada en cada ciclo fue de 25 mg/kg en ciclos separados por 8 días²³³.
2. Monoterapia con doxorubicina (Farmiblastina®, Pfizer): Se administró una dosis de 5 mg/kg en cada ciclo, con un tiempo de recuperación entre ciclos de 10 días²³³.
3. Tratamiento combinado: Cada dosis consistió en 25 mg/kg de docetaxel y 5 mg/kg de doxorubicina. El tiempo de recuperación entre ciclos fue el del fármaco que requería más tiempo: 10 días.

Los fármacos se obtuvieron mediante receta veterinaria oficial.

2.2.2 Determinación de los fenotipos de respuesta al tratamiento

El estudio de la respuesta al tratamiento se realizó de la misma manera en los tumores aloinjertados en F1 y en la cohorte F1BX2, con la salvedad de que los ratones F1BX2 fueron intervenidos quirúrgicamente para obtener una biopsia del tumor antes de iniciar la quimioterapia. Consideramos distintos fenotipos que caracterizaron la respuesta tumoral al tratamiento.

Efecto del tratamiento sobre la dinámica de crecimiento tumoral

Se tomaron medidas del volumen tumoral usando un calibrador digital en los días de administración de cada ciclo de quimioterapia y a mitad del periodo de recuperación entre ciclos. Del mismo modo, una vez finalizado el tratamiento, se siguieron registrando

las dimensiones del tumor con la misma periodicidad, hasta el sacrificio de los ratones. El sacrificio se realizó dos meses después de finalizar el tratamiento, o cuando el tumor superó los 25 mm de diámetro mayor o el ratón presentó signos de enfermedad, definidos como adelgazamiento con hundimiento de costados, pelo erizado, taquipnea, pérdida del 25% del peso, etc. Se calculó la *velocidad de crecimiento tumoral* en tres fases diferentes: *antes del tratamiento*, *durante el tratamiento* y *después del tratamiento*. La velocidad de crecimiento en cada una de las fases se calculó de la misma manera que en los tumores de la F1BX1, como la pendiente de la recta que mejor se ajustó a la evolución del volumen tumoral con respecto al tiempo en escala semilogarítmica (**Figura 10**).

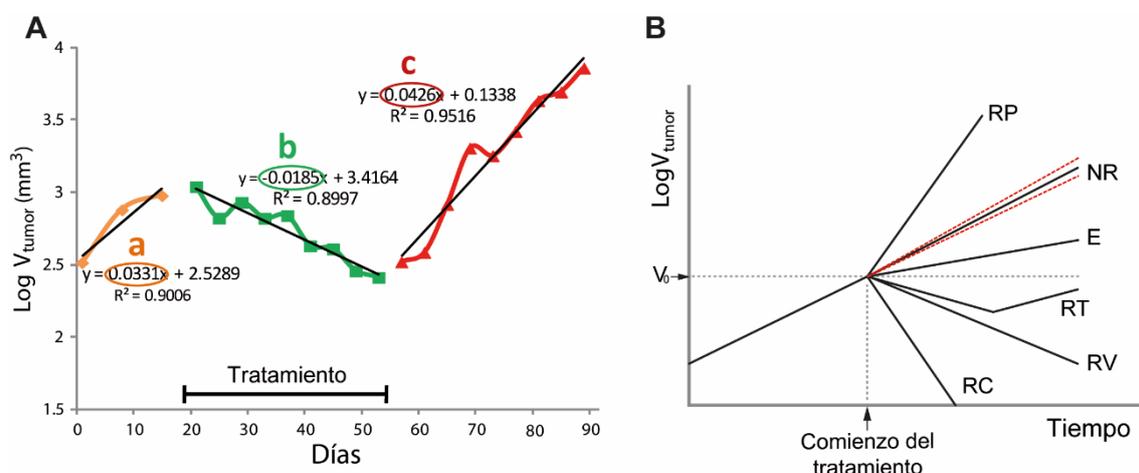


Figura 10. Cálculo de la velocidad de crecimiento tumoral en las 3 etapas de los tumores tratados y definición de los tipos de respuesta. (A) Representamos el logaritmo decimal del volumen tumoral en mm^3 en función del tiempo en días. Usamos la pendiente de la recta que se ajusta a la curva de evolución tumoral (a) antes, (b) durante y (c) después del tratamiento, como medidas de la velocidad de crecimiento en cada una de estas fases. (B) Definición esquemática de los tipos de respuesta considerados. RC: respuesta completa; RV: reducción del volumen tumoral; E: estabilización; RT: resistencia temprana; NR: no respuesta; RP: respuesta paradójica.

Además de las velocidades de crecimiento, definimos tres fenotipos para cuantificar el cambio observado en la velocidad de crecimiento de cada tumor entre estas fases:

- *Respuesta Durante el Tratamiento (RDT)*: es el resultado de la resta: *velocidad de crecimiento antes del tratamiento* menos *velocidad de crecimiento durante el tratamiento* ($RDT = a - b$ en la **Figura 10A**). Cuantifica el cambio experimentado en la velocidad de crecimiento del tumor durante el tratamiento con respecto a la velocidad que tenía antes de empezar. Está definida de tal manera que un valor más alto de RDT significa una mejor respuesta al tratamiento.

- *Respuesta a la Retirada del Tratamiento (RRT)*: es el resultado de la resta: *velocidad de crecimiento durante el tratamiento* menos *velocidad de crecimiento después del tratamiento* ($RRT=b-c$ en la **Figura 10A**). Cuantifica el cambio experimentado en la velocidad de crecimiento del tumor al finalizar el tratamiento con respecto a la que tenía durante el mismo. Está definida de tal manera que un valor mayor de RRT significa un mejor comportamiento del tumor al retirar el tratamiento.
- *Cambio Observado Respecto a la Velocidad Inicial (CORVI)*: es el resultado de la resta: *velocidad de crecimiento antes del tratamiento* menos *velocidad de crecimiento después del tratamiento* ($CORVI=a-c$ en la **Figura 10A**). Cuantifica el cambio en la velocidad de crecimiento entre las dos fases sin tratamiento: la anterior y la posterior a éste. Está definida de tal manera que un valor mayor de CORVI implica un mejor comportamiento en la fase posterior al tratamiento con respecto al que el tumor tenía antes de éste.

Considerando los cambios inducidos por el tratamiento en el volumen tumoral y en la velocidad de crecimiento, clasificamos la respuesta de cada tumor en uno de los siguientes grupos (**Figura 10B**):

- *Respuesta completa*: la de aquellos tumores que desaparecieron por completo a la palpación durante la administración de la quimioterapia.
- *Reducción del volumen tumoral*: pertenecieron a este grupo los tumores que redujeron su volumen durante el tratamiento sin llegar a desaparecer. Se definieron numéricamente por tener una velocidad de crecimiento negativa.
- *Estabilización*: los tumores que continuaron creciendo durante el tratamiento, pero a menor velocidad que antes de empezar el tratamiento. Son los tumores con una velocidad de crecimiento durante el tratamiento positiva y RDT mayor que 0.01.
- *Resistencia temprana*: en aquellos casos en los que durante la fase de tratamiento se observó un comportamiento bifásico. Estos tumores respondieron inicialmente, de modo que experimentaron una reducción en su tamaño, o redujeron notablemente su velocidad de progresión local, pero sin llegar a terminar el tratamiento dejaron de responder y reiniciaron su crecimiento.
- *Ausencia de respuesta*: el tumor siguió creciendo aproximadamente a la misma velocidad que antes de iniciar el tratamiento. Consideramos este tipo de respuesta cuando el valor absoluto de RDT fue menor que 0.01.
- *Respuesta paradójica*: la de los tumores que crecieron a mayor velocidad durante el tratamiento que antes de iniciarlo. El valor de RDT de estos tumores es negativo y menor que -0.01.

Otros patofenotipos de respuesta al tratamiento

Además de los cambios en la dinámica de crecimiento tumoral, se consideraron los mismos patofenotipos usados en el estudio de la evolución tumoral sin tratamiento: *peso tumoral*, *volumen tumoral*, *incidencia de metástasis* y *multiplicidad de metástasis*. En el estudio de la respuesta al tratamiento, la *supervivencia* y el *tiempo de enfermedad* no se tuvieron en cuenta, ya que, como los ratones se sacrificaron como máximo dos meses después de finalizar el tratamiento, estos patofenotipos no estuvieron determinados por la respuesta al tratamiento.

Para evaluar la toxicidad producida por la quimioterapia en los ratones de la cohorte F1BX2 consideramos la *supervivencia tras el inicio del tratamiento* y el *peso corporal en la necropsia*.

3. Obtención y procesamiento de muestras tumorales

3.1 Cirugía y obtención de biopsia tumoral

En los tumores de la cohorte F1BX2, se sustrajo una biopsia del tumor antes de iniciar el tratamiento. Cuando el diámetro mayor del tumor alcanzó los 12 mm, el ratón fue intervenido en condiciones de esterilidad y bajo anestesia con isoflurano. Se reseco aproximadamente la mitad de la masa tumoral con un bisturí electrocoagulador. La herida se cosió con puntos de sutura y se dejó un tiempo de recuperación de 10 días tras la intervención antes de comenzar la administración de quimioterapia.

3.2 Necropsia

A lo largo de todos los estudios, los ratones se sacrificaron cuando presentaron signos evidentes de enfermedad. Sin embargo, estos tumores son bien tolerados en la mayoría de los casos, de modo que establecimos el límite de 25 mm de diámetro tumoral mayor como máximo, para realizar la eutanasia de los ratones que superasen este límite. Los ratones que recibieron quimioterapia se sacrificaron 2 meses después de recibir la última dosis o cuando cumplieron alguna de las otras condiciones descritas.

La eutanasia se realizó mediante dislocación cervical; se accedió a la cavidad torácica y se recogieron los pulmones, se fijaron durante 24 horas en paraformaldehído al 3.7%, tamponado con metanol; tras la fijación, se conservaron en etanol al 70% y a 4°C. Se realizó un recuento de metástasis superficiales en los pulmones utilizando una lupa de mesa (Zeiss) con un objetivo 10x.

3.3 Procesamiento de los tumores de mama

Cada muestra tumoral obtenida en la biopsia o en la necropsia se dividió en cuatro fragmentos, cada uno de los cuales se procesó de manera distinta para realizar diferentes estudios:

1. Congelación rápida en nitrógeno líquido y conservación a -80°C. Estas muestras fueron usadas para la extracción de DNA, RNA y proteínas.

2. Fijación e inclusión en parafina. Un fragmento tumoral se mantuvo en una solución de paraformaldehído al 3.7%, tamponado con metanol, durante 24 horas. Pasado este tiempo, se pasó la muestra a etanol al 70%, donde se conservó a 4°C hasta el momento de su inclusión en parafina.

3. Suspensiones de células individualizadas. Las células tumorales se conservaron así en condiciones de alta viabilidad para su análisis por citometría de flujo y para su trasplante en ratones receptores. Las muestras se disgregaron mecánicamente con bisturís en medio DMEM/F12, suplementado con un 5% de suero bovino fetal. Se procesaron de esta manera dos fragmentos de tumor que, tras la disgregación mecánica, se sometieron, respectivamente, a digestión enzimática a 37°C durante 2 horas y durante 6 horas, en un volumen de 10 ml en tubos Falcon de 50 ml con 300 U/ml de colagenasa (#098K8616, Sigma) y 100 U/ml de hialuronidasa (#017K7003, Sigma). Las células digeridas durante 6 horas son muestras enriquecidas en células epiteliales individualizadas y se utilizaron para el aloinjerto de tumores en receptores F1 y para cuantificar subpoblaciones celulares epiteliales y estromales mediante citometría de flujo. Las células digeridas durante 2 horas son muestras con la digestión suficiente para liberar leucocitos infiltrantes con buena viabilidad, por lo que se usaron para analizar la infiltración por células inmunitarias mediante citometría de flujo. Tras la digestión enzimática, las muestras se centrifugaron 5 minutos a 1200 rpm y se aspiró el sobrenadante. A continuación, se añadieron 1 o 2 ml, en función de la cantidad de eritrocitos en el botón celular, de solución de lisis de células rojas (*ACK Lysing Buffer #10-548E, Lonza*), a base de cloruro amónico. Éste se agitó suavemente y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones y se aspiró el sobrenadante. Para conseguir la suspensión de células individualizadas se añadieron 5 ml de PBS suplementado con 2% de suero bovino fetal y 0.1 mg/ml de DNasa (*#DN25, Sigma*) y se pipeteó 25 veces con una pipeta de 10 ml. Tras incubar 5 minutos a temperatura ambiente, la suspensión se filtró a través de filtros de 70 µm (*#352350, BD Falcon*), que se lavaron con 5 ml de PBS para obtener tantas células como fuera posible. Tras otro paso de centrifugación en las mismas condiciones se resuspendió el pellet en suero

bovino fetal con un 6% de DMSO y se procedió a la congelación lenta para conservar la viabilidad celular. Las células se guardaron a -80°C o en nitrógeno líquido (fase gaseosa).

4. Protocolos generales

4.1 Extracción de DNA de tejidos

Se extrajo DNA de tejido de cola y tumores congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C . Las muestras se incubaron en 500 μl de *buffer* de lisis (Tris 100 mM pH 8, ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 5 Mm, SDS 0.2%, NaCl 2 mM) y 1 μl de Proteinasa K a 100 mg/ μl (#3115801001, Roche) durante toda la noche a 55°C . Tras la incubación, se añadieron 500 μl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) (#A2493, AppliChem), se pasó la mezcla a tubos de *Phase Lock Gel* (#2302820, 5 PRIME) y se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm para separar la fase acuosa y la fase orgánica. El gel facilitó la separación de las fases y la recogida del sobrenadante con el DNA. Se precipitó el DNA con isopropanol (#W992DM, Fisher Bioreagents) y se centrifugó durante otros 5 minutos a 12000 rpm. Se lavó el *pellet* con etanol al 70% para eliminar las sales y se volvió a centrifugar 5 minutos a 12000 rpm. Tras eliminar el sobrenadante y dejar que se evaporase todo el etanol residual, se resuspendió el DNA en 100 μl de *buffer* TE (Tris 100 mM pH 8; EDTA 1 mM) y se homogeneizó en agitación a temperatura ambiente durante al menos 1 hora.

4.2 Extracción de RNA de tumores

Para la extracción de RNA de fragmentos de tumores congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C se usó el kit *Quiagen miRNeasy Mini Kit* (#217004, Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. De forma resumida, se descontaminó la zona de trabajo de posibles RNasas con *RNase Exitus Plus* (AppliChem, #A7153) y se homogeneizó el fragmento de tumor congelado en 700 μl de trizol (Qiagen 5.346.994) en tubos con esferas de cerámica (*Precellys Lysing Kit, tissue homogenizing CK mix #KT03961-1-009.2, Precellys*), dando dos pulsos de 10 segundos a una intensidad 5.5 (m/s) en un homogeneizador (*FastPrep Homogenizer, Thermo Savant*) a 4°C . El homogeneizado se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 140 μl de cloroformo, se agitó la mezcla vigorosamente durante 15 segundos y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se centrifugó la mezcla a 12000 rpm y 4°C durante 15 minutos, para separar la fase acuosa y la fase orgánica.

La fase acuosa se pasó a un tubo de 1.5 ml libre de RNasa (*Eppendorf*) con 525 μ l de etanol, se mezcló mediante pipeteo, se introdujo la mezcla en una de las columnas del kit de extracción y se centrifugó durante 15 segundos a 12000 rpm. Tras la centrifugación se añadieron 350 μ l de *buffer RWT* a la columna y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. A continuación, se realizó una incubación con DNasa para eliminar los restos de DNA de la muestra. Para ello, se añadieron 10 μ l de DNasa (2.7 U/ μ l) (*Quiagen #79254*) y 70 μ l de *buffer RDD* y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación se añadieron otros 350 μ l de *buffer RWT* y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 segundos. A continuación, se realizaron dos lavados mediante la adición de 500 μ l de *Buffer RPE* y centrifugación a 12000 rpm, durante 15 segundos en el primer lavado y 2 minutos en el segundo. Finalmente, para eluir el RNA, se puso la columna sobre un nuevo tubo colector, se añadieron 40 μ l de agua libre de RNasa y se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto.

4.3 Cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos

Se cuantificó la concentración de DNA o RNA en los extractos mediante la medición de su absorbancia a 260 nm con un microespectrofotómetro *Nanodrop ND-1000*. Se usaron las *ratios* entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm, y entre 260 nm y 230 nm como medida de la pureza de los ácidos nucleicos extraídos y para descartar la presencia de contaminantes procedentes de la extracción, como fenoles, que pudieran interferir en análisis posteriores. Consideramos que las muestras con *ratio* 260/230 mayor que 2 y con *ratio* 260/280 mayor que 2 en el caso de RNA, y mayor que 1.8 en el caso del DNA, cumplían los requisitos mínimos de calidad para ser usadas en estudios posteriores.

4.4 Extracción de proteína de tumores

Se extrajeron proteínas de fragmentos de tumores que habían sido congelados en nitrógeno líquido y que se almacenaron a -80°C . Se homogeneizaron fragmentos de 10-15 mg en *buffer* de extracción (específico para cada ensayo) en tubos con esferas de cerámica (*Precellys Lysing Kit, tissue homogenizing CK mix #KT03961-1-009.2, Precellys*) dando dos pulsos de 10 segundos a una intensidad 5.5 (m/s) en un homogeneizador (*FastPrep Homogenizer, Thermo Savant*) a 4°C . Se incubaron las muestras en hielo durante 20 minutos y, a continuación, se centrifugaron a máxima velocidad y 4°C durante 5 minutos, para que los sólidos no disueltos en el *buffer* formaran un *pellet*. Se recogió el sobrenadante y, en el caso de las muestras para analizar posteriormente por Luminex, se pasaron a través de un filtro de 0.65 μm (*Ultrafree-MC-DV, #UFC30DV00, Millipore*) para eliminar todos los restos sólidos en suspensión.

4.5 Cuantificación de la concentración de proteínas

Para cuantificar la concentración de proteínas de los extractos se utilizó el método de BCA (*BCA protein assay reagent A, 500ml, #23228* y *BCA protein assay reagent B, 25 ml, #23224, Thermo Fisher*). Este método se basa en la *reacción de Biuret* entre las proteínas y el ión Cu^{2+} , que se reduce a Cu^{1+} , el cual forma un complejo de color púrpura con el ácido bicinconínico (BCA), que absorbe la luz a 570 nm (**Figura 11**).

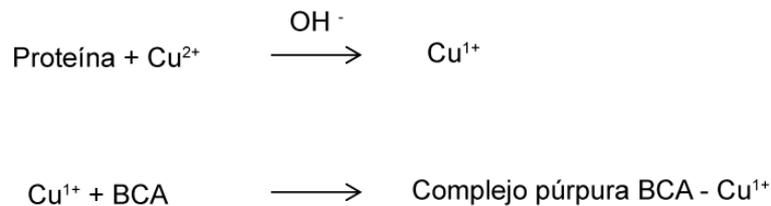


Figura 11. Fundamento del método de BCA que se ha utilizado para la cuantificación de proteínas.

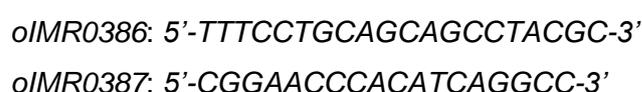
Se diluyó la muestra 1:10 en buffer de extracción y se añadieron 10 μl de la proteína diluida por pocillo en una placa de 96 pocillos. A continuación, se añadieron 200 μl de la mezcla BCA (196 μl del reactivo A y 4 μl del reactivo B, por muestra); se homogenizó la mezcla y se incubó entre 20 y 30 minutos a 37°C. A continuación, se midió la absorbancia en un lector de placas *Ultra-Evolution TECAN* a 570 nm. La concentración de proteínas presente en cada muestra se determinó mediante la comparación de su absorbancia a 570 nm con la de una curva estándar con concentraciones conocidas de albúmina (*Albumin Standard, #11811345, Thermo Fisher*).

5. Protocolos Específicos

5.1 Detección del transgén *MMTV-ErbB2/Neu* mediante PCR

La identificación de los ratones portadores del transgén *MMTV-ErbB2/Neu* en su genoma se realizó mediante PCR en DNA extraído de un fragmento de cola que se cortó en el momento del destete con un sistema de calor (*Hot bead sterilizer, #18000-45, F.S.T.*), para conseguir cauterización, hemostasia y esterilidad de forma simultánea.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el transgén fueron:



El programa de PCR se describe en la **Tabla 1**. Se determinó la presencia del transgén mediante la detección del producto de PCR, de 600 pares de bases (bp), en un gel de agarosa al 1.5% en el que se realizó la electroforesis de las muestras.

Tabla 1. Programa de PCR para la amplificación del transgén MMTV-ErbB2/Neu

Paso	Temperatura	Duración	Comentario
1	94°C	3 min	
2	94°C	20 s	-0.5°C por ciclo Repetición de los pasos 2-4 durante 12 ciclos
3	64°C	30 s	
4	72°C	35 s	
5	94°C	20 s	Repetición de los pasos 5-7 durante 25 ciclos
6	58°C	30 s	
7	72°C	35 s	
8	72°C	2 min	
9	10°C		Mantener

5.2 Genotipado de genoma completo de los ratones *backcross* F1BX1 y F1BX2

Para realizar el análisis de ligamiento genético e identificar las regiones del genoma asociadas a los fenotipos estudiados, se hizo un genotipado de genoma completo de las dos cohortes de ratones generadas mediante retrocruce. Ambos genotipados se llevaron a cabo mediante plataforma *Illumina* en el *Centro Nacional de Genotipado (Ce-Gen)* en el nodo localizado en el *Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)*. Se utilizó el DNA extraído de la cola para determinar el genotipo de cada ratón en posiciones donde se dan polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) distribuidos a lo largo de todo el genoma. En el genotipado de la cohorte F1BX1 se utilizó una plataforma con 377 SNPs, de los cuales 244 fueron diferentes entre C57BL/6 y FVB y, por tanto, informativos. Este panel incluyó una media de cuatro SNPs en cada intervalo de 27 Mb, y al menos un SNP de cada intervalo fue informativo. En el genotipado de la cohorte F1BX2 se utilizó un panel de mayor densidad, que incluyó 1449 SNPs, de los cuales 806 fueron informativos.

5.3 Determinación de la longitud telomérica mediante PCR cuantitativa

Se extrajo DNA de un fragmento de tumor congelado y se cuantificó siguiendo los protocolos ya descritos. Este DNA se usó para determinar la longitud telomérica media en el tumor mediante la *Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (QPCR)*²³⁴. Esta técnica se basa en la cuantificación de la emisión de fluorescencia de moléculas de *Sybr Green I*, un fluoróforo que se une al surco menor de las moléculas de DNA de cadena

calculó el promedio del Ct para la longitud telomérica y para el gen *36b4* y se calculó su ΔCt como:

$$\Delta Ct = Ct_{longitud\ telomérica} - Ct_{36b4}$$

Una de las muestras, elegida arbitrariamente, se utilizó como muestra de referencia para calcular la cantidad relativa de cada muestra con respecto a ella. Esta muestra se incluyó en todas las placas y permitió comparar entre muestras analizadas en distintas placas. La RQ de cada muestra se calculó siguiendo la fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{muestra} - \Delta Ct_{referencia}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

5.4 Cuantificación de la expresión del transgén mediante PCR cuantitativa

Se extrajo y cuantificó RNA de fragmentos de tumores congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C siguiendo los protocolos previamente descritos. En este RNA, se midieron los niveles de RNA mensajero de *ErbB2/Neu* mediante QPCR.

Primero se sintetizó el cDNA utilizando el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (#04379012001, Roche). Para cada reacción de síntesis se mezclaron 3 μg de RNA tumoral con 2 μl de *random hexamer primers* y agua libre de RNasa hasta un volumen final de 13 μl . Se incubó esta mezcla durante 10 minutos a 65°C para desnaturalizar la estructura secundaria del RNA y permitir el acceso y unión de los oligonucleótidos al RNA molde. A continuación, se añadieron 4 μl de *buffer* de reacción, 2 μl de dNTPs, 0.5 μl de inhibidor de RNasa y 0.5 μl de retrotranscriptasa, y se realizó la síntesis de cDNA mediante incubación secuencial a 25°C durante 10 minutos y a 55°C durante 30 minutos. Se realizó una incubación final a 85°C durante 5 minutos para inactivar la retrotranscriptasa y el cDNA resultante se utilizó en la QPCR para cuantificar la expresión.

Para cuantificar la cantidad de cDNA de *ErbB2/Neu* se utilizaron ensayos comerciales de *Applied Biosystems* con sondas *TaqMan* dirigidos frente a la secuencia de *ErbB2/Neu* de rata (#Rn00566561_m1), ya que el transgén procede de este animal, y de *Hprt* de ratón (#Mm00446968_m1). Se utilizó *Hprt* como gen de referencia por su expresión estable en la mama²³⁷, de modo que se corrigieron las diferencias en la cuantificación debidas a diferencias en la cantidad de RNA de partida. Estos ensayos comerciales incluyen una pareja de oligonucleótidos para la amplificación del DNA diana y una sonda *TaqMan* que se une específicamente a una secuencia interna del fragmento que se amplifica. Estas sondas consisten en un oligonucleótido complementario a la secuencia a la que se une, con una fluoróforo conjugado en su extremo 5' y un amortiguador o

quencher en su extremo 3' que inhibe la fluorescencia del fluoróforo. Cuando se produce la elongación del cebador durante la PCR, la actividad 5'-3' exonucleasa de la Taq polimerasa degrada la sonda *TaqMan* unida al DNA molde, de manera que libera el fluoróforo. Así, la señal emitida por el fluoróforo libre es proporcional a la cantidad de DNA de interés presente en el producto de PCR. Una ventaja de estos ensayos es que, debido a la especificidad proporcionada por la sonda, elimina la necesidad de realizar el análisis de la *curva de fusión*.

Para la reacción de QPCR se utilizó 1 μ l del cDNA procedente de la síntesis según el protocolo previamente descrito, que se mezcló con 1 μ l de ensayo *TaqMan*, 10 μ l de Mix de reacción *Perfecta qPCR SuperMix* (#733-1188, VWR) y 8 μ l de agua. El programa de PCR consistió en dos incubaciones secuenciales a 50°C durante dos minutos y a 95°C durante 10 minutos, seguidas de 40 ciclos constituidos por una fase de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y una fase de anillamiento y elongación a 60°C durante un minuto. Al final de cada ciclo, se midió la fluorescencia emitida por la sonda *TaqMan* degradada. Se usaron las mismas placas, adhesivos y termociclador que en la QPCR para medir la longitud telomérica.

Para cada muestra, las reacciones de QPCR frente a *ErbB2/Neu* y *Hprt* se realizaron en paralelo y por duplicado. El análisis de los datos se hizo mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para calcular la RQ de RNA de *ErbB2/Neu* en cada muestra, de la misma manera que se hizo para la longitud telomérica, con la diferencia de que en el cálculo del ΔCt se usaron los Ct promedio de *ErbB2/Neu* y *Hprt*.

$$\Delta Ct = Ct_{ErbB2/Neu} - Ct_{Hprt}$$

5.5 Análisis de las mutaciones en *ErbB2/Neu* presentes en el tumor

Se estudió la mutación presente en el transcrito de *ErbB2/Neu* mediante secuenciación. Para ello, se realizó una PCR para amplificar *ErbB2/Neu* en cDNA obtenido de los tumores siguiendo los protocolos previamente descritos. Tras 3 minutos de incubación a 94°C, se realizaron 30 ciclos de PCR, cada uno de los cuales consistió en desnaturalización a 94°C durante 40 segundos, anillamiento a 52°C durante 45 segundos y extensión a 72°C durante 45 segundos. Tras los 30 ciclos se completó la extensión mediante incubación a 72°C durante 5 minutos adicionales. Los oligonucleótidos utilizados fueron los publicados por Siegel *et al.*²³⁸:

AB2913: 5'-CGGAACCCACATCAGGCC-3'

AB1310: 5'-TTTCCTGCAGCAGCCTACGC-3'

El producto de PCR se purificó utilizando el kit *PCR Extract Mini Kit* (#2300610, 5 PRIME) y se secuenció usando el oligonucleótido AB1309 (5'-GTCAACTGCAGT-CATTCCT-3')²³⁸ en el Servicio de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer. Para analizar las mutaciones, se compararon las secuencias obtenidas con la secuencia de la versión silvestre de *ErbB2/Neu* presente originalmente en el transgén con el *software* libre *Cromas Lite* (*Techenlysium*).

5.6 Cuantificación del marcador de proliferación Ki67 mediante inmunohistoquímica en *tissue array*

Inclusión en parafina y tinción con hematoxilina-eosina: Los fragmentos de tumores fijados mediante el procedimiento ya descrito se tallaron e incluyeron en parafina. Brevemente, los tejidos se deshidrataron mediante 3 incubaciones de 1 hora en concentraciones crecientes de etanol: 60%, 80% y 100%. A continuación, se realizaron otras 3 incubaciones de 1 hora en xilol para sustituir el agente deshidratante por una sustancia miscible con la parafina. Finalmente, se realizaron otras 3 incubaciones de 1 hora con parafina líquida, tras las cuales se hicieron los bloques, con moldes del tamaño adecuado, en una estación de inclusión en parafina donde se enfrió la parafina hasta su solidificación. Una vez enfriados los bloques, se hicieron cortes de 3 μm con el micró-tomo. Los cortes se pasaron a un baño de agua caliente donde se estiraron y extendieron sobre un portaobjetos. Una vez en el portaobjetos, los cortes se desparafinaron y deshidrataron, y se realizó la tinción con hematoxilina-eosina siguiendo el protocolo de la **Tabla 2**.

Construcción de los *tissue arrays*: A continuación, se generaron los *tissue arrays* en el servicio de Patología Molecular Comparada del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca. Para ello, se examinaron las tinciones de hematoxilina-eosina de los tumores incluidos en el estudio y se seleccionaron 3 zonas representativas de cada tumor que se marcaron en los bloques para extraer los cilindros de parafina. Posteriormente, se extrajeron los cilindros de tejido y se incorporaron en un bloque receptor. De esta manera se generaron los *tissue arrays*. Esta técnica tiene la ventaja de que se homogeneiza el procesamiento y la tinción de las muestras y, al incluir numerosas muestras en un solo bloque, facilita la comparación entre éstas.

Tabla 2. Protocolo de tinción con hematoxilina-eosina de los cortes de tejido incluido en parafina.

Procedimiento	Solución	Tiempo
Desparafinado	Xilol	5 minutos
	Xilol	5 minutos
	Xilol	5 minutos
Rehidratación	Etanol 100%	5 minutos
	Etanol 75%	5 minutos
	Etanol 50%	5 minutos
Tinción	Hematoxilina	4 minutos
	Agua corriente	5 minutos
	Eosina	2 minutos
Deshidratación	Etanol 50%	5 minutos
	Etanol 75%	5 minutos
	Etanol 100%	5 minutos
Aclaramiento	Xilol	5 minutos
	Xilol	5 minutos
	Xilol	5 minutos

Tinción inmunohistoquímica de Ki67: Esta tinción fue realizada en el Servicio de Patología Molecular Comparada del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca. De manera resumida, se utilizó el micrótopo para preparar cortes de 3 μm de los *tissue arrays*. Los cortes se desparafinaron y deshidrataron siguiendo el mismo proceso que para la tinción con hematoxilina-eosina (**Tabla 2**). A continuación, se realizó el desenmascaramiento antigénico con *buffer* citrato, y se bloquearon las peroxidasa endógenas con una solución de peróxido de hidrógeno al 30% en metanol. Después, se lavaron los cortes con PBS y se procedió con el bloqueo de los sitios de unión inespecífica mediante incubación con *buffer* de bloqueo (PBS con 2% de leche y 0.1% de Tritón X-100). Tras el bloqueo, se incubaron las muestras durante toda la noche a 4°C con una dilución 1:50 del anticuerpo anti-Ki67 (#RB-1510-R7, Thermo) producido en conejo. Al día siguiente, se lavaron las muestras con PBST (PBS con 0.1% de Triton X-100) para eliminar el exceso de anticuerpo primario. Después, se añadió el anticuerpo secundario que reconoce la región constante de las inmunoglobulinas de conejo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario estaba conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP), y para su revelado se utilizó el kit *Vectastain elite ABC Kit* (Vector Labs #PK-6100), que usa como cromógeno la diaminobenzidina (DAB). Tras la incubación con el anticuerpo secundario, se hicieron varios lavados con PBST y se añadió la solución ABC del kit. Tras una incubación de 1 hora, se lavó con PBST y se incubó con DAB para revelar la inmunohistoquímica. Por último, se realizó una contra-tinción con hematoxilina.

Análisis y cuantificación de la tinción: La cuantificación se llevó a cabo utilizando el escáner Ariol (*Leica Biosystems*) en el Servicio de Patología Molecular Comparada del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca. Este sistema permitió la cuantificación automática, previo entrenamiento, del número de núcleos positivos y negativos para la tinción de Ki67 presentes en cada uno de los cilindros de los que se realizó el corte. De esta manera, se calculó para cada cilindro el *índice proliferativo* como el porcentaje de células positivas para la tinción con respecto del total de células. Puesto que se extrajeron 3 cilindros de cada tumor, la cuantificación de cada muestra se realizó por triplicado y se calculó la media. Se excluyeron del análisis aquellos casos en los que la integridad del cilindro no estuvo bien conservada.

5.7 Cuantificación de subpoblaciones celulares mediante citometría de flujo

Para el estudio de subpoblaciones epiteliales y estromales se utilizaron suspensiones celulares preparadas mediante digestión enzimática de los tumores durante 6 horas; mientras que para analizar el infiltrado inmunológico utilizamos suspensiones obtenidas tras digerirlos durante dos horas.

Las suspensiones de células tumorales se descongelaron en un baño a 37°C y se añadieron inmediatamente a un tubo cónico de 15 ml (*Falcon*) con 5 ml de *solución A* (300 ml de DMEM, 80 ml de suero bovino fetal, 4000 unidades de heparina (#H4784, *Sigma*) y 100 mg de DNasa (#DN25, *Sigma*)), previamente calentada a 37°C en un baño. Tras mezclar las células con la solución A, se incubaron durante 15 minutos en un baño a 37°C. A continuación, se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm y 4°C, y se aspiró el sobrenadante. Todos los pasos posteriores se realizaron en hielo para mantener en lo posible la viabilidad celular. El botón celular se resuspendió en PBS suplementado con un 2% de suero bovino fetal, se filtró a través de filtros de 70 µm y se añadieron entre 1 y 5 millones de células a los tubos de citometría en los que se realizó el marcaje. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 1200 rpm, se eliminó el sobrenadante por decantación y se añadieron 52 µl de solución de bloqueo (50 µl de PBS + 2 µl de anti CD16/CD32 (#553142, *BD Pharmigen*)) a cada tubo. Se aplicó un vórtex suave a la mezcla y se incubó en hielo durante 10 minutos. Tras la incubación, se añadió a cada tubo la mezcla de los anticuerpos de marcaje correspondiente, que contenía 50 µl de PBS al 2% de suero bovino fetal y 1 µl de cada anticuerpo, según se describe en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Mezclas de anticuerpos usadas para la cuantificación de subpoblaciones celulares en tumores. En el estudio de subpoblaciones epiteliales, se excluyeron del análisis las células positivas para los marcadores de linaje no epitelial, marcadas con ficoeritrina (PE). En el estudio de células estromales, se excluyeron del análisis células hematológicas y epiteliales, marcadas con APC y PE/Cy7.

Tipo celular	Anticuerpo y fluorocromo	Concentración usada	Casa comercial	Referencia
Epitelial	CD31 PE	0.2 mg/ml	BD Pharmigen	553373
	CD45 PE	0.2 mg/ml	BD Pharmigen	553372
	TER119 PE	0.2 mg/ml	BD Pharmigen	553673
	CD140 PE	0.2 mg/ml	eBioscience	12-140-81
	CD61 FITC	0.5 mg/ml	BD Pharmigen	553346
	CD29 APC/Cy7	0.2 mg/ml	BioLegend	102226
	Sca1 PECy5	0.2 mg/ml	eBioscience	15-5981-82
	CD24 PE/Cy7	0.2 mg/ml	BD Pharmigen	560536
	CD49f APC	0.2 mg/ml	eBioscience	17-0495-82
Estromal	CD31 FITC	0.5 mg/ml	BD Pharmigen	553372
	CD140 PE	0.2 mg/ml	eBioscience	12-140-81
	CD45 APC	0.2 mg/ml	BD Pharmigen	559864
	TER119 APC	0.2 mg/ml	BD Pharmigen	557909
	CD24 PE/Cy7	0.2 mg/ml	BD Pharmigen	560536
Infiltrado inmunológico	F4/80 FITC	0.5 mg/ml	Caltag	RM2901
	CD45 PE	0.2 mg/ml	BD Pharmigen	553372
	Gr1-biotina	0.2 mg/ml	BD Pharmigen	553125
	+ Estreptavidina-APC	0.2 mg/ml	BD Pharmigen	554067

Además, se prepararon los tubos de compensación que incluyeron células sin marcaje y células marcadas individualmente con cada uno de los fluorocromos utilizados en el análisis. Se aplicó un vórtex suave y se incubaron las células con los anticuerpos durante 30 minutos en oscuridad y en hielo. Al finalizar la incubación, se hizo un lavado con 4 ml de PBS con un 2% de suero bovino fetal y se centrifugó a 1200 rpm y 4°C durante 5 minutos. En el caso de anticuerpos biotinilados, tras este paso se incubaron las células durante otros 30 minutos en hielo y en oscuridad en 50 μ l de PBS al 2% de suero bovino fetal, con 1 μ l de estreptavidina conjugada con el fluorocromo correspondiente y se repitió el lavado. Finalmente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 100 μ l de PBS con un 2% de suero bovino fetal con 1 μ l del marcador de viabilidad *Sytox blue* (#S34857, Thermo Fisher Scientific) o, en el caso del estudio de células del sistema inmune, *7AAD* (#00-69993-50, eBioscience). Tras un vórtex suave, las células se mantuvieron en hielo hasta ser analizadas en el citómetro. Para el análisis de las subpoblaciones epiteliales y estromales se utilizó un citómetro *FACS Aria III* (BD) en el Servicio de Citometría de la Universidad de Salamanca, mientras que para el análisis de la infiltración por células inmunes se utilizó un citómetro *AccuriC6* (BD). El análisis de datos se realizó con el programa *FlowJo* (Treestar, California).

5.8 Determinación de los niveles de proteína mediante ELISA

En los tumores de la cohorte F1BX1 se cuantificaron los niveles de algunas proteínas de las vías de señalización por debajo de ERBB2/NEU mediante ELISA. Para ello, se siguieron los pasos de los protocolos de extracción y cuantificación de proteínas ya descritos. La extracción se realizó en *buffer* RIPA (NaCl 150 mM, NP40 1% (v/v), Tris-HCl 50 mM pH 8.0, SDS 0.1% (v/v), EDTA 1 mM y desoxicolato 0.5% (w/v)) al que se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (*#11836153001, Roche*).

Los niveles de proteína total y fosforilada de AKT2, AKT3 y mTOR, y los niveles totales de ERK1/2 se determinaron mediante ensayos inmunoenzimáticos tipo sándwich, *Sandwich ELISA kit (Pathscan Cell Signalling Technology)*, phospho-AKT2 (Ser474) (*#7932*); AKT2 total (*#7930*); phospho-AKT3 (Ser472) (*#7942*); AKT3 total (*#7934*); phospho-mTOR (Ser2481) (*#7978*); phospho-mTOR (Ser2448) (*#7976*); mTOR total (*#7974*); p44/42 MAPK (ERK1/2) total (*#7050*). En cambio, para determinar los niveles de AKT1 total y fosforilado y de ERK1/2 fosforilado, se utilizaron los ensayos inmunoenzimáticos *ELISA Antibody Pair (Pathscan Cell Signalling Technology)*, pan-phospho-AKT (Thr308) (*#7144*); phospho-AKT1 (Ser473) (*#7143*); AKT1 total (*#7142*); phospho-P44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (*#7246*). En todos los casos se realizaron los ensayos siguiendo las instrucciones del fabricante.

En los ensayos de tipo sándwich, el anticuerpo de captura estaba adherido a la placa, de modo que se añadieron directamente los lisados proteicos y el anticuerpo de captura se unió específicamente a su proteína diana. Por el contrario, en los ensayos inmunoenzimáticos no tipo sándwich, el anticuerpo de captura no estaba adherido a la placa y fue necesario un paso previo en el que se incubó el anticuerpo para su adhesión a ésta (*Clear 96-well Microtest Plate (BD Falcon, #353077)*) durante 16 h a 4°C. A continuación, se añadió el anticuerpo de detección, que se unió a otro epítipo de la proteína diana. Posteriormente, se añadió un anticuerpo secundario *anti-mouse IgG-HRP* que se unió al complejo y el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) que, como consecuencia de la actividad de la peroxidasa de rábano picante (HRP), generó un producto coloreado. Tras detener la reacción, se leyó la absorbancia a 450 nm utilizando el lector de placas *Synergy-4 (Biotek)*. La cantidad de proteína cargada en todos los ensayos fue de 5 µg, la cual se seleccionó tras realizar un estudio previo de la linealidad de la señal con distintas concentraciones de proteína.

5.9 Determinación de los niveles de proteína mediante Luminex

La cuantificación de proteínas de señalización en lisados proteicos de tumores de la cohorte F1BX2 se realizó mediante ensayos multiplex con tecnología Luminex xMAP®

de *Millipore (Milliplex®)*. Estos ensayos multiplex tienen la ventaja sobre el ELISA de que permiten cuantificar los niveles de varias proteínas en un único ensayo.

Se basan en el uso de microesferas magnéticas de 6.45 μm de diámetro teñidas internamente con una mezcla de dos colorantes fluorescentes, y que tienen un anticuerpo de captura adherido a ellas. La combinación de los dos fluorocromos en cantidades precisas permite diferenciar, por la fluorescencia resultante de la mezcla, entre las esferas que se unen específicamente a cada analito. Además, se usa un anticuerpo de detección biotinilado que reconoce otro epítipo de la proteína de interés, de modo que se une al complejo formado por la microesfera, el anticuerpo de captura y el analito. Al añadir estreptavidina conjugada con ficoeritrina (PE), ésta se une a la biotina del anticuerpo de detección de manera proporcional a la cantidad de analito capturado inicialmente. Al final del proceso, las microesferas se hacen pasar por el lector, en este caso un *Bio-Plex 200 (Bio-Rad)*, que utiliza los principios de la citometría de flujo para identificar las microesferas correspondientes a cada analito por la fluorescencia de los fluorocromos internos de éstas, y medir la señal de la ficoeritrina unida a cada microesfera. La medida que se usa como estimación de la cantidad de cada analito presente en la muestra es la mediana de fluorescencia emitida por la ficoeritrina de los complejos formados por las microesferas correspondientes a ese analito (**Figura 13**).

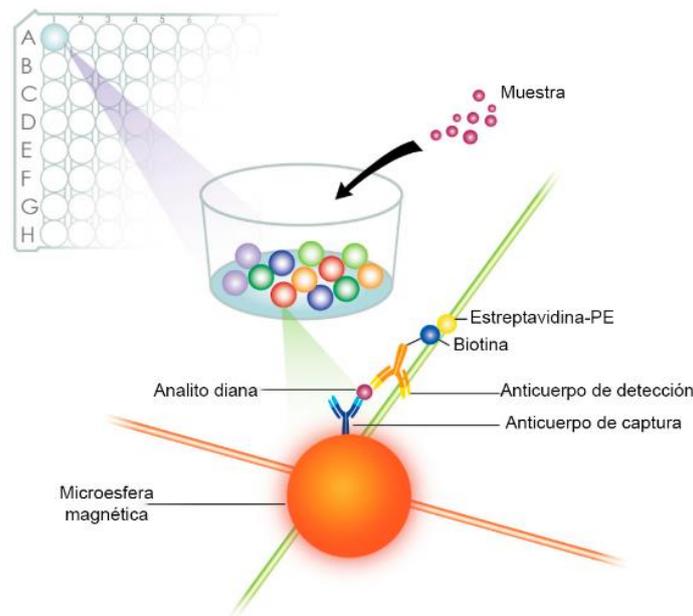


Figura 13. Esquema de funcionamiento de la tecnología Luminex. Figura modificada de la página web de Whitehead Scientific (<http://whitesci.co.za>)

Se cuantificaron los niveles de ATR, pCHK1(S345), pCHK2(T68), γ H2AX, p-P53(S15), MDM2 y P21 utilizando el kit *7-plex DNA Damage/Genotoxicity Magnetic Bead Kit (Milliplex Map Kit #48-621MAG, Millipore)*, al que se añadieron los ensayos *MAPmates* compatibles con el *buffer* de ensayo de este kit para cuantificar los niveles de caspasa-3 activada, pGSK3 β (S9) (#46-690MAG), pSRC(Y419) (#46-710MAG) y p-cJUN(S73) (#46-622MAG) y β -tubulina (#46-713MAG). En otro ensayo se utilizó el kit *9-Plex Multi-Pathway Magnetic Bead Kit (Milliplex Map Kit #48-680MAG)* que incluyó los reactivos necesarios para cuantificar pERK1/2(T185/Y187), p-P38(T180/Y182), pNF κ B(S536), pJNK(T183/Y185), pAKT(S473), p-P70S6K(T412), pCREB(S133), pSTAT3(S727) y pSTAT5(Y694/699), al que se añadieron los *MAPmates* compatibles para cuantificar pBAD(S112) (#46-694MAG), pSTAT1(Y701) (#46-655MAG), p-mTOR(S2448) (#46-686MAG), pMEK1(S222) (#46-670MAG), pRPS6(S235/S236) (#46-714MAG) y β -tubulina (#46-713MAG). En un tercer ensayo, se cuantificaron los niveles de factores de crecimiento y angiogénesis angiopoyetina-2, sFASL, anfirregulina, betacelulina, EGF, endogлина, endotelina, FGF-2, folistatina, G-CSF, HGF, IL-1 β , IL-6, IL-17A, KC, leptina, MIP-1 α , MCP-1, PLGF-2, prolactina, sALK-1, sCD31/PECAM-1, SDF-1, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D y TNF α con el kit *Milliplex MAP Angiogenesis/Growth Factor Magnetic Bead Panel (#MAGPMAG-24K, Millipore)*. Finalmente, cuantificamos los niveles de TGF β -1, TGF β -2 y TGF β -3 con el kit *Milliplex MAP TGF β Magnetic Bead 3 Plex Kit (#TGF MAG64K-03, Millipore)*.

Las proteínas se extrajeron en *buffer de lisis* (#43-040, Millipore) siguiendo el protocolo descrito previamente. La cantidad de proteína cargada se decidió en ensayos preliminares en los que se testaron diferentes cantidades en el rango recomendado por los kits (1-25 μ g), de modo que se eligieron cantidades de proteína que produjeran una señal detectable y en el rango lineal. En los kits *9-Plex Multi-Pathway* y *7-plex DNA Damage/Genotoxicity* la cantidad de proteína cargada fue 15 μ g; en el kit de *Angiogenesis/Growth Factor* se cargaron 20 μ g; y en el de TGF β , 13.5 μ g. Para el análisis de TGF β , se requirió un tratamiento ácido previo al ensayo para liberar las moléculas de TGF β de los complejos latentes en los que se sintetiza²³⁹. Para ello, se añadieron 2 μ l de HCl 1N a 25 μ l de cada muestra, se comprobó que el pH bajó por debajo de 3.0 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación, la muestra se neutralizó añadiendo 2 μ l de NaOH 1N.

El ensayo se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, las proteínas extraídas en *buffer de lisis* se mezclaron con *buffer de ensayo* de cada kit y con las microesferas cubiertas de anticuerpos de captura en placas de 96 pocillos de plástico oscuro y fondo transparente incluidas en los kits. Esta mezcla se incubó durante

18 horas en la cámara fría en un agitador de placas a 800 rpm. Al día siguiente, se eliminó el sobrenadante por decantación, colocando previamente la placa con las muestras sobre una base magnética, que hizo que las microesferas, también magnéticas, quedasen adheridas al fondo de la placa. A continuación, se hicieron dos lavados con *buffer de ensayo*, se añadió el anticuerpo de detección biotinilado y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de placas a 800 rpm. A continuación, se eliminó por decantación el anticuerpo de detección y se añadió la estreptavidina conjugada con ficoeritrina. Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente en agitación, se añadió el *buffer de amplificación* y se incubó durante otros 15 minutos en las mismas condiciones. Finalmente, se eliminó el sobrenadante por decantación, se resuspendieron las microesferas en 150 μ l de *buffer de ensayo* o *sheat fluid*, dependiendo del kit utilizado, y se adquirieron y analizaron las muestras.

La cuantificación realizada con los kits *9-Plex Multi-Pathway* y *7-plex DNA Damage/Genotoxicity* fue relativa, ya que estos kits no incluyeron curvas estándares de concentraciones conocidas de cada una de las proteínas analizadas. La mediana de la intensidad de fluorescencia correspondiente a cada proteína analizada se corrigió por la cantidad de proteína cargada usando la señal de la β -tubulina. En cambio, la cuantificación realizada con los kits *Angiogenesis/Growth Factor* y de TGF β fue absoluta, ya que estos kits incluyeron curvas estándares de concentraciones conocidas de los analitos estudiados. De esta manera, pudimos convertir la señal de fluorescencia de cada analito en su concentración en la muestra en pg/ml.

6. Análisis de los resultados

6.1 Análisis de la distribución de las variables

Para las variables estudiadas, se analizó la presencia de valores extremos o *outliers* mediante el *test de Grubbs* del programa *Graphpad Prism5*. A continuación, se examinó la distribución de estas variables y se determinó si se ajustaron a la distribución normal mediante el *test de Shapiro-Wilks* con el programa de estadística *JMP12*.

6.2 Análisis univariante y bivariante de las asociaciones ente variables

La correlación entre variables continuas se estudió mediante el *test de Pearson* en el caso de que las variables siguieran una distribución normal. En caso contrario, el test utilizado fue el *test de Spearman*.

Para comparar el valor tomado por una variable entre dos grupos se utilizó el *test t de Student*, cuando la variable siguió una distribución normal en los grupos estudiados. En caso de que la variable no siguiera una distribución normal, se utilizó el test no paramétrico *U de Mann Whitney*. Cuando se realizaron comparaciones de medidas repetidas o pareadas se utilizaron las versiones pareadas de estos tests: el *test t para muestras pareadas* cuando las distribuciones fueron normales o la *prueba de rangos con signo de Wilcoxon*, en caso contrario.

Siguiendo el mismo criterio, cuando se comparó una variable normal entre más de dos grupos se utilizó el *test del análisis de la varianza o ANOVA de una vía*, y el *test de Kruskal-Wallis* en el caso de las variables que no siguieron una distribución normal. Después de realizar la comparación global entre grupos, en el caso de que se detectasen diferencias estadísticamente significativas, se llevó a cabo un *test post-hoc* para determinar entre qué grupos se dieron las diferencias. Los *tests post-hoc* utilizados fueron el *test de Tukey* en el caso del ANOVA y el *test de Dunn* en el caso del *test de Kruskal-Wallis*.

Para la comparación de variables categóricas entre grupos se utilizó el *test de Chi-cuadrado*, o el *test exacto de Fisher* en el caso de que se comparasen variables binarias entre dos grupos. Para las comparaciones de fenotipos temporales se utilizaron *curvas de Kaplan-Meier*, cuya significación estadística se determinó mediante el *test log-rank*.

Los programas estadísticos utilizados para realizar los tests descritos fueron *Graphpad Prism5* y *JMP12*.

6.3 Análisis multivariante de las asociaciones ente variables

6.3.1 HJ-Biplot

El HJ-biplot es una extensión de los biplots clásicos desarrollados por Gabriel²⁴⁰. Este método se basa en el análisis de componentes principales²⁴⁰⁻²⁴² y permite la identificación de patrones en una matriz de datos. El HJ-biplot es una representación, en un mismo sistema de referencia, de las variables (representadas como vectores) y de los casos (representados como puntos). Para interpretar los datos representados en un biplot deben seguirse las siguientes pautas (**Figura 14**):

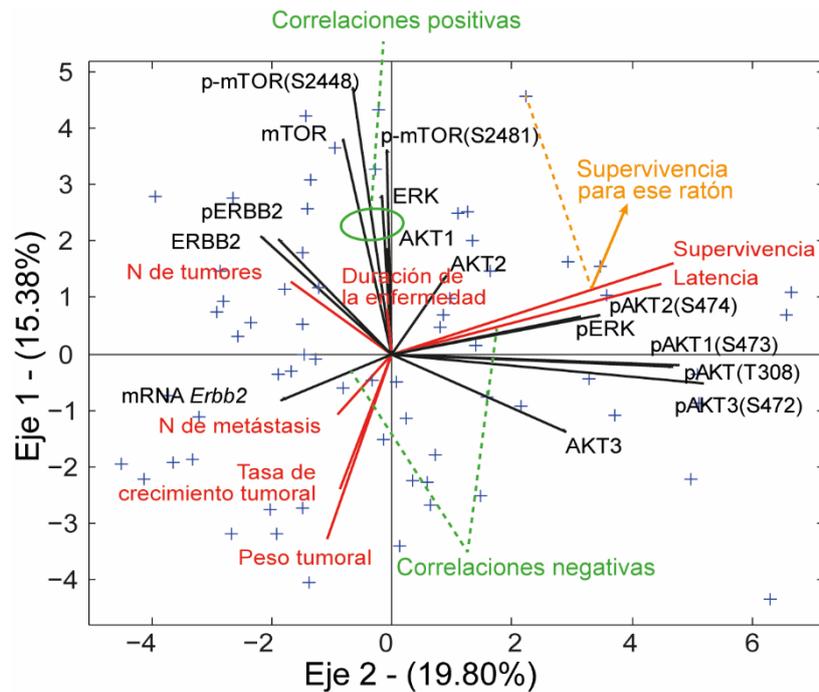


Figura 14. Ejemplo de representación biplot e indicaciones para su interpretación.

- La distancia entre dos puntos es inversamente proporcional a la similitud entre los individuos representados por estos puntos. De esta manera, los individuos similares entre sí, en cuanto a las variables incluidas en el estudio, ocupan lugares próximos en la representación.
- La longitud de los vectores refleja la dispersión o la variabilidad de las variables que representan.
- El ángulo que forman los vectores entre sí está relacionado con la correlación entre las variables que representan. Los vectores que forman ángulos de 90° representan variables independientes entre sí, los que forman ángulos agudos correlacionan de manera positiva y los que forman ángulos obtusos correlacionan de forma negativa.
- La proyección ortogonal de un punto sobre un vector refleja el valor de la variable representada por ese vector en el individuo representado por ese punto. Cuanto más larga es la proyección del punto sobre el vector, mayor es el valor de la variable en ese individuo.

El biplot se generó siguiendo el método de *regresión lineal por mínimos cuadrados* y para clasificar a los animales en distintos grupos a partir del biplot generado, se utilizó un método jerárquico que utiliza la distancia euclídea, el *método de Ward*. El análisis se realizó con el programa *MultBiplot* desarrollado por El Dr. Vicente-Villardón²⁴³ del *Departamento de Estadística de la Universidad de Salamanca* en el entorno de programación orientado a matrices *MATLAB*²⁴⁴.

6.4 Análisis de ligamiento genético

La información de los marcadores de genotipado de los ratones de las cohortes *backcross* se utilizó para realizar el *análisis de ligamiento* genético e identificar regiones genómicas de rasgo cuantitativo (QTL) asociadas con la variabilidad en el fenotipo de interés, y que podrían estar participando en la determinación de éste. El ligamiento genético hace referencia a la cosegregación, durante la generación de los gametos, de fragmentos genómicos que se localizan en el mismo cromosoma. Dos marcadores genéticos cualesquiera, en este caso SNPs, que se localicen en cromosomas diferentes van a segregar independientemente el uno del otro durante la meiosis. Así, imaginemos la gametogénesis en un individuo heterocigoto en dos marcadores *Aa* y *Bb*. Si los dos marcadores se encontrasen en cromosomas diferentes, las frecuencias esperadas de cada genotipo en los gametos generados serían 25% *AB*, 25% *ab*, 25% *Ab* y 25% *aB*. En cambio, si ambos marcadores estuvieran en el mismo cromosoma, de modo que en uno de los cromosomas homólogos tuviéramos el genotipo *AB*, y en el otro tuviéramos *ab*, estos marcadores cosegregarían y el genotipo de los gametos sería *AB* o *ab*, excepto en los casos en los que se hubiera producido la recombinación entre ambos marcadores durante la meiosis (**Figura 15**).

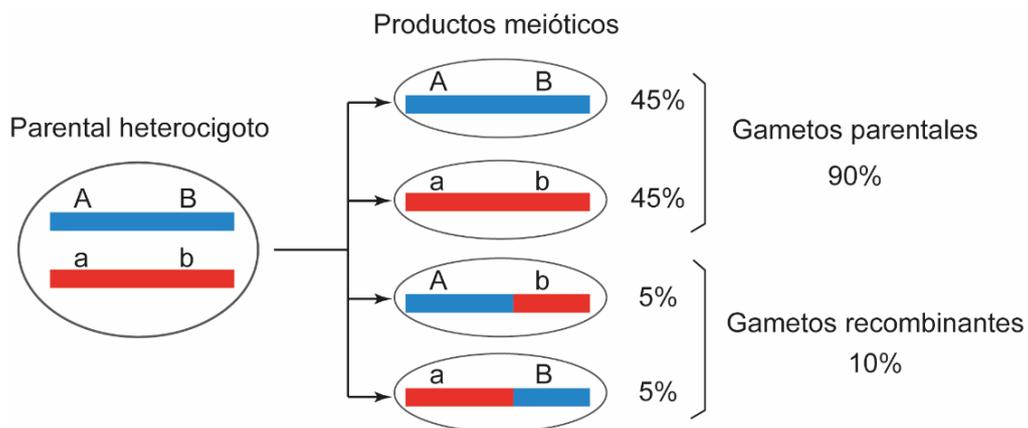


Figura 15. Segregación de marcadores genéticos ligados durante la meiosis. Las frecuencias de cada producto meiótico que se representan corresponderían a dos marcadores separados por 10 centimorgan (cM), entre los cuales la frecuencia de recombinación es del 10%.

Por esta razón, denominaríamos a los gametos con el genotipo *Ab* o *aB* *gametos recombinantes*. La frecuencia de estos *gametos recombinantes* sería menor que el 50% que esperaríamos en el caso de que los marcadores estuvieran en cromosomas separados, de modo que diríamos que estos dos marcadores se encuentran en *desequilibrio de ligamiento*. Además, puesto que la probabilidad de que ocurra un evento de recom-

binación entre dos marcadores durante la meiosis depende, en gran medida, de la distancia física que los separa, la frecuencia de recombinación entre marcadores (representada como θ) es una medida indirecta de la distancia entre éstos. Esta *frecuencia de recombinación* se define como la proporción de gametos recombinantes respecto del total de gametos transmitidos. La frecuencia de recombinación máxima es $\theta=0.5$, que corresponde a la observada entre marcadores localizados en cromosomas diferentes y que, por tanto, no se encuentran ligados. En cambio, cuando dos marcadores se encuentran ligados, se observa que $\theta < 0.5$, y cuanto menos frecuentes sean los eventos de recombinación entre ellos, menor será el valor de θ .

La distancia genética entre marcadores (d) está en función del número de eventos de recombinación que suceden entre éstos, y se expresa en centimorgans (cM). En nuestro estudio, se realizó el control de calidad de los datos genéticos comparando la distancia genética estimada en base a las frecuencias de recombinación entre marcadores observadas en las cohortes *backcross* con la distancia genética correspondiente a las posiciones anotadas para los marcadores en las bases de datos de referencia (*Mouse Genome Informatics*)^{245, 246}.

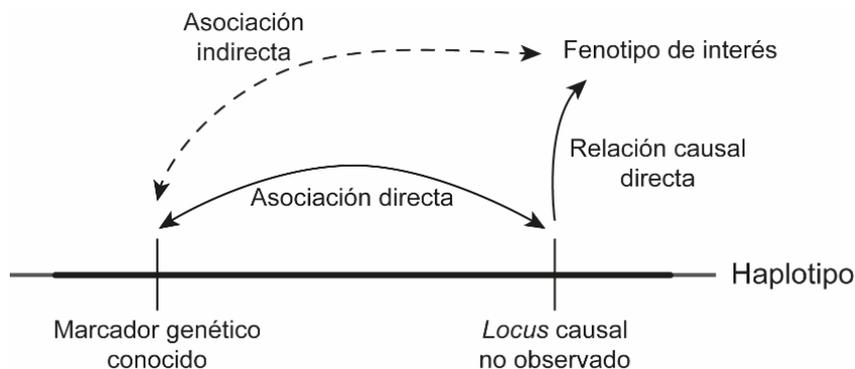


Figura 16. Análisis de ligamiento aplicado a fenotipos. En la figura se representa un locus causal de un fenotipo de interés que cosegrega junto a uno de los marcadores genéticos que se han estudiado, formando un haplotipo. Aunque el marcador genético no guarda una relación causal con el fenotipo de interés, el análisis de ligamiento detectará la asociación entre el genotipo en este marcador y el fenotipo (línea discontinua).

El análisis de ligamiento es un método de análisis estadístico para determinar si, en base a los datos genéticos observados, dos marcadores se encuentren ligados o segregan de manera independiente. Este análisis es extensible para determinar la relación entre el genotipo en los marcadores genéticos y la distribución de un fenotipo de interés en una población genéticamente heterogénea (**Figura 16**). De esta manera, se identifican *regiones de rasgo cuantitativo* (QTL), en las que diferencias en el genotipo se asocian con diferencias en el fenotipo estudiado. El análisis de ligamiento se realizó

con el paquete *R/qtl* en R y con la interfaz RStudio. Se utilizó el método de *mapeo por intervalos de máxima probabilidad con el algoritmo esperanza-maximización* o *algoritmo EM*. El genotipo condicional se calculó usando la *función de Haldane* con un tamaño de paso de 2.5 cM y un error de genotipado de 0.001²⁴⁷.

Para puntuar la significación estadística del ligamiento de los QTL detectados se utilizó el *LOD-score*, que se define como el logaritmo en base 10 de la *Odd Ratio* (o razón de riesgo); ésta es el cociente entre las probabilidades de que los datos observados se hubieran generado bajo la hipótesis de que un *locus* esté ligado a un rasgo fenotípico, y bajo la hipótesis de que no lo esté. Un *LOD score* igual a 3 significa que el dato observado es 1000 veces más probable bajo la hipótesis de ligamiento que bajo la hipótesis de independencia. Se utilizaron los criterios establecidos por Lander y Kruglyak²⁴⁸ para considerar el nivel de significación de la asociación observada entre un QTL y el fenotipo de interés. Así, se consideró que valores de *LOD score* superiores a 1.5 indicaron la *presencia sugestiva de ligamiento*, mientras que valores superiores a 3.3 indicaron que el ligamiento detectado fue estadísticamente significativo.

CONCLUSIONES

Conclusión global

Nuestros estudios en cruces experimentales de ratón permiten concluir que la gran heterogeneidad de presentación del cáncer de mama entre individuos, en cuanto a la susceptibilidad, evolución y respuesta al tratamiento, puede explicarse en función de determinantes genéticos y fenotipos intermedios.

Conclusiones específicas

PRIMERA:

Se ha definido la heterogeneidad de la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama, sin interferencia del tratamiento, mediante determinantes genéticos y fenotipos intermedios originados a nivel de la célula tumoral, del estroma y sistémico.

SEGUNDA:

En un modelo de minimización de la variabilidad de fenotipos intermedios de origen estromal y sistémico, y que mantiene la heterogeneidad genética en el componente epitelial tumoral, se ha explicado la respuesta a la quimioterapia con doxorubicina y docetaxel.

TERCERA:

La respuesta del cáncer de mama al tratamiento con doxorubicina y/o docetaxel está muy influenciada por el fondo genético. Aquí, en un modelo de heterogeneidad a niveles epitelial, estromal y sistémico, hemos descrito parte del componente poligénico, así como fenotipos intermedios de señalización que explican parte de la variabilidad de dicha respuesta.

CONCLUSIONS

Main conclusion

Our studies in experimental crosses of mice show that the great heterogeneity of breast cancer susceptibility, evolution and response to treatment among individuals can be explained by genetic determinants and intermediate phenotypes.

Specific conclusions

FIRST:

We have defined the heterogeneity of breast cancer susceptibility and evolution without treatment interference based on genetic determinants and intermediate phenotypes located at tumor cell, stromal and systemic levels.

SECOND:

We have explained the response to chemotherapy with docetaxel and doxorubicin in a model of genetic heterogeneity in tumor epithelial cells, where the influences from intermediate phenotypes located at stromal and systemic levels to response variability are minimized.

THIRD:

Breast cancer response to chemotherapy with docetaxel and/or doxorubicin is highly influenced by genetic background. Here, we have described part of the polygenic component and the signaling intermediate phenotypes that explain part of the variability of this response in a model of genetic heterogeneity at epithelial, stromal, and systemic level.

BIBLIOGRAFÍA

1. Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians* **63**, 11-30 (2013).
2. Ferlay, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer* **136**, E359-86 (2015).
3. Narod, S.A., Iqbal, J. & Miller, A.B. Why have breast cancer mortality rates declined? *Journal of Cancer Policy* **5**, 8-17 (2015).
4. Otto, S.J. et al. Initiation of population-based mammography screening in Dutch municipalities and effect on breast-cancer mortality: a systematic review. *Lancet* **361**, 1411-7 (2003).
5. Bleyer, A. & Welch, H.G. Effect of three decades of screening mammography on breast-cancer incidence. *The New England journal of medicine* **367**, 1998-2005 (2012).
6. DeSantis, C.E. et al. International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **24**, 1495-506 (2015).
7. Swain, S.M. et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine* **372**, 724-34 (2015).
8. Apostolou, P. & Fostira, F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *BioMed research international* **2013**, 747318 (2013).
9. Claus, E.B., Risch, N. & Thompson, W.D. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *American journal of human genetics* **48**, 232-42 (1991).
10. Savage, K.I. & Harkin, D.P. BRCA1, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability. *FEBS J* **282**, 630-46 (2015).
11. Wang, Y. et al. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes & development* **14**, 927-39 (2000).
12. Welcsh, P.L. & King, M.C. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Human molecular genetics* **10**, 705-13 (2001).
13. Johannsdottir, G. et al. High prevalence of the 999del5 mutation in icelandic breast and ovarian cancer patients. *Cancer research* **56**, 3663-5 (1996).
14. Roa, B.B., Boyd, A.A., Volcik, K. & Richards, C.S. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nature genetics* **14**, 185-7 (1996).
15. Konstantopoulou, I. et al. Greek BRCA1 and BRCA2 mutation spectrum: two BRCA1 mutations account for half the carriers found among high-risk breast/ovarian cancer patients. *Breast cancer research and treatment* **107**, 431-41 (2008).
16. Thorlacius, S. et al. Population-based study of risk of breast cancer in carriers of BRCA2 mutation. *Lancet* **352**, 1337-9 (1998).
17. Foulkes, W.D. BRCA1 and BRCA2: chemosensitivity, treatment outcomes and prognosis. *Familial cancer* **5**, 135-42 (2006).
18. Menendez, M. et al. Assessing the RNA effect of 26 DNA variants in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Breast cancer research and treatment* **132**, 979-92 (2012).
19. Couch, F.J., Nathanson, K.L. & Offit, K. Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention. *Science* **343**, 1466-70 (2014).
20. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* **351**, 1451-67 (1998).
21. Fisher, B. et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *Journal of the National Cancer Institute* **90**, 1371-88 (1998).

22. Guillem, J.G. et al. ASCO/SSO review of current role of risk-reducing surgery in common hereditary cancer syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **24**, 4642-60 (2006).
23. Gonzalez, K.D. et al. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 1250-6 (2009).
24. Lammens, C.R. et al. Regular surveillance for Li-Fraumeni Syndrome: advice, adherence and perceived benefits. *Familial cancer* **9**, 647-54 (2010).
25. Allain, D.C. Genetic counseling and testing for common hereditary breast cancer syndromes: a paper from the 2007 William Beaumont hospital symposium on molecular pathology. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* **10**, 383-95 (2008).
26. van Lier, M.G. et al. High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations. *The American journal of gastroenterology* **105**, 1258-64; author reply 1265 (2010).
27. Schrader, K.A. et al. Hereditary diffuse gastric cancer: association with lobular breast cancer. *Familial cancer* **7**, 73-82 (2008).
28. Balmain, A. Cancer as a complex genetic trait: tumor susceptibility in humans and mouse models. *Cell* **108**, 145-52 (2002).
29. Bertheau, P. et al. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast* **22 Suppl 2**, S27-9 (2013).
30. Lichtenstein, P. et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England journal of medicine* **343**, 78-85 (2000).
31. Easton, D.F. et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* **447**, 1087-93 (2007).
32. Hunter, D.J. et al. A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nature genetics* **39**, 870-4 (2007).
33. Cox, A. et al. A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nature genetics* **39**, 352-8 (2007).
34. Lukong, K.E. Understanding breast cancer - The long and winding road. *BBA clinical* **7**, 64-77 (2017).
35. McPherson, K., Steel, C.M. & Dixon, J.M. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* **321**, 624-8 (2000).
36. Benz, C.C. & Yau, C. Ageing, oxidative stress and cancer: paradigms in parallax. *Nature reviews. Cancer* **8**, 875-9 (2008).
37. Anders, C.K. et al. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**, 3324-30 (2008).
38. Mandell, J.B. Bathsheba's breast Women, cancer & history. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 1397-1397 (2005).
39. Press, D.J. & Pharoah, P. Risk factors for breast cancer: a reanalysis of two case-control studies from 1926 and 1931. *Epidemiology* **21**, 566-72 (2010).
40. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *The Lancet. Oncology* **13**, 1141-51 (2012).
41. Shi, L. et al. Prepubertal urinary estrogen excretion and its relationship with pubertal timing. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **299**, E990-7 (2010).

42. DeBerardinis, R.J. & Cheng, T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* **29**, 313-24 (2010).
43. Mouritsen, A. et al. Hypothesis: exposure to endocrine-disrupting chemicals may interfere with timing of puberty. *International journal of andrology* **33**, 346-59 (2010).
44. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet* **360**, 187-95 (2002).
45. van den Brandt, P.A. et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *American journal of epidemiology* **152**, 514-27 (2000).
46. Liu, Y., Nguyen, N. & Colditz, G.A. Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. *Women's health* **11**, 65-77 (2015).
47. Kumle, M. et al. Use of oral contraceptives and breast cancer risk: The Norwegian-Swedish Women's Lifestyle and Health Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**, 1375-81 (2002).
48. Marchbanks, P.A. et al. Oral contraceptive formulation and risk of breast cancer. *Contraception* **85**, 342-50 (2012).
49. Zhu, H., Lei, X., Feng, J. & Wang, Y. Oral contraceptive use and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *The European journal of contraception & reproductive health care : the official journal of the European Society of Contraception* **17**, 402-14 (2012).
50. Hunter, D.J. et al. Oral contraceptive use and breast cancer: a prospective study of young women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **19**, 2496-502 (2010).
51. Samson, M. et al. Progestin and breast cancer risk: a systematic review. *Breast cancer research and treatment* **155**, 3-12 (2016).
52. Bernstein, L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **7**, 3-15 (2002).
53. Rossouw, J.E. et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **288**, 321-33 (2002).
54. Ravdin, P.M. et al. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *The New England journal of medicine* **356**, 1670-4 (2007).
55. vom Saal, F.S. et al. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reproductive toxicology* **24**, 131-8 (2007).
56. Exposure in utero to diethylstilbestrol and related synthetic hormones. Association with vaginal and cervical cancers and other abnormalities. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **236**, 1107-9 (1976).
57. Herbst, A.L., Ulfelder, H. & Poskanzer, D.C. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *The New England journal of medicine* **284**, 878-81 (1971).
58. Brisken, C. Endocrine Disruptors and Breast Cancer. *CHIMIA International Journal for Chemistry* **62**, 406-409 (2008).
59. Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.Y., Reidy, J.A. & Needham, L.L. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environmental health perspectives* **116**, 39-44 (2008).
60. Howdeshell, K.L., Hotchkiss, A.K., Thayer, K.A., Vandenberg, J.G. & vom Saal, F.S. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* **401**, 763-4 (1999).

61. Kolonel, L.N., Altshuler, D. & Henderson, B.E. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nature reviews. Cancer* **4**, 519-27 (2004).
62. Rios, A.C., Fu, N.Y., Lindeman, G.J. & Visvader, J.E. In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature* **506**, 322-7 (2014).
63. Travers, M.T. et al. The role of prolactin and growth hormone in the regulation of casein gene expression and mammary cell survival: relationships to milk synthesis and secretion. *Endocrinology* **137**, 1530-9 (1996).
64. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-74 (2011).
65. Witkiewicz, A.K. & Knudsen, E.S. Retinoblastoma tumor suppressor pathway in breast cancer: prognosis, precision medicine, and therapeutic interventions. *Breast cancer research : BCR* **16**, 207 (2014).
66. Curto, M., Cole, B.K., Lallemand, D., Liu, C.H. & McClatchey, A.I. Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *The Journal of cell biology* **177**, 893-903 (2007).
67. Barnes, D.M. & Gillett, C.E. Cyclin D1 in breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **52**, 1-15 (1998).
68. Trere, D. et al. High prevalence of retinoblastoma protein loss in triple-negative breast cancers and its association with a good prognosis in patients treated with adjuvant chemotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **20**, 1818-23 (2009).
69. Tang, B. et al. TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. *The Journal of clinical investigation* **112**, 1116-24 (2003).
70. Adams, J.M. & Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324-37 (2007).
71. Sahoo, S., Brickley, D.R., Kocherginsky, M. & Conzen, S.D. Coordinate expression of the PI3-kinase downstream effectors serum and glucocorticoid-induced kinase (SGK-1) and Akt-1 in human breast cancer. *European journal of cancer* **41**, 2754-9 (2005).
72. Biswas, D.K. et al. NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10137-42 (2004).
73. Blasco, M.A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature reviews. Genetics* **6**, 611-22 (2005).
74. Raynaud, C.M. et al. DNA damage repair and telomere length in normal breast, preneoplastic lesions, and invasive cancer. *American journal of clinical oncology* **33**, 341-5 (2010).
75. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **29**, 789-91 (2009).
76. Klymkowsky, M.W. & Savagner, P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *The American journal of pathology* **174**, 1588-93 (2009).
77. Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M. & Ford, H.L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **15**, 117-34 (2010).
78. Tse, J.C. & Kalluri, R. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J Cell Biochem* **101**, 816-29 (2007).
79. Ciccia, A. & Elledge, S.J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell* **40**, 179-204 (2010).

80. Carney, J.P. et al. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* **93**, 477-86 (1998).
81. Matsuoka, S. et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**, 1160-6 (2007).
82. Lord, C.J. & Ashworth, A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* **481**, 287-94 (2012).
83. Matt, S. & Hofmann, T.G. The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **73**, 2829-50 (2016).
84. Marechal, A. & Zou, L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5** (2013).
85. Dvorak, H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine* **315**, 1650-9 (1986).
86. Grivennikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-99 (2010).
87. Wyckoff, J.B. et al. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer research* **67**, 2649-56 (2007).
88. Carels, N., Spinasse, L.B., Tilli, T.M. & Tuszynski, J.A. Toward precision medicine of breast cancer. *Theoretical biology & medical modelling* **13**, 7 (2016).
89. Nielsen, T.O. et al. Expression of the insulin-like growth factor I receptor and urokinase plasminogen activator in breast cancer is associated with poor survival: potential for intervention with 17-allylamino geldanamycin. *Cancer research* **64**, 286-91 (2004).
90. Ullrich, A. & Schlessinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203-12 (1990).
91. Garrett, T.P. et al. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Molecular cell* **11**, 495-505 (2003).
92. Sliwkowski, M.X. Ready to partner. *Nature structural biology* **10**, 158-9 (2003).
93. Yarden, Y. & Sliwkowski, M.X. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 127-37 (2001).
94. Guy, P.M., Platko, J.V., Cantley, L.C., Cerione, R.A. & Carraway, K.L., 3rd. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 8132-6 (1994).
95. Vijapurkar, U., Kim, M.S. & Koland, J.G. Roles of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3'-kinase in ErbB2/ErbB3 coreceptor-mediated heregulin signaling. *Experimental cell research* **284**, 291-302 (2003).
96. Heintz, N.H., Leslie, K.O., Rogers, L.A. & Howard, P.L. Amplification of the c-erb B-2 oncogene and prognosis of breast adenocarcinoma. *Archives of pathology & laboratory medicine* **114**, 160-3 (1990).
97. Shih, C., Padhy, L.C., Murray, M. & Weinberg, R.A. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* **290**, 261-4 (1981).
98. Muller, W.J., Sinn, E., Pattengale, P.K., Wallace, R. & Leder, P. Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* **54**, 105-15 (1988).
99. Guy, C.T. et al. Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 10578-82 (1992).
100. Siegel, P.M. & Muller, W.J. Mutations affecting conserved cysteine residues within the extracellular domain of Neu promote receptor dimerization and activation. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**, 8878-83 (1996).
101. Sun, Z. et al. Analysis of different HER-2 mutations in breast cancer progression and drug resistance. *Journal of cellular and molecular medicine* **19**, 2691-701 (2015).
 102. Siegel, P.M., Ryan, E.D., Cardiff, R.D. & Muller, W.J. Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *The EMBO journal* **18**, 2149-64 (1999).
 103. Turpin, J. et al. The ErbB2DeltaEx16 splice variant is a major oncogenic driver in breast cancer that promotes a pro-metastatic tumor microenvironment. *Oncogene* **35**, 6053-6064 (2016).
 104. Tural, D., Akar, E., Mutlu, H. & Kilickap, S. P95 HER2 fragments and breast cancer outcome. *Expert review of anticancer therapy* **14**, 1089-96 (2014).
 105. Dieci, M.V., Arnedos, M., Andre, F. & Soria, J.C. Fibroblast growth factor receptor inhibitors as a cancer treatment: from a biologic rationale to medical perspectives. *Cancer discovery* **3**, 264-79 (2013).
 106. Manning, B.D. & Cantley, L.C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-74 (2007).
 107. Yamamoto-Ibusuki, M., Arnedos, M. & Andre, F. Targeted therapies for ER+/HER2-metastatic breast cancer. *BMC medicine* **13**, 137 (2015).
 108. Gajria, D. & Chandralapaty, S. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert review of anticancer therapy* **11**, 263-75 (2011).
 109. Zhang, H.Y., Liang, F., Jia, Z.L., Song, S.T. & Jiang, Z.F. PTEN mutation, methylation and expression in breast cancer patients. *Oncology letters* **6**, 161-168 (2013).
 110. Laplante, M. & Sabatini, D.M. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of cell science* **126**, 1713-9 (2013).
 111. Zoncu, R., Efeyan, A. & Sabatini, D.M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 21-35 (2011).
 112. Whyte, J., Bergin, O., Bianchi, A., McNally, S. & Martin, F. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast Cancer Res* **11**, 209 (2009).
 113. von Kriegsheim, A. et al. Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome. *Nature cell biology* **11**, 1458-64 (2009).
 114. Pearson, G. et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* **22**, 153-83 (2001).
 115. Joslin, E.J., Opresko, L.K., Wells, A., Wiley, H.S. & Lauffenburger, D.A. EGF-receptor-mediated mammary epithelial cell migration is driven by sustained ERK signalling from autocrine stimulation. *Journal of cell science* **120** (2007).
 116. Pages, G. et al. Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase cascade. *Annals of the New York Academy of Sciences* **902**, 187-200 (2000).
 117. Mueller, H. et al. Potential prognostic value of mitogen-activated protein kinase activity for disease-free survival of primary breast cancer patients. *Int J Cancer* **89** (2000).
 118. Bergqvist, J. et al. Activated ERK1/2 and phosphorylated oestrogen receptor alpha are associated with improved breast cancer survival in women treated with tamoxifen. *European journal of cancer* **42** (2006).
 119. Thornton, T.M. & Rincon, M. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci* **5** (2009).

120. Davis, R.J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Soc Symp* **64** (1999).
121. Jochum, W., Passegue, E. & Wagner, E.F. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* **20**, 2401-12 (2001).
122. Nass, N. & Kalinski, T. Tamoxifen resistance: from cell culture experiments towards novel biomarkers. *Pathology, research and practice* **211**, 189-97 (2015).
123. Christoforou, P., Christopoulos, P.F. & Koutsilieris, M. The role of estrogen receptor beta in prostate cancer. *Molecular medicine* **20**, 427-34 (2014).
124. Scaling, A.L., Prossnitz, E.R. & Hathaway, H.J. GPER mediates estrogen-induced signaling and proliferation in human breast epithelial cells and normal and malignant breast. *Hormones & cancer* **5**, 146-60 (2014).
125. Kato, S. Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast cancer* **8**, 3-9 (2001).
126. Lee, A.V., Cui, X. & Oesterreich, S. Cross-talk among estrogen receptor, epidermal growth factor, and insulin-like growth factor signaling in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **7**, 4429s-4435s; discussion 4411s-4412s (2001).
127. Yang, Z., Barnes, C.J. & Kumar, R. Human epidermal growth factor receptor 2 status modulates subcellular localization of and interaction with estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**, 3621-8 (2004).
128. Kahlert, S. et al. Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *The Journal of biological chemistry* **275**, 18447-53 (2000).
129. Levine, R.L., Pardanani, A., Tefferi, A. & Gilliland, D.G. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nature reviews. Cancer* **7**, 673-83 (2007).
130. Sansone, P. & Bromberg, J. Targeting the interleukin-6/Jak/stat pathway in human malignancies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**, 1005-14 (2012).
131. Banerjee, K. & Resat, H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. *International journal of cancer* **138**, 2570-8 (2016).
132. Parsons, S.J. & Parsons, J.T. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* **23**, 7906-9 (2004).
133. Bromann, P.A., Korkaya, H. & Courtneidge, S.A. The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene* **23**, 7957-68 (2004).
134. Mitra, S.K., Hanson, D.A. & Schlaepfer, D.D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 56-68 (2005).
135. Al Saleh, S., Sharaf, L.H. & Luqmani, Y.A. Signalling pathways involved in endocrine resistance in breast cancer and associations with epithelial to mesenchymal transition (Review). *International journal of oncology* **38**, 1197-217 (2011).
136. Okada, M. Regulation of the SRC family kinases by Csk. *International journal of biological sciences* **8**, 1385-97 (2012).
137. Nunes-Xavier, C.E., Martin-Perez, J., Elson, A. & Pulido, R. Protein tyrosine phosphatases as novel targets in breast cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta* **1836**, 211-26 (2013).
138. Elston, C.W., Ellis, I.O. & Pinder, S.E. Pathological prognostic factors in breast cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* **31**, 209-23 (1999).
139. Perou, C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-52 (2000).

140. Sorlie, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10869-74 (2001).
141. Prat, A. et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**, 203-9 (2013).
142. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61-70 (2012).
143. Lønning, P.E. Molecular classes of breast cancer and their clinical relevance. *Current Breast Cancer Reports* **1**, 183-189 (2009).
144. Oakman, C., Moretti, E., Galardi, F., Santarpia, L. & Di Leo, A. The role of topoisomerase IIalpha and HER-2 in predicting sensitivity to anthracyclines in breast cancer patients. *Cancer Treat Rev* **35**, 662-7 (2009).
145. Dean-Colomb, W. & Esteva, F.J. Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond. *Eur J Cancer* **44**, 2806-12 (2008).
146. Tang, Y., Wang, Y., Kiani, M.F. & Wang, B. Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. *Clinical breast cancer* **16**, 335-343 (2016).
147. Prat, A. et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast* **24 Suppl 2**, S26-35 (2015).
148. Eroles, P., Bosch, A., Perez-Fidalgo, J.A. & Lluch, A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer treatment reviews* **38**, 698-707 (2012).
149. Prat, A. et al. Molecular features of the basal-like breast cancer subtype based on BRCA1 mutation status. *Breast Cancer Research and Treatment* **147**, 185-191 (2014).
150. Natrajan, R. & Weigelt, B. Risk Stratification and Intrinsic Subtype Classification of Breast Cancer: a Multi-Parameter Test to Rule Them All? *Journal of the National Cancer Institute* **108** (2016).
151. Curtis, C. et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* **486**, 346-52 (2012).
152. Goel, S., Sharma, R., Hamilton, A. & Beith, J. LHRH agonists for adjuvant therapy of early breast cancer in premenopausal women. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD004562 (2009).
153. Johnston, S.R. & Dowsett, M. Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nature reviews. Cancer* **3**, 821-31 (2003).
154. Wakeling, A.E. Similarities and distinctions in the mode of action of different classes of antioestrogens. *Endocrine-related cancer* **7**, 17-28 (2000).
155. Nitiss, J.L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature reviews. Cancer* **9**, 338-50 (2009).
156. Kataja, V. & Castiglione, M. Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **19 Suppl 2**, ii11-3 (2008).
157. Dieras, V. Review of docetaxel/doxorubicin combination in metastatic breast cancer. *Oncology* **11**, 31-3 (1997).
158. von Minckwitz, G. Docetaxel/anthracycline combinations for breast cancer treatment. *Expert opinion on pharmacotherapy* **8**, 485-95 (2007).
159. Gradishar, W.J. et al. Invasive Breast Cancer Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* **14**, 324-54 (2016).

160. LoRusso, P.M., Weiss, D., Guardino, E., Girish, S. & Sliwkowski, M.X. Trastuzumab emtansine: a unique antibody-drug conjugate in development for human epidermal growth factor receptor 2-positive cancer. *Clin Cancer Res* **17**, 6437-47 (2011).
161. Brufsky, A.M. et al. RIBBON-2: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating the efficacy and safety of bevacizumab in combination with chemotherapy for second-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **29**, 4286-93 (2011).
162. Robert, N.J. et al. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **29**, 1252-60 (2011).
163. Mackey, J.R. et al. Primary results of ROSE/TRIO-12, a randomized placebo-controlled phase III trial evaluating the addition of ramucirumab to first-line docetaxel chemotherapy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **33**, 141-8 (2015).
164. Bergh, J. et al. First-line treatment of advanced breast cancer with sunitinib in combination with docetaxel versus docetaxel alone: results of a prospective, randomized phase III study. *J Clin Oncol* **30**, 921-9 (2012).
165. Crown, J.P. et al. Phase III trial of sunitinib in combination with capecitabine versus capecitabine monotherapy for the treatment of patients with pretreated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **31**, 2870-8 (2013).
166. Baselga, J. et al. A phase 3 trial comparing capecitabine in combination with Sorafenib or placebo for treatment of locally advanced or metastatic HER2-Negative breast Cancer (the RESILIENCE study): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* **14**, 228 (2013).
167. Yardley, D.A. et al. Everolimus plus exemestane in postmenopausal patients with HR(+) breast cancer: BOLERO-2 final progression-free survival analysis. *Adv Ther* **30**, 870-84 (2013).
168. PI3K Inhibitor Improves PFS in BELLE-2 Trial. *Cancer Discov* **6**, 115-6 (2016).
169. Gu, G., Dustin, D. & Fuqua, S.A. Targeted therapy for breast cancer and molecular mechanisms of resistance to treatment. *Curr Opin Pharmacol* **31**, 97-103 (2016).
170. Tutt, A.N. et al. Exploiting the DNA repair defect in BRCA mutant cells in the design of new therapeutic strategies for cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**, 139-48 (2005).
171. O'Shaughnessy, J. et al. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* **364**, 205-14 (2011).
172. Robinson, D.R. et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat Genet* **45**, 1446-51 (2013).
173. Miller, T.W. et al. Loss of Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10 engages ErbB3 and insulin-like growth factor-I receptor signaling to promote antiestrogen resistance in breast cancer. *Cancer Res* **69**, 4192-201 (2009).
174. Raha, P., Thomas, S. & Munster, P.N. Epigenetic modulation: a novel therapeutic target for overcoming hormonal therapy resistance. *Epigenomics* **3**, 451-70 (2011).
175. Dean, M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **14**, 3-9 (2009).
176. Clarke, R., Leonessa, F. & Trock, B. Multidrug resistance/P-glycoprotein and breast cancer: review and meta-analysis. *Semin Oncol* **32**, S9-15 (2005).
177. Leonessa, F. & Clarke, R. ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **10**, 43-73 (2003).
178. Chevillard, S. et al. Biological and clinical significance of concurrent p53 gene alterations, MDR1 gene expression, and S-phase fraction analyses in breast cancer

- patients treated with primary chemotherapy or radiotherapy. *Clin Cancer Res* **3**, 2471-8 (1997).
179. Vtorushin, S.V. et al. The phenomenon of multi-drug resistance in the treatment of malignant tumors. *Exp Oncol* **36**, 144-56 (2014).
 180. Cole, S.P. et al. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* **54**, 5902-10 (1994).
 181. Vu, T. & Claret, F.X. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Front Oncol* **2**, 62 (2012).
 182. De, P., Hasmann, M. & Leyland-Jones, B. Molecular determinants of trastuzumab efficacy: What is their clinical relevance? *Cancer Treat Rev* **39**, 925-34 (2013).
 183. Formisano, L. et al. Epidermal growth factor-receptor activation modulates Src-dependent resistance to lapatinib in breast cancer models. *Breast Cancer Res* **16**, R45 (2014).
 184. Masoud, V. & Pages, G. Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. *World J Clin Oncol* **8**, 120-134 (2017).
 185. Shelley, M. et al. Chemotherapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, CD005247 (2006).
 186. Shou, M. et al. Role of human cytochrome P450 3A4 and 3A5 in the metabolism of taxotere and its derivatives: enzyme specificity, interindividual distribution and metabolic contribution in human liver. *Pharmacogenetics* **8**, 391-401 (1998).
 187. Tran, A. et al. Pharmacokinetics and toxicity of docetaxel: role of CYP3A, MDR1, and GST polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* **79**, 570-80 (2006).
 188. Bosch, T.M. et al. Pharmacogenetic screening of CYP3A and ABCB1 in relation to population pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Cancer Res* **12**, 5786-93 (2006).
 189. Chew, S.C. et al. The effects of CYP3A4, CYP3A5, ABCB1, ABCC2, ABCG2 and SLCO1B3 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of docetaxel in nasopharyngeal carcinoma patients. *Cancer Chemother Pharmacol* **67**, 1471-8 (2011).
 190. Chen, S. et al. Pharmacogenetics of irinotecan, doxorubicin and docetaxel transporters in Asian and Caucasian cancer patients: a comparative review. *Drug Metab Rev* **48**, 502-540 (2016).
 191. Levy, P. et al. Influence of ABCB1 polymorphisms and docetaxel pharmacokinetics on pathological response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **139**, 421-8 (2013).
 192. Kim, H.J. et al. ABCB1 polymorphism as prognostic factor in breast cancer patients treated with docetaxel and doxorubicin neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Sci* **106**, 86-93 (2015).
 193. Eckhoff, L., Feddersen, S., Knoop, A.S., Ewertz, M. & Bergmann, T.K. Docetaxel-induced neuropathy: a pharmacogenetic case-control study of 150 women with early-stage breast cancer. *Acta Oncol* **54**, 530-7 (2015).
 194. Kiyotani, K. et al. Association of genetic polymorphisms in SLCO1B3 and ABCC2 with docetaxel-induced leukopenia. *Cancer Sci* **99**, 967-72 (2008).
 195. Lewis, L.D. et al. The relationship of polymorphisms in ABCC2 and SLCO1B3 with docetaxel pharmacokinetics and neutropenia: CALGB 60805 (Alliance). *Pharmacogenet Genomics* **23**, 29-33 (2013).
 196. de Graan, A.J. et al. Influence of polymorphic OATP1B-type carriers on the disposition of docetaxel. *Clin Cancer Res* **18**, 4433-40 (2012).
 197. Chew, S.C. et al. Influence of SLCO1B3 haplotype-tag SNPs on docetaxel disposition in Chinese nasopharyngeal cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* **73**, 606-18 (2012).

198. Callens, C. et al. High-throughput pharmacogenetics identifies SLC01A2 polymorphisms as candidates to elucidate the risk of febrile neutropenia in the breast cancer RAPP-01 trial. *Breast Cancer Res Treat* **153**, 383-9 (2015).
199. Hertz, D.L. et al. Pharmacogenetic Discovery in CALGB (Alliance) 90401 and Mechanistic Validation of a VAC14 Polymorphism that Increases Risk of Docetaxel-Induced Neuropathy. *Clin Cancer Res* **22**, 4890-4900 (2016).
200. Schneider, B.P. et al. Genome-Wide Association Studies for Taxane-Induced Peripheral Neuropathy in ECOG-5103 and ECOG-1199. *Clin Cancer Res* **21**, 5082-91 (2015).
201. Raj, S., Franco, V.I. & Lipshultz, S.E. Anthracycline-induced cardiotoxicity: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* **16**, 315 (2014).
202. Kassner, N. et al. Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver. *Drug Metab Dispos* **36**, 2113-20 (2008).
203. Forrest, G.L., Gonzalez, B., Tseng, W., Li, X. & Mann, J. Human carbonyl reductase overexpression in the heart advances the development of doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice. *Cancer Res* **60**, 5158-64 (2000).
204. Loscher, W. & Potschka, H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci* **6**, 591-602 (2005).
205. Okabe, M. et al. Characterization of the organic cation transporter SLC22A16: a doxorubicin importer. *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 754-62 (2005).
206. Voon, P.J. et al. Correlation of aldo-ketoreductase (AKR) 1C3 genetic variant with doxorubicin pharmacodynamics in Asian breast cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* **75**, 1497-505 (2013).
207. Bray, J. et al. Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *Br J Cancer* **102**, 1003-9 (2010).
208. Wojnowski, L. et al. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation* **112**, 3754-62 (2005).
209. Song, G. et al. Gulp1 is associated with the pharmacokinetics of PEGylated liposomal doxorubicin (PLD) in inbred mouse strains. *Nanomedicine* **12**, 2007-2017 (2016).
210. Zheng, Z. et al. A Mendelian locus on chromosome 16 determines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2502-7 (2005).
211. Visscher, P.M., Hill, W.G. & Wray, N.R. Heritability in the genomics era--concepts and misconceptions. *Nature reviews. Genetics* **9**, 255-66 (2008).
212. Visscher, P.M. Sizing up human height variation. *Nature genetics* **40**, 489-90 (2008).
213. Maher, B. Personal genomes: The case of the missing heritability. *Nature* **456**, 18-21 (2008).
214. Manolio, T.A. et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* **461**, 747-53 (2009).
215. Lander, E.S. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature* **470**, 187-97 (2011).
216. Antonarakis, S.E., Chakravarti, A., Cohen, J.C. & Hardy, J. Mendelian disorders and multifactorial traits: the big divide or one for all? *Nature reviews. Genetics* **11**, 380-4 (2010).
217. Bodmer, W. & Bonilla, C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nature genetics* **40**, 695-701 (2008).
218. Fritsche, L.G. et al. A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nature genetics* **48**, 134-43 (2016).

219. Johannsdottir, H.K. et al. Chromosome 5 imbalance mapping in breast tumors from BRCA1 and BRCA2 mutation carriers and sporadic breast tumors. *Int J Cancer* **119**, 1052-60 (2006).
220. Gottesman, II & Gould, T.D. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *The American journal of psychiatry* **160**, 636-45 (2003).
221. Vincent, G.M., Timothy, K.W., Leppert, M. & Keating, M. The spectrum of symptoms and QT intervals in carriers of the gene for the long-QT syndrome. *The New England journal of medicine* **327**, 846-52 (1992).
222. Lalouel, J.M. et al. Genetic analysis of idiopathic hemochromatosis using both qualitative (disease status) and quantitative (serum iron) information. *American journal of human genetics* **37**, 700-18 (1985).
223. Greenberg, D.A. et al. Juvenile myoclonic epilepsy (JME) may be linked to the BF and HLA loci on human chromosome 6. *American journal of medical genetics* **31**, 185-92 (1988).
224. Leppert, M. et al. Genetic analysis of an inherited predisposition to colon cancer in a family with a variable number of adenomatous polyps. *The New England journal of medicine* **322**, 904-8 (1990).
225. Blanco-Gomez, A. et al. Missing heritability of complex diseases: Enlightenment by genetic variants from intermediate phenotypes. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **38**, 664-73 (2016).
226. Ghossaini, M. & Pharoah, P.D. Polygenic susceptibility to breast cancer: current state-of-the-art. *Future Oncol* **5**, 689-701 (2009).
227. McClellan, J. & King, M.C. Genetic heterogeneity in human disease. *Cell* **141**, 210-7 (2010).
228. Galvan, A., Ioannidis, J.P. & Dragani, T.A. Beyond genome-wide association studies: genetic heterogeneity and individual predisposition to cancer. *Trends in genetics : TIG* **26**, 132-41 (2010).
229. Rowse, G.J., Ritland, S.R. & Gendler, S.J. Genetic modulation of neu proto-oncogene-induced mammary tumorigenesis. *Cancer research* **58**, 2675-9 (1998).
230. Davie, S.A. et al. Effects of FVB/NJ and C57Bl/6J strain backgrounds on mammary tumor phenotype in inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Transgenic research* **16**, 193-201 (2007).
231. Castellanos-Martin, A. et al. Unraveling heterogeneous susceptibility and the evolution of breast cancer using a systems biology approach. *Genome biology* **16**, 40 (2015).
232. Tomayko, M.M. & Reynolds, C.P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **24**, 148-54 (1989).
233. Rottenberg, S. et al. Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 12117-22 (2007).
234. Callicott, R.J. & Womack, J.E. Real-time PCR assay for measurement of mouse telomeres. *Comp Med* **56**, 17-22 (2006).
235. Cawthon, R.M. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* **30**, e47 (2002).
236. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**, 402-8 (2001).
237. Meier-Abt, F. et al. Parity induces differentiation and reduces Wnt/Notch signaling ratio and proliferation potential of basal stem/progenitor cells isolated from mouse mammary epithelium. *Breast Cancer Res* **15**, R36 (2013).

238. Siegel, P.M., Dankort, D.L., Hardy, W.R. & Muller, W.J. Novel activating mutations in the neu proto-oncogene involved in induction of mammary tumors. *Mol Cell Biol* **14**, 7068-77 (1994).
239. Khan, S.A., Joyce, J. & Tsuda, T. Quantification of active and total transforming growth factor-beta levels in serum and solid organ tissues by bioassay. *BMC Res Notes* **5**, 636 (2012).
240. GABRIEL, K.R. The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika* **58**, 453-467 (1971).
241. Zhang, Z.D. et al. Statistical analysis of the genomic distribution and correlation of regulatory elements in the ENCODE regions. *Genome research* **17**, 787-97 (2007).
242. Galindo, M. [An alternative for simultaneous representations. HJ-Biplot]. *Qüestió* **10**, 13-23 (1986).
243. Villardón, V. (Departamento de Estadística. Universidad de Salamanca. , 2010).
244. <http://biplot.usal.es/multbiplot>.
245. Cox, A. et al. A new standard genetic map for the laboratory mouse. *Genetics* **182**, 1335-44 (2009).
246. <http://cgd.jax.org/mousemapconverter/>.
247. Broman, K.W., Wu, H., Sen, S. & Churchill, G.A. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* **19**, 889-90 (2003).
248. Lander, E. & Kruglyak, L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature genetics* **11**, 241-7 (1995).
249. Lo, P.K. et al. CD49f and CD61 identify Her2/neu-induced mammary tumor-initiating cells that are potentially derived from luminal progenitors and maintained by the integrin-TGFbeta signaling. *Oncogene* **31**, 2614-26 (2012).
250. Solovieff, N., Cotsapas, C., Lee, P.H., Purcell, S.M. & Smoller, J.W. Pleiotropy in complex traits: challenges and strategies. *Nature reviews. Genetics* **14**, 483-95 (2013).
251. Auchincloss, H., Jr. & Winn, H.J. Clarence Cook Little (1888-1971): the genetic basis of transplant immunology. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **4**, 155-9 (2004).
252. Coussens, L.M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-7 (2002).
253. Kurt, R.A., Whitaker, R., Baher, A., Seung, S. & Urba, W.J. Spontaneous mammary carcinomas fail to induce an immune response in syngeneic FVBN202 neu transgenic mice. *Int J Cancer* **87**, 688-94 (2000).
254. Reilly, R.T. et al. HER-2/neu is a tumor rejection target in tolerized HER-2/neu transgenic mice. *Cancer Res* **60**, 3569-76 (2000).
255. Woods, D. & Turchi, J.J. Chemotherapy induced DNA damage response: convergence of drugs and pathways. *Cancer Biol Ther* **14**, 379-89 (2013).
256. Smith, J., Tho, L.M., Xu, N. & Gillespie, D.A. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* **108**, 73-112 (2010).
257. Bissonnette, R.P., Echeverri, F., Mahboubi, A. & Green, D.R. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* **359**, 552-4 (1992).
258. Yildirim, E., Dalgic, T. & Berberoglu, U. Prognostic significance of young age in breast cancer. *Journal of surgical oncology* **74**, 267-72 (2000).
259. Chan, R., Muller, W.J. & Siegel, P.M. Oncogenic activating mutations in the neu/erbB-2 oncogene are involved in the induction of mammary tumors. *Annals of the New York Academy of Sciences* **889**, 45-51 (1999).

260. Beevers, A.J., Damianoglou, A., Oates, J., Rodger, A. & Dixon, A.M. Sequence-dependent oligomerization of the Neu transmembrane domain suggests inhibition of "conformational switching" by an oncogenic mutant. *Biochemistry* **49**, 2811-20 (2010).
261. Burke, C.L. & Stern, D.F. Activation of Neu (ErbB-2) mediated by disulfide bond-induced dimerization reveals a receptor tyrosine kinase dimer interface. *Mol Cell Biol* **18**, 5371-9 (1998).
262. Bartholomeusz, C. et al. High ERK protein expression levels correlate with shorter survival in triple-negative breast cancer patients. *The oncologist* **17**, 766-74 (2012).
263. Hutchinson, J.N., Jin, J., Cardiff, R.D., Woodgett, J.R. & Muller, W.J. Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer research* **64**, 3171-8 (2004).
264. Schmitz, K.J. et al. Prognostic relevance of activated Akt kinase in node-negative breast cancer: a clinicopathological study of 99 cases. *Mod Pathol* **17**, 15-21 (2004).
265. Cicenias, J. et al. Increased level of phosphorylated akt measured by chemiluminescence-linked immunosorbent assay is a predictor of poor prognosis in primary breast cancer overexpressing ErbB-2. *Breast Cancer Res* **7**, R394-401 (2005).
266. Milde-Langosch, K. et al. Expression and prognostic relevance of activated extracellular-regulated kinases (ERK1/2) in breast cancer. *British journal of cancer* **92**, 2206-15 (2005).
267. Nadasi, E. et al. Prognostic factors in Hungarian breast cancer patients. *Anticancer research* **27**, 279-82 (2007).
268. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. & Guan, K.L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* **4**, 648-57 (2002).
269. Kovacina, K.S. et al. Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J Biol Chem* **278**, 10189-94 (2003).
270. Nave, B.T., Ouwens, M., Withers, D.J., Alessi, D.R. & Shepherd, P.R. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *The Biochemical journal* **344 Pt 2**, 427-31 (1999).
271. Memmott, R.M. & Dennis, P.A. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell Signal* **21**, 656-64 (2009).
272. Nasr, Z., Robert, F., Porco, J.A., Jr., Muller, W.J. & Pelletier, J. eIF4F suppression in breast cancer affects maintenance and progression. *Oncogene* **32**, 861-71 (2013).
273. Inoki, K., Zhu, T. & Guan, K.L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**, 577-90 (2003).
274. Arsham, A.M., Howell, J.J. & Simon, M.C. A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J Biol Chem* **278**, 29655-60 (2003).
275. Grange, C., Lanzardo, S., Cavallo, F., Camussi, G. & Bussolati, B. Sca-1 identifies the tumor-initiating cells in mammary tumors of BALB-neuT transgenic mice. *Neoplasia* **10**, 1433-43 (2008).
276. Orimo, A. et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **121**, 335-48 (2005).
277. Wislez, M. et al. Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death. *Cancer Res* **63**, 1405-12 (2003).
278. Jensen, H.K. et al. Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* **27**, 4709-17 (2009).

279. Strell, C., Lang, K., Niggemann, B., Zaenker, K.S. & Entschladen, F. Neutrophil granulocytes promote the migratory activity of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells via ICAM-1. *Exp Cell Res* **316**, 138-48 (2010).
280. Wei, B. et al. The neutrophil lymphocyte ratio is associated with breast cancer prognosis: an updated systematic review and meta-analysis. *Onco Targets Ther* **9**, 5567-75 (2016).
281. Williams, C.B., Yeh, E.S. & Soloff, A.C. Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *NPJ Breast Cancer* **2** (2016).
282. Qian, B. et al. A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PLoS One* **4**, e6562 (2009).
283. Inwald, E.C. et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat* **139**, 539-52 (2013).
284. Donate, L.E. & Blasco, M.A. Telomeres in cancer and ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**, 76-84 (2011).
285. Stearns, F.W. One hundred years of pleiotropy: a retrospective. *Genetics* **186**, 767-73 (2010).
286. Wagner, G.P. & Zhang, J. The pleiotropic structure of the genotype-phenotype map: the evolvability of complex organisms. *Nature reviews. Genetics* **12**, 204-13 (2011).
287. Granda, T.G. et al. Experimental chronotherapy of mouse mammary adenocarcinoma MA13/C with docetaxel and doxorubicin as single agents and in combination. *Cancer Res* **61**, 1996-2001 (2001).
288. Jones, S.E. et al. Phase III trial comparing doxorubicin plus cyclophosphamide with docetaxel plus cyclophosphamide as adjuvant therapy for operable breast cancer. *J Clin Oncol* **24**, 5381-7 (2006).
289. Chan, S. et al. Prospective randomized trial of docetaxel versus doxorubicin in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **17**, 2341-54 (1999).
290. O'Shaughnessy, J. Extending survival with chemotherapy in metastatic breast cancer. *Oncologist* **10 Suppl 3**, 20-9 (2005).
291. Naumov, G.N. et al. Ineffectiveness of doxorubicin treatment on solitary dormant mammary carcinoma cells or late-developing metastases. *Breast Cancer Res Treat* **82**, 199-206 (2003).
292. Fantozzi, A. & Christofori, G. Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* **8**, 212 (2006).
293. Whittle, J.R., Lewis, M.T., Lindeman, G.J. & Visvader, J.E. Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. *Breast Cancer Res* **17**, 17 (2015).
294. Penault-Llorca, F. et al. Ki67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* **27**, 2809-15 (2009).
295. Hugh, J. et al. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol* **27**, 1168-76 (2009).
296. Bartlett, J.M. et al. Type 1 receptor tyrosine kinase profiles identify patients with enhanced benefit from anthracyclines in the BR9601 adjuvant breast cancer chemotherapy trial. *J Clin Oncol* **26**, 5027-35 (2008).
297. Yu, C., Wang, S., Dent, P. & Grant, S. Sequence-dependent potentiation of paclitaxel-mediated apoptosis in human leukemia cells by inhibitors of the mitogen-activated protein kinase/ mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Pharmacol* **60**, 143-54 (2001).

298. Stone, A.A. & Chambers, T.C. Microtubule inhibitors elicit differential effects on MAP kinase (JNK, ERK, and p38) signaling pathways in human KB-3 carcinoma cells. *Exp Cell Res* **254**, 110-9 (2000).
299. Shtil, A.A. et al. Differential regulation of mitogen-activated protein kinases by microtubule-binding agents in human breast cancer cells. *Oncogene* **18**, 377-84 (1999).
300. Yacoub, A. et al. Sequence dependent exposure of mammary carcinoma cells to Taxotere and the MEK1/2 inhibitor U0126 causes enhanced cell killing in vitro. *Cancer Biol Ther* **2**, 670-6 (2003).
301. Holt, S.V. et al. The MEK1/2 inhibitor, selumetinib (AZD6244; ARRY-142886), enhances anti-tumour efficacy when combined with conventional chemotherapeutic agents in human tumour xenograft models. *Br J Cancer* **106**, 858-66 (2012).
302. Xing, H. et al. Activation of fibronectin/PI-3K/Akt2 leads to chemoresistance to docetaxel by regulating survivin protein expression in ovarian and breast cancer cells. *Cancer Lett* **261**, 108-19 (2008).
303. Chang, J.C. et al. Patterns of resistance and incomplete response to docetaxel by gene expression profiling in breast cancer patients. *J Clin Oncol* **23**, 1169-77 (2005).
304. Irie, H.Y. et al. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of cell biology* **171**, 1023-34 (2005).
305. Maroulakou, I.G., Oemler, W., Naber, S.P. & Tsichlis, P.N. Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice. *Cancer Res* **67**, 167-77 (2007).
306. Visvader, J.E. & Lindeman, G.J. Mammary stem cells and mammapoiesis. *Cancer Res* **66**, 9798-801 (2006).
307. Wang, G.Y. et al. Establishment of murine basal cell carcinoma allografts: a potential model for preclinical drug testing and for molecular analysis. *J Invest Dermatol* **131**, 2298-305 (2011).
308. Mueller, M.M. & Fusenig, N.E. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* **4**, 839-49 (2004).
309. Zhang, C. et al. The Association between Telomere Length and Cancer Prognosis: Evidence from a Meta-Analysis. *PLoS One* **10**, e0133174 (2015).
310. Ennour-Idrissi, K., Maunsell, E. & Diorio, C. Telomere Length and Breast Cancer Prognosis: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **26**, 3-10 (2017).
311. De Laurentiis, M. et al. Taxane-based combinations as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol* **26**, 44-53 (2008).
312. Tacar, O., Sriamornsak, P. & Dass, C.R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol* **65**, 157-70 (2013).
313. Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N. & Karliner, J.S. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology* **115**, 155-62 (2010).
314. Slamon, D.J. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* **344**, 783-92 (2001).
315. Seidman, A. et al. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J Clin Oncol* **20**, 1215-21 (2002).
316. Extra, J.M. et al. Phase I and pharmacokinetic study of Taxotere (RP 56976; NSC 628503) given as a short intravenous infusion. *Cancer Res* **53**, 1037-42 (1993).
317. Sparano, J.A. Doxorubicin/taxane combinations: cardiac toxicity and pharmacokinetics. *Semin Oncol* **26**, 14-9 (1999).

318. Nabholz, J.M. et al. Docetaxel and doxorubicin compared with doxorubicin and cyclophosphamide as first-line chemotherapy for metastatic breast cancer: results of a randomized, multicenter, phase III trial. *J Clin Oncol* **21**, 968-75 (2003).
319. Sparano, J.A., O'Neill, A., Schaefer, P.L., Falkson, C.I. & Wood, W.C. Phase II trial of doxorubicin and docetaxel plus granulocyte colony-stimulating factor in metastatic breast cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study E1196. *J Clin Oncol* **18**, 2369-77 (2000).
320. von Minckwitz, G. Docetaxel/anthracycline combinations for breast cancer treatment. *Expert Opin Pharmacother* **8**, 485-95 (2007).
321. Alba, E. et al. Multicenter randomized trial comparing sequential with concomitant administration of doxorubicin and docetaxel as first-line treatment of metastatic breast cancer: a Spanish Breast Cancer Research Group (GEICAM-9903) phase III study. *J Clin Oncol* **22**, 2587-93 (2004).
322. Rosner, M., Siegel, N., Valli, A., Fuchs, C. & Hengstschlager, M. mTOR phosphorylated at S2448 binds to raptor and rictor. *Amino Acids* **38**, 223-8 (2010).
323. Ruvinsky, I. & Meyuhas, O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci* **31**, 342-8 (2006).
324. Harada, H., Andersen, J.S., Mann, M., Terada, N. & Korsmeyer, S.J. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9666-70 (2001).
325. Welt, C., Sidis, Y., Keutmann, H. & Schneyer, A. Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**, 724-52 (2002).
326. Razanajaona, D. et al. Silencing of FLRG, an antagonist of activin, inhibits human breast tumor cell growth. *Cancer Res* **67**, 7223-9 (2007).
327. Couto, H.L. et al. Follistatin Expression in Human Invasive Breast Tumors: Pathologic and Clinical Associations. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* (2016).
328. Bloise, E. et al. Differential expression of follistatin and FLRG in human breast proliferative disorders. *BMC Cancer* **9**, 320 (2009).
329. Ho-Yen, C.M., Jones, J.L. & Kermorgant, S. The clinical and functional significance of c-Met in breast cancer: a review. *Breast Cancer Res* **17**, 52 (2015).
330. Yamashita, J. et al. Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. *Cancer Res* **54**, 1630-3 (1994).
331. Bulavin, D.V. et al. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat Genet* **36**, 343-50 (2004).
332. Pereira, L., Igea, A., Canovas, B., Dolado, I. & Nebreda, A.R. Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK. *EMBO Mol Med* **5**, 1759-74 (2013).
333. Brown, I. et al. Reduced expression of p27 is a novel mechanism of docetaxel resistance in breast cancer cells. *Breast Cancer Res* **6**, R601-7 (2004).
334. Esteva, F.J. et al. Prognostic significance of phosphorylated P38 mitogen-activated protein kinase and HER-2 expression in lymph node-positive breast carcinoma. *Cancer* **100**, 499-506 (2004).
335. Rose, D.P., Gilhooly, E.M. & Nixon, D.W. Adverse effects of obesity on breast cancer prognosis, and the biological actions of leptin (review). *Int J Oncol* **21**, 1285-92 (2002).
336. Niu, J. et al. The Association between Leptin Level and Breast Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One* **8**, e67349 (2013).

337. Ishikawa, M., Kitayama, J. & Nagawa, H. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 4325-31 (2004).
338. Kim, H.S. Leptin and leptin receptor expression in breast cancer. *Cancer Res Treat* **41**, 155-63 (2009).
339. Rene Gonzalez, R. et al. Leptin-signaling inhibition results in efficient anti-tumor activity in estrogen receptor positive or negative breast cancer. *Breast Cancer Res* **11**, R36 (2009).
340. Huang, Q. et al. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med* **17**, 860-6 (2011).
341. Wells, A., Kassis, J., Solava, J., Turner, T. & Lauffenburger, D.A. Growth factor-induced cell motility in tumor invasion. *Acta Oncol* **41**, 124-30 (2002).
342. Wang, S.J., Saadi, W., Lin, F., Minh-Canh Nguyen, C. & Li Jeon, N. Differential effects of EGF gradient profiles on MDA-MB-231 breast cancer cell chemotaxis. *Exp Cell Res* **300**, 180-9 (2004).
343. Wyckoff, J.B., Segall, J.E. & Condeelis, J.S. The collection of the motile population of cells from a living tumor. *Cancer Res* **60**, 5401-4 (2000).
344. Ying, L. et al. Cancer Associated Fibroblast-Derived Hepatocyte Growth Factor Inhibits the Paclitaxel-Induced Apoptosis of Lung Cancer A549 Cells by Up-Regulating the PI3K/Akt and GRP78 Signaling on a Microfluidic Platform. *PLoS One* **10**, e0129593 (2015).
345. Asakawa, H. et al. Prediction of breast cancer sensitivity to neoadjuvant chemotherapy based on status of DNA damage repair proteins. *Breast Cancer Res* **12**, R17 (2010).
346. Nagelkerke, A. et al. Poor prognosis of constitutive gamma-H2AX expressing triple-negative breast cancers is associated with telomere length. *Biomark Med* **9**, 383-90 (2015).
347. Nagelkerke, A. et al. Constitutive expression of gamma-H2AX has prognostic relevance in triple negative breast cancer. *Radiother Oncol* **101**, 39-45 (2011).
348. Fan, M. & Chambers, T.C. Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. *Drug Resist Updat* **4**, 253-67 (2001).
349. Roberts, P.J. & Der, C.J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**, 3291-310 (2007).
350. Cheung, E.C. & Slack, R.S. Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis. *Sci STKE* **2004**, PE45 (2004).
351. Tang, D. et al. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem* **277**, 12710-7 (2002).
352. Kim, J. & Freeman, M.R. JNK/SAPK mediates doxorubicin-induced differentiation and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **79**, 321-8 (2003).
353. Brantley-Finley, C. et al. The JNK, ERK and p53 pathways play distinct roles in apoptosis mediated by the antitumor agents vinblastine, doxorubicin, and etoposide. *Biochem Pharmacol* **66**, 459-69 (2003).
354. Steven, A. & Seliger, B. Control of CREB expression in tumors: from molecular mechanisms and signal transduction pathways to therapeutic target. *Oncotarget* **7**, 35454-65 (2016).
355. Xiao, X., Li, B.X., Mitton, B., Ikeda, A. & Sakamoto, K.M. Targeting CREB for cancer therapy: friend or foe. *Curr Cancer Drug Targets* **10**, 384-91 (2010).
356. Chhabra, A., Fernando, H., Watkins, G., Mansel, R.E. & Jiang, W.G. Expression of transcription factor CREB1 in human breast cancer and its correlation with prognosis. *Oncol Rep* **18**, 953-8 (2007).

357. Timoshenko, A.V., Chakraborty, C., Wagner, G.F. & Lala, P.K. COX-2-mediated stimulation of the lymphangiogenic factor VEGF-C in human breast cancer. *Br J Cancer* **94**, 1154-63 (2006).
358. Wagner, E.F. & Nebreda, A.R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* **9**, 537-49 (2009).
359. Wang, Z. et al. TAK1 inhibitor NG25 enhances doxorubicin-mediated apoptosis in breast cancer cells. *Sci Rep* **6**, 32737 (2016).
360. Ho, K.K. et al. Phosphorylation of FOXO3a on Ser-7 by p38 promotes its nuclear localization in response to doxorubicin. *J Biol Chem* **287**, 1545-55 (2012).
361. Cekanova, M. et al. BCL-2 family protein, BAD is down-regulated in breast cancer and inhibits cell invasion. *Exp Cell Res* **331**, 1-10 (2015).
362. Al-Bazz, Y.O., Underwood, J.C., Brown, B.L. & Dobson, P.R. Prognostic significance of Akt, phospho-Akt and BAD expression in primary breast cancer. *Eur J Cancer* **45**, 694-704 (2009).
363. Cannings, E. et al. Bad expression predicts outcome in patients treated with tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* **102**, 173-9 (2007).
364. Diaz, N. et al. Activation of stat3 in primary tumors from high-risk breast cancer patients is associated with elevated levels of activated SRC and survivin expression. *Clin Cancer Res* **12**, 20-8 (2006).
365. Garcia, R. et al. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* **20**, 2499-513 (2001).
366. Sellier, H., Rebillard, A., Guette, C., Barre, B. & Coqueret, O. How should we define STAT3 as an oncogene and as a potential target for therapy? *JAKSTAT* **2**, e24716 (2013).
367. Ganapathi, R.N. & Ganapathi, M.K. Mechanisms regulating resistance to inhibitors of topoisomerase II. *Front Pharmacol* **4**, 89 (2013).
368. Choi, J.S., Piao, Y.J. & Kang, K.W. Effects of quercetin on the bioavailability of doxorubicin in rats: role of CYP3A4 and P-gp inhibition by quercetin. *Arch Pharm Res* **34**, 607-13 (2011).
369. Lal, S. et al. CBR1 and CBR3 pharmacogenetics and their influence on doxorubicin disposition in Asian breast cancer patients. *Cancer Sci* **99**, 2045-54 (2008).
370. Durmus, S. et al. In vivo disposition of doxorubicin is affected by mouse Oatp1a/1b and human OATP1A/1B transporters. *Int J Cancer* **135**, 1700-10 (2014).
371. Lee, H.H., Leake, B.F., Kim, R.B. & Ho, R.H. Contribution of Organic Anion-Transporting Polypeptides 1A/1B to Doxorubicin Uptake and Clearance. *Mol Pharmacol* **91**, 14-24 (2017).
372. Thorn, C.F. et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* **21**, 440-6 (2011).

