



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA – CSIC

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DEL EMBARAZO Y DEL
USO DE ANÁLOGOS DE LA SOMATOSTATINA FRENTE AL
CÁNCER DE MAMA**

ROBERTO CORCHADO COBOS

Salamanca, 2022

D. JESÚS PÉREZ LOSADA, Investigador Científico del Consejo superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado: **“ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DEL EMBARAZO Y DEL USO DE ANÁLOGOS DE LA SOMATOSTATINA FRENTE AL CÁNCER DE MAMA”**, que presenta el doctorando **D. Roberto Corchado Cobos**, 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, expide y firma la presente certificación en Salamanca a 3 de mayo de 2022.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized initial 'J' followed by a horizontal line and a small flourish.

Fdo: Dr. D. Jesús Pérez Losada

La investigación de este proyecto ha estado financiada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO) (SAF2014-56989-R, SAF2017-88854-R), el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) (PID2020-118527RB-I00, PDC2021-121735-I00)

Durante el transcurso de esta tesis, 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/1100/2017)

Artículos científicos publicados en el transcurso de esta tesis doctoral.

- Chang H, Yang X, Moore J, Liu XP, Jen KY, Snijders AM, Ma L, Chou W, **Corchado-Cobos R**, García-Sancha N, Mendiburu-Eliçabe M, Pérez-Losada J, Barcellos-Hoff MH, Mao JH. From Mouse to Human: Cellular Morphometric Subtype Learned From Mouse Mammary Tumors Provides Prognostic Value in Human Breast Cancer. *Front Oncol.* 2022 Feb 11;11:819565. doi: 10.3389/fonc.2021.819565. PMID: 35242697; PMCID: PMC8886672.
- **Corchado-Cobos R**, García-Sancha N, Mendiburu-Eliçabe M, Gómez-Vecino A, Jiménez-Navas A, Pérez-Baena MJ, Holgado-Madruga M, Mao JH, Cañueto J, Castillo-Lluva S, Pérez-Losada J. Pathophysiological Integration of Metabolic Reprogramming in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2022 Jan 10;14(2):322. doi: 10.3390/cancers14020322. PMID: 35053485; PMCID: PMC8773662.
- Conde-Ferreirós A, Corchete LA, Puebla-Tornero L, **Corchado-Cobos R**, García-Sancha N, Román-Curto C, Cañueto J. Definition of prognostic subgroups in the T3 stage of the eighth edition of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous squamous cell carcinoma: Tentative T3 stage subclassification. *J Am Acad Dermatol.* 2021 Nov;85(5):1168-1177. doi: 10.1016/j.jaad.2020.03.088. Epub 2020 Apr 9. PMID: 32278798.
- García-Sancha N, **Corchado-Cobos R**, Bellido-Hernández L, Román-Curto C, Cardeñoso-Álvarez E, Pérez-Losada J, Orfao A, Cañueto J. Overcoming Resistance to Immunotherapy in Advanced Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2021 Oct 13;13(20):5134. doi: 10.3390/cancers13205134. PMID: 34680282; PMCID: PMC8533861.
- Becerril S, **Corchado-Cobos R**, García-Sancha N, Revelles L, Revilla D, Ugalde T, Román-Curto C, Pérez-Losada J, Cañueto J. Viruses and Skin Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021 May 20;22(10):5399. doi: 10.3390/ijms22105399. PMID: 34065594; PMCID: PMC8161099.
- Puebla-Tornero L, Corchete-Sánchez LA, Conde-Ferreirós A, García-Sancha N, **Corchado-Cobos R**, Román-Curto C, Cañueto J. Performance of Salamanca refinement of the T3-AJCC8 versus the Brigham and Women's Hospital and Tübingen alternative staging systems for high-risk cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2021 Apr;84(4):938-945. doi: 10.1016/j.jaad.2020.12.020. Epub 2021 Jan 9. PMID: 33333151.
- Blanco-Gómez A, Hontecillas-Prieto L, **Corchado-Cobos R**, García-Sancha N, Salvador N, Castellanos-Martín A, Sáez-Freire MDM, Mendiburu-Eliçabe M, Alonso-López D, De Las Rivas J, Lorente M, García-Casas A, Del Carmen S, Abad-Hernández MDM, Cruz-Hernández JJ, Rodríguez-Sánchez CA, Claros-Ampuero J, García-Cenador B, García-Criado J, Orimo A, Gridley T, Pérez-Losada J, Castillo-Lluva S. Stromal SNAI2 Is Required for ERBB2 Breast Cancer Progression. *Cancer Res.* 2020 Dec 1;80(23):5216-5230. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0278. Epub 2020 Oct 6. PMID: 33023950; PMCID: PMC7718390.
- **Corchado-Cobos R**, García-Sancha N, González-Sarmiento R, Pérez-Losada J, Cañueto J. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: From Biology to Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020 Apr 22;21(8):2956. doi: 10.3390/ijms21082956. PMID: 32331425; PMCID: PMC7216042.
- García-Sancha N, **Corchado-Cobos R**, Pérez-Losada J, Cañueto J. MicroRNA Dysregulation in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2019 May 2;20(9):2181. doi: 10.3390/ijms20092181. PMID: 31052530; PMCID: PMC6540078.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera aprovechar esta ocasión para expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que han contribuido, directa o indirectamente, a que este trabajo haya sido posible.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Jesús Pérez Losada, la oportunidad para unirme a su equipo y la confianza depositada todos estos años en mí. También el esfuerzo por brindarme una formación “holística”. Tras siete años formando parte de su equipo, sólo tengo palabras de respeto, agradecimiento y admiración, tanto a nivel científico, como humano. Jesús, gracias por tus consejos y dirección, por inculcarme tus valores, que han hecho de mi no solo un científico, si no una mejor persona. Gracias por tu paciencia a la hora de reconducir mi temperamental *Mamba Mentality*. Como tu bien sabes “buenos, buenos... sois muy pocos”.

Muchas gracias a todos mis compañeros de laboratorio por cada momento compartido con vosotros, a los que me recibieron y me acogieron en mi llegada y a los que fueron viniendo después. A Aurora, por su buena actitud, su predisposición para echar una mano siempre que ha sido necesario, eres un ejemplo de motivación y energía. A Alejandro y Manuel Jesús, por el humor, los buenos ratos y el buen ambiente que impera actualmente en el laboratorio. A Tatiana, por su impetuosas ganas de ayudar, siempre con una sonrisa, y por su hospitalidad *tica*. A Sofía, por su disposición y asesoramiento en aspectos metodológicos aplicados en esta tesis. Al Dr. Blanco-Gómez, por acogerme y ayudarme en mis primeros pasos en el mundo de la ciencia. Adrián, gracias por tu infinita paciencia conmigo, por transmitir todos tus conocimientos de forma tan generosa, eres un referente científico para mí, pero lo más importante, lo eres también como persona, gracias, amigo. A Natalia, no tengo ninguna duda de que este trabajo nunca se hubiese realizado si no es por ti. Más allá de lo que me has aportado científicamente, que no ha sido poco, quiero agradecerte todo lo que has hecho todos estos años por mí. Te has convertido en una de las personas más importantes en mi vida, me has hecho madurar y crecer como persona, has hecho de mis problemas los tuyos, haciendo fácil lo difícil. Sabes que soy escéptico con estas cosas, pero no dudo si te digo que mi padre, desde donde esté, te puso en mi vida para protegerme. Quiero que sepas que tienes en mi un apoyo, una persona que tirará de ti cuando no puedas más, que te levantará cuando te caigas, las veces que haga falta.

Al Dr. Javier Cañueto, gracias por contar con nosotros para ayudarte en tus trabajos siempre fructíferos, por mostrarnos el fascinante mundo del carcinoma *epidermioide*,

me has enseñado la investigación desde un punto de vista clínico. Gracias, sobre todo, por tu profesionalidad, por ser un ejemplo de trabajo duro y por el asesoramiento dermatológico idóneo en todo momento.

Al Dr. Isidro Sánchez, por sus consejos y asesoramiento en el comienzo de este trabajo de tesis doctoral. Así como a los integrantes de su laboratorio, siempre dispuestos a ayudar.

Al Dr. Manuel Sánchez Martín y al Dr. Juan Luis García Hernández por su asesoramiento y colaboración, y también por esos momentos no tan científicos que hacen los días más distendidos en el laboratorio.

Al Dr. Luis Corchete, por su ayuda en la interpretación de los datos bioinformáticos, agradezco mucho tu implicación, rapidez y conocimiento aportado en este trabajo.

Al Servicio de Patología Molecular Comparada del Centro de Investigación del Cáncer. A la Dra. Carmen García-Macías, muchísimas gracias Mamen por acogerme en tu servicio, gracias por animarme a despertar la curiosidad científica en mí. También, por implicarte tanto en todas las investigaciones que hemos llevado a cabo en el Laboratorio. A Susana, Jairo y Telmo, por tener tanta paciencia con aquel chiquillo de prácticas, por depositar en mí vuestra confianza, y por todas esas horas de conversación enfrente del ARIOL, que hicieron de aquel comienzo un precioso recuerdo en mi cabeza.

Al Servicio de Microscopía y Citometría del Centro de Investigación del Cáncer, especialmente a Ana y Sara, por su incondicional ayuda a la hora de tratar las muestras, haciendo siempre un trabajo excelente.

A Elena Alonso del Hospital Universitario de Salamanca, tu dedicación y preocupación para que todo salga bien, te hacen una profesional impecable, pero me gustaría resaltar la buena persona que eres. Gracias por todas esas tardes en el hospital, no te imaginas el cariño que le tengo a esos momentos.

A Isabel y Marina, por el gran trabajo que realizan en el animalario. Sin vosotras no sería posible manejar con tanta exactitud, tal cantidad de ratones.

También quiero mostrar mi agradecimiento al personal de los Servicios del Centro de Investigación del Cáncer, que muchas veces son invisibles, pero que sin su trabajo nada de esto sería posible.

A las chicas del 6, Clara y María, muchas gracias por vuestros consejos y ayuda en cultivos, es impresionante veros trabajar en una campana. Agradecerlos también todas

esas horas de desahogo tan imprescindibles. Sólo deseo que dentro de unos años nos acordemos de esta etapa y nos riámos a carcajadas.

A mis biólogos, ese reducto de personas únicas y maravillosas. Todos y cada uno de vosotros me ha aportado multitud de momentos, de risas, de anécdotas y batallitas irrepetibles, gracias por todas y cada una de ellas, las que pasaron y las que están por venir. A Óscar, gracias por compartir estos últimos años de tesis, donde las fuerzas ya flaquean y donde tu presencia con la del resto de *papeleros* me ha dado momentos muy felices. A Alejandro, mi *Splash Brother*, eres un referente, un hermano mayor, un confidente, una de las personas por las cuales hoy, estoy donde estoy. Sólo tengo palabras de admiración hacia ti, gracias por aportarme tanto sin tú ni si quiera saberlo.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia. A mis abuelos Santos y Tere, por cuidar de su *tesorito*, por desvivirse y hacer que nada fuese un problema durante mi infancia. A mis tíos Inma, Eme y Manolo, por ser un apoyo fundamental en los momentos más duros de mi vida, siempre os habéis preocupado para que no me faltase nada, me habéis enseñado que el éxito es fruto del trabajo duro. A mi madre, por luchar y sacrificarse día tras día, dándome todo lo que está en su mano, para que yo pueda a cumplir mis aspiraciones. Gracias por enseñarme a afrontar con entereza los problemas, por animarme a perseguir mis sueños hasta hacerlos realidad. A mi padre, por ser la fuerza para levantarme todas las mañanas, el reflejo donde mirarme, mi modelo a seguir. Gracias por ser el padre que fuiste, una persona atenta, cuidadosa y paciente, el mejor mentor que pude tener. Tú me enseñaste a agarrar la vida con fuerza, a lidiar con las circunstancias más difíciles, me enseñaste a ser quien soy. Te echo mucho de menos y sólo espero que allá donde estés, te sientas orgulloso de tu hijo.

A mi padre, Santos Corchado

INTRODUCCIÓN	1
1. Epidemiología del cáncer de mama.....	3
2. Clasificación del cáncer de mama.....	4
2.1. Clasificación histológica	5
2.2. Clasificación TNM	5
2.3. Clasificación molecular.....	6
3. Factores de riesgo en cáncer de mama	7
3.1. Factores genéticos	7
3.2. Factores no genéticos o ambientales	11
3.2.1. Edad	11
3.2.2. Factores reproductivos	11
3.2.2.1. Edad de la menarquia y de la menopausia.....	11
3.2.2.2. Edad del primer embarazo	12
3.2.3. Consumo de hormonas exógenas.....	13
3.2.4. Estilo de vida.....	13
3.2.4.1. Sobrepeso y obesidad.....	13
3.2.4.2. Consumo de alcohol.....	14
3.2.4.3. Actividad física.....	14
3.2.5. Antecedentes familiares y personales	15
4. Embarazo y cáncer de mama	16
4.1. Composición de la glándula mamaria.....	16
4.2. Desarrollo de la glándula mamaria	17
4.3. Efecto protector del embarazo frente al cáncer de mama.....	18
5. Implicación del eje GH/IGF-1 en el desarrollo de la glándula mamaria y en el cáncer de mama.....	20
5.1. Regulación de la secreción de GH e IGF-1	20
5.2. Mecanismos de acción de GH, IGF-1 y SST	22
5.2.1. Vías de señalización activadas por la GH.....	22
5.2.2. Vías de señalización activadas por el IGF-1	23
5.2.3. Vías de señalización activadas por la somatostatina	24
5.3. Funciones del eje GH/IGF-1	26
5.3.1. Papel del eje GH/IGF-1 en el desarrollo y homeostasis de los tejidos.....	26
5.3.2. Papel del eje GH/IGF-1 en el desarrollo de la glándula mamaria	26
5.4. Implicación de la vía GH/IGF-1 y la somatostatina en el cáncer de mama	27
5.4.1. Importancia de GH e IGF-1 en cáncer de mama	27
5.4.2. Importancia de la somatostatina en el cáncer de mama.....	29

5.5. Uso de análogos de la somatostatina en la clínica	30
5.5.1. Descripción de los principales análogos de la somatostatina	30
5.5.2. Uso de los análogos de la somatostatina frente al cáncer de mama.....	32
6. Prevención del cáncer de mama.....	33
6.1. Cirugía preventiva	33
6.2. Quimioprevención	33
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... (suprimido)	
MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
1. Modelo experimental in vivo	45
1.1. Cepas de ratón.....	45
1.1.1. Modelo <i>K14-Cre; Brca1^{fl/fl} P53^{fl/fl}</i>	45
1.1.2. Modelo FVB/N – Tg(MMTV-Neu)202Mul/J	45
1.1.3. Modelo RFP; <i>K14-Cre; Brca1^{fl/fl} P53^{fl/fl}</i>	46
1.2. Grupos de estudio	47
1.3. Preparación y administración del fármaco	49
1.4. Evaluación de la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama	50
2. Obtención y procesamiento de tejidos	51
2.1. Necropsia y extracción de tejidos	51
2.2. Procesamiento de los tejidos.....	52
2.3. Tinción con hematoxilina – eosina.....	54
3. Protocolos generales de los estudios in vivo.....	55
3.1. Extracción de DNA de tejidos	55
3.2. Extracción de RNA de tejidos	55
3.3. Cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos	56
4. Protocolos específicos de los estudios in vivo	57
4.1. Genotipado de los ratones	57
4.1.1. Detección de los alelos recombinados de <i>Brca1</i> y <i>P53</i> , de la presencia del transgén citoqueratina 14-Cre y de la RFP mediante PCR	57
4.1.2. Detección del transgén <i>MMTV-ErbB2/Neu</i> mediante PCR	59
4.2. Obtención de organoides derivados de mamas de ratón.....	60
4.3. Disociación de las mamas y evaluación de las subpoblaciones epiteliales de la glándula mamaria mediante citometría de flujo	60
4.4. Detección mediante inmunohistoquímica de la expresión de Ki67 en mamas de ratón.....	62
4.5. Detección mediante inmunohistoquímica de la expresión de caspasa-3 en mamas de ratón	63

4.6. Cuantificación del área epitelial ductal en las mamas de ratón.....	64
4.7. Cuantificación de la proliferación del componente epitelial ductal	64
4.8. Cuantificación de P53 recombinado mediante PCR cuantitativa	65
4.9. Cuantificación de la expresión de los receptores de la somatostatina mediante PCR cuantitativa	67
4.10. Cuantificación de las metástasis pulmonares mediante lupa binocular.....	69
4.11. Construcción de librerías para la secuenciación de RNA mensajero	70
5. Modelo experimental in vitro.....	70
5.1. Líneas celulares	70
5.1.1. Línea celular HC11.....	70
5.1.2. Línea celular MCF10A	71
5.1.3. Línea celular HCC1937	71
5.1.4. Línea celular AU565.....	72
5.2. Condiciones de cultivo, mantenimiento y preservación de las células	72
5.3. Preparación del fármaco utilizado en líneas celulares	73
6. Protocolos generales de los estudios in vitro	73
6.1. Cuantificación de células en cámara de Neubauer	73
6.2. Extracción de RNA de líneas celulares.....	74
6.3. Extracción de proteínas de líneas celulares	75
6.4. Cuantificación de la concentración de proteínas.....	76
7. Protocolos específicos para los estudios in vitro	77
7.1. Estudio de la viabilidad celular mediante MTT	77
7.2. Evaluación de la muerte celular mediante anexina V / yoduro de propidio	78
7.3. Análisis de la proliferación celular mediante BrdU	79
7.4. Análisis del ciclo celular con yoduro de propidio.....	80
7.5. Western blot	81
7.6. PCR cuantitativa de la expresión de los receptores de la somatostatina	82
8. Análisis de los datos	83
8.1. Análisis de la distribución de las variables.....	83
8.2. Análisis univariante y bivariante de las asociaciones entre las variables	84
8.3. Análisis estadístico de RNAseq.....	84
RESULTADOS.....(suprimido)	
DISCUSIÓN.....(suprimido)	
CONCLUSIONES.....(suprimido)	

Indice

BIBLIOGRAFÍA.....	207
ANEXOS.....	(suprimido)

INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es el tumor más frecuente. Según los datos de la *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, en 2020 se diagnosticaron 2.3 millones de casos nuevos de cáncer de mama en todo el mundo, superando así al cáncer de pulmón como el tumor más diagnosticado. Supuso más de 680.000 muertes, siendo el quinto tipo de cáncer con mayor mortalidad, por detrás del cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de estómago y cáncer de hígado. En mujeres, el cáncer de mama es el tumor más frecuente y es la principal causa de muerte por cáncer¹.

Según datos recogidos por el programa de *Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER)* del *National Cancer Institute (NCI)* de Estados Unidos, aproximadamente, una de cada ocho mujeres tiene riesgo de desarrollar cáncer de mama a lo largo de su vida². Alrededor del 80% de todos los cánceres de mama surgen en mujeres mayores de 50 años; y la probabilidad a 10 años de desarrollar cáncer de mama invasivo aumenta de un 2% a los 40 años, a alrededor del 3% a los 50-60 años y hasta el 7% a partir los 70 años, produciendo un riesgo acumulado de por vida del 12.9%². Las ratios de incidencia son un 88% más altas en los países desarrollados que en los países en vías de desarrollo; sin embargo, mujeres que viven en países en crecimiento tienen tasas de mortalidad un 17% más altas en comparación con las mujeres que viven en países con mayor índice de desarrollo económico¹. Las elevadas tasas de incidencia en los países desarrollados reflejan una mayor prevalencia de factores de riesgo asociados al cáncer de mama. Entre esos factores está un mayor envejecimiento de la población, factores reproductivos y hormonales (menarquia temprana, menopausia tardía, primer embarazo tardío, menor número de hijos, consumo de terapia hormonal en la menopausia y uso de anticonceptivos orales) y factores de riesgo relacionados con el estilo de vida (ingesta de alcohol, obesidad, sobrepeso y sedentarismo), pero también existe mayor detección mediante mamografías organizadas en programas de prevención³. Además, una prevalencia excepcionalmente elevada de mutaciones en genes de alta penetrancia, como *BRCA1* y *BRCA2*, entre mujeres de ascendencia judía Ashkenazi, explica en parte la alta incidencia en Israel y ciertas subpoblaciones europeas⁴.

La incidencia y la mortalidad por cáncer de mama han aumentado en las tres últimas décadas, aunque las tendencias varían según la región geográfica y el grupo de edad. En los países desarrollados, se produjo un incremento en la incidencia de cáncer de mama durante la década de los 80 y los 90, probablemente, debido al aumento en el consumo de terapia hormonal, al descenso en los ratios de fertilidad y a la

incorporación de programas de detección temprana^{5,6}. A partir de los 2000, ese incremento se ha estabilizado e incluso ha disminuido, coincidiendo con un descenso del uso de terapia hormonal de reemplazo y una estabilización en la participación en los programas de detección precoz^{5,7,8}. Desde 2007, se observa un cambio en la tendencia con un incremento en la incidencia en Estados Unidos del 0.5% anual², e incluso algo mayor en otros países de Europa y Oceanía⁹. Este aumento se observa concretamente en mujeres con tumores positivos para el receptor de estrógenos, lo que se puede deber al incremento en la obesidad que se está produciendo en las últimas décadas y que se relaciona directamente con el desarrollo de tumores de mama positivos para ese receptor¹⁰. Por el contrario, en los países en vías de desarrollo, se está produciendo un incremento muy rápido en la incidencia de cáncer de mama, debido a la occidentalización de los estilos de vida (embarazos más tardíos, falta de actividad física y dieta deficiente), mejor registro de los casos de cáncer y mejores métodos de detección¹¹. En cuanto a la mortalidad por cáncer de mama, en los países desarrollados se ha producido un descenso en las últimas tres décadas, gracias a los avances efectivos en la detección temprana y en el tratamiento del cáncer¹². Sin embargo, en los países subdesarrollados y en vías de desarrollo, se está produciendo un incremento de la mortalidad por cáncer de mama, debido a una detección del cáncer más tardía y la imposibilidad de aplicar terapias eficaces¹³. Con todo ello, las proyecciones actuales indican que para el año 2050, el número mundial de casos nuevos de cáncer de mama alcanzará los 3.2 millones anuales, y el número de muertes llegará al millón de mujeres¹⁴, lo que supondrá un gran problema de salud pública.

Todos estos datos ponen de manifiesto la necesidad de seguir trabajando para reducir la incidencia de la enfermedad. Por ello, es fundamental conocer los mecanismos implicados en la susceptibilidad y el desarrollo del cáncer de mama para explorar nuevas estrategias de prevención.

2. Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, con características histológicas y moleculares variables, y con diferente comportamiento clínico y de respuesta al tratamiento. La clasificación del cáncer, en general, tiene como objetivo proporcionar un diagnóstico preciso de la enfermedad y predecir el comportamiento del tumor para facilitar la toma de decisiones en cuanto al manejo de la enfermedad. En el caso del

cáncer de mama, podemos diferenciar entre una clasificación histológica, TNM y molecular.

2.1. Clasificación histológica

La mayoría de los tumores de mama son adenocarcinomas que surgen de células epiteliales. Estos se pueden dividir en carcinomas *in situ*, que se limitan al componente epitelial de la mama, sin romper la membrana basal, o carcinomas invasivos o infiltrativos, que han invadido el estroma adyacente. Los carcinomas invasivos se pueden subdividir según su patrón de crecimiento y el grado de diferenciación o grado histopatológico. Este último se basa en la evaluación de tres características morfológicas: el grado de formación de túbulos o glándulas, el pleomorfismo nuclear y el recuento mitótico. Un tumor bien diferenciado (grado 1), tiene estructuras conservadas en más del 75% del tejido, un grado leve de pleomorfismo nuclear (células con núcleos pequeños y con tamaño parecido a las células epiteliales normales) y bajo recuento mitótico (menos de 7 mitosis contadas en diez campos a un aumento de 0.52 mm). Un tumor moderadamente diferenciado (grado 2), se caracteriza por tener estructuras glandulares o tubulares en un 10-75% del tumor, moderado pleomorfismo (células más grandes que las normales con nucléolos visibles) y moderado número de mitosis (de 8 a 15 mitosis). Un tumor pobremente diferenciado (grado 3), tiene un marcado pleomorfismo celular (células con nucléolos prominentes y muy variables en tamaño y forma), elevado número de mitosis (más de 16 mitosis) y ningún tipo de estructura conservada. El grado de diferenciación del carcinoma de mama es un factor pronóstico importante, siendo el grado 3 el que peor supervivencia presenta¹⁵.

2.2. Clasificación TNM

La estadificación TNM, publicada por el *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, utiliza la información del tamaño del tumor (T), la afectación de los ganglios linfáticos regionales (N) y las metástasis a distancia (M). La estadificación combina estos factores y clasifica la enfermedad en nueve etapas (O, IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC y IV) con diferentes pronósticos y tratamientos¹⁶.

2.3. Clasificación molecular

En el año 2000, Sorlie y Perou identificaron 5 subtipos intrínsecos de cáncer de mama basados en los perfiles de expresión génica: luminal A, luminal B, enriquecido en ERBB2, basal y *normal-like*^{17,18}. Los tumores luminales A se caracterizan por la expresión del receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y las citoqueratinas 8 y 18. Presentan una baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular y bajo grado histológico, siendo los que mejor pronóstico tienen. Los luminales B también expresan el ER, pero tienen un fenotipo más agresivo que los luminales A, mayor grado histológico y peor pronóstico. La principal diferencia entre los dos subtipos de tumores luminales es una mayor expresión en el subtipo luminal B de genes de proliferación, como *MKI67* y *ciclina B1*, y de ciclo celular, como *AURKA*, y también expresan a menudo *EGFR* y *HER2*. Los tumores enriquecidos en ERBB2 tienen expresión elevada del gen del receptor tirosina quinasa *HER2* y otros genes asociados a esa vía, como *GRB7* y *PAGP3*. Son negativos para ER y PR y presentan una alta proporción de mutaciones en *TP53* y *PI3KCA*. Son de alto grado histológico, con mal pronóstico, aunque se pueden beneficiar de la terapia con el anticuerpo monoclonal anti-HER2, trastuzumab, y otros inhibidores específicos de esta vía. El subtipo basal se caracteriza por expresar las citoqueratinas 5 y 17, P-cadherina, caveolinas 1 y 2, nestina y EGFR. No expresan ni ER, ni PR, ni HER2, por lo que también se denominan tumores “triple negativo”. Tienen un alto grado histológico, tienden a ser carcinomas ductales infiltrantes con alto índice mitótico y son muy agresivos. Es el subtipo más frecuente en mujeres con mutación en *BRCA1* y están asociados a mutaciones en *TP53*. En cuanto a los tumores *normal-like*, éstos carecen de la expresión de ER, PR y HER2, por lo que son “triple negativo” pero no de tipo basal, porque son negativos para la citoqueratina 5 y EGFR. Además, después se ha identificado el subtipo *claudin-low*, caracterizado por una baja expresión de genes implicados en las uniones célula-célula, incluidos las Claudina 3, 4 y 7, ocludina y E-cadherina^{19,20}.

En los últimos años, también se han desarrollado paneles de expresión multigénicos comerciales para la clasificación de los tumores y para predecir el riesgo de recurrencia o el pronóstico de la enfermedad (*MammaTyper*, *Oncotype*, *Mammaprint*, *Genomic Grade Index*, *Prosigna* o *PAM50*, *EndoPredict*, *Breast Cancer Index*), basados en el análisis de la expresión de un número limitado de genes^{21,22}. Sin embargo, a pesar de que el análisis de la expresión génica ha demostrado ser una herramienta muy eficaz para clasificar los tumores de mama, estos análisis son costosos y en la práctica clínica no se hacen de manera generalizada. Por ello, en

2011 el panel de consenso de *St. Gallen* propuso cuatro subtipos basados en métodos de tinción inmunohistoquímica e hibridación fluorescente *in situ*. Así, el subtipo luminal A se caracteriza por ser ER y PR positivo, HER2 negativo y con baja expresión de Ki67 (<14%); el subtipo luminal B, por ser ER y/o PR positivo, HER2 negativo o positivo y Ki67 alto; HER2 enriquecido por ser ER y PR negativo y HER2 positivo; y, el triple negativo por ser ER, PR y HER2 negativos²³.

Actualmente, en la clínica se utilizan todos los datos histológicos y moleculares para el diagnóstico del cáncer de mama. Así, la última edición de la AJCC (AJCC8) ha incorporado al TNM, el grado histológico, el estado de los receptores hormonales y HER2, y el panel multigénico Oncotype DX para definir el pronóstico y determinar el tratamiento¹⁶. De momento, el análisis de la expresión de Ki67 no ha sido incorporado de forma sistemática debido a cierta variabilidad entre observadores que necesita ser resuelta²⁴.

3. Factores de riesgo en cáncer de mama

Existe un número significativo de factores de riesgo de cáncer de mama, que se pueden agrupar en factores genéticos y no genéticos o ambientales.

3.1. Factores genéticos

El cáncer de mama hereditario se debe a la herencia de genes con variantes mutadas, que tienen un fuerte efecto sobre el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Alrededor del 5 al 10% de los cánceres de mama están relacionados con mutaciones genéticas heredadas de uno de los dos progenitores. La alta incidencia de cáncer de mama en ciertas familias se describió por primera vez en 1866²⁵; sin embargo, los genes de susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama más comunes (*BRCA1* y *BRCA2*), no fueron descubiertos hasta mediados de los años 1990^{26,27}. Mutaciones en la línea germinal de estos genes se asocian con un riesgo del desarrollo de cáncer de mama a lo largo de la vida de entre el 27-87%, así como un mayor riesgo de padecer cáncer de ovario²⁸. Además de estos dos genes, en las últimas décadas se han descrito otros de alta y moderada penetrancia, relacionados con ciertos síndromes hereditarios que aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama. También se han identificado numerosos polimorfismos de un único nucleótido (SNP) que, de forma individual, confieren un incremento bajo del riesgo de desarrollar cáncer de mama^{29,30}. Se estima que los genes de predisposición conocidos no representan más del 30% de los casos

Introducción

de cáncer de mama con historia familiar de cáncer hereditario, y que más del 50% de la predisposición genética al cáncer de mama hereditario permanece sin explicación³¹.

- *BRCA1*

El gen de susceptibilidad al cáncer de mama *BRCA1* está situado en el brazo largo del cromosoma 17 en la posición 21 (17q21). Posee 24 exones y en su exón más largo, el 11, donde se localizan las mutaciones más frecuentes. Codifica una proteína de 1863 aminoácidos en humanos y 1812 en ratón^{26,32}. También codifica al menos dos proteínas de menor tamaño debido al *splicing* alternativo^{33,34}.

La proteína *BRCA1* se compone de un dominio RING en el extremo aminoterminal con actividad E3 ubiquitín ligasa; un dominio NLS, responsable de la localización nuclear de la proteína; un dominio coiled-coil por el que se une a la proteína *PALB2*; un dominio rico en residuos de serina-glutamina entre los aminoácidos 1280-1524; y, finalmente, dos dominios BRCT en el extremo carboxiterminal, responsables de la unión de *BRCA1* a proteínas fosforiladas. Por estos dominios *BRCA1* interactúa, directa o indirectamente, con numerosas moléculas, incluidas proteínas con actividad supresora tumoral, oncoproteínas, proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular, activadores y represores de la transcripción génica, y reguladores de la respuesta al daño al DNA y de la apoptosis^{35,36}. La pérdida de la función de *BRCA1* da como resultado defectos en todas esas vías celulares, provocando inestabilidad genómica e, indirectamente, produciendo el desarrollo de cáncer³⁷.

Se han identificado más de 1600 mutaciones en *BRCA1*, algunas patogénicas y otras con significado desconocido. Las mujeres con una mutación en *BRCA1* tienen un riesgo de desarrollar cáncer de mama a lo largo de su vida del 46% al 87%, y de desarrollar cáncer de ovario entre el 16 y 68%^{28,38-40}.

- *BRCA2*

El gen *BRCA2* está ubicado en el brazo largo del cromosoma 13 (13q12.3) y contiene 27 exones que codifican una proteína de 3418 aminoácidos²⁷.

La proteína *BRCA2* contiene un dominio aminoterminal de unión a *PALB2*; un dominio de unión al DNA monocatenario y bicatenario; un dominio NLS, responsable de la localización nuclear de la proteína; y un dominio carboxiterminal, que contiene un sitio de fosforilación por el que se une a *RAD51*⁴¹. 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 *BRCA2* confiere riesgo de desarrollar cáncer de mama, tanto en mujeres como en hombres. Para las mujeres, el riesgo de desarrollar cáncer de mama a lo largo de su vida es de entre el 27% y el 84%, y del 11% al 30% de desarrollar cáncer de ovario. En los hombres, el riesgo de desarrollar cáncer de mama es del 6%.

En promedio, una mujer con una mutación en *BRCA1* o *BRCA2* tiene, aproximadamente, un 70% de probabilidad de desarrollar cáncer de mama a los 80 años (riesgo acumulado)²⁸. Existe una variación en la distribución de las mutaciones en *BRCA1/2*. En ciertos países y comunidades étnicas, el espectro de mutaciones se limita a unas pocas mutaciones fundadoras. Por ejemplo, en la población judía Ashkenazi existe una mayor incidencia de mutaciones hereditarias en *BRCA1/2*: las mutaciones *BRCA1* c.68_69delAG, c.5266dupC y *BRCA2* c.5946delT representan el 98-99% de las mutaciones en estos genes⁴. En España, cinco mutaciones en el gen *BRCA1* (c.68_69delAG, c.211A>G (BIC: 330A>G), c.5117G>A (BIC: 5236G>A), c.5123C>A (BIC: 5242C>A), c.470_471delCT (BIC: 589_590delCT)) representan el 46.6% de las mutaciones en este gen, y cuatro mutaciones en *BRCA2* (c.2808_2811del4 (BIC: 3036_3039del4), c.6629_6630delAA (BIC: c.6857delAA), c.9026_9030del5 (BIC: 9254-9258del5), c.9310_9311delAA (BIC: 9538delAA)) representan el 56.6%⁴². Conocer el espectro de las mutaciones y su distribución geográfica, puede hacer más efectiva la estrategia de detección y prevención del cáncer de mama y ovario⁴³.

Sin embargo, las mutaciones y reordenamientos o deleciones en *BRCA1* y *BRCA2* solo explican el 15% de los cánceres de mama familiares. Este alto riesgo se incrementa o disminuye según la historia familiar de cáncer de mama, la localización de la mutación y otros factores, tanto genéticos como no genéticos.

- *TP53*

Es un gen supresor cuya mutación produce el síndrome de Li-Fraumeni, que se caracteriza por una predisposición genética a un amplio número de tumores, incluyendo sarcomas, tumores cerebrales, leucemias y otros tipos de cáncer a edad temprana⁴⁴. Las mujeres portadoras de la mutación en *TP53* tienen un riesgo de hasta el 90% de desarrollar cáncer de mama a lo largo de su vida. El cáncer de mama en estas pacientes se presenta de forma precoz, con una mediana de edad en el momento del diagnóstico de menos de 35 años⁴⁵. Tienden a ser positivos para el

Introducción

receptor HER2, y el 84% son también positivos para el receptor de estrógenos y/o progesterona^{46,47}.

- *PTEN*

La mutación del gen *PTEN* en la línea germinal produce el síndrome de Cowden, caracterizado por el desarrollo de tumores benignos, conocidos como hamartomas, en múltiples órganos. Este síndrome confiere una susceptibilidad genética al desarrollo de cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, melanoma y tumores benignos. Las mujeres con una mutación en este gen tienen un riesgo estimado del 85% de desarrollar cáncer de mama a lo largo de su vida⁴⁸⁻⁵⁰.

- *STK11/LKB1*

Las mutaciones en este gen supresor tumoral están relacionadas con el síndrome Peutz-Jeghers, caracterizado por el desarrollo de hamartomas gastrointestinales y pigmentaciones mucocutáneas. Se asocia con un alto riesgo de desarrollar diferentes tipos de cáncer, principalmente colorrectal, pero también de páncreas, estómago, intestino delgado y de mama, entre otros⁵¹⁻⁵³.

- *CDH1*

CDH1 codifica la proteína E-cadherina. La mutación en la línea germinal de este gen es responsable del desarrollo de cáncer gástrico hereditario difuso y de cáncer de mama lobulillar. Las mujeres portadoras de una mutación en este gen tienen un riesgo de cáncer de mama de entre el 39% y el 52%⁵⁴⁻⁵⁶.

Todas estas mutaciones en genes de alta penetrancia se heredan con un patrón de herencia autosómica dominante. Otros genes con penetrancia moderada son *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *BARD1*, *BRIP1*, *MRE11A*, *NBN*, *RAD50*, *RAD51C*, *XRCC2*, *RAD51D* y *ABRAXAS*⁵⁷, que participan en procesos de reparación de daño al DNA y que, en muchos casos, interactúan con *BRCA1* y *BRCA2*, confiriendo un riesgo variable de desarrollo de cáncer de mama. Sin embargo, hay que destacar que sólo una pequeña fracción de los casos hereditarios se explica por mutaciones en los genes descritos. Incluso en casos en los que se hereda una mutación en genes de alta penetrancia,

ésta no es completa, y se encuentra modificada por otros factores, tanto genéticos como ambientales.

Además, mediante estudios de asociación de genoma completo (GWAS, del inglés *Genome-Wide Association Studies*) y estudios de asociación del transcriptoma completo (TWAS, del inglés *Transcriptome-Wide Association Studies*), se han identificado numerosos *loci* y genes de baja penetrancia relacionados con un incremento ligero en el riesgo a desarrollar cáncer de mama esporádico (no hereditario). Por ejemplo, se han identificado SNP en *MAP3K1*, *FGFR2*, *LSP1*, *TNRC19* y *CASP8*, entre otros. Estos SNP, aunque individualmente confieren un riesgo pequeño, su efecto combinado, cuando se resume como una puntuación de riesgo poligénico, puede ser sustancial^{29,30,58-62}.

3.2. Factores no genéticos o ambientales

3.2.1. Edad

La edad avanzada es el factor de riesgo más importante para el desarrollo del cáncer en general, incluido el de mama. La tasa de incidencia de cáncer de mama aumenta significativamente con la edad, duplicándose cada 10 años hasta la menopausia, donde alcanza su punto máximo. Tras la menopausia, la tasa de incidencia se mantiene constante^{63,64}.

3.2.2. Factores reproductivos

3.2.2.1. Edad de la menarquia y de la menopausia

Desde mediados del siglo XIX, la edad media de la menarquia ha disminuído de los 17 a los 12 años⁶⁵⁻⁶⁷. Se ha estimado que el riesgo relativo de desarrollar cáncer de mama aumenta un 5% por cada año que se adelanta la menarquia, tomando como referencia la edad de 13 años⁶⁸. Entre los factores que parece que modifican la edad de menarquia se incluyen factores genéticos y ambientales, como la exposición prenatal al tabaco y a disruptores hormonales (como el bisfenol A), el aumento en el índice de masa corporal (IMC) y el consumo de una dieta rica en proteínas animales⁶⁹⁻⁷². Existe una asociación estadísticamente significativa entre el aumento del IMC y la menarquia a edades tempranas. Se sabe que un mayor IMC entre los 2 y los 9 años se asocia con una menarquia temprana^{73,74}. Además, en un metaanálisis de 32

Introducción

GWAS, se han identificado 30 nuevos *loci* implicados en el metabolismo lípido y el crecimiento celular asociados con el momento de la menarquia⁷².

Una menopausia tardía se asocia con un aumento en el riesgo relativo de padecer cáncer de mama. Este riesgo se estima en un 2.9% por cada año que se retrasa⁶⁸. La edad media de la menopausia ha pasado de, aproximadamente, los 49 años en mujeres nacidas en 1910; a 51.5 en mujeres nacidas únicamente 20 años después; y a 53.7 años en mujeres nacidas durante los años 60⁷⁵⁻⁷⁷. El momento de la menopausia está influenciado por la paridad, el uso de anticonceptivos, el tabaquismo y el nivel socioeconómico⁷⁸, así como por factores genéticos^{79,80}.

En un primer momento, se pensó que el hecho de que una menarquia temprana y una menopausia tardía aumentasen el riesgo de cáncer de mama, debido a un mayor tiempo de exposición a las hormonas ováricas, sobre todo a los estrógenos. Sin embargo, el hecho de que el riesgo sea tan variable, ha hecho pensar que lo importante sería el momento en el que se produce la exposición de la glándula mamaria a los estrógenos. Así, una mama inmadura tendría una mayor capacidad de respuesta a los estrógenos, y cuanto más temprano suceda la señalización estrogénica, antes comenzaría la rápida proliferación de las células de la mama que pueden acumular mutaciones⁸¹.

3.2.2.2. Edad del primer embarazo

En siglo XVIII, Bernardino Ramazzini, fundador de la medicina del trabajo, observó un incremento en el riesgo de cáncer de mama en las monjas, identificando por primera vez una asociación entre la historia reproductiva y el riesgo de esta enfermedad⁸². Tener hijos antes de los 30 años proporciona una protección a largo plazo contra el cáncer de mama, siendo especialmente importante la edad a la que tiene lugar el primer embarazo. Así, aquellas mujeres que cuyo primer embarazo es antes de los 20 años, tienen un 50% menos riesgo de desarrollar cáncer de mama que las mujeres que no tienen ningún embarazo. A medida que aumenta la edad del primer embarazo la protección disminuye y, a partir de los 35 años, hay un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama⁸³. Además, los embarazos posteriores, entre los 20 y los 30 años, aumentan la protección contra el cáncer de mama en, aproximadamente, un 10%⁸⁴. Sin embargo, sobre todo después de los 35 años y en primíparas, aunque no exclusivamente, hay un período de mayor riesgo de cáncer de mama tras el embarazo, asociado al ambiente proinflamatorio que tiene lugar durante el proceso de involución, cuyo pico sería 5 años después del parto⁸⁴⁻⁸⁶.

Los mecanismos por los que se produce este efecto protector del embarazo frente al cáncer de mama no están bien definidos. Se han postulado diferentes hipótesis que se discutirán en profundidad más adelante.

3.2.3. Consumo de hormonas exógenas

El consumo de estrógenos exógenos también se asocia con un aumento del riesgo de desarrollar cáncer de mama. Las principales fuentes de estrógenos exógenos son los anticonceptivos orales (AO) y la terapia de reemplazo hormonal (TRH). Los AO comenzaron a usarse en los años 1960 y ya los primeros, basados en la combinación de estrógenos y progestágenos en dosis más altas que las actuales, se asociaban con un incremento del riesgo relativo de 1.24 durante la toma y en los 10 años posteriores a la suspensión de la medicación⁸⁷. Aunque los AO de nueva generación han mejorado y disminuido los efectos secundarios, en un estudio reciente todavía se ha observado que hay un mayor riesgo de cáncer de mama cuanto mayor es la duración del uso de éstos, y en aquellas mujeres que toman estradiol con levonorgestrel (progestágeno), levonorgestrel solo, o que usan un sistema intrauterino de liberación de levonorgestrel⁸⁸.

En cuanto a la TRH, comúnmente usada en mujeres para reducir los síntomas de la menopausia, sobre todo en la década de los 90, se ha observado un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama en función de los años de duración del tratamiento y de la combinación de hormonas utilizada. Así, el consumo de estrógenos más progestágenos diariamente durante 5 años aumentaría la incidencia de cáncer de mama entre los 50 y los 69 años en, aproximadamente, una de cada 50 mujeres. En el caso de consumir estrógenos pero con preparaciones intermitentes de progestágenos, el aumento sería de una en cada 70, y en el caso de sólo consumir estrógenos, de una de cada 200. Tras 10 años de terapia, los riesgos se duplicarían. Además, su uso predispone a un mayor riesgo de desarrollar tumores de mama ER positivos y lobulillares⁸⁹.

3.2.4. Estilo de vida

3.2.4.1. Sobrepeso y obesidad

Varios estudios muestran una relación evidente entre el aumento del IMC y una mayor incidencia de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas. Sin embargo, esta

Introducción

relación parece invertirse en mujeres premenopáusicas con un IMC alto^{10,90,91}, aunque esto varía según el subtipo de cáncer de mama⁹². Así, en un metaanálisis que recogió los resultados de 9 cohortes y 22 estudios de casos y controles, se observó que las mujeres postmenopáusicas con un peso corporal más alto tuvieron un aumento del riesgo relativo del 82% de desarrollar tumores ER+ PR+. Cada aumento en 5 unidades en el IMC se asoció con un aumento del riesgo del 33% entre las mujeres postmenopáusicas, y en un 10% menos de riesgo entre las mujeres premenopáusicas⁹³. Por el contrario, la obesidad sí que se asoció con un mayor riesgo de tumores ER- y triple negativo en mujeres premenopáusicas^{94,95}. Se han propuesto varios mecanismos para explicar el vínculo entre el aumento del IMC y el riesgo de desarrollar cáncer, incluido el aumento de la conversión de andrógenos en estrógenos en la grasa, la señalización de la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), el estado de inflamación crónica latente debido a citocinas producidas por la grasa y la secreción de adipocinas proangiogénicas⁹².

3.2.4.2. Consumo de alcohol

El consumo excesivo de alcohol aumenta el riesgo de cáncer de mama. Un metaanálisis basado en 53 estudios epidemiológicos mostró que una ingesta de 35-44 gramos de alcohol al día puede aumentar el riesgo de cáncer de mama en un 32%, con un aumento del riesgo relativo del 7.1% por cada 10 gramos adicionales de ingesta diaria de alcohol⁹⁶. Incluso niveles más bajos de consumo de alcohol (5-10 gramos por día), podrían aumentar el riesgo en un 15%⁹⁷. Esto se debe a que el etanol estimula la proliferación celular y aumenta los niveles de estrógenos circulantes. Además, el etanol se oxida a acetaldehído, que puede inducir daño en las cadenas del DNA y producir aberraciones cromosómicas, considerándose mutagénico y cancerígeno⁹⁸.

3.2.4.3. Actividad física

La actividad física, de moderada a intensa, se asocia con una reducción del riesgo relativo de cáncer de mama de aproximadamente un 25%, cuando se comparan mujeres más activas con menos activas^{99,100}. Los mecanismos que pueden explicar esta protección incluyen los efectos de la actividad física sobre el metabolismo de los estrógenos, la sensibilidad a la insulina, y un bajo nivel de marcadores de inflamación

y de estrés oxidativo¹⁰¹. También se han descrito cambios transcripcionales inducidos por la actividad física¹⁰².

3.2.5. Antecedentes familiares y personales

Casi una cuarta parte de todos los casos de cáncer de mama están relacionados con antecedentes familiares (aunque solo un 5-10% serían hereditarios con herencia mendeliana). Un estudio de más de 133.000 mujeres de Reino Unido, demostró que las mujeres con un familiar de primer grado con cáncer de mama tienen un riesgo 1.72 veces mayor de desarrollar esta enfermedad que las mujeres sin familiares afectados. Además, el riesgo se multiplica por 2.5 o más en mujeres con dos o más familiares de primer grado con cáncer de mama¹⁰³.

En cuanto a los antecedentes personales, mujeres que han tenido cáncer de mama tienen más probabilidades de tener un segundo tumor de mama. Además, también aumentan el riesgo algunas enfermedades benignas de la mama. Este riesgo es mayor cuando se presentan hiperplasias atípicas, seguido de lesiones proliferativas sin atipias y lesiones no proliferativas¹⁰⁴.

Todos estos factores de riesgo están representados en la **Figura 1**.

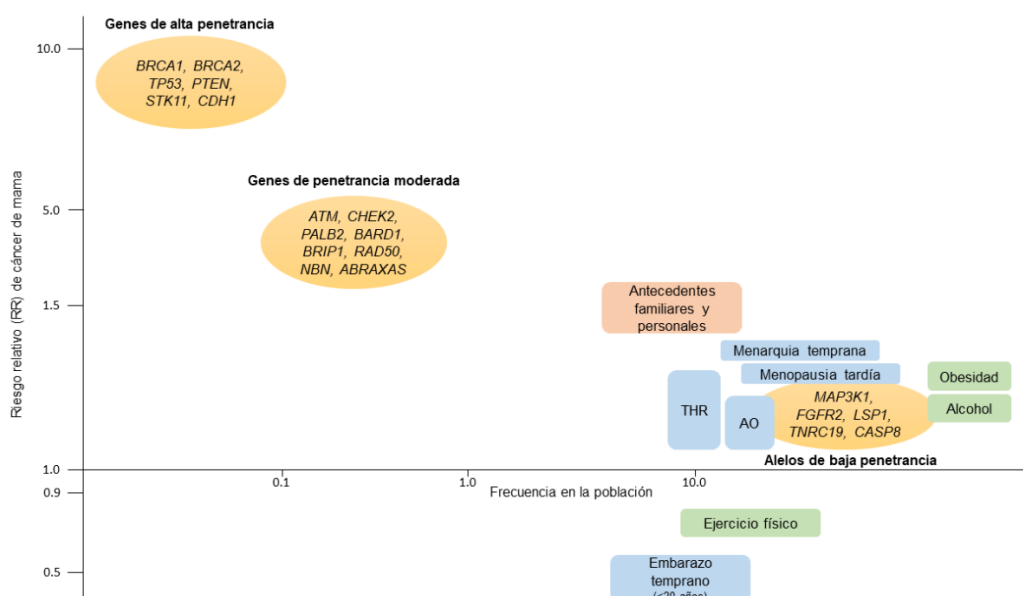


Figura 1. Representación de los factores de riesgo de cáncer de mama y su frecuencia en la población. Se muestra la frecuencia en la población (eje x) de los factores de riesgo del cáncer de mama genéticos y no genéticos y sus asociaciones con el riesgo relativo de cáncer de mama (eje y). En amarillo, los genes de alta, moderada y baja penetrancia que tienen influencia en el desarrollo de cáncer de mama. En verde, los factores ambientales relacionados con el estilo de vida. En azul, los factores relacionados con la historia reproductiva y el consumo de hormonas exógenas. En naranja, los antecedentes familiares y personales. AO,

4. Embarazo y cáncer de mama

4.1. Composición de la glándula mamaria

La glándula mamaria es un órgano complejo, cuya función principal en las hembras de los mamíferos, es producir leche durante la lactancia para la alimentación de las crías. La glándula mamaria está compuesta por varios tipos celulares, incluidas células epiteliales, adipocitos, fibroblastos, células endoteliales e inmunitarias. Las células epiteliales se encuentran formando los ductos y alveolos de la glándula mamaria, y están divididas en dos tipos de compartimentos: el compartimento luminal, formado por la capa interna de células epiteliales localizada hacia la luz del ducto (lumen); y el compartimento basal, que es la capa celular externa que rodea a las células luminales y que se encuentra en contacto con la membrana basal. El compartimento luminal está formado por (i) células alveolares que recubren la luz de los alveolos y son responsables de la producción de leche; (ii) de células ductales, que forman los ductos que salen de los alveolos y que transportan la leche hasta el pezón; y, (iii) progenitores luminales, tanto ductales como alveolares. En el compartimento basal hay (i) células basales mioepiteliales con capacidad contráctil para favorecer la conducción de la leche a través de los ductos, (ii) progenitores mioepiteliales y (iii) células madre de la glándula mamaria (*Mammary Stem Cells – MaSC*). Estas últimas tienen capacidad de autorrenovación, y son las encargadas de permitir el crecimiento del tejido mamario durante la pubertad y en la gestación¹⁰⁶ (**Figura 2**).

Estas poblaciones epiteliales se pueden identificar mediante el reconocimiento de proteínas de superficie con anticuerpos específicos y citometría de flujo. Las poblaciones luminales y basales, se pueden diferenciar según la expresión de la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM) y la integrina $\alpha 6$ (CD49f). Así, las células luminales muestran un fenotipo de expresión de EpCAM alto y CD49f bajo; al contrario que las células basales, que son EpCAM bajo y CD49f alto^{107,108}. El antígeno de células madre 1 (Sca1), permite diferenciar entre células luminales ER+, sensibles a los estrógenos (Sca1 positivas), y células luminales ER- (Sca1 negativas). Las primeras, Sca1+, incluyen las células que forman los ductos, mientras que las segundas, Sca1-, son células alveolares¹⁰⁹. Entre las células Sca1+, el antígeno CD61 diferencia entre células luminales progenitoras (CD61+) y luminales maduras (CD61-)¹¹⁰. Diferentes grupos han intentado clasificar las células epiteliales de la mama

combinando diferentes marcadores de superficie, como c-kit, CD29, CD14, CD49b, con el objetivo de comprender la jerarquía epitelial mamaria y determinar de qué subpoblación celular surgirían los diferentes tipos de tumores^{111,112} (Figura 2). Por ejemplo, en el caso de tumores asociados a mutaciones en *BRCA1*, se ha descrito que surgirían de una población de progenitores luminales aberrantes con capacidad de autorrenovación^{113,114} y no de basales, como se creyó inicialmente.

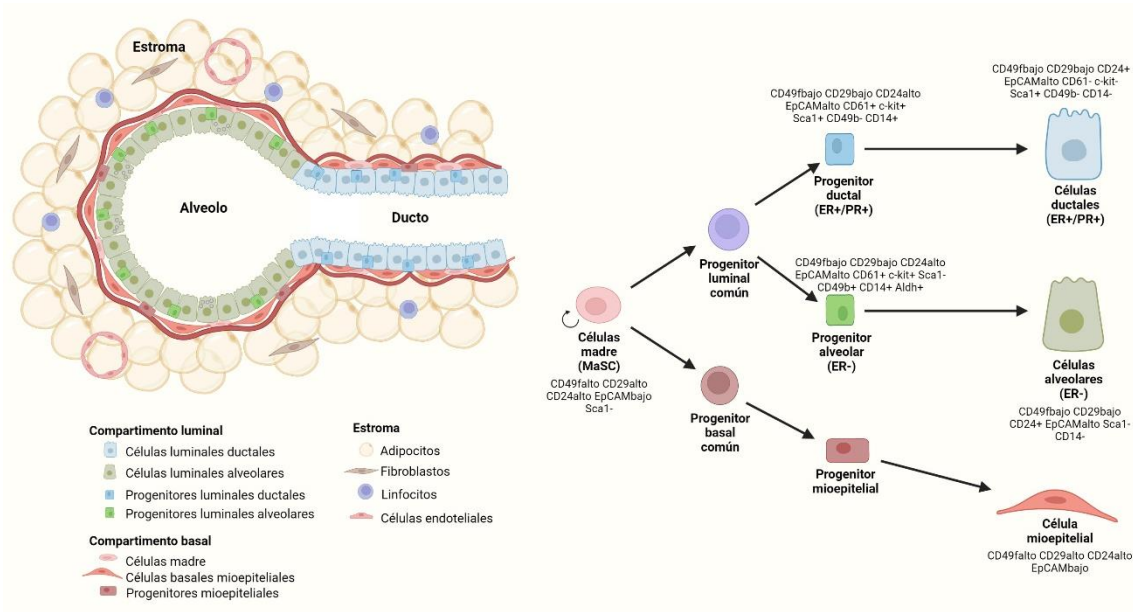


Figura 2. Representación esquemática de los tipos celulares que componen la glándula mamaria y los marcadores que identifican las diferentes subpoblaciones epiteliales. A la izquierda, se representan los tipos de células epiteliales y estromales que componen la glándula mamaria. A la derecha, se ilustra la jerarquía epitelial de la mama con los marcadores que identifican a cada subpoblación. MaSC, Mammary Stem Cell (células madre de la glándula mamaria). Figura creada con BioRender. Adaptada de Cristea, S. et al.¹¹⁵, Visvader, J. E. et al.¹¹¹ y Fu, N. Y. et al.¹¹².

4.2. Desarrollo de la glándula mamaria

Al nacer, el sistema de conductos que forman la glándula mamaria es rudimentario. La mayoría de los cambios morfológicos de la misma ocurren en la pubertad, cuando las hormonas y los factores de crecimiento inducen la diferenciación celular y la formación de estructuras especializadas, denominadas *Brotos Finales Terminales* (TEBs). Los TEBs, altamente proliferativos, continúan expandiéndose en respuesta al ciclo de las hormonas ováricas, de modo que, la glándula mamaria madura y virgen, consiste en una extensa red de ductos y acinos, que en humanos se conoce como *Unidades Ducto-Lobulillares Terminales* (TDLU). Durante el embarazo, la glándula mamaria sufre profundos cambios que consisten en una diferenciación y expansión del sistema ductal mamario por acción de los estrógenos, la progesterona y la hormona del

crecimiento (GH, del inglés *Growth hormone*). En respuesta a la señalización por la prolactina, las estructuras lóbulo-alveolares se transforman en conductos ramificados secundarios y terciarios; las células lumbinales alveolares comienzan a producir leche, ésta se libera y viaja por los ductos gracias a la hormona peptídica oxitocina, donde induce las contracciones de las células mioepiteliales. Al final de la lactancia, la glándula mamaria pasa por un proceso conocido como involución postlactancia, tras el cual, la mama vuelve a un estado morfológico similar previo al embarazo. El inicio de la involución ocurre debido a la estasis de la leche y a la falta de estímulo de succión en el pezón. Esta etapa se divide en dos fases: la etapa reversible, que en ratón dura, aproximadamente 48 horas, y la etapa irreversible, caracterizada por una apoptosis masiva del epitelio y una remodelación del tejido, junto con una infiltración controlada de células del sistema inmune para eliminar la leche residual y los restos celulares acumulados¹⁰⁶. Tras la involución, que en el humano puede durar 24 meses o más¹¹⁶, la glándula mamaria vuelve a estar preparada para sufrir los cambios celulares y moleculares de un nuevo embarazo.

4.3. Efecto protector del embarazo frente al cáncer de mama

Como se ha comentado anteriormente, el embarazo tiene un efecto protector frente al cáncer de mama. Así, aquellas mujeres que tienen un embarazo antes de los 20 años, tienen un 50% menos de riesgo de desarrollar cáncer de mama que las que no tuvieron embarazo⁸³. Este efecto protector es un fenómeno universal, sucede en mujeres de todas las etnias, y en diferentes especies de mamíferos de experimentación, como ratas y ratones, tanto en modelos de carcinogénesis química como en animales modificados genéticamente¹¹⁷⁻¹²⁰. Entre el embarazo y la lactancia, es el propio embarazo el que más contribuye a esa protección. Así, se ha descrito que 34 semanas de embarazo ya son suficientes para tener dicho efecto protector, aunque el embarazo no llegue a término¹²¹. También se ha descrito que una lactancia materna de al menos 6 meses de duración, proporciona una reducción del 10% en el riesgo de cáncer de mama¹²²; beneficio que se puede incrementar con duraciones más prolongadas de la lactancia¹²³. Además, se ha observado que cada embarazo aporta una protección extra de entre un 10% y un 13%^{84,124}. Esta protección del embarazo y la lactancia se ha observado tanto para tumores ER+ y ER-¹²⁵, y en mujeres con mutación en *BRCA1/2*. Aunque en este último caso los estudios fueron controvertidos, parece que la protección también estaría presente en este grupo^{124,126}.

Los mecanismos que subyacen a este efecto protector del embarazo siguen sin identificarse completamente. Se han propuesto cambios histológicos, celulares y moleculares producidos por el embarazo que pueden contribuir a esta protección.

En cuanto a los cambios histológicos, se ha descrito que las mujeres nulíparas tendrían, de forma predominante, lóbulos de tipo 1, donde habría células madre de tipo 1 con mayor capacidad de malignización que las células madre de tipo 2, éstas estarían presentes en lóbulos tipo 2, típicos de mujeres que han pasado por un embarazo y una posterior involución, y que serían más refractarias a la transformación¹²⁷⁻¹²⁹.

También, tras el embarazo, se han identificado cambios en el estroma mamario y en la matriz extracelular (ECM, del inglés *Extracellular Matrix*), que estarían implicados en la protección frente al cáncer de mama. Así, se ha observado una mayor proporción de colágeno de tipo I, que se asocia con una disminución de la rigidez del estroma en la ECM de ratas que pasaron por una gestación. Estas diferencias en la rigidez estromal se relacionan con cambios moleculares relacionados, indirectamente, con la supresión tumoral, como son el aumento en la expresión de E-cadherina y la regulación a la baja de la expresión de genes que codifican metaloproteasas, implicadas en el desarrollo del cáncer¹³⁰.

Respecto a los cambios celulares, el embarazo produce modificaciones en el fenotipo celular de las células epiteliales de la glándula mamaria. Por ejemplo, tras el embarazo, se ha descrito una disminución en el número de células positivas para receptores de hormonas ER y PR¹³¹, así como una disminución en el número de progenitores CD44+/p27+ que tendrían una mayor capacidad de proliferación¹³².

En lo referente a cambios moleculares, el embarazo induce en las células epiteliales de la mama cambios en la expresión génica, que implicarían modificaciones en diferentes programas funcionales¹³³. Se han descrito 238 genes regulados al alza y 48 genes regulados a la baja en mamas de mujeres premenopáusicas que tuvieron hijos, con respecto a mujeres nulíparas. Entre los genes sobreexpresados tras el embarazo, algunos cambian de expresión de manera transitoria, como los implicados en vigilancia inmunológica (*CD8A*, *XCL1*, *GZMA*, *CXCL14*, entre otros); mientras que otros lo hacen de manera permanente, como los implicados en la respuesta inmune (*CCL19*, *HLA-DRA*, *GLI3*) y la diferenciación celular (*EGR3*, *DSC3*, *KRT5*, *FZD8*). Entre los genes infraexpresados en mujeres que habían tenido un embarazo destacan: *COL6A6*, *CXCL1*, *FOXQ1*, *KDM4B* y *TOX3*, implicados en procesos de remodelamiento de la ECM, en la vía de proliferación WNT y en el remodelamiento de la cromatina¹³⁴. En el

caso de mamas de mujeres postmenopáusicas parosas, se ha descrito un enriquecimiento de genes implicados en el procesamiento del RNA y diferenciación, y una regulación a la baja de genes implicados en proliferación, como *IGF-1*^{135,136}. En un estudio con ratas hembra nulíparas y múltiparas, se observó un patrón de expresión de 70 genes inducidos por la gravidez. Muchos de los genes regulados a la baja en las múltiparas están implicados en la remodelación de la ECM; mientras que los genes sobreexpresados se asociaron con la vía de TGF- β y la respuesta inmunitaria¹³⁷. Genes asociados a la vía de WNT (*Lgr5*, *Axin5*, *Vcan* e *Igfbp3*), genes inducidos por NOTCH (*Gata3*, *Id3* y *Dusp1*) y genes de proliferación (*Csn1s1*, *Csn2* y *Ltf*) también se expresan de forma diferencial entre ratones hembra nulíparas y múltiparas. En concreto, las células epiteliales luminales de mamas que han pasado por el embarazo tendrían una menor expresión de la vía de WNT y de ciclinas implicadas en proliferación, y un aumento de la expresión de genes de la vía de NOTCH, implicada en diferenciación¹³¹. También se ha descrito que el IGF-1 circulante en plasma, sería más bajo en mujeres con hijos, y que los niveles plasmáticos de éste correlacionarían negativamente con el número de embarazos^{138,139}.

Además, se han observado cambios epigenéticos inducidos por el embarazo que bloquearían el desarrollo de lesiones premalignas en la mama¹⁴⁰. Comparado con mujeres postmenopáusicas nulíparas, las células epiteliales de mujeres postmenopáusicas múltiparas muestran heterocromatina rica en histona H3 trimetilada en la lisina 27 (H3K27me3), que es un indicador de una cromatina transcripcionalmente inactiva¹⁴¹. Ciertamente, se han descrito cambios epigenéticos inducidos por el embarazo que se traducirían en cambios transcripcionales. Así, en ratones, se ha observado que tras el embarazo, los genes, *Igf1r*, *Igf1*, *Igfbp4*, *Irs1*, *Prlr* y *Stat5b*, implicados todos ellos en la vía GH/IGF-1, se encuentran hipermetilados y silenciados en la mama¹⁴². Por el contrario, se ha demostrado hipometilación de promotores de genes como *Elf5* y *Cldn4*, implicados en la diferenciación celular¹⁴³.

5. Implicación del eje GH/IGF-1 en el desarrollo de la glándula mamaria y en el cáncer de mama

5.1. Regulación de la secreción de GH e IGF-1

La hormona del crecimiento (GH, del inglés *Growth hormone*) y el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1, del inglés *Insuline Growth Factor-1*), son hormonas pleiotrópicas con múltiples funciones, como la regulación del crecimiento

somático, el mantenimiento de la masa ósea, la diferenciación y el metabolismo celular¹⁴⁴.

La GH es una hormona peptídica, secretada de manera pulsátil por las células somatotrofas de la hipófisis anterior (adenohipófisis), con episodios secretores separados por intervalos de quiescencia secretora con niveles de GH indetectables. Dos péptidos hipotalámicos funcionan como reguladores primarios de la secreción de GH: la hormona liberadora de GH (GHRH, del inglés *Growth Hormone-Releasing Hormone*) y la somatostatina (SST), que estimulan e inhiben la síntesis y liberación de la GH, respectivamente. La GHRH, producida por las neuronas del núcleo arqueado del hipotálamo, interacciona con el receptor GHRHR, acoplado a una proteína G en las células somatotrofas de la adenohipófisis, promoviendo la liberación de GH a través de la activación de la señalización por AMP cíclico (AMPc). Por su parte, la somatostatina es producida por las neuronas neuroendocrinas del núcleo ventromedial del hipotálamo, e inhibe la secreción de GH al unirse a los receptores SSTR (del inglés, *Somatostatin Receptor*) (**Figura 3**). Los niveles séricos de GH/IGF-1, la glucosa, las concentraciones de otras hormonas (insulina, grelina, hormonas gonadales, glucocorticoides) y la secreción de ciertos neurotransmisores del sistema nervioso central, regulan también la secreción de GHRH y SST y, con ello, indirectamente, la secreción de GH. Además, los pulsos secretores de GH varían en frecuencia y amplitud según la edad, el sexo, el estado puberal, la fase del ciclo menstrual, el sueño, el estado nutricional, el ejercicio y la composición corporal¹⁴⁵.

Una vez que la glándula pituitaria libera GH, ésta circula en la sangre y se une a un receptor de superficie celular dimérico, llamado receptor de GH (GHR), muy expresado en el hígado, músculo, riñón, corazón y epidermis. Bajo la influencia directa de la GH, el hígado produce IGF-1; éste es el mayor productor de esta molécula, aunque también se puede generar en otros tejidos del cuerpo¹⁴⁶. El IGF-1 se une al receptor IGF-1R en numerosos tejidos, promoviendo la activación de las vías PI3K/AKT/mTOR y MAPK, implicadas en el crecimiento celular, la proliferación, la supervivencia y la diferenciación. La unión de IGF-1 a su receptor, también está controlada por una familia de seis proteínas de unión, llamadas IGFBP (del inglés *IGF binding protein*), que controlan la cantidad de IGF-1 libre¹⁴⁶. Además de las acciones endocrinas de la GH hipofisiaria y el IGF-1 hepático circulantes, estas dos hormonas también pueden ser sintetizadas por otros tejidos donde actuarían localmente de forma autocrina/paracrina, y cuya acción, en muchos casos, tendría incluso mayor trascendencia funcional que la endocrina^{147,148} (**Figura 3**).

Introducción

Lo mismo sucede con la somatostatina, que no sólo actúa a nivel central, sino también periférico. Así, se ha demostrado la presencia de receptores de la somatostatina en el páncreas, tracto digestivo, riñón, tiroides, pulmón, bazo, glándula mamaria y en diferentes tipos de tumores. Este hecho es de gran relevancia como base para la estrategia terapéutica de ciertos tipos de tumores, que se comentarán más adelante¹⁴⁹.

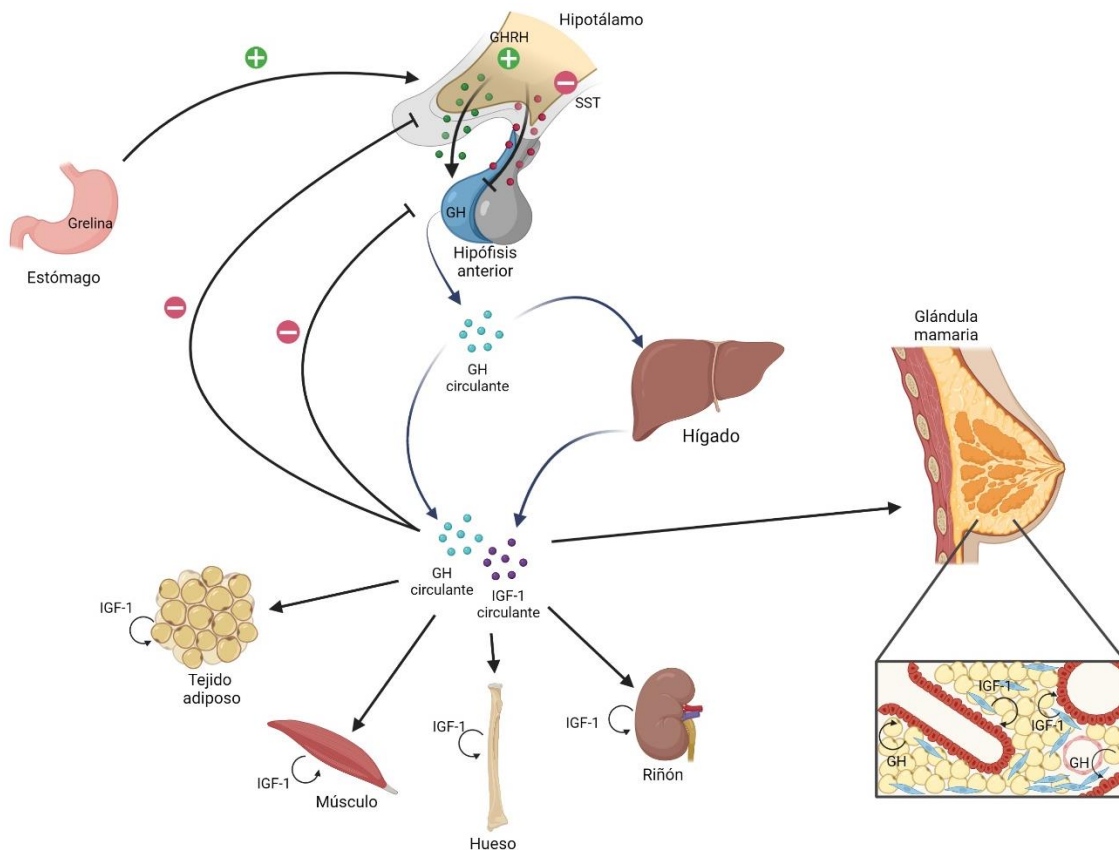


Figura 3. Esquema representativo de la regulación del eje GH/IGF-1. La secreción de GH por la hipófisis anterior está controlada por las hormonas hipotalámicas GHRH y SST. Tanto la GH circulante como el IGF-1 producido por el hígado, ejercen su acción sobre diferentes tejidos. La glándula mamaria produce GH e IGF-1 que tienen acciones paracrinas y autocrinas. La secreción está regulada por hormonas como la grelina, producida en el estómago, y por otros factores. GH, Hormona del crecimiento; IGF-1, Factor de crecimiento similar a la insulina-1; GHRH, Hormona liberadora de la hormona del crecimiento; SST, somatostatina. Figura creada con BioRender.

5.2. Mecanismos de acción de GH, IGF-1 y SST

5.2.1. Vías de señalización activadas por la GH

La GH humana es codificada por el gen GH1, localizado en el cromosoma 17q22-24. Está formada por 191 aminoácidos y adquiere, mediante dos puentes disulfuro, una

estructura cuaternaria caracterizada por cuatro hélices, necesaria para la dimerización del receptor¹⁵⁰.

La GH, tanto la de producción sistémica como la de síntesis local, se une al receptor GHR para ejercer su acción. Para que se produzca la señalización es necesario la dimerización del receptor. Para ello, la GH se une al primer monómero del receptor por los 24 primeros aminoácidos de la hélice I y toda la hélice IV. Cuando se ha formado el binomio GH-GHR, la molécula gira sobre un eje proporcionado por la hélice II y permite que se realice un cambio de conformación espacial, de tal manera que los últimos 13 aminoácidos de la hélice I y toda la hélice III se pueden fijar a un segundo receptor, produciéndose la dimerización¹⁵¹.

Una vez que se ha unido la GH, GHR cambia de conformación en la zona de unión a las proteínas *Janus kinasa 2* (JAK2), lo que facilita la fosforilación de los residuos de tirosina de JAK2 y su consecuente activación. JAK2 va a fosforilar múltiples residuos de tirosina del dominio intracelular del receptor, lo que proporciona un andamiaje para la activación de múltiples vías. Una de estas vías es la de las proteínas STAT (STAT1, STAT3, STAT5A y STAT5B) que una vez fosforiladas, se homo- o heterodimerizan y se trasladan al núcleo donde se une a promotores en el DNA, e inician la transcripción de diferentes genes como *IGF-1*, *IGFBP3* y *ALS*. A través de la unión de JAK2 con una proteína denominada SHC, se produce la fosforilación de esta molécula que inicia la cascada de la vía RAS/MAPK, que finalmente activa la molécula ERK y la transcripción de c-JUN y c-MYC, implicadas en proliferación. Las proteínas JAK2 fosforilan IRS-1,2 y 3, las cuales activan PI3K/mTOR, implicadas en proliferación y supervivencia. Otra de las vías que se activa es PKC, a través de su fosforilación por GHR, y estimula la expresión de c-FOS y el aumento de los niveles de calcio intracelulares¹⁵² (**Figura 4**).

5.2.2. Vías de señalización activadas por el IGF-1

La proteína IGF-1, originalmente denominada somatomedina C, está codificada por el gen del mismo nombre. Es una hormona similar en estructura molecular a la insulina, formada por 70 aminoácidos en una sola cadena con tres puentes disulfuro.

El IGF-1 libre, generado en el hígado o en otros tejidos (riñón, páncreas, bazo, intestino delgado, ovarios, cerebro o glándula mamaria), se une a su receptor tirosina quinasa IGF-1R. Este receptor está compuesto por 2 subunidades extracelulares α y 2 unidades transmembrana β ¹⁵³. Tras la unión del ligando con el receptor, IGF-1R

recluta y fosforila a los sustratos IRS (2, 3 y 4) y SHC, que inician cascadas de fosforilación. Las primeras activan a PI3K y AKT. AKT va a ejercer su acción a través de mTORC1, FOXO y GSK3. La activación de mTORC1 juega un papel fundamental en el crecimiento celular y la supervivencia al promover la absorción de nutrientes, el almacenamiento de energía y la traducción de proteínas. Las proteínas FOXO inhiben la apoptosis, el estrés oxidativo y la activación de enzimas gluconeogénicas, favoreciendo la proliferación y supervivencia. Por su parte, GSK3, que es inhibida por AKT, aumenta la glucogénesis y participa en la vía de señalización de WNT. Además, SHC activa la vía RAS/MAPK/ERK, implicada en proliferación^{146,154} (**Figura 4**).

5.2.3. Vías de señalización activadas por la somatostatina

La somatostatina es sintetizada en el hipotálamo y en las células delta de los islotes de Langerhans del páncreas, como un gran péptido precursor inactivo de 116 aminoácidos, que sufre una fragmentación proteolítica, específica de tejido, para producir dos péptidos activos de 14 y 28 aminoácidos. Los receptores de la somatostatina (SSTR) son receptores transmembrana de 7 dominios acoplados a una proteína G (GPCRs). Se han identificado y clonado 5 subtipos diferentes de SSTR (SSTR-1, -2, -3, -4, -5), codificados por genes diferentes. Una vez que se produce la unión al receptor, la somatostatina tiene efectos anti-secretorios y anti-proliferativos. Por un lado, los cinco receptores producen una inhibición de los canales de calcio dependientes del voltaje y la estimulación de los canales de potasio, lo que induce la disminución de las concentraciones de calcio intracelular, e inhiben la adenilato ciclasa, lo que finalmente conduce a una inhibición de los niveles de AMPc. Los bajos niveles de calcio y AMPc inhiben la secreción. Además, los cinco receptores producen la activación de las proteínas tirosina fosfatasa (PTP), lo que conduce a la inhibición de las vías de PI3K/AKT, ERK1/2, óxido nítrico sintasa (NOS) y la proteína quinasa dependiente de cGMP, lo que da como resultado una transcripción reducida y una inhibición de la expresión de genes implicados en la supervivencia celular, en la proliferación celular y en la angiogénesis. La activación de las PTP también favorece la inhibición de la señalización de IGF-1R a través de regulaciones postraduccionales, involucradas en la desfosforilación de los receptores IGF-1R y/o sus efectores intracelulares. Los receptores SSTR2 y SSTR3 también aumentan la apoptosis al activar la vía extrínseca e intrínseca de esta forma de muerte celular¹⁵⁵ (**Figura 4**).

Los receptores encargados de suprimir la síntesis de GH por la adenohipófisis son, principalmente, el SSTR2 y el SSTR5. Además, el SSTR2 y SSTR3 están implicados

en la inhibición de la síntesis de IGF-1 en el hígado mediante la fosforilación de las PTP, la desfosforilación de STAT5 y, en última instancia, la transcripción de IGF-1¹⁵⁶. Todos ellos, pueden llevar a cabo las acciones antitumorales de la somatostatina en aquellos órganos que expresen SSTR¹⁵⁷.

La homodimerización y/o heterodimerización de toda la familia de GPCR, incluidos los SSTR, juegan un papel fundamental en la unión de ligandos y la transducción de señales¹⁵⁸. SSTR1 existe como monómero, mientras que la homodimerización de los receptores 2, 3, 4 y 5 se produce de forma constitutiva o después de la unión a la somatostatina. También pueden formar heterodímeros con otros miembros de la familia de los receptores de SST (SSTR1/SSTR2), ya sea en condiciones de reposo o tras la unión del ligando¹⁵⁹. Además, los SSTR también dimerizan con receptores de otras familias de GPCR, como el receptor 2 de la dopamina (D2R)¹⁶⁰ o con otras familias de receptores, como receptores de tirosina quinasa, como por ejemplo, el EGFR¹⁶¹.

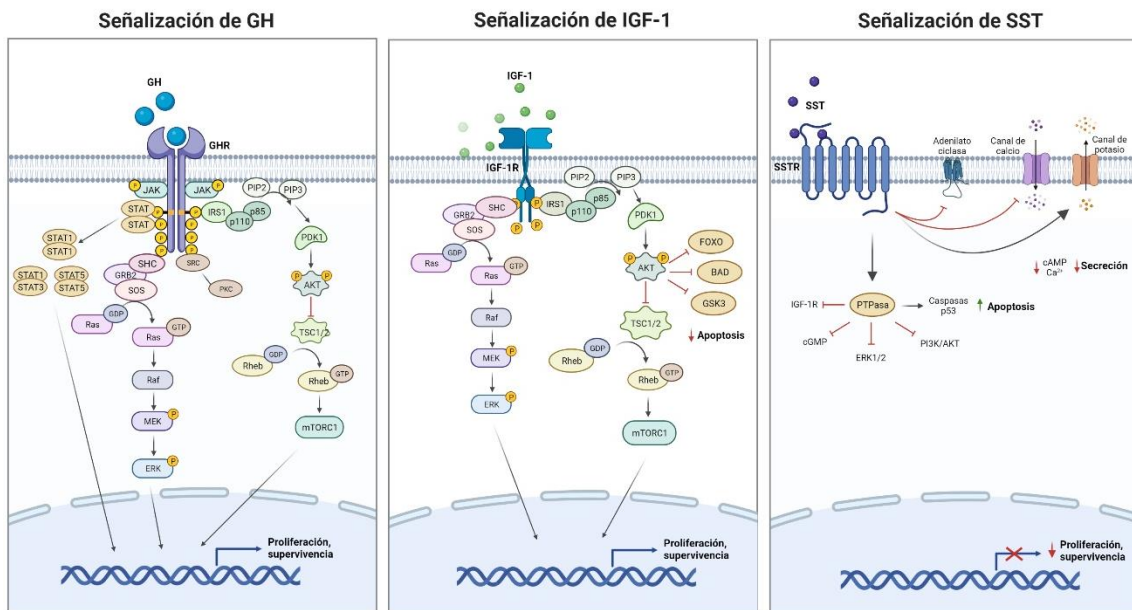


Figura 4. Vías de señalización activadas por los receptores GHR, IGF-1R y SSTR. A la izquierda, señalización del receptor GHR tras la unión de GH. En el centro, señalización del receptor IGF-1R tras la unión de IGF-1. A la derecha, señalización mediada por un SSTR tras la unión de la SST. Figura creada con BioRender. Basada en Brooks et al.¹⁵², Tao et al.¹⁴⁶ y Chalabi, M. et al.¹⁵⁵.

5.3. Funciones del eje GH/IGF-1

5.3.1. Papel del eje GH/IGF-1 en el desarrollo y homeostasis de los tejidos

Este eje es especialmente importante durante el desarrollo fetal y el crecimiento en la adolescencia. La secreción de GH y de IGF-1 aumenta hasta alcanzar su pico en la pubertad, reduciéndose posteriormente hasta unos niveles más bajos en el adulto, donde la acción que realiza es de homeostasis de los tejidos.

En el hueso, la GH y el IGF-1 regulan el crecimiento óseo longitudinal a través de su acción sobre los condrocitos de la placa de crecimiento de los huesos largos. Favorece la captación de glucosa, la síntesis de proteínas, la conversión de condrocitos en células osteogénicas y el posterior depósito de hueso nuevo¹⁶². En el músculo esquelético, incrementan la captación de aminoácidos para aumentar la síntesis de proteínas, a la vez que disminuye la captación de glucosa para producir un incremento en la masa corporal magra¹⁶³. En el tejido adiposo inducen la liberación de los ácidos grasos, intensifica la lipólisis y reduce la captación de glucosa para producir un descenso en la adiposidad¹⁶⁴. En el resto de los tejidos, como el riñón, el páncreas, el intestino, la piel, el hueso, el corazón o los pulmones, producen un incremento en la síntesis proteica, la síntesis de DNA, el tamaño y número de células, para permitir el crecimiento de estos y el desarrollo de sus funciones. Además, están implicados en el desarrollo neuronal, la foliculogénesis ovárica, el desarrollo de los testículos, del timo y en la hematopoyesis¹⁶⁵⁻¹⁶⁷.

En el caso de la glándula mamaria, se ha demostrado que este tejido expresa GHR y también es capaz de producir tanto GH como IGF-1, con acciones autocrinas/paracrinas importantes en su desarrollo^{168,169}, que se describirán a continuación. Además, el eje GH/IGF-1 tiene un papel importante en el desarrollo de diferentes tipos de tumores, incluido el cáncer de mama, y sus vías de regulación pueden ser una estrategia para combatirlo.

5.3.2. Papel del eje GH/IGF-1 en el desarrollo de la glándula mamaria

Aunque el desarrollo de la red de conductos de la glándula mamaria se inicia con el aumento de estrógenos que se produce durante la pubertad, el completo desarrollo requiere de múltiples hormonas y factores de crecimiento que actúan tanto a nivel sistémico como local. Experimentos realizados desde los años 50 en ratas ovariectomizadas e hipofisectomizadas, demostraron la importancia de la GH en el

desarrollo de la morfogénesis ductal¹⁷⁰⁻¹⁷². Al profundizar en estos estudios utilizando ratones deficientes en IGF-1, se demostró que el tratamiento de IGF-1 junto con estradiol rescataba el desarrollo ductal en animales hipofisectomizados (sin GH), mientras que el exceso de GH y los estrógenos no lograron rescatar la morfología de las glándulas deficientes en IGF-1, poniendo de manifiesto la importancia de IGF-1 como mediador de la acción de GH¹⁷³. Además, se ha observado que el IGF-1 paracrino, y no el endocrino, es más importante en la morfogénesis de la ramificación mamaria. Así, ratones con delección de IGF-1 en el hígado tenían una ramificación normal de la mama, mientras que los ratones que presentaban una delección de IGF-1, concretamente en la mama, mostraban un árbol ductal reducido¹⁷⁴. Así mismo, la administración de pegvisomant, un potente antagonista de la acción de la GH, a ratones hembra vírgenes, produce un retraso significativo en el crecimiento del conducto mamario, que se asocia con una disminución en el número de yemas terminales y una ramificación reducida en la glándula¹⁷⁵.

La unión de GH con el GHR en las células estromales de la mama, activa la producción de mRNA de IGF-1. Este IGF-1 actúa en los TEBs, donde activa la vía IGF-1R e incrementa la proliferación de las células epiteliales y reduce su apoptosis¹⁷⁶. Los estrógenos y la progesterona potencian este efecto del IGF-1, y la combinación de los tres es necesaria para la diferenciación lóbulo-alveolar que se produce durante el embarazo¹⁷⁷. Ya tras el embarazo, la progesterona y la prolactina toman un papel principal y son las encargadas de generar alveolos secretores de leche¹⁷⁸.

5.4. Implicación de la vía GH/IGF-1 y la somatostatina en el cáncer de mama

5.4.1. Importancia de GH e IGF-1 en cáncer de mama

Además de su papel en el desarrollo mamario, el eje GH/IGF-1 también está implicado en la tumorigénesis mamaria^{179,180}. En los años 1950, se documentó por primera vez la regresión de un tumor mamario metastásico tras una hipofisectomía. Por ello, en los años 60, comenzó a utilizarse esta técnica como terapia contra el cáncer de mama implicando a la hormona del crecimiento en la patogénesis de esta enfermedad^{181,182}. Posteriormente, estudios epidemiológicos han indicado un incremento en el riesgo de cáncer de mama asociado a polimorfismos en genes del eje GH/IGF-1¹⁸³. También, varios estudios han sugerido que los niveles circulantes de IGF-1 están asociados con un mayor riesgo de cáncer de mama en mujeres premenopáusicas¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. Los datos experimentales obtenidos de estudios en humanos, ratones y líneas celulares, también

Introducción

sugieren que la reducción de la señalización de GH/IGF-1 tiene un impacto negativo en el desarrollo del tumor de mama^{175,187} y, al contrario, que el aumento de éstos está relacionado con el aumento de hiperplasias mamarias¹⁷⁶. Así, en pacientes con síndrome de Laron (enfermedad congénita donde el receptor de la hormona del crecimiento no es funcional) o con deficiencias congénitas en IGF-1, no se observa incidencia de cáncer de mama^{187,188}. Así mismo, ratones que sobreexpresan un antagonista del GHR (hGH-G120R) y que tienen niveles reducidos de IGF-1, son resistentes al desarrollo de tumores de mama inducidos por 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA)¹⁸⁹. Las ratas Dwarf, con una mutación en el gen *GH* que produce cantidades pequeñas de una proteína GH truncada que no es capaz de unirse a GHR, también son resistentes al desarrollo de cáncer de mama inducido por DMBA y *N*-metil-*N*-nitrosourea^{190,191}; y este efecto es anulado por la introducción de GH circulante que restaura la tumorigénesis mamaria^{191,192}. Por el contrario, ratones transgénicos que sobreexpresan IGF-1R, exhiben una alta incidencia de tumores mamarios¹⁹³. Así mismo, la sobreexpresión de IGF-1R en células epiteliales mamarias no tumorales (MCF10A) produce una transformación completa y el crecimiento al realizar un xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos¹⁹⁴.

Además, GH e IGF-1 están implicados también en la evolución, pronóstico y metástasis del cáncer de mama, al influir en la angiogénesis y la resistencia al tratamiento¹⁷⁹. La expresión de la GH correlaciona positivamente con las metástasis en los ganglios linfáticos, el estadio tumoral y el índice proliferativo¹⁹⁵. También se ha observado que la acción autocrina de la GH en las células tumorales MCF-7 les confiere un fenotipo mesenquimal e invasivo *in vitro* y generan tumores más agresivos *in vivo*¹⁹⁶. En ratones *lit/lit* (que tienen niveles reducidos de GH e IGF-1, debido a una mutación puntual en el gen *GHRH*) en un fondo genético nod/SCID, para tolerar xenotrasplantes, el crecimiento de la línea celular de carcinoma mamario MCF-7 trasplantada, se redujo significativamente en comparación con ratones control¹⁹⁷. Lo mismo sucede al inyectar estas mismas células a ratones tratados con pegvisomant, un antagonista de GHR¹⁷⁵, poniendo de manifiesto la importancia de esta vía en la progresión del tumor.

El efecto que tiene GH/IGF-1 sobre el desarrollo y progresión del cáncer de mama se debe a múltiples factores¹⁷⁹. Así, se ha observado como la GH autocrina es suficiente para promover la transformación oncogénica en líneas celulares¹⁹⁸ e incrementa la proliferación de las células *stem* y progenitoras que expresan GHR, presentes en el 90% de los carcinomas ductales¹⁹⁹. También es capaz de aumentar el potencial replicativo de las células, lo que se conoce como inmortalización, al incrementar la

actividad de la telomerasa a través del aumento de la síntesis de las proteínas de la subunidad catalítica de la telomerasa hTERT²⁰⁰. GH/IGF-1 promueve la supervivencia y la proliferación al activar las vías MAPK y JAK/STAT y aumentar los niveles de ciclina D1 y c-MYC^{201,202}. Favorece la angiogénesis, porque incrementa la síntesis de VEGF-A y VEGFR²⁰³. Por último, incrementa la transición epitelio-mesénquima y, con ello, la invasión local y la metástasis; todo ello, debido a activar el factor nuclear-kB²⁰⁴, incrementar la actividad de las metaloproteasas (MMP) 2 y 9¹⁹⁶, y regular a la baja la expresión de E-cadherina²⁰⁴. También se ha observado como el IGF-1 liberado por adipocitos de pacientes obesos induce la proliferación de las células MCF-7 en experimentos de cocultivo al favorecer la fosforilación de ERK, AKT y STAT3²⁰⁵. Así mismo, en un estudio con ratones transgénicos en los que la expresión de IGF-1 está bajo el control del promotor de la queratina bovina 5 (BK5), que se expresa en las células mioepiteliales de glándula mamaria, se observó un incremento de la señalización de COX-2 y postanglandinas tanto en las glándulas mamarias normales como en los tumores²⁰⁶. Estas moléculas, implicadas en inflamación, crean un ambiente protumorigénico, promueven la angiogénesis al elevar los niveles de VEGF y favorecen la evasión de las respuestas inmunológicas antitumorales²⁰⁶. Estos estudios ponen de manifiesto la importancia del IGF-1 con acciones autocrinas/paracrinas en la carcinogénesis mamaria²⁰⁷.

5.4.2. Importancia de la somatostatina en el cáncer de mama

Como se ha descrito anteriormente, la somatostatina tiene acciones anti-proliferativas y pro-apoptóticas mediadas por sus receptores, los SSTR¹⁵⁵. Los SSTR se encuentran presentes en una gran variedad de tumores y líneas tumorales, incluidos los tumores neuroendocrinos de la hipófisis y de otras localizaciones, tumores gastroenteropancreáticos, cáncer de pulmón, carcinomas medulares del tiroides y linfomas^{208,209}. En el caso de los tumores de mama, éstos expresan los cinco SSTR²¹⁰. Específicamente, el 50-70% de los tumores de mama son positivos para algún SSTR²¹¹, siendo el SSTR2 el que se expresa con mayor frecuencia, seguido del SSTR3, SSTR1, SSTR4 y SSTR5, respectivamente²¹².

La presencia de SSTR2 se considera un factor de buena evolución en el cáncer de mama, pues se asocia a una baja invasión y proliferación²¹², y al subtipo luminal con expresión de los receptores hormonales^{213,214}. La relación entre los estrógenos y SSTR2 ha sido confirmada por varios estudios^{210,215}. Esta relación se debe a que hay elementos reguladores de la transcripción en el gen de SSTR2 que contienen sitios de

Introducción

unión para los estrógenos²¹⁶. El papel antiproliferativo de SSTR2 en el cáncer de mama se ha demostrado *in vitro* al inducir la apoptosis, detener el ciclo celular y disminuir la expresión de EGFR en la línea celular tumoral MCF-7, dependiente de estrógenos²¹⁷. Sin embargo, en los cánceres de mama que expresan la variante truncada SSTR5-TMD4, la función supresora de SSTR2 se ve comprometida. Esta variante, se correlaciona con la pérdida del receptor de estrógenos y de HER2, y con metástasis en los ganglios linfáticos, por lo que su presencia es un marcador de mal pronóstico²¹⁸. Del mismo modo, la presencia de SSTR4 también se relaciona con tumores luminales de buen pronóstico²¹³; y la sobreexpresión de SSTR3 en MCF-7 y en MDA-MB-231, también se asocia con una inhibición de la apoptosis y parada del ciclo celular, respectivamente²¹⁹.

Dado que los SSTR tienen importancia en el cáncer de mama, varios estudios han demostrado la acción antiproliferativa de los análogos de la somatostatina en líneas celulares y en modelos animales, dando pie a su uso en la clínica para el tratamiento del cáncer de mama.

5.5. Uso de análogos de la somatostatina en la clínica

5.5.1. Descripción de los principales análogos de la somatostatina

Los efectos pro-apoptóticos y anti-proliferativos de la somatostatina permitieron su identificación como diana farmacológica. Sin embargo, el límite principal en el uso de la somatostatina como agente terapéutico es la vida media tan corta que tiene de, aproximadamente, 1 a 3 minutos. Así, para prolongar la actividad biológica de la SST se han sintetizado varios análogos (SSA, del inglés *Somatostatin Analogue*), con una vida media mayor y, a menudo, dotados de mayor efecto biológico que la somatostatina.

El primer análogo sintético de la somatostatina (SSA) aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) en 1988, fue el octapéptido octreótido u octreotide, comercializado como Sandostatin. Está indicado en el tratamiento de la acromegalia y de la diarrea severa, asociada a tumores carcinoides metastásicos y tumores neuroendocrinos pancreáticos secretores de polipéptidos intestinales vasoactivos (VIP) (tumores también denominados VIPomas). Muestra una alta afinidad por SSTR2 y afinidad moderada por SSTR5²²⁰. Tiene una vida media de 90 a 120 minutos tras su administración subcutánea, y una acción farmacológica que dura entre 8 y 12 horas²²¹. Con el desarrollo de la formulación de Sandostatin de

liberación prolongada (Sandostatin-LAR, del inglés *Long Acting Release*) en 1997, mejoró aún más la aplicación clínica de este compuesto. En esta nueva formulación, el octreotide se encapsula en microesferas de un polímero que se disuelve lentamente, y las dosis se pueden administrar por vía intramuscular una vez cada 28 días²²². En la glándula pituitaria, el octreotide tiene una potencia 40 veces mayor que la somatostatina natural para inhibir la secreción de GH. En el páncreas, se ha demostrado que inhibe la secreción de insulina, glucagón, polipéptidos pancreáticos y bicarbonato. En el tracto gastrointestinal, inhibe la secreción de gastrina, motilina y secretina, y la liberación de polipéptidos intestinales vasoactivos, así como la absorción de los carbohidratos. Por sus acciones, es un fármaco importante en el tratamiento de tumores secretores, como los VIPomas, y en tumores carcinoides que producen y liberan gran cantidad de hormonas²²⁰.

Otro análogo de la somatostatina es el Lanreotide (Somatuline), un octapéptido cíclico que se desarrolló en la década de 1990. Su uso fue aprobado por la FDA para el tratamiento de la acromegalia en pacientes que no responden a la cirugía en 2007, para el tratamiento de tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos irresecables, localmente avanzados o metastásicos en 2014 y para el tratamiento del síndrome carcinoide en 2017²²³⁻²²⁵. Muestra una gran afinidad por el SSTR2 y una menor afinidad por el SSTR5. Su formulación inicial tenía una vida media de 90 minutos. La siguiente formulación que se desarrolló, el Lanreotide de liberación sostenida (Lanreotide SR), tenía una vida media de 4.5 días y se administraba cada 10 días. Años más tarde, el Lanreotide Autogel ha surgido como una formulación acuosa administrada por vía subcutánea cada 28 días.

El tercer análogo de la somatostatina, el Pasireotide (SOM230), es un SSA de segunda generación. Fue aprobado en 2014 por la FDA y en 2017 por la Agencia Europea del Medicamento (EMA), en su forma de larga administración (Pasireotide LAR o Signifor LAR), para el tratamiento de la acromegalia, la enfermedad de Cushing y tumores carcinoides metastásicos refractarios o resistentes al octreotide²²⁶. Se caracteriza por unirse con alta afinidad a SSTR1, SSTR2, SSTR3 y SSTR5²²⁷. En comparación con el octreotide, el pasireotide tiene una afinidad de unión 30, 5 y 40 veces superior a SSTR1, SSTR3 y SSTR5, respectivamente, y 2.5 veces menor hacia SSTR2. Con respecto al lanreotide, las afinidades son 19, 9 y 106 veces mayor a SSTR1, SSTR3 y SSTR5, respectivamente, y con menor afinidad hacia SSTR2²²⁷.

5.5.2. Uso de los análogos de la somatostatina frente al cáncer de mama

Puesto que la GH e IGF-1 tienen un papel relevante en la patogenia del cáncer de mama, la inhibición de estas hormonas con el uso de los análogos de la somatostatina ha sido un campo ampliamente estudiado. Se ha comprobado el efecto de los SSA solos y en combinación con el modulador del receptor de estrógenos, tamoxifeno, y con quimioterápicos en el tratamiento del cáncer de mama.

En experimentos en ratas, la administración de octreotide junto con tamoxifeno ha demostrado eficacia en la supresión de la expresión de IGF-1 y en los niveles de IGF-1 en suero de una manera más potente que con el tratamiento con un único fármaco²²⁸. Esta combinación también ha sido probada en ratas en las que se induce el tumor de mama con DMBA, en las que los animales tratados con ambos agentes tienen tumores con un volumen más reducido que aquellas ratas tratadas con un único agente²²⁹. Sin embargo, en la clínica, la combinación de octreotide con tamoxifeno no ha demostrado ser más eficaz que la terapia solo con tamoxifeno en el tratamiento de mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama metastásico, ni en la terapia adyuvante tras la cirugía, a pesar de que sí que se produce una reducción significativamente mayor en los niveles séricos de IGF-1^{230,231}.

En el caso del pasireotide, únicamente se ha probado la eficacia de una inyección prequirúrgica de pasireotide LAR para reducir la incidencia posoperatoria de linfocitos sintomáticos después de la disección de los ganglios axilares²³², pero no se ha probado su eficacia en el tratamiento del cáncer de mama como tal. Sin embargo, sí que se ha evaluado su efecto sobre lesiones hiperplásicas pre-malignas²³³. Se ha descrito que el pasireotide no solo inhibe la secreción pituitaria de la GH, sino que también tiene un efecto inhibitorio directo de la acción del IGF-1 en la glándula mamaria. Así, en un estudio la administración de SOM230 en ratas intactas e hipofisectomizadas inhibió el desarrollo mamario al estimular la síntesis de la proteína IGFBP5 que regula la biodisponibilidad de IGF-1²³⁴. Gracias a este efecto directo sobre la glándula mamaria, también se ha descrito que el pasireotide es capaz de prevenir la hiperplasia mamaria inducida por la GH y el estradiol (E₂). En este trabajo, tras eliminar las fuentes endógenas de GH y estrógenos mediante la hipofisectomía y la ooforectomía a ratas hembra, se administró GH y E₂ y, como respuesta, a los siete días todos los TEBs y el 75% de los conductos de las mamas se volvieron hiperplásicos. Al tratar a las hembras con pasireotide, el número y el tamaño de los TEBs y los conductos hiperplásicos se redujo. También se observó un aumento de la apoptosis y una disminución de la proliferación al inhibir la vía de señalización del IGF-

1R²³⁵. Lo mismo se observó en 13 mujeres con diagnóstico de hiperplasia atípica que fueron tratadas durante 10 días con pasireotide, en las que disminuyó la proliferación y aumentó la apoptosis en todas las lesiones pre-malignas, sin observarse cambios en la expresión de ER ni el PR y con una disminución en la fosforilación de IGF-1R, AKT o ERK1/2²³³.

El perfil de efectos secundarios del pasireotide es tolerable. Puede empeorar el control de la glucosa en pacientes diabéticos y causar hiperglucemia transitoria de leve a moderada en personas que no son diabéticas²³⁶. Otros efectos secundarios pueden ser náuseas, vómitos, diarrea, cálculos biliares y la prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma. Sin embargo, todos los efectos que produce son manejables²³⁷.

6. Prevención del cáncer de mama

6.1. Cirugía preventiva

La medida más eficaz para reducir el riesgo de cáncer de mama es la mastectomía bilateral con doble ooforectomía. La amputación de ambos pechos se asocia con una reducción del riesgo del 90-95%²³⁸⁻²⁴⁰; sin embargo, la operación puede tener complicaciones como dolor, sangrado, infección o desarrollo de seromas²⁴¹. Además, esta intervención tiene implicaciones psicológicas importantes y la autopercepción de una imagen corporal negativa en la mujer²⁴². Por ello, las guías recomiendan limitarla a las mujeres con un riesgo de cáncer de mama muy alto.

6.2. Quimioprevención

Los medicamentos para reducir el riesgo de desarrollar un tumor de mama son una opción de quimioprevención para las mujeres que no desean someterse a una mastectomía, y también para las mujeres cuyo riesgo no sea lo suficientemente elevado como para que la cirugía se considere apropiada. Los medicamentos actualmente aprobados por la FDA para este fin son los moduladores selectivos del receptor de estrógenos, como el tamoxifeno y raloxifeno; también se han propuesto, con más limitaciones, los inhibidores de la aromatasa, exemestano y anastrozol.

El tamoxifeno es efectivo en mujeres premenopáusicas y postmenopáusicas. Reduce el riesgo de cáncer de mama ER+ en un 44%²⁴³ y la reducción se observa durante los 5 años de administración del medicamento y se mantiene durante los 15 años

posteriores a la finalización del mismo²⁴⁴. Sin embargo, los efectos secundarios del tamoxifeno son frecuentes y muy molestos. Incluyen síntomas menopáusicos, como sofocos y sudoración nocturna y, otros menos frecuentes, pero potencialmente muy graves como un incremento en el riesgo del desarrollo de tromboembolismos y cáncer de endometrio²⁴⁵. El raloxifeno únicamente ha sido efectivo en mujeres postmenopáusicas. Redujo el riesgo de desarrollo de cáncer de mama ER+ en un 76% durante los tres años de tratamiento en mujeres en que se empleó como tratamiento de la osteoporosis²⁴⁶. Además, tiene menor riesgo de desarrollo de eventos tromboembólicos y de cáncer de endometrio que el tamoxifeno^{246,247}. Los riesgos y beneficios del tratamiento con raloxifeno o tamoxifeno en mujeres posmenopáusicas dependen de la edad, de la etnia, de la presencia previa de histerectomía y del riesgo que tengan de desarrollar cáncer de mama. Por ello, se han publicado tablas de riesgo-beneficio para ambos medicamentos que pueden ayudar a identificar el grupo de mujeres en el que los beneficios superan a los riesgos²⁴⁸.

Los ensayos con inhibidores de la aromatasa también han demostrado que estos medicamentos pueden ser eficaces en la prevención. El exemestano es capaz de reducir el riesgo de cáncer de mama invasivo en un 60%²⁴⁹, mientras que el anastrozol lo puede hacer en un 49% y su efecto puede persistir hasta 10 años después de terminado un tratamiento de 5 años^{250,251}. Estos medicamentos solo pueden usarse en mujeres posmenopáusicas, ya que son ineficaces con ovarios funcionales. Presentan menos efectos secundarios que los modulares del receptor de estrógenos, sin embargo, aumentan el riesgo de fracturas óseas²⁵².

Actualmente, hay diversos ensayos clínicos con diferentes fármacos (bifosfonatos, retinoides, moduladores del receptor de progesterona, metformina o anti-RANKL) para evaluar su papel en la quimioprevención del cáncer de mama¹⁰⁵, pero de momento no hay una estrategia de prevención completamente eficaz y sin efectos adversos potencialmente graves. Debido a estos efectos secundarios un elevado porcentaje de mujeres no acepta la quimioprevención²⁵³. Así mismo, alrededor del 40% de las mujeres no pueden continuar con la quimioprevención durante el período establecido de cinco años por la aparición de efectos secundarios muy molestos²⁵⁴. Además, en el caso del tamoxifeno, éste no se puede prescribir de forma segura en mujeres premenopáusicas que desean tener hijos, están embarazadas o en período de lactancia, por lo que muchas rechazan esta opción de quimioprevención²⁵⁵.

Puesto que el cáncer de mama es tan frecuente, sería ideal disponer de una estrategia de quimioprevención universal, sin efectos secundarios graves o molestos, que pudiera aplicarse a la mayoría de las mujeres.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Modelo experimental in vivo

1.1. Cepas de ratón

1.1.1. Modelo *K14-Cre; Brca1^{fl/fl} P53^{fl/fl}*

El modelo *K14-Cre; Brca1^{fl/fl} P53^{fl/fl}* es un doble *knock-out* condicional de tejido, deficiente en los genes *Brca1* y *P53* y, a la vez, es un transgénico que sobreexpresa la recombinasa Cre bajo el promotor del gen de la citoqueratina 14 (*K14*). En este modelo, el gen *Brca1* tiene insertadas dos secuencias de nucleótidos *LoxP*, en los intrones 3 y 13, respectivamente, y en los intrones 1 y 10 del gen *P53*. La recombinasa Cre reconoce esas secuencias *LoxP* y delecta el fragmento de DNA comprendido entre ambas. Así, aquellas células que expresan *K14*, y su descendencia, pierden los exones del 5 al 13 en el gen *Brca1*, y del 2 al 10 en *P53*, dando lugar a un defecto funcional en ambos genes. El gen *K14* se expresa en células epiteliales, principalmente del tejido mamario y de la piel. En este modelo de carcinogénesis, la delectación de *Brca1* y *P53* ocurre en el 5 al 30% de las células epiteliales de la glándula mamaria. Por ello, estos ratones desarrollan tumores de mama con un 100% de penetrancia y a una edad media de siete meses. Remedan los tumores humanos triple negativo con mutación en *BRCA1*; como tales, expresan marcadores epiteliales basales, son negativos para el receptor de estrógenos (ER), negativos para el receptor de progesterona (PR) y negativos para el receptor tirosina quinasa ErbB2, siendo tumores altamente proliferativos. También desarrollan tumores de piel de tipo carcinoma epidermoide cutáneo. Este modelo de ratón fue generado por el laboratorio del Dr. Jonkers del *Netherlands Cancer Institute*^{256,257} y cedido a nuestro grupo; se encuentra en un fondo genético FVB/N y, a partir de ahora, se denominará modelo *Brca1/P53*.

1.1.2. Modelo FVB/N – Tg(MMTV-Neu)202Mul/J

El modelo FVB/N – Tg(MMTV-Neu)202Mul/J es un ratón transgénico en fondo genético FVB/N, portador del proto-oncogén *ErbB2/Neu*, expresado bajo el promotor LTR (repetición terminal larga) del virus del tumor mamario de ratón o *mouse mammary tumor virus* (MMTV). Este modelo fue generado por Guy *et al.*²⁵⁸ y se obtuvo de los laboratorios Jackson.

Material y métodos

El ratón sobreexpresa un transgén que incluye la secuencia salvaje del gen *ErbB2/Neu* de rata, bajo la región promotora anteriormente mencionada del MMTV. Además, contiene secuencias de *splicing* alternativo y poliadenilación procedentes del poliomavirus SV-40, que aportan mayor estabilidad al transcrito. En el ratón macho, el transgén no produce cambios fenotípicos, y se expresa en bajos niveles en el epitelio mamario normal, timo, bazo, glándulas salivales, pulmones y testículos. En ratones hembra, con fondo genético FVB, la expresión del transgén induce en la mama la aparición de adenocarcinomas focales, rodeados de tejido mamario hiperplásico, con un periodo de latencia entre ocho y doce meses. Además, estos ratones desarrollan metástasis pulmonares multifocales con una incidencia del 70% a partir de los nueve meses de edad. El promotor LTR del MMTV contiene elementos de respuesta para glucocorticoides, andrógenos y progesterona. Esto hace que el grado de expresión de los genes bajo el control de este promotor, esté altamente influido por los niveles de esas hormonas, lo que provoca un incremento en la expresión del transgén *ErbB2/Neu* durante el embarazo. Por ello, tras el estado de gravidez, estos ratones desarrollan tumores de mama más agresivos, con una latencia de aparición del tumor de siete meses. A partir de ahora, se denominará modelo *ErbB2/Neu*.

1.1.3. Modelo RFP; *K14-Cre*; *Brca1^{flf} P53^{flf}*

Este modelo se obtuvo del cruce entre el ratón *Brca1/P53*, anteriormente descrito (en la sección 1.1.1 de material y métodos), con el ratón *reporter* C57BL/6-Gt(ROSA)26^{tm1Hjf} obtenido del repositorio INFRAFRONTIER/EMMA y generado por el grupo del Dr. Fehling en el Instituto de Inmunología de la Universidad Clínica de Ulm, Alemania ²⁵⁹. Este ratón es un *knock-in* que sobreexpresa la proteína roja fluorescente (RFP, del inglés *Red Fluorescent Protein*) bajo el promotor del ROSA26. El gen que codifica la RFP tiene en el extremo 5' un codón de *stop* flanqueado por dos sitios *LoxP*. La recombinasa Cre reconoce estos sitios *LoxP* y deletiona el codón de *stop*, lo que permite la síntesis de la proteína RFP. Tras el cruce con el modelo de ratón *K14-Cre*; *Brca1^{flf} P53^{flf}* algunas de las células epiteliales que expresan *K14* pierden los exones *floxeados* de los dos alelos de *Brca1* y *P53*, y también se remueve el codón de *stop* y expresan RFP, emitiendo fluorescencia roja. El porcentaje de células epiteliales de la glándula mamaria que pierden *Brca1* y *P53* y emiten fluorescencia es del 5 al 30%. A partir de ahora, se denominará modelo RFP+.

1.2. Grupos de estudio

Los ratones se dividieron en diferentes grupos de estudio:

- Nulíparas: ratones hembra que no tuvieron ningún embarazo.
- Múltiparas con lactancia: ratones hembra que tuvieron dos embarazos con sus respectivos periodos de lactancia. Estos ratones fueron puestos en cruce a las 6 semanas de edad. La duración del embarazo en el ratón es de 21 días, seguidos de 21 días adicionales de periodo de lactancia.
- Nulíparas tratadas con pasireotide: ratones hembra que no tuvieron embarazo. Se comenzó a administrar pasireotide a las ocho semanas de edad; después de esa primera dosis, las siguientes fueron cada 28 días.
- Múltiparas con lactancia tratadas con pasireotide: ratones hembra que tuvieron dos embarazos consecutivos con sus respectivos periodos de lactancia. Entre los siete y diez días después del segundo periodo de lactancia, comenzaron el tratamiento con pasireotide. Después de la primera dosis, las siguientes fueron cada 28 días.

Los estudios realizados en el modelo de ratón *ErbB2/Neu* únicamente se llevaron a cabo en nulíparas con y sin tratamiento, ya que, como se ha indicado en su descripción, el embarazo exacerba la latencia y el comportamiento tumoral por la inducción del transgén por hormonas del embarazo. Obviamente, ello dificulta los estudios de protección frente al cáncer de mama mediada por el embarazo. Sin embargo, los estudios con los modelos *Brca1/P53* y RFP+, fueron realizados tanto en los grupos de nulíparas como de múltiparas; todos ellos, con y sin tratamiento, bajo las pautas descritas anteriormente.

Los grupos de estudio se dividieron en dos cohortes con diferente evolución temporal denominadas cohorte longitudinal y transversal.

- La **cohorte longitudinal** la formaron ratones tratados y sin tratar, en los que se evaluó (i) la susceptibilidad al cáncer de mama y (ii) su posterior evolución. Por lo que en esta cohorte se determinaron: a) variables o patofenotipos de susceptibilidad y evolución tumoral (ver apartado 1.4. de material y métodos) y b) variables moleculares y celulares, asociadas a la susceptibilidad y evolución de la enfermedad, y que podrían estar implicadas en el diferente comportamiento de esta.

Material y métodos

Los ratones fueron sacrificados cuando el tumor de mama alcanzó 25 mm en su diámetro mayor, si un tumor de piel superó 1 cm de diámetro, o cuando el deterioro del ratón era evidente y obligó a su sacrificio. Entre los signos de deterioro se incluyen adelgazamiento con pérdida del 25% del peso inicial, erizamiento del pelo, taquipnea, o ulceración de los tumores. Los grupos que formaron esta corte fueron: (i) nulíparas *Brca1/P53* (N=35); (ii) nulíparas *Brca1/P53* tratadas con pasireotide (N=33); (iii) multíparas con lactancia *Brca1/P53* (N=32); (iv) multíparas con lactancia *Brca1/P53* tratadas con pasireotide (N=35); (v) nulíparas *ErbB2/Neu* (N=28) y (vi) nulíparas *ErbB2/Neu* tratadas con pasireotide (N=32) (**Figura 5**).

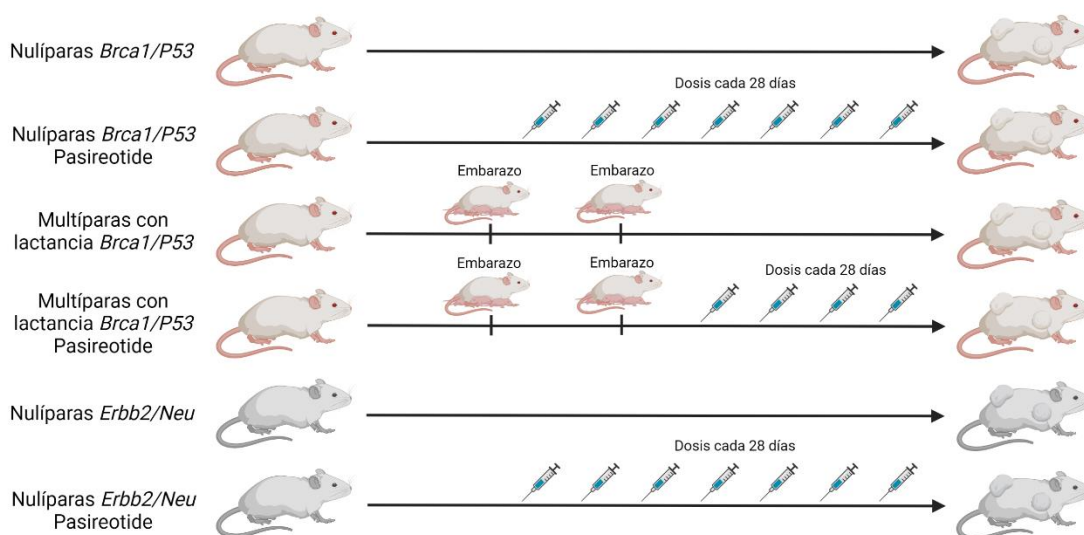


Figura 5. Esquema representativo de la cohorte longitudinal. Se indican los seis grupos de ratones de los modelos *Brca1/P53* y *ErbB2/Neu*, en las que se evaluó la susceptibilidad al cáncer de mama y su posterior evolución. Figura creada con BioRender.

- La **cohorte transversal** se generó para estudiar los diferentes parámetros moleculares y celulares que pudieran estar implicados en la protección frente al cáncer de mama, pero sin estar influidos por la edad. Por ello, todos los ratones de esta cohorte fueron sacrificados a la misma edad. Así, los ratones nulíparas se sacrificaron a los 160 – 170 días de vida; y los ratones multíparas con lactancia, se sacrificaron 60 días después de finalizar el segundo embarazo con su correspondiente periodo de lactancia (**Figura 6**). El número de ratones que formaron los grupos de la cohorte transversal, tanto en régimen de tratamiento como sin él, fue de 5 a 10 animales por grupo.

Los animales fueron estabulados en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca, bajo condiciones libres de patógenos (SPF). Las prácticas a las que fueron sometidos están amparadas por el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Ganadería sobre la “Protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos”, de acuerdo con las disposiciones de la Unión Europea. El proyecto fue evaluado positivamente por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca (número de referencia 0000486).

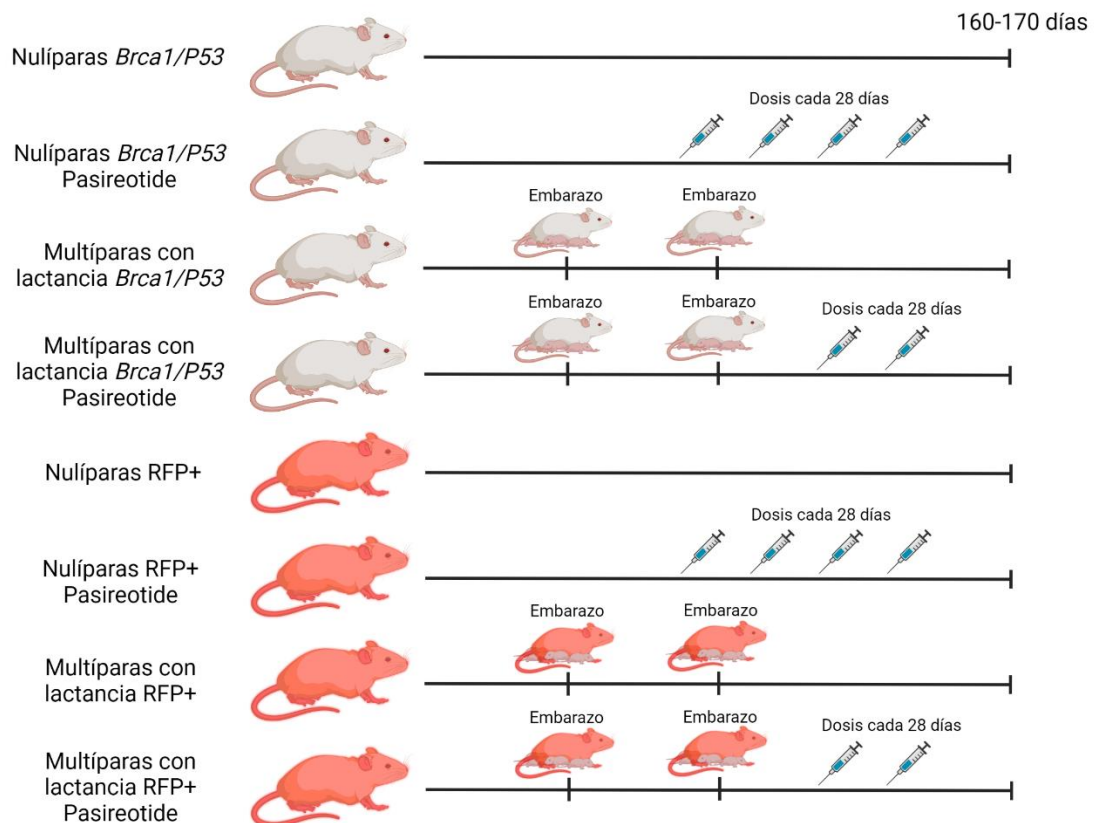


Figura 6. Esquema representativo de la cohorte transversal. Se muestran los ocho grupos evaluados de los modelos de ratón *Brca1/P53* y *RFP+* sacrificados todos ellos a la misma edad (160-170 días). Figura creada con BioRender.

1.3. Preparación y administración del fármaco

El fármaco Pasireotide-Long Administration Release (Pasireotide-LAR o Signifor-LAR), generosamente cedido por Novartis, se administró por vía subcutánea a una dosis de 40 mg/Kg cada 28 días, a una concentración del fármaco de 20 mg/ml²⁶⁰. El fármaco se diluyó en un excipiente complejo, cada mililitro de diluyente se compone de 45 mg de D-manitol (#M4125, Sigma-Aldrich), 7 mg de carboximetilcelulosa sódica (#21902-100G, Sigma-Aldrich) y 4 mg de poloxámero 188 (Kolliphor® P188, #15759-1KG,

Material y métodos

Sigma-Aldrich), disueltos en agua destilada²⁶¹. Para la preparación del diluyente, se llevó agua destilada a ebullición y se añadió poco a poco la carboximetilcelulosa sódica, que se fue diluyendo lentamente. Una vez disuelta la carboximetilcelulosa sódica, se añadieron el D-manitol y el poloxámero 188, mientras se encontraba en agitación continua. Posteriormente, se alicuotó el diluyente en tubos de 1.5 ml y se almacenó a 4°C.

Previamente a la administración del fármaco, los ratones se pesaron para calcular la dosis de fármaco que debían recibir. La administración de este fue por vía subcutánea con una jeringuilla y aguja estériles (*ICO plus 3 Tuberculina 0.5 x 16, #N14085, Peroxfarma*), bajo anestesia con isoflurano (*Vetflurane®*, #575837-4, *Virbac*).

1.4. Evaluación de la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama

Los ratones de los distintos grupos de la cohorte longitudinal fueron revisados dos veces por semana. Se valoró su estado físico, así como la aparición de nuevos tumores de mama mediante la palpación. A partir de la detección del tumor, se evaluó su crecimiento semanal, midiendo con un calibre digital el diámetro mayor y el diámetro menor.

Se consideraron distintos patofenotipos para caracterizar la susceptibilidad y la evolución de la enfermedad. Se distinguió entre patofenotipos temporales y propiamente tumorales.

Patofenotipos temporales:

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

Patofenotipos tumorales:

- *Incidencia tumoral*: definida como el porcentaje de ratones de un grupo que desarrollaron tumor de mama con respecto al total de animales de ese grupo.

- *Multiplicidad tumoral*: es el porcentaje de animales que desarrollan dos o más tumores de mama, con respecto al total de ratones que desarrollaron tumor.
- *Número de tumores*: es el número de tumores de mama que desarrolla un ratón.
- *Tasa de crecimiento tumoral*: se obtiene del valor de la pendiente de la recta que se ajusta a la curva de crecimiento tumoral. Esta curva se generó tras representar el logaritmo en base 10 del volumen tumoral en el eje de ordenadas, y el tiempo en el eje de abscisas de cada medida. El valor de la pendiente se normalizó por el promedio de los logaritmos. El cálculo del volumen tumoral se obtuvo con la fórmula clásica²⁶²:

$$\text{Volumen tumoral} = \frac{\text{Diámetro mayor} \times \text{Diámetro menor}^2}{2}$$

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

2. Obtención y procesamiento de tejidos

2.1. Necropsia y extracción de tejidos

En todos los grupos de la cohorte longitudinal anteriormente descritos, los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron 25 mm en su diámetro mayor. No obstante, si el animal mostraba signos de deterioro físico o de enfermedad avanzada (como taquipnea, pelo erizado, pérdida del 25% del peso inicial o ulceración de tumor), se sacrificó antes de alcanzar la medida establecida. En el caso de los animales destinados a la cohorte transversal, el sacrificio se realizó en la fecha convenida. La eutanasia de los ratones se realizó mediante el método de dislocación cervical precedida de anestesia con isoflurano (*Vetflurane*®, #575837-4, *Virbac*). Este es un

Material y métodos

método de sacrificio no doloroso y que no produce cambios en los órganos de estudio; genera una pérdida de conciencia del animal, seguida de una parada cardiorrespiratoria. La eutanasia se llevó a cabo en habitaciones donde no se encontraban otros ratones estabulados, y siempre alejados del resto de animales de experimentación.

Posteriormente, la necropsia se llevó a cabo con el material quirúrgico necesario debidamente esterilizado (pinzas, tijeras quirúrgicas, bisturí...). Del animal se extrajeron las mamas, de las que la cuarta mama inguinal derecha se destinó a estudios histopatológicos. Para ello, se incluyó en un casete y se fijó en paraformaldehído al 3.7% tamponado con metanol (#29121100, *PanReac AppliChem*), para su posterior inclusión en parafina. El resto de las mamas se destinaron a la obtención de organoides (protocolo que se detalla más adelante). A continuación, se llevó a cabo la apertura del abdomen y de la caja torácica para la evaluación y extracción del hígado, bazo, páncreas, riñones, corazón y pulmones. Los pulmones se fijaron durante 24 horas en paraformaldehído para su posterior revisión de posibles hallazgos metastásicos. El resto de los órganos se diseccionaron, y se destinó una porción para estudios histopatológicos, fijándolos con paraformaldehído; la parte restante de los órganos se congeló de forma inmediata con nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C.

2.2. Procesamiento de los tejidos

Para su correcta fijación, los órganos estuvieron 24 horas inmersos en paraformaldehído al 3.7%, tamponado con metanol, a temperatura ambiente. Posteriormente, se cambiaron las muestras a una solución de etanol al 70%, a 4°C, donde se conservaron hasta su tallado.

La técnica del tallado de muestras histopatológicas consiste en seccionar y orientar de forma correcta las muestras para su posterior visualización al microscopio. El corte realizado debe ser lo más representativo posible de toda la muestra. Por ello, cada órgano requiere un tallado diferente; sin embargo, órganos como la mama o el páncreas, no requirieron de un tallado previo, se estiraron y orientaron correctamente, incluyéndolos enteros en parafina. En cambio, órganos como el bazo, corazón o riñones, fueron seccionados longitudinalmente, con ayuda de pinzas y bisturí. Otros órganos de mayor tamaño, y/o compuestos, como son los pulmones y el hígado, primero fueron separados en sus diferentes lóbulos y, posteriormente, se cortaron en secciones representativas de los diferentes lóbulos. En el caso de los tumores, se

realizaron secciones longitudinales de los mismos, para poder incluir la mayor área de tejido posible. Una vez tallados los órganos, se introdujeron en un casete histopatológico para su fijación e inclusión en parafina.

El proceso de fijación del tejido se realizó en un procesador automático (*Excelsior™ ES Tissue Processor, # A78400006, Thermo Scientific™*). Este aparato incluye una serie de fases con diferentes reactivos (descritos en la **Tabla 1**), donde, primeramente, la muestra es deshidratada y el agua es sustituida por una serie de alcoholes, con concentraciones crecientes progresivas. Finalmente, los alcoholes son sustituidos por parafina, quedando los intersticios de los tejidos fijados y el órgano endurecido en su totalidad.

Las técnicas histopatológicas se llevaron a cabo en el Servicio de Patología Molecular Comparada y en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca.

Tabla 1. Fases del proceso de inclusión de los tejidos en parafina, realizado en un procesador automático.

Proceso	Reactivo	Tiempo
Fijación	Formol	30 minutos
Deshidratación	Alcohol 70%	1 hora
	Alcohol 80%	1 hora
	Alcohol 90%	1 hora
	Alcohol 100%	3 horas
Aclaramiento	Xileno	3 horas
Inclusión	Parafina	4 horas

Una vez concluido el procesamiento de las muestras, éstas se extrajeron del procesador y se llevaron a una estación de inclusión en parafina. En ella, mediante unos moldes y un dispensador de parafina caliente, se construyó un bloque de parafina que incluye el órgano, correctamente orientado, para su posterior corte con el microtomo.

Cuando se obtuvo un bloque de parafina completamente frío y lo suficientemente sólido, se realizaron cortes del tejido de 2 µm de grosor, mediante un microtomo manual de rotación (*Leica RM2255*). Se seleccionaron los dos o tres mejores cortes y se introdujeron en un baño con agua a 50°C, para estirar el fragmento cortado y facilitar la adherencia de las muestras en el portaobjetos.

2.3. Tinción con hematoxilina – eosina

La tinción con hematoxilina y eosina es una de las técnicas más habituales de tinción de tejidos en cortes histopatológicos. Es usada de forma rutinaria en investigación y en la clínica, por su utilidad, sencillez y bajo coste. La hematoxilina es un compuesto catiónico que tiñe de color azul las estructuras ácidas, como son los núcleos. La eosina tiene naturaleza aniónica y tiñe de color rosáceo los componentes básicos, como el citoplasma celular.

Esta tinción se llevó a cabo en todos los órganos y tumores recogidos, mediante la batería de tinción manual, siguiendo el protocolo de tiempos y reactivos mostrados en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Fases del protocolo de tinción con hematoxilina y eosina.

Proceso	Reactivo	Tiempo
Desparafinado	Histoclear 1	5 minutos
	Histoclear 2	5 minutos
	Histoclear 3	5 minutos
	Histoclear (50%) + Alcohol 100% (50%)	5 minutos
Rehidratación	Alcohol 100%	5 minutos
	Alcohol 90%	5 minutos
	Alcohol 80%	5 minutos
	Agua destilada	5 minutos
Tinción	Hematoxilina de Harris	10 minutos
	Agua destilada (lavado)	20 minutos
	Eosina 0,5% + ácido acético	30 segundos
Deshidratación	Agua destilada	25 segundos
	Alcohol 80%	25 segundos
	Alcohol 90%	25 segundos
	Alcohol 100%	25 segundos
	Histoclear (50%) + Alcohol 100% (50%)	25 segundos
	Histoclear	25 segundos
	Histoclear	25 segundos
	Histoclear	25 segundos

Una vez finalizado el proceso de tinción, se montaron las muestras añadiendo una gota de fijador no acuoso, DPX (#100579, Merck Millipore), que es una resina acrílica con base de xileno que se seca rápidamente y no decolora. Sobre ella se coloca un cubreobjetos de tamaño acorde con el de la muestra.

3. Protocolos generales de los estudios *in vivo*

3.1. Extracción de DNA de tejidos

Para la extracción de DNA de tejidos, previamente, se hizo una digestión con proteinasa K. Así, a cada muestra se añadieron 500 µl de buffer de lisis (Tris 1 M a pH 8, ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M, SDS 10% y NaCl 5 M) y 2 µl de proteinasa K (20 mg/ml) (#3115879001, Roche), y se incubó a 55°C toda la noche. La proteinasa K es una proteasa endolítica que degrada las proteínas unidas al DNA, reduciendo así las contaminaciones y protegiendo los ácidos nucleicos de la acción de las nucleasas.

Después, se añadieron a cada muestra 500 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) (#136112-00-0, Sigma-Aldrich), se mezcló y se pasó todo el volumen a un tubo que contiene una matriz en fase gel (*Phase Lock Gel*, #2302800, 5 Prime). Posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm, para separar la fase acuosa con el DNA de la fase orgánica, que contiene las proteínas y las sustancias insolubles, que quedan atrapadas en la matriz gelificada del fondo. Seguidamente, se añadieron 500 µl de cloroformo (#1024451000, Sigma-Aldrich) y se mezcló el contenido para eliminar restos de fenol residual de la fase anterior. Se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm, se recogió el sobrenadante y se precipitó el DNA en un volumen de 1 ml de isopropanol (#33539, Honeywell Riedel-de-Haen). En esta fase se suele visualizar el DNA en forma de "ovillo". Después, cada muestra se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm y se decantó el sobrenadante con precaución, para no perder la muestra. A continuación, se lavó el pellet de DNA con 500 µl de etanol al 70%, para eliminar las sales concentradas que precipitan junto al DNA. Por último, se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 12000 rpm. Tras eliminar el sobrenadante y dejar que se evaporase el etanol residual, se resuspendió el DNA en 100 µl de buffer TE (Tris 100 mM a pH 8, EDTA 1 mM) y se homogeneizó durante al menos 1 hora en agitación orbital a temperatura ambiente.

3.2. Extracción de RNA de tejidos

Antes de la extracción de RNA, se limpió el área de trabajo con un producto específico que elimina las RNasas, *RNase Exitus Plus* (#A71530500, PanReac AppliChem). A continuación, se seccionó el tejido almacenado a -80°C, en fragmentos de 5 a 30 mg. Para la extracción de RNA, se usó el *kit* comercial *Qiagen miRNeasy Mini Kit*

Material y métodos

(#217004, Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento de muestra congelado se introdujo en un tubo con esferas de cerámica (*Precellys Lysing Kit*, #P000918-LYSK0-A, Bertin Technologies) para triturar el tejido. Además, al tubo se añadieron 700 µl de Qiazol (#1023537, Qiagen). El tejido se trituró en un homogeneizador (*FastPrep 24™ 5G*, #116005500, MP Biomedicals), dando dos pulsos de intensidad 5.5 de 10 segundos de duración cada uno. El homogeneizado se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente; seguidamente, se añadieron 140 µl de cloroformo y se agitó la muestra vigorosamente durante 15 segundos. El resultado fue una mezcla homogénea de color rosáceo que se dejó reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente. Después, se centrifugó la mezcla durante 15 minutos a 12000 rpm y a una temperatura de 4°C, separando así la fase acuosa (sobrenadante) de la fase orgánica que quedó en el fondo. Se pasó la fase acuosa, con cuidado de no transferir la interfase, a un nuevo tubo de 1.5 ml libre de RNasas (#20170-038, VWR) al que se le añadieron 525 µl de etanol al 100%. Se mezcló la muestra y se pasó a una columna, incluida en el *kit* de extracción, que retiene el RNA. Se centrifugó durante 15 segundos a 12000 rpm y, tras la centrifugación, se eliminó el líquido recogido por el tubo colector de la columna. Seguidamente, se añadieron 700 µl de *buffer* RWT a la columna, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 segundos y se desechó el líquido almacenado en el tubo colector. A continuación, se hicieron dos lavados con 500 µl de *buffer* RPE, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 segundos el primer lavado y durante 2 minutos el segundo. Tras los dos lavados, se cambió la columna a un tubo de 2 ml (*Eppendorf*) y se centrifugó a máxima potencia (≥ 12000 rpm) durante 1 minuto. Se cambió la columna a un tubo de 1.5 ml libre de RNasas (#20170-038, VWR), donde después quedaría almacenada la muestra, se añadieron 37 µl de agua libre de RNasas a la columna, dejándolo reposar durante 2 minutos, para favorecer la dilución del RNA en el agua, y se centrifugó el tubo durante 1 minuto a 12000 rpm. A partir de ese momento, el RNA se manejó siempre en hielo, hasta ser almacenado en un congelador a -80°C .

3.3. Cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos

Una vez extraído el DNA o RNA de las muestras, se cuantificó su concentración y pureza mediante la medición de la absorbancia a 230, 260 y 280 nm de longitud de onda con un microespectrofotómetro *Nanodrop ND-1000*. Las *ratios* entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm, y entre 260 nm y 230 nm, se usaron como indicadores de pureza de la muestra. Así, valores cercanos o mayores de 2 de la *ratio*

260/280, tanto en RNA como en DNA; y valores mayores de 2 en el RNA y de 1.8 en el DNA de la *ratio* 260/230, indican que los ácidos nucleicos son de la pureza adecuada para llevar a cabo los estudios subsiguientes.

4. Protocolos específicos de los estudios *in vivo*

4.1. Genotipado de los ratones

4.1.1. Detección de los alelos recombinados de *Brca1* y *P53*, de la presencia del transgén citoqueratina 14-Cre y de la RFP mediante PCR

Para identificar la delección de los genes *Brca1* y *P53* en el modelo de ratón *Brca1/P53*, se realizaron cinco reacciones de PCR en el DNA extraído de la cola. Para ello, se cortó un pequeño fragmento de cola (3-4 mm) en el momento del destete, para lo que se utilizó un sistema de calor (*Hot bead sterilizer*, #18000-45, F.S.T.) que permite de forma simultánea la hemostasia, esterilidad y cauterización en el momento del corte.

Una vez realizada la extracción del DNA de cola, se determinó la presencia del transgén K14-Cre-recombinasa, mediante la detección de la secuencia del promotor de la K14; y de los alelos salvajes (wt) y delecionados (ko) de *Brca1* y *P53*. Para identificar los alelos salvajes, se diseñaron oligonucleótidos específicos de regiones próximas a los sitios *LoxP*, localizados en el intrón 3 de *Brca1* (*Brca1-int3-fwd* y *Brca1-int3-rev*) y en el intrón 10 de *P53* (*P53-int10-fwd* y *P53-int10-rev*). Para identificar el alelo delecionado de *Brca1*, se utilizó el oligonucleótido *forward* (*Brca1-int3-fwd*) de la anterior reacción, con un nuevo oligonucleótido *reverse* (*Brca1-int13-rev*), situado en el intrón 13. En el caso de *P53*, se utilizó el oligonucleótido *reverse* (*P53-int10-rev*) de la reacción anterior, con un nuevo oligonucleótido *forward* (*P53-int1-fwd*) en el intrón 1. Cuando no hay delección, esta segunda reacción no se puede producir porque el fragmento a amplificar es demasiado grande, y sólo hay producto de la amplificación cuando se han perdido los exones situados entre los sitios *LoxP* de cada gen (**Figura 7**).

En el modelo de ratón RFP, además, se identificó la presencia del gen *RFP* con otras dos reacciones, una frente al alelo wt y otra frente al alelo que contiene el *knock-in*, siguiendo la misma estrategia usada para identificar los alelos de *Brca1* y *P53*.

Material y métodos

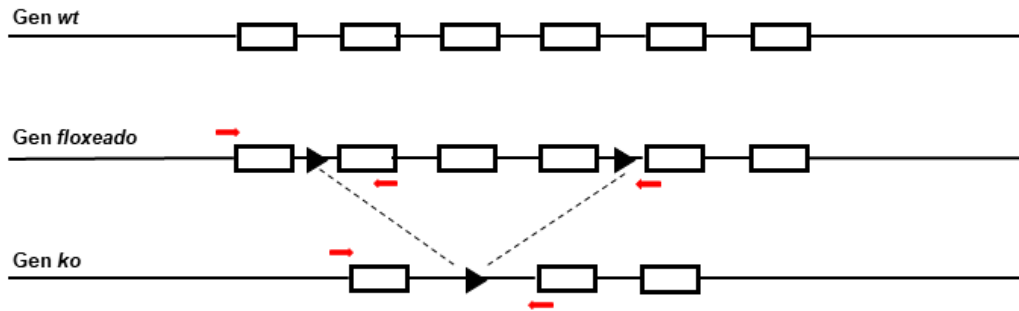


Figura 7. Esquema conceptual de la delección de *Brca1* y de *P53*, y su detección por PCR. Las líneas representan los intrones y las cajas los exones. Los triángulos negros indican los sitios LoxP. Las flechas rojas señalan la zona de reconocimiento de los oligonucleótidos.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron las siguientes:

K14Cre-fwd: 5'-ACCCGAGCACCTTCTCTTCAC-3'

K14Cre-rev: 5'-CATCACTCGTTGCATCGA-3'

Brca1-int3-fwd: 5'-TATCACCACTGAATCTCTACCG-3'

Brca1-int3-rev: 5'-GACCTCAAACCTCTGAGATCCAC-3'

Brca1-int13-rev: 5'-TCCATAGCATCTCCTTCTAAAC-3'

P53-int1-fwd: 5'-CACAAAAACAGGTTAAACCCAG-3'

P53-int10-fwd: 5'-AAGGGGTATGAGGGACAAGG-3'

P53-int10-rev: 5'-GAAGACAGAAAAGGGGAGGG-3'

RFP-HL15-fwd: 5'-AAGACCGCGAAGAGTTTGTCC-3'

RFP-HL54-fwd: 5'-TAAGCCTGCCCAGAAGACTCC-3'

RFP-HL154-rev: 5'-AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA-3'

En todos los casos anteriores, para la reacción de PCR se mezclaron 1 μ l del DNA obtenido de cola (50 ng), 2 μ l de oligonucleótidos específicos *forward* y *reverse* (5 μ M), 2 μ l de dNTPs (2.5 mM) (#20.031-4179, *Biotech*), 2 μ l de buffer 10x, 0.6 μ l de $MgCl_2$ (50 mM), 0.12 μ l de Taq polimerasa (5 U/ μ l) (*NZYTaq II DNA polymerase*, #MB35401, *Nzytech*) y 10.28 μ l de H_2O .

A continuación, la reacción de PCR para detectar *K14-Cre*, *Brca1* y *P53* se realizó con el siguiente programa de ciclos de temperatura: 94°C durante 2 minutos; 30 ciclos, cada uno de ellos compuesto por los tres pasos siguientes: 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 50 segundos; y, por último, un ciclo único de 72°C, durante 5 minutos.

En el caso de la detección del gen *RFP*, el programa de PCR fue: 95°C durante 5 minutos; 35 ciclos, cada uno de ellos compuesto por tres pasos de: 94°C durante 10 segundos, 62°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos; y, por último, 72°C durante 5 minutos.

Posteriormente, el producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, marcado con *Midori Green* (#MB13201, *Nzytech*), un intercalante del DNA no tóxico, que emite luz visible cuando recibe luz ultravioleta. Por último, para conocer el resultado del genotipado de los ratones, el gel se fotografió bajo luz ultravioleta.

4.1.2. Detección del transgén *MMTV-ErbB2/Neu* mediante PCR

Para identificar los ratones que portaban el transgén *MMTV – ErbB2/Neu* en su genoma, se realizó una PCR de DNA extraído de la cola del ratón, obtenida como se detalla en la sección previa, 4.1.1.

La mezcla utilizada en cada reacción de PCR fue: 1 µl del DNA extraído de la cola (50 ng), 2 µl de oligonucleótidos específicos *forward* y *reverse* (5 µM), 2 µl de dNTPs (2.5 mM) (#20.031-4179, *Biotools*), 2 µl de buffer 10x, 0.8 µl de MgCl₂ (50 mM), 0.12 µl de Taq polimerasa (5 U/µl) (*NZYTaq II DNA polymerase*, #MB35401, *Nzytech*) y 10.08 µl de H₂O.

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

MMTV-Neu-fwd: 5'-TTTCCTGCAGCAGCCTACGC-3'

MMTV-Neu-rev: 5'-CGGAACCCACATCAGGCC-3'

El programa de PCR que se utilizó fue: 94°C durante 5 minutos; después, 12 ciclos compuestos cada uno de ellos por los 3 pasos siguientes de 94°C durante 20 segundos, 64°C durante 30 segundos (en cada ciclo, esta temperatura de anillamiento fue descendiendo 0.5°C, desde los 64°C hasta los 58°C), y 72°C durante 35 segundos; después, el programa continuó con 25 ciclos, cada uno de ellos incluyó los tres pasos siguientes: 94°C durante 20 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 35 segundos; por último, se añadió un último paso de 72°C durante 5 minutos, para completar la extensión de los fragmentos amplificados.

A continuación, el producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con *Midori Green* (#MB13201, *Nzytech*), para ver el resultado a través de un transiluminador con luz ultravioleta.

4.2. Obtención de organoides derivados de mamas de ratón

Para obtener una suspensión enriquecida en células epiteliales de mama de ratón, de las que obtener RNA y proteínas, se obtuvieron organoides de mamas de ratón ²⁶³. Para ello, una vez extraídas las mamas en la necropsia del ratón, éstas fueron disgregadas mecánicamente mediante cortes con dos bisturís. Seguidamente, se incubaron en un volumen de 10 ml de medio suplementado (DMEM/F12 (50%/50%), 5% de suero bovino fetal y 1% de penicilina/estreptomicina); al que se añadieron 1.25 ml de colagenasa (6000 U/ml) (#C2674, *Sigma-Aldrich*), enzima proteolítica obtenida de *Clostridium histolyticum*, que degrada el colágeno; y 1 ml de tripsina, al 2.5% (#15090046, *ThermoFisher Scientific*), enzima que hidroliza los enlaces peptídicos de las proteínas. La digestión enzimática se realizó durante 30 minutos a 37°C, en agitación orbital a 100 rpm. Tras la incubación, se centrifugó cada muestra durante 5 minutos a 1200 rpm a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se obtuvieron tres fases: la superior, enriquecida en grasa derivada de las mamas; la intermedia, más acuosa; y, por último, en el fondo, el pellet sólido, donde se encuentran los organoides. Mediante el aspirado con una bomba de vacío se eliminaron las dos primeras fases, dejando únicamente el pellet.

Al pellet obtenido se le añadieron 4 ml de PBS suplementado con un 2% de suero bovino fetal y 119 µl de DNasa (676 U/ml) (#DN25, *Sigma-Aldrich*). Se disgregó el pellet agitándolo cuidadosamente y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm a temperatura ambiente. Finalizada la centrifugación, se aspiró el sobrenadante y se realizaron tres lavados con 4 ml de PBS frío, suplementado con suero bovino fetal al 2%, dando un pulso de 1500 rpm durante 5 segundos y decantando el sobrenadante entre los lavados. Por último, se añadió 1 ml de PBS suplementado frío y se repartió en dos tubos de 1.5 ml libre de RNasas, que se centrifugaron durante 5 minutos a 2200 rpm a una temperatura de 4°C. Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante con una pipeta P200 y se congeló el pellet de forma rápida con nitrógeno líquido.

4.3. Disociación de las mamas y evaluación de las subpoblaciones epiteliales de la glándula mamaria mediante citometría de flujo

Una vez extraídas las mamas del ratón, se incubaron en un tubo de 50 ml (*Falcon*, #352070, *ThermoFisher Scientific*) con 9 ml de medio DMEM/F-12 (#11554546, *ThermoFisher Scientific*), 500 µl de colagenasa (6000 U/ml) (#C2674, *Sigma-Aldrich*) y 500 µl de hialuronidasa (2000 U/ml) (#H3506, *Sigma-Aldrich*), a una temperatura de

37°C durante 16 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se disgregaron los restos de tejido mediante pipeteo durante 30 segundos, y se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 350 g y a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet formado en 2 ml de *buffer* ACK (*ACK Lysing Buffer, #A10492-01, ThermoFisher Scientific*) para lisar los eritrocitos presentes en la muestra. Se incubó la muestra disgregada en el *buffer* ACK durante 5 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se centrifugó a 350 g durante 5 minutos. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se añadió 1 ml de tripsina (*Trypsin-EDTA 0.25% phenol red, #25200056, ThermoFisher Scientific*) a 37°C. Se resuspendió el pellet mediante pipeteo durante 2 minutos. Después, se añadieron 10 ml de solución salina (*Gibco HBSS, #14025-092, ThermoFisher Scientific*) suplementada con tampón HEPES 10 mM (*#15630106, ThermoFisher Scientific*) y 2% de suero bovino fetal que, en este contexto, mejora la viabilidad celular y detiene el efecto de la tripsina. Posteriormente, cada muestra se centrifugó durante 5 minutos a 350 g, a temperatura ambiente. A continuación, se descartó el sobrenadante y se añadió 1 ml de la solución salina tamponada (llamada HF, a partir de ahora) y 100 µl de DNasa (676 U/ml) (*#DN25, Sigma-Aldrich*) precalentada a 37°C; se pipeteó cuidadosamente durante 1 minuto durante la acción de la DNasa y, después, se añadieron 5 ml de HF frío, para detener la acción de la DNasa. Se filtró la mezcla a través de un filtro de 40 µm (*Cell Strainer, #352340, Corning*) y se lavó con 5 ml de HF frío. Se centrifugó durante 5 minutos a 350 g, a 4°C de temperatura y se eliminó el sobrenadante tras la centrifugación.

Posteriormente, se resuspendió el pellet en 5 ml de HF frío y se distribuyó en tubos de citometría con filtro de 35 µm. Así, 4/5 de la muestra se destinaron para el inmunomarcaje y el 1/5 restante se destinó como control sin marcar. Cada muestra se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm a 4°C y después se decantó el sobrenadante. Se añadieron 52 µl de solución de bloqueo, formada por 50 µl de HF y 2 µl de anticuerpo anti-CD16/CD32 (*#MO16PU (V500), ImmunoStep*), se aplicó un vórtex suave y se incubó durante 10 minutos a 4°C. A continuación, se añadieron 50 µl de solución de inmunomarcaje (cuya composición de anticuerpos está detallada en la **Tabla 3**) al tubo del estudio y 50 µl de HF al tubo control.

Después, cada muestra se mezcló con un vórtex suave y se incubó durante 30 minutos en oscuridad y a una temperatura de 4°C. Tras la incubación, se añadieron 4 ml de HF frío a cada tubo y se centrifugó cada muestra durante 5 minutos a 1200 rpm a 4°C. Después, se descartó el sobrenadante y se añadieron 100 µl de HF frío a cada tubo, que se mantuvo en oscuridad y a 4°C, hasta el momento de la adquisición en el

Material y métodos

citómetro. Antes de la adquisición, se añadió 1 µl de marcador de viabilidad, *Dye eFluor™ 506* (#65-0866-14, *Invitrogen*). Por último, se adquirieron las muestras en el citómetro *LSR Fortessa X-20 Cell Analyser* (*BD Biosciences*) del Servicio de Citometría de la Universidad de Salamanca. Este citómetro es capaz de detectar hasta 20 marcadores de manera simultánea. El análisis posterior de los datos se realizó con el programa *FlowJo V10* (*Treestar, California*).

Tabla 3. Lista de anticuerpos de la solución de inmunomarcaje.

Anticuerpo	Fluorocromo	Dilución	Casa comercial	Referencia
CD45	FITC	1:100	BD Biosciences	553080
CD140	FITC	1:100	Invitrogen	11-1401-82
CD31	FITC	1:100	BD Biosciences	553372
Ter119	FITC	1:100	BD Biosciences	557915
CD49f	APC	1:100	eBioscience	17-0495-80
CD29	APC – Cy7	1:100	BioLegend	102226
CD61	BV421	1:100	BD Biosciences	566227
Sca1	PerCP – Cy5	1:100	Invitrogen	45-5981-80
EpCAM	PE – Cy7	1:200	InmunoStep	M326PC7

4.4. Detección mediante inmunohistoquímica de la expresión de Ki67 en mamas de ratón

La proteína Ki67 es un marcador celular de proliferación usado comúnmente en inmunohistoquímica. Esta proteína está presente en todas las fases del ciclo celular, pero ausente en las células quiescentes. Su detección a través de técnicas inmunohistoquímicas la han convertido en una herramienta muy útil para evaluar el índice de proliferación celular de un tejido. Particularmente, en cáncer de mama, se usa para la clasificación y evaluación del pronóstico, y para complementar la información a la hora de tomar decisiones terapéuticas²³.

La reacción de inmunodetección de Ki67 se realizó en el Servicio de Patología Molecular Comparada del Centro de Investigación del Cáncer. Tras la inclusión de las mamas en bloques de parafina, se realizaron cortes de 3 µm de grosor. Los cortes se “pescaron” en portaobjetos especialmente tratados para este tipo de técnicas (*Leica BOND Plus Slides, #S21.2113.A, Leica*), cargados positivamente para favorecer la adherencia de las muestras. El proceso de inmunomarcaje se llevó a cabo mediante una estación *Discovery ULTRA* de Roche. En este equipo se realiza el desparafinado de las muestras en los portaobjetos y las distintas incubaciones con los anticuerpos,

completando las reacciones de inmunohistoquímica de forma homogénea y en poco tiempo.

De forma resumida, el protocolo que desempeñó el aparato fue el siguiente: primero, se realizó el desparafinado de las muestras; para ello, se calentaron los portaobjetos a 69°C. A continuación, se realizó un acondicionamiento de las muestras, que consistió en el desenmascaramiento del epítipo, mediante la incubación de las muestras en un *buffer* que contiene TRIS 100 mM y EDTA 10 mM a pH 8, a una temperatura de 100°C durante 32 minutos. Después, de forma manual, se aplicó el anticuerpo primario (*Rabbit Anti-Human Ki-67 Monoclonal Antibody (Clone SP6), #MAD-020310Q, Master Diagnostica*) con una dilución 1:50 y se incubaron las muestras a 37°C durante 60 minutos. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron dos lavados (*Discovery Wash (RUO), #07311079001, Roche Diagnostics*). Posteriormente, se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario prediluido (*OmniMap anti-Rb HRP, #05269679001, Roche*), conjugado con peroxidasa de rábano picante, durante 16 minutos y se reveló con diaminobencidina (*ChromoMAP DAB kit, #05266645001, Roche*). Por último, se hizo una contratinción con hematoxilina, se limpiaron los portaobjetos y, de forma manual, se montó el cubreobjetos aplicando una gota de resina DPX (*#100579, Merck Millipore*).

4.5. Detección mediante inmunohistoquímica de la expresión de caspasa-3 en mamas de ratón

La caspasa-3 es una proteína de la familia de las cisteín-proteasas, vinculada directamente con la apoptosis. La expresión de esta proteína aumenta la vulnerabilidad de las células a la apoptosis, o activa por sí misma la cascada de señalización de este proceso²⁶⁴.

La inmunodetección de caspasa-3 se realizó en el Servicio de Patología Molecular Comparada del Centro de Investigación del Cáncer. Al igual que en la sección anterior, este proceso se llevó a cabo en la estación *Discovery ULTRA* de Roche. Tras el desenmascaramiento del epítipo, se aplicó de forma manual el anticuerpo primario (*Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody, #9661, Cell Signaling*) con una dilución 1:200 y se incubaron las muestras a 37°C, durante 60 minutos. Después, se realizaron los mismos pasos de lavado, incubación del anticuerpo secundario, revelado y contratinción que se detallan en la sección previa, 4.4 de material y métodos. Por último, se montó el cubreobjetos aplicando una gota de resina DPX (*#100579, Merck Millipore*).

4.6. Cuantificación del área epitelial ductal en las mamas de ratón

Para la cuantificación del área epitelial ductal, se tomaron 5 fotografías representativas de la mama (que no contuvieran sólo grasa y que excluyeran el ganglio que forma parte de la estructura habitual de la mama del ratón). Las fotografías fueron tomadas al azar de la parte distal de la mama, teñida con hematoxilina – eosina. La zona distal es la región de la mama más alejada del cuerpo del animal una vez abierto en necropsia, siendo esta zona la que se encuentra más próxima al pezón. Se seleccionó esta región por ser el área que mayor número de ductos posee, ya que, en esa zona, estos convergen hacia la luz del ducto terminal, que desemboca en el pezón. Por ello, es la zona de la mama con mayor área de tejido epitelial. Las imágenes fueron tomadas con una cámara (*Leica ICC50 HD*), acoplada a un microscopio óptico *Leica DM750*. Se tomaron 5 fotografías a un aumento de 10X en una serie de campos elegidos al azar.

Una vez tomadas las fotografías de cada mama, estas fueron analizadas con *ImageJ*. Este es un programa de procesamiento de imágenes, de dominio público, programado en *Java*, que fue desarrollado en el *National Institutes of Health* (NIH). *ImageJ* ofrece múltiples posibilidades, como la muestra y edición de imagen, su análisis y procesamiento, la creación de histogramas, gráficos o el desarrollo de *plugins* y *macros*. La evaluación del área ductal se definió como el área ocupada por tejido epitelial, junto con el estroma adyacente periductal, que está alrededor de las células epiteliales; además, se excluyó la luz ductal y el contenido de la misma. Con la herramienta de selección del programa, se eligió manualmente el área total (área de tejido epitelial más el área de la luz) y después se seleccionó el área ocupada por la luz ductal con el fin de excluirla después. Así, se obtuvo con el programa los micrómetros cuadrados (μm^2) que ambas superficies ocupaban. Finalmente, se calculó el porcentaje del componente de área ductal mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje del componente epitelial del área ductal} = \frac{\text{Área total del ducto} - \text{área de la luz y/o el contenido}}{\text{Área total de la fotografía}} \times 100$$

4.7. Cuantificación de la proliferación del componente epitelial ductal

La evaluación de la proliferación del componente epitelial ductal, se llevó a cabo mediante la cuantificación del número de células Ki67 positivas en las mamas de ratón. Para ello, se tomaron 5 fotografías del inmunomarcado de Ki67, de la región

distal de la mama, con la cámara del microscopio *Leica DM1000* a un aumento de 20X.

El procesamiento y la cuantificación de las imágenes se llevaron a cabo con el *software Leica Application Suite V3.7*. Este *software* integra la cámara digital que porta el microscopio *Leica DM1000* con una interfaz que permite capturar, procesar y analizar las imágenes. Para la cuantificación de las fotografías, primero, se asignaron en el programa los parámetros de color y forma, para lo que se diseñó un *script* para células positivas y otro para células negativas. Después, se delimitó manualmente en el monitor, la región que debía cuantificar el *software*, excluyendo el componente adiposo de la mama, y seleccionando únicamente el tejido epitelial que componía el ducto (excluyendo también la luz del mismo). Una vez aplicado el *script* de células positivas para Ki67, se generó un informe con el número de células; seguidamente, se ejecutó el *script* de células negativas, y se obtuvo un informe similar. Para obtener el número de células positivas por campo se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de células positivas} = \frac{\text{Células positivas}}{\text{Células positivas} + \text{Células negativas}} \times 100$$

4.8. Cuantificación de *P53* recombinado mediante PCR cuantitativa

Para cuantificar el alelo de *P53* recombinado en las mamas de los ratones, primero, se extrajo el DNA de los organoides generados a partir de las mamas. Después, se cuantificó la concentración y se evaluó la pureza del DNA, siguiendo los protocolos descritos anteriormente en el punto 3.3. A continuación, el DNA se diluyó a una concentración de 20 ng/μl para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (QPCR) por el método de *Sybr Green*. Esta técnica se basa en la cuantificación de la emisión de fluorescencia de moléculas de *Sybr Green*, un fluoróforo que se une al surco menor de las moléculas de DNA de cadena doble. Durante la fase de síntesis exponencial de la PCR, por cada ciclo de la reacción se duplica la cantidad de producto de PCR y, conforme va aumentando la cantidad de DNA, también aumenta la señal fluorescente (**Figura 8**).

Para llevar a cabo la detección y cuantificación del alelo de *P53* recombinado, se diseñaron dos oligonucleótidos específicos para su reconocimiento. Además de *P53* recombinado, se amplificó un gen de referencia en todas las muestras para corregir la señal obtenida en cada muestra por la carga de DNA genómico de partida. Para este

Material y métodos

fin, se empleó el gen de la *gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Gapdh)*. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados fueron las siguientes:

P53del-fwd: 5'-GAGACGGAGAAAGGGCGACT-3'

P53del-rev: 5'-CTAGAACTAGTGGATCCCCCG-3'

Gapdh-fwd: 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3'

Gapdh-rev: 5'-GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'

Para cada reacción de QPCR, se mezclaron 2 µl del DNA extraído de los organoides; 0.15 µl de cada oligonucleótido, *forward* y *reverse* (25 µM); 6 µl del *buffer* de reacción *Perfecta Sybr Green SuperMix ROX* (#95055-500, *QuantaBio*); y 3.7 µl de agua, para alcanzar un volumen de reacción de 12 µl. Las reacciones para determinar *P53* recombinado y *Gapdh* se realizaron por triplicado, en placas de 96 pocillos (*Twin-Tec real time PCR plates 96, #0030132513, Eppendorf*), cubiertas herméticamente con un adhesivo (*Optically Clear Adhesive Seal Sheets, #AB-1170, ThermoFisher Scientific*). La QPCR y la lectura de la señal se realizó en el termociclador *Mastercycler ep Realplex2 (Eppendorf)*.

El programa de QPCR consistió en una primera fase de desnaturalización del DNA de doble cadena, a 95°C durante 10 minutos. A continuación, se sucedieron 40 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales consistió en una primera fase de desnaturalización del DNA a 95°C durante 15 segundos, una fase de anillamiento a 58°C durante 30 segundos y una fase de extensión de 72°C durante 30 segundos. La fluorescencia emitida por el *Sybr Green* se midió en cada ciclo al final de la fase de extensión.

Al finalizar los 40 ciclos, se controló la especificidad de la reacción mediante el análisis de la curva de fusión (o curva de *melting*). Este análisis consiste en un aumento progresivo de la temperatura de 58°C a 95°C, mientras se monitoriza la señal de fluorescencia, para determinar la temperatura de desnaturalización del producto de PCR generado anteriormente. Esta temperatura se detecta por un descenso brusco en la señal de *Sybr Green* como consecuencia de su disociación del DNA desnaturalizado, y depende del tamaño del producto de PCR y de su secuencia. En reacciones específicas debe haber un único producto de PCR y, por tanto, un único pico de desnaturalización.

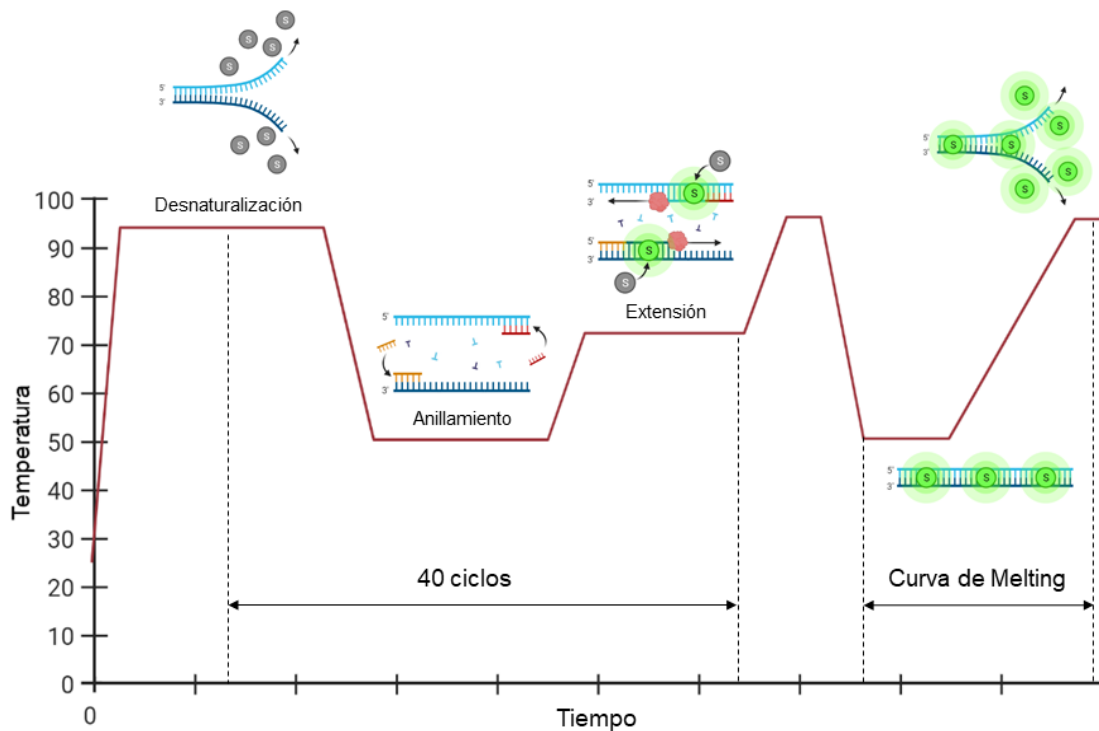


Figura 8. Representación del programa de QPCR con la curva de melting, junto con el esquema de la actuación del Sybr Green en cada fase de la QPCR.

Para el análisis de los datos se utilizó el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para estimar la cantidad relativa (*Relative Quantity* o RQ) del fragmento *P53* recombinado de cada muestra ²⁶⁵. En cada reacción se obtuvo el ciclo límite o *Ct* (*cycle threshold*), que es aquel en el que la señal originada por el producto de la reacción se diferencia del fondo. Para cada triplicado, se calculó el promedio del *Ct*. El ΔCt se calculó restando al *Ct* de *P53* recombinado, el *Ct* de *Gapdh* en cada muestra. Se llevó a cabo una normalización calculando el $\Delta\Delta Ct$, restando del ΔCt de cada muestra problema, el ΔCt de una muestra de referencia (en este caso un tumor, en el que todas las células tienen el gen *P53* deleciónado). Esta muestra se incluyó en todas las placas y permitió comparar muestras analizadas en diferentes estudios. La RQ de cada muestra se calculó aplicando la siguiente fórmula:

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

4.9. Cuantificación de la expresión de los receptores de la somatostatina mediante PCR cuantitativa

Para cuantificar la expresión de los receptores de la somatostatina (SSTRs) en las mamas de ratón, primero, se extrajo RNA de las mismas y se cuantificó como se

Material y métodos

detalla en los puntos 3.2 y 3.3 de esta sección de material y métodos. Con el RNA extraído, se procedió a la síntesis de cDNA, utilizando el *kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (#04379012001, Roche)*. Para cada reacción de síntesis de cDNA, se mezclaron 400 ng de RNA total, con 2 µl de *random hexamer primers* y agua libre de RNasas, hasta alcanzar un volumen final de reacción de 13 µl. La mezcla se incubó a 65°C durante 10 minutos, para favorecer la desnaturalización de la estructura secundaria del RNA y permitir la unión de los oligonucleótidos al RNA molde. Seguidamente, se añadieron 4 µl de *buffer* de reacción, junto con 2 µl de dNTPs (10 mM), 0.5 µl de inhibidor de RNasas (40 U/µl) y 0.5 µl de retrotranscriptasa (20 U/µl). Se sintetizó el cDNA mediante la incubación de la mezcla de forma secuencial, primero, a 25°C durante 10 minutos y, posteriormente, a 55°C durante 30 minutos, para amplificar fragmentos de hasta 4 kb. Finalmente, se realizó una incubación a 85°C durante 5 minutos, para inactivar la retrotranscriptasa.

Ya obtenido el cDNA, se procedió a cuantificar la expresión de los diferentes genes que codifican los receptores de la somatostatina mediante QPCR. Para ello, previamente se diseñaron oligonucleótidos con las secuencias específicas para reconocer los transcritos derivados de los genes de cada receptor. Además, también se incluyeron oligonucleótidos con secuencias específicas para el reconocimiento de la expresión de un gen con expresión constitutiva, el de la *gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Gapdh)*. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados fueron las siguientes:

mSSTR1-fwd: 5'-AGCAGGAAAGGAGGTAGGTGT-3'

mSSTR1-rev: 5'-GGGTAGGTGCCAGTCAAGAA-3'

mSSTR2-fwd: 5'-GGAGCGACAGTAAGCAGGAC-3'

mSSTR2-rev: 5'-CAGGGAATGGGAGACACACT-3'

mSSTR3-fwd: 5'-TATTGGCTGGGGAAGAGATG-3'

mSSTR3-rev: 5'-CAGAGTGGGCAGACTTGTGA-3'

mSSTR5-fwd: 5'-AGGGTTGTGAACTGGGTGAG-3'

mSSTR5-rev: 5'-CCATGGTTGACACCACTCTG-3'

Gapdh-fwd: 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3'

Gapdh-rev: 5'-GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'

Para cada reacción de QPCR se mezclaron 2 µl de cDNA total, previamente sintetizado; 0.15 µl de cada oligonucleótido *forward* y *reverse* (25 µM); 6 µl del *mix* de reacción *Perfecta Sybr Green SuperMix ROX* (#95055-500, *QuantaBio*); y 3.4 µl de agua, para alcanzar un volumen total de 12 µl. Las reacciones se realizaron por triplicado en una placa de 96 pocillos (*Twin-Tec real time PCR plates 96, #0030132513, Eppendorf*), cubiertas herméticamente con un adhesivo (*Optically Clear Adhesive Seal Sheets, #AB-1170, ThermoFisher Scientific*). La QPCR y la lectura de la señal se realizaron en un termociclador *Mastercycler ep Realplex2* (*Eppendorf*).

El programa de PCR incluyó una primera fase a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos formados cada uno de ellos por dos pasos; el primero, a 95°C durante 15 segundos y el segundo de 55°C durante 30 segundos que permite la fase de anillamiento. La fluorescencia emitida por el *Sybr Green* se midió en cada ciclo al final de la fase de anillamiento. Por último, se realizó el análisis de la curva de fusión (o curva de *melting*) aumentando progresivamente la temperatura desde 55°C hasta los 95°C, mientras se hacía una monitorización de la señal de fluorescencia.

El análisis de los datos se hizo mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}^{265}$; para calcular la RQ de expresión de los genes SSTR en cada muestra. El método utilizado fue el mismo que se empleó para cuantificar la recombinación de *P53*, con la diferencia de que en el cálculo del ΔCt se usaron los Ct promedio de los SSTRs, menos el Ct de la *Gadph*. Como muestra de referencia (control positivo) se utilizó cerebro de ratón.

4.10. Cuantificación de las metástasis pulmonares mediante lupa binocular

Una vez realizada la necropsia y la fijación de los pulmones en paraformaldehído durante 24 horas, se llevó a cabo el recuento de las metástasis mediante una lupa binocular de mesa (*Zeiss Stemi 2000*). Primero, se separaron los cinco lóbulos pulmonares (4 en el pulmón derecho y un único lóbulo en el pulmón izquierdo), con unas pinzas y un bisturí. Se observaron los diferentes lóbulos bajo el objetivo 10x de la lupa, y se realizó un recuento del número de metástasis de cada lóbulo. La cuantificación fue realizada por dos observadores. Seguidamente, para obtener el cálculo del número de metástasis, se realizó la media del total de las mismas vistas por cada observador. En los casos en que hubo una discrepancia de dos o más metástasis, se volvieron a evaluar hasta encontrar un consenso.

4.11. Construcción de librerías para la secuenciación de RNA mensajero

La construcción de librerías y el análisis de los datos de secuenciación de RNA mensajero fueron realizados por la empresa Novogene. De forma resumida, una vez extraído el RNA de los organoides (sección 3.2. de material y métodos), se realizó un control de calidad usando electroforesis en gel de agarosa al 1% para ver la degradación del RNA, Nanodrop para verificar la cantidad y la pureza del RNA, y cuantificación en el bioanalizador Agilent 5400 para verificar la integridad del RNA (RIN). Tras ello, se utilizó el *Kit* Epicenter Ribo-Zero rRNA Depletion (#20040526, *Illumina*) para eliminar el RNA ribosómico. El RNA total se seleccionó con poli-A, seguido de una fragmentación del RNA en fragmentos pequeños. Los fragmentos de RNA cortados se transcribieron a DNA complementario y se ligaron con adaptadores utilizando el *kit* de preparación de librerías (*NEBNext Ultra RNA Library Prep*, #E7770, *Illumina*). Tras la amplificación de los fragmentos mediante PCR, las librerías de RNA se secuenciaron en la plataforma *Illumina NovaSeq 6000 PE150*.

5. Modelo experimental *in vitro*

5.1. Líneas celulares

Para evaluar los efectos del pasireotide *in vitro*, se utilizaron cuatro líneas celulares, tres ellas obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, Maryland); y una cuarta, la línea HC11, fue una donación del Dr. Lluís Montoliú del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) de Madrid.

5.1.1. Línea celular HC11

Esta línea deriva del epitelio mamario normal de ratón. Se trata de un clon sensible a la prolactina derivado de una línea celular epitelial denominada COMMA 1D, originada en un ratón hembra BALB/c gestante. Las células HC11 responden a un cóctel de hormonas que inducen la diferenciación lactogénica y que incluye: prolactina, insulina y dexametasona o hidrocortisona. En este proceso de diferenciación lactogénica las células muestran vesículas en el citoplasma, ricas en material proteináceo y expresan proteínas de la leche como la beta-caseína²⁶⁶. Las células HC11 son utilizadas habitualmente como un modelo *in vitro* para estudiar la diferenciación lactogénica y la involución postlactancia²⁶⁷.

La línea HC11 crece en adhesión y monocapa con RPMI-1640 (#21875034, *ThermoFisher Scientific*), suplementado con un 10% de suero bovino fetal (*Gibco™ Fetal Bovine Serum*, #26140079, *Fisher Scientific*), 1% de penicilina/estreptomicina (10.000 U/ml), glutamina 200 mM (*Gibco™ L-glutamina*, #25030081, *Fisher Scientific*), 5 µg/ml de insulina (#I0516-5ML, *Sigma-Aldrich*) y 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (#RP8661, *ThermoFisher Scientific*). Para inducir la diferenciación lactogénica, se sustituyó el medio de crecimiento anterior por medio de diferenciación, formado por RPMI-1640, suplementado con un 10% de suero bovino fetal, 1% de penicilina/estreptomicina, 5 µg/ml de insulina, 5 µg de prolactina (*Recombinant Murine Prolactin*, #315-16, *PeproTech*) y 1 µg de hidrocortisona (#H0888, *Sigma-Aldrich*). Las células se mantuvieron tres días en este medio de diferenciación. Después, para conseguir un estado de postdiferenciación, se sustituyó el medio de diferenciación por su medio de crecimiento habitual, donde se matuvieron durante al menos tres días, para completar la postdiferenciación.

5.1.2. Línea celular MCF10A

Es una línea celular humana obtenida de epitelio mamario no tumoral. Estas células se aislaron de una mujer caucásica de 36 años, sin antecedentes familiares de cáncer de mama y con una lesión fibroquística mamaria benigna.

El crecimiento de esta línea celular es en adhesión y en monocapa. Fueron cultivadas en medio DMEM/F-12 (#11554546, *ThermoFisher Scientific*), suplementado con un 5% de suero de caballo (*Gibco Horse serum, heat inactivated, New Zealand origin*, #26050088, *ThermoFisher Scientific*), 1% de penicilina/estreptomicina, glutamina 200 mM (*Gibco™ L-glutamina*, #25030081, *Fisher Scientific*), 0.5 µg/ml de hidrocortisona (#H0888, *Sigma-Aldrich*), 10 µg/ml de insulina (#I0516-5ML, *Sigma-Aldrich*), 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (#RP8661, *ThermoFisher Scientific*) y 100 ng/ml de toxina colérica (*Cholera Toxin from Vibrio cholera*, #C88052, *Sigma-Aldrich*).

5.1.3. Línea celular HCC1937

Esta línea celular se aisló de un carcinoma ductal infiltrante de grado III, de una paciente caucásica de 23 años, que portaba una mutación germinal en el gen *BRCA1*. Las células fueron descritas como “triple negativas”. La línea posee mutaciones en homocigosis en 5382C de *BRCA1* y en el gen *RB1*. Además, presenta una mutación adquirida en el gen *TP53*, con pérdida de los dos alelos de tipo salvaje (*wild type*), lo

Material y métodos

que provoca la pérdida de expresión de este. También, tiene una deleción homocigótica adquirida en el gen *PTEN* y una pérdida de heterocigosidad en múltiples *loci* implicados en la patogenia del cáncer de mama²⁶⁸.

Estas células son adherentes y presentan una morfología epitelial. Se cultivaron en RPMI-1640 (#21875034, *ThermoFisher Scientific*), suplementado con un 10% de suero bovino fetal (*Gibco™ Fetal Bovine Serum*, #26140079, *Fisher Scientific*), 1% de penicilina/estreptomicina (#I0516-5ML, *Sigma-Aldrich*) y glutamina 200 mM (*Gibco™ L-glutamina*, #25030081, *Fisher Scientific*).

5.1.4. Línea celular AU565

Línea celular aislada del derrame pleural de una paciente caucásica de 43 años que padecía un adenocarcinoma de mama, que fue tratada con radioterapia, esteroides, ciclofosfamida y 5-fluorouracilo. De esta misma paciente, se aisló la línea SK-BR-3 (que no forma parte de este estudio). Las células AU565 tienen una sobreexpresión y amplificación del oncogén *HER2/NEU*, y tienen expresada la versión oncogénica de *HER3*, *HER4* y *TP53*.

Las células presentan un crecimiento adherente. El medio de cultivo empleado fue RPMI-1640 (#21875034, *ThermoFisher Scientific*), suplementado con un 10% de suero bovino fetal (*Gibco™ Fetal Bovine Serum*, #26140079, *Fisher Scientific*), 1% de penicilina/estreptomicina (#I0516-5ML, *Sigma-Aldrich*) y glutamina 200 mM (*Gibco™ L-glutamina*, #25030081, *Fisher Scientific*).

5.2. Condiciones de cultivo, mantenimiento y preservación de las células

Todas las líneas celulares fueron manejadas en campanas de cultivos en condiciones de esterilidad, cultivadas con medio suplementado en placas estériles y en incubadores que generan una atmósfera húmeda, con un 5% de CO₂ y una temperatura constante de 37°C. Periódicamente, las células fueron sembradas en una nueva placa para su expansión y/o experimentación. Para ello, se aspiró el medio de cultivo de la placa, se lavaron con PBS 1X Na⁺, se aspiró el medio de lavado y se añadió 1 ml de enzimas de disociación celular (*TrypLE™ Express*, #12604-013, *Gibco*), se incubaron entre 5 y 10 minutos (dependiendo de la línea celular y las condiciones de confluencia de la placa), se neutralizaron las enzimas con medio

completo fresco y se pasó la suspensión celular a una nueva placa de cultivo adecuada al experimento.

Para realizar los experimentos, las células se crecieron hasta alcanzar una confluencia del 70 – 80%, encontrándose en fase de crecimiento exponencial. Para almacenar las células se lavaron con PBS 1X Na⁺ y se despegaron con 1 ml de enzimas de disociación celular (*TrypLE™ Express*, #12604-013, Gibco). Una vez despegadas, se neutralizaron las enzimas de disociación celular con medio de cultivo completo y se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm. Después, se aspiró el medio y se resuspendió el pellet celular en 1 ml de medio de congelación formado por suero bovino fetal (*Gibco™ Fetal Bovine Serum*, #26140079, Fisher Scientific), con un 10% de dimetilsulfóxido (#D4540-500ML, Sigma-Aldrich). Los crioviales de células se almacenaron durante 2 horas a -20°C, después se mantuvieron a 80°C durante 24 horas y, por último, se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo. El proceso de congelación se realizó de forma lenta y progresiva, para reducir al máximo el estrés osmótico de las células.

El proceso de descongelación celular se realizó introduciendo el criovial en un baño termostático a 37°C entre 3 – 5 minutos. Después, las células se añadieron a una placa con medio completo y se diluyó el medio de congelación en el medio de cultivo, como recomienda la ATCC. La descongelación de las células se hizo con rapidez, para evitar la toxicidad del dimetilsulfóxido.

5.3. Preparación del fármaco utilizado en líneas celulares

Primero, se reconstituyó el fármaco, Pasireotide ditrifluoroacetato (#HY-79135, *MedChemExpress*), que se encontraba como polvo liofilizado. El vial contenía 1 mg de fármaco, al que se le añadieron 784.16 µl de dimetilsulfóxido como agente diluyente, obteniendo así una concentración de trabajo de 1 mM^{269,270}. A continuación, se hicieron alícuotas de trabajo de 50 µl que se almacenaron en un congelador a -80°C.

6. Protocolos generales de los estudios *in vitro*

6.1. Cuantificación de células en cámara de Neubauer

El azul tripán es un colorante derivado de la toluidina que tiñe tejidos y células muertas. Por ello, se emplea para evaluar la viabilidad celular por exclusión, ya que no

Material y métodos

tiñe las células vivas que tienen las membranas citoplasmáticas íntegras. Las células se contaron con un hemocitómetro (cámara de Neubauer). Este es un portaobjetos especializado, en el que hay una retícula grabada y donde se conoce el volumen depositado entre él y un cubreobjetos.

Para cuantificar las células, primero, se retiró el medio de cultivo de la placa con la confluencia celular óptima, se lavaron las células con PBS 1X Na⁺ y se despegaron con 1 ml de enzimas de disociación celular (*TrypLE™ Express*, #12604-013, Gibco). Cuando las células se encontraban ya en suspensión, se recogieron en 5 ml de medio de cultivo fresco.

Después, se preparó un tubo de 1.5 ml (*Eppendorf*) con 30 µl de azul de tripán (#15250061, *ThermoFisher Scientific*) y 10 µl de la suspensión celular (para obtener un factor de dilución 1:4), se homogeneizó la muestra y se colocaron 10 µl de la mezcla en cada una de las dos cámaras del hemocitómetro (*Neubauer Improved*, #1110000, *Optik Labor*). A continuación, mediante un microscopio invertido *Leica DMI1*, con el objetivo 10X, se contabilizaron las células que se encontraban dentro de cada uno de los cuatro cuadrantes de 1 mm² que forman cada cámara del hemocitómetro. Una vez contabilizados los cuatro cuadrantes de cada cámara, se realizó la media aritmética de las dos cámaras y se obtuvo la concentración celular (células/ml) aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración celular} = \frac{\text{Media del recuento celular}}{4} \times \text{Factor de dilución} \times 10.000$$

6.2. Extracción de RNA de líneas celulares

La extracción de RNA de líneas celulares se llevó a cabo mediante el *kit RNeasy Mini Kit* (#74104, *Qiagen*), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Antes de comenzar la extracción, se suplementó el buffer RLT con 10 µl de β-mercaptoetanol por cada mililitro de buffer RLT que se fuera a utilizar (600 µl de buffer RLT para cada muestra).

Después, comenzó el protocolo de extracción. Primero, se eliminó el medio de la placa de cultivo y se lavó con PBS 1X Na⁺ frío, se aspiró el PBS y se añadieron 600 µl de buffer RLT suplementado. Con la placa sobre hielo, se despegaron las células con un rascador (#83.1830, *SARSTEDT*) y se pasaron a un tubo de 1.5 ml (*Eppendorf*), donde se mezclaron cuidadosamente con una pipeta el *buffer* y las células para generar un

lisado. Seguidamente, se pasaron los lisados a una columna del *kit QiAshredder*, donde se centrifugaron durante 2 minutos a la máxima velocidad (13000 rpm). Tras la centrifugación, el producto de la columna se pasó a un tubo de 1.5 ml libre de RNAsas (#211-0015, VWR) y se añadió un volumen de etanol al 70%, se mezcló mediante pipeteo y se transfirieron 700 µl de la mezcla a una columna *RNeasy*, que se centrifugó durante 15 segundos a 12000 rpm. Se eliminó el líquido residual almacenado en el tubo colector, se repitió el proceso de centrifugación con el resto de la mezcla que quedaba en el tubo. Después de esta segunda centrifugación, se añadieron 700 µl de buffer RW1 del *kit* a la columna y se centrifugó durante 15 segundos a 12000 rpm, se eliminó el líquido residual del tubo colector y se añadieron 500 µl de *buffer* RPE del *kit* a la columna, que se volvió a centrifugar durante 15 segundos a 12000 rpm. Se volvieron a añadir 500 µl de *buffer* RPE a la columna y se centrifugó durante 15 segundos a 12000 rpm. A continuación, se pasó la columna a un nuevo tubo colector y se centrifugó durante 1 minuto a la máxima velocidad, para asegurar que no quedaba ningún resto de etanol. Tras esta centrifugación, se pasó la columna a un tubo de 1.5 ml libre de RNAsas, y se añadieron a la columna 37 µl de agua libre de RNAsas, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente, para favorecer la dilución del RNA en el agua y se centrifugó durante 1 minuto a 12000 rpm. Por último, se almacenó el RNA a -80°C.

6.3. Extracción de proteínas de líneas celulares

Antes de llevar a cabo el protocolo de extracción, se hizo el *buffer* de lisis RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay*), específico para la extracción de proteínas. Este *buffer* contiene: Triton™ X-100 (#MKBJ3318V, Sigma-Aldrich), SDS 10%, Tris 1 M a pH 8, ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 5 mM, deoxicolato sódico 10x, NaCl 5 M y agua destilada. Una vez completado el *buffer*, se añadió una pastilla de inhibidor de proteasas (*cOmplete Mini*, #11836153001, Roche), una pastilla de inhibidor de fosfatasas (*PhosSTOP EASYpack*, #04906837001, Roche), 10 µl de DTT 1 M por cada 100 ml de *buffer* para estabilizar enzimas con grupos sulfhidrilos y 100 µl de PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*) por cada 100 ml de *buffer*, para inhibir las proteasas de serina.

Primero, se aspiró el medio de cultivo, se lavó la placa con PBS 1x Na y se incubaron las células a 37°C con 1 ml de TrypLE (*TrypLE™ Express*, #12604-013, Gibco) para despegarlas de la placa. A continuación, se centrifugaron las células a 1200 rpm durante 5 minutos, se lavó el pellet celular y se centrifugó de nuevo a 1200 rpm

Material y métodos

durante 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en el *buffer* de lisis RIPA, anteriormente preparado, donde se incubaron en hielo durante 30 minutos. Tras la incubación, se obtuvo una solución de alta viscosidad, que se centrifugó durante 10 minutos a máxima velocidad (>12000 rpm), a una temperatura de 4°C. Del producto de la centrifugación se recogió el sobrenadante, que es donde se encuentra el lisado soluble de proteínas, y se descartó el pellet, que contenía los restos celulares. El sobrenadante que contenía las proteínas (lisados proteico) se almacenó a -80°C.

6.4. Cuantificación de la concentración de proteínas

Para cuantificar la concentración de proteína de los extractos, se empleó el método del BCA (*bicinchoninic acid*). Este método se basa en la *reacción de Biuret* entre las proteínas y el ión Cu^{2+} , que se reduce a Cu^{1+} y éste, al entrar en contacto con el ácido bicinónico, forma un complejo de color púrpura de intensidad proporcional a la cantidad de ion cuproso y a su vez, de proteínas²⁷¹ (**Figura 9**). Se trata de un método sensible, rápido y efectivo para la cuantificación de proteínas.

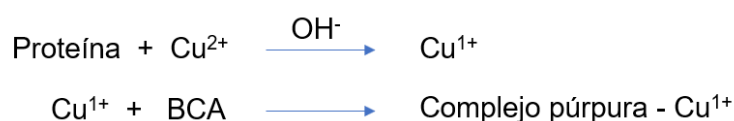


Figura 9. Esquema del fundamento del método del BCA, empleado en la cuantificación de la concentración de proteínas.

Primero, se realizó la mezcla de BCA según el protocolo recomendado por el fabricante del *kit*. Para ello, se añadieron 196 μl de reactivo A (*BCA protein assay reagent A, 500ml, #23228, Thermo Fisher*) y 4 μl de reactivo B (*BCA protein assay reagent B, 25 ml, #23224, Thermo Fisher*) por muestra a medir y pocillo. Se homogeneizó bien la mezcla de reactivos BCA y en una placa de 96 pocillos (*Falcon, #353072, ThermoFisher Scientific*) se añadieron 200 μl de la mezcla. A continuación, se hizo una dilución 1:10 de la muestra de proteína y se añadieron 10 μl a la placa con el reactivo BCA. Se homogeneizó el reactivo de BCA con la muestra y se incubó entre 20 – 30 minutos en una estufa a 37°C. Por último, se midió la absorbancia de cada pocillo en un lector de placas *Ultra-Evolution TECAN* a 570 nm de longitud de onda. La concentración de proteínas de cada muestra se determinó mediante la comparación de una recta patrón de concentraciones conocidas de albúmina (*Albumin Standard, #23209, ThermoFisher Scientific*).

7. Protocolos específicos para los estudios *in vitro*

7.1. Estudio de la viabilidad celular mediante MTT

Este método, desarrollado por Mosmann en 1983²⁷², se basa en la reducción metabólica del bromuro 3-(4,5-dimetritiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, comúnmente abreviado como MTT, realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Este análisis de la viabilidad celular se basa en una reacción colorimétrica, donde se parte de un color amarillo, debido a las sales de tetrazolio, que cambian a un color azulado, producido por la reducción de dichas sales a formazán, por acción de la enzima mitocondrial señalada. El formazán generado, queda retenido en las células y puede ser liberado mediante su solubilización, permitiendo cuantificar por reacción colorimétrica la cantidad de MTT reducido como consecuencia de la actividad metabólica celular. La cantidad de MTT reducido formado, es proporcional a la cantidad de células vivas del cultivo. Este método ha sido muy usado para medir de forma indirecta, tanto la supervivencia como la proliferación celular, ya que, a mayor número de células vivas, mayor es la cantidad de formazán formado.

Para realizar este estudio, se sembraron 10.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos (*Falcon, #353072, ThermoFisher Scientific*). Después de 24 horas, se lavaron las células y se añadió medio fresco sin fármaco a los controles, y con fármaco a diferentes concentraciones (5 μM , 10 μM , 15 μM o 20 μM) a los casos de estudio, y se incubaron durante 48 y 72 horas. Aparte de células control y tratadas, también se incluyeron pocillos sólo con medio para ser usados como blanco, y pocillos con células a los que se les añadió Triton™ X-100 (*#MKBJ3318V, Sigma-Aldrich*) como control positivo de nula viabilidad celular.

Todas las condiciones de estudio se realizaron por triplicado. Pasadas las correspondientes 48 y 72 horas, se añadieron 10 μl de la solución de MTT a cada pocillo, mezclando cuidadosamente en un agitador orbital (*MixMate, Eppendorf*) durante 30 segundos a 350 rpm; seguidamente, la placa se incubó durante 3 horas a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se añadieron 200 μl de dimetilsulfóxido (DMSO) y se mezclaron con la muestra con una pipeta para disolver los cristales de formazán y obtener un color morado uniforme en el pocillo. Finalmente, se realizó la lectura de la intensidad del color en un lector de microplacas (*Tecan infinite M200Pro*), midiendo a unas longitudes de onda de 570 nm y 630 nm, esta última para evaluar la señal de fondo.

7.2. Evaluación de la muerte celular mediante anexina V / yoduro de propidio

La fosfatidilserina es un lípido que se encuentra distribuido ampliamente en la membrana plasmática; normalmente, se encuentra restringido a la hemimembrana interna de la misma. Sin embargo, durante el proceso de apoptosis celular temprana, caracterizado por la pérdida de la estructura de la membrana plasmática, la fosfatidilserina queda expuesta en la superficie exterior de la célula.

La anexina V es una proteína de unión a calcio, de 36 KDa; tiene afinidad de unión con la fosfatidilserina, lo que permite identificar aquellas células apoptóticas en fase temprana, que mantienen íntegra la membrana celular y en las que la fosfatidilserina se ha traslocado a la hemimembrana externa de la célula. Así, el marcaje simultáneo de anexina V y yoduro de propidio (PI) (un agente intercalante del DNA), una vez se ha permeabilizado la membrana, permite la discriminación y clasificación entre células vivas (anexina V negativas y PI negativas), células que se encuentran en apoptosis temprana (anexina V positivas y PI negativas) y células en apoptosis tardía y necróticas (anexina V positivas y PI positivas).

Para llevar a cabo el estudio de muerte celular, se sembraron 200.000 células, que se encontraban en fase exponencial de crecimiento, por pocillo, en una placa de 12 pocillos (*Falcon 12-well, #353043, Corning*). Transcurridas 24 horas, se cambió el medio de las células, diferenciando entre células control que no recibieron tratamiento, y células de estudio que sí recibieron tratamiento con pasireotide. Tras 48 horas expuestas al tratamiento, se despegaron las células mediante enzimas de disociación celular (*TrypLE™ Express, #12604-013, Gibco*). Después, se pasaron las células a tubos de citometría (*#352008, ThermoFisher Scientific*), donde se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS 1X Na⁺ y se resuspendieron en 100 µl de *buffer* de unión a anexina V (0.1 M HEPES/NaOH pH 7.4 y 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂), añadiendo 5 µl de anexina V – FITC y 5 µl de solución de marcaje de yoduro de propidio (*Anexina V FITC – Kit de detección de apoptosis, #ANXVKF-100T, Immunostep*). La mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad; transcurrido ese tiempo, se añadieron 100 µl de *buffer* de unión a anexina V.

Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de alta sensibilidad, FACS Aria III (*BD Biosciences*), en el Servicio de Microscopía y Citometría del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer. Para cada línea celular, se realizó una matriz de compensación, para lo que se adquirieron en el citómetro un tubo de células no teñidas, otro con células teñidas solamente con anexina V y no con yoduro de

propidio, y un último tubo marcado con yoduro de propidio, pero sin anexina V. Los datos adquiridos del citómetro fueron posteriormente procesados con el *software FlowJo V10*.

7.3. Análisis de la proliferación celular mediante BrdU

La bromodesoxiuridina (BrdU o 5-bromo-2-desoxiuridina) es un nucleótido halogenado sintético, análogo de la timidina. Esta analogía permite que la BrdU se incorpore al DNA, sustituyendo a la timidina en casi su totalidad. La incorporación de la BrdU se produce en la fase de síntesis (fase S) del ciclo celular. De esta manera, usando un anticuerpo frente a BrdU, conjugado con un fluoróforo, junto con la tinción de yoduro de propidio (PI), una vez permeabilizada la membrana, se puede evaluar el ciclo celular. Así, se pueden diferenciar aquellas células que se encuentran en fase G₀/G₁ del ciclo celular (BrdU negativas, PI en 2n) de aquellas que se encuentran en fase S (BrdU positivas, PI en un continuo entre 2n y 4n), de las que se encuentran en la fase G₂/M (BrdU negativas, PI en 4n).

Para llevar a cabo este ensayo, se sembraron 200.000 células, que se encontraban en fase de crecimiento exponencial, por pocillo, en una placa de 12 pocillos. Transcurridas las primeras 24 horas, se sustituyó el medio de las células por nuevo medio con fármaco en aquellas que debían recibirlo y con medio fresco sin fármaco a las células control. A continuación, se añadió BrdU al medio. El tiempo de exposición a la BrdU debe de ajustarse en cada línea celular y depende de cómo de rápido ciclen las células. En este estudio, los periodos de incubación con la BrdU comprendieron desde las 16h hasta las 48h. Una vez transcurridas 48h de tratamiento, se despegaron las células mediante enzimas de disociación celular (*TrypLE™ Express*, #12604-013, *Gibco*) y se pasaron a tubos de citometría (#352008, *ThermoFisher Scientific*) donde se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm. Seguidamente, se decantó el sobrenadante y se lavó el pellet dos veces con una solución al 1% de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS 1X Na⁺, centrifugando durante 15 minutos a 500 g. Tras los lavados, el pellet obtenido se resuspendió en 200 µl de PBS 1X Na⁺ frío y se añadió lentamente a un tubo de citometría nuevo, que contenía 3 ml de etanol al 70% previamente enfriado a -20°C; incubándose posteriormente durante 30 minutos en hielo, con el fin de fijar las células. Después, las células se centrifugaron durante 10 minutos a 500 g, a una temperatura de 10°C. A continuación, se aspiró el sobrenadante y se añadió 1 ml de HCl 2N con 0,5% de Triton™ X-100 (# MKBJ3318V, *Sigma-Aldrich*) para desnaturalizar el DNA, para lo que se dejaron las células durante

Material y métodos

30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron las células durante 10 minutos a 500 g, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de 0,1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ pH 8,5, para neutralizar el HCl, y se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 500 g. Después, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 μl de PBS 1% BSA con 0,5% de Tween® 20 (#BP337-100, Fisher Scientific), añadiendo 2 μl de anticuerpo anti-BrdU conjugado con Alexa Fluor® 488 (#B35139, Life Technologies) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, se añadió 1 ml de PBS 1% BSA con 0,5% de Tween® 20 (#BP337-100, Fisher Scientific), se centrifugó durante 5 minutos a 500 g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 μl de yoduro de propidio diluido en PBS 1X Na^+ (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Una vez realizado el protocolo de tinción, se adquirieron las muestras en un citómetro de alta sensibilidad, FACS Aria III (BD Biosciences) en el Servicio de Microscopía y Citometría del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer. Para cada línea celular, se realizó una matriz de compensación y todas las condiciones del estudio se realizaron por triplicado. Tras la adquisición de las muestras, los datos fueron analizados con el software FlowJo V10.

7.4. Análisis del ciclo celular con yoduro de propidio

El ciclo celular consiste en una secuencia estructurada y ordenada de procesos celulares que conducen a la duplicación del contenido y a la división celular. Este ciclo tiene cuatro fases: G_1 , S, G_2 y M. Las células fuera de ciclo, quiescentes, se encuentran en fase G_0 . Como se ha comentado en esta memoria, el yoduro de propidio (PI), es un agente intercalante del DNA. Esta capacidad de agregación cuantitativa al DNA, junto con la capacidad fluorescente de este compuesto, lo convierte en una herramienta útil para cuantificar la cantidad de DNA y así diferenciar las distintas fases del ciclo celular por las que está atravesando la célula.

Para llevar a cabo ese estudio, primero, se sembraron 200.000 células por pocillo, que previamente se encontraban en fase de crecimiento exponencial, en una placa de 12 pocillos. Tras 24 horas, se lavaron las células con PBS 1X Na^+ y se cambió el medio, al que se le añadió o no el tratamiento pertinente, según fueran pocillos de casos o de controles. Transcurridas 48 horas de tratamiento, se despegaron las células con enzimas de disociación (TrypLE™ Express, #12604-013, Gibco), se recogieron en tubos de citometría (#352008, ThermoFisher Scientific) y se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm. Seguidamente, se descartó el sobrenadante, se hizo un lavado

con PBS 1X Na⁺ y se centrifugaron durante 5 minutos a 500 g. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se añadió cuidadosamente (gota a gota) 1 ml de etanol al 70% frío, a -20°C, mientras se mezclaban las células con un vórtex. Las muestras permanecieron 30 minutos en hielo para fijar las células. A continuación, se centrifugaron durante 10 minutos a 500 g, a una temperatura de 10°C. Se descartó el sobrenadante, se realizaron dos lavados con PBS 1X Na⁺ y se centrifugaron durante 5 minutos a 500 g. Después, se añadieron 50 µl de ribonucleasa A (#R6513-50MG, *Sigma-Aldrich*) a una concentración de 100 µg/ml, para degradar el RNA de la muestra y, a continuación, se añadieron 50 µl de PI a una concentración de 50 µg/ml. Se incubaron las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, las muestras fueron adquiridas en un citómetro *Accuri C6* (*BD Biosciences*) en el Servicio de Microscopía y Citometría del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer. Tras la adquisición de las muestras, los datos se analizaron con el *software FlowJo V10*.

7.5. Western blot

El western blot, es una técnica de electrotransferencia para analizar e identificar proteínas específicas procedentes de lisados celulares o tejidos. Una vez realizada la extracción y cuantificación de proteínas de las líneas celulares (véase apartados 6.3 y 6.4 de esta sección de material y métodos), éstas se mezclaron con el tampón de carga (Tris – HCl pH 6.8 100 mM, 4% SDS, 0.05% azul de bromofenol, 20% glicerina, y 2% β-mercaptoetanol). Una vez hecha la mezcla, las muestras se incubaron a 100°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Posteriormente, se cargaron las muestras en geles de poliacrilamida con densidades variables, de acuerdo con el peso molecular esperado de las proteínas. Ya cargadas las muestras, se sometieron a una diferencia de potencial, aplicando una corriente de 120 V, durante el tiempo necesario, según el tamaño de la proteína de interés. Tras finalizar la electroforesis, las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, *Transfer Membrane*, #RPN303F, *GE Healthcare*), mediante un sistema de transferencia húmeda, sometido a una corriente de 350 mA de intensidad durante 2 horas. El *buffer* de transferencia empleado estuvo compuesto por Tris 25 mM, glicina 192 mM y 20% de metanol. A continuación, se realizó una incubación de 1 hora para bloquear la membrana, para ello se empleó un *buffer* salino que contenía Tris y Tween-20 (TBS-T a partir de aquí), (Tris pH 7.5, 20 mM, NaCl 150 mM y 0.1% de Tween 20), suplementado con leche desnatada en polvo al 5% que es un producto rico

Material y métodos

en proteínas que produce el bloqueo. Tras el bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario (descritos en **Tabla 4**), durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Posteriormente, se retiró el anticuerpo y se realizaron 4 lavados con TBS-T. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa de rábano, disuelto en TBS-T, durante 1 hora. Por último, tras la incubación con el anticuerpo secundario, se lavó la membrana 4 veces con TBS-T y se procedió al revelado en radiografía de la membrana, empleando un sistema de detección por quimioluminiscencia basado en la oxidación del luminol (*Pierce ECL Western Blotting Substrate, #32106, ThermoFisher Scientific*).

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en los ensayos de Western blot.

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial	Referencia
Akt	1:1000	Cell Signaling	#9272
Phospho-Akt (Ser473)	1:1000	Cell Signaling	#9271
Phospho-ERK1 (Thr202/Tyr204) y Phospho-ERK2 (Thr185/Tyr187)	1:1000	Sigma-Aldrich	#E7028
Ciclina D1	1:5000	Cell Signaling	#2922
CDK-4	1:1000	Santa Cruz	#SC-260
Ciclina A	1:3000	BD Biosciences	#611268
CDK-2	1:1000	Santa Cruz	#SC-6248
CDK-1/Cdc-2	1:5000	Santa Cruz	#SC-54
Ciclina B	1:5000	Santa Cruz	#SC-245
P27	1:1000	Santa Cruz	#SC-1641
Calnexina	1:40000	Enzo Life Sciences	#SPA-860

7.6. PCR cuantitativa de la expresión de los receptores de la somatostatina

Para cuantificar la expresión de los receptores de la somatostatina (SSTRs) en las diferentes líneas celulares, primero, se extrajo RNA de las mismas y se cuantificó, como se detalla en los puntos 6.2 y 3.3 de esta sección de metodología. Después, se sintetizó cDNA utilizando el *kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (#04379012001, Roche)*, siguiendo el mismo procedimiento que se describe en la sección 4.9. cuando se cuantificó mediante QPCR la expresión de los receptores de somatostatina en mamas de ratón.

Ya obtenido el cDNA, se procedió a cuantificar la expresión de los diferentes genes que codifican los receptores de la somatostatina mediante QPCR. Para ello, junto con

las secuencias anteriormente diseñadas para reconocer los transcritos de cada receptor en la mama de ratón (sección 4.9. de material y métodos), se diseñaron otras para las secuencias específicas de los SSTR humanos, para identificar los transcritos en las líneas celulares humanas. Además, como se hizo previamente, se incluyeron oligonucleótidos con secuencias específicas para el reconocimiento de la expresión de la *Gapdh*, siendo la misma secuencia tanto en ratón como en humano. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados para la detección de los SSTR humanos fueron las siguientes:

hSSTR1-fwd: 5'-TGGTGGGCTTCGTGTTGT-3'

hSSTR1-rev: 5'-CAGCTGCACCACGTAGAAAG-3'

hSSTR2-fwd: 5'-GGCCAATCTTCCTCTTTTCC-3'

hSSTR2-rev: 5'-TGGTTTGAGGTGTTGGTTGA-3'

hSSTR3-fwd: 5'-TCATCTGCCTCTGCTACCTG-3'

hSSTR3-rev: 5'-ACGTTGACGATGTTGAGCAC-3'

hSSTR5-fwd: 5'-TCAACCCTCTTCCCATTAC-3'

hSSTR5-rev: 5'-CAGGATCCACAGAGACAGCA-3'

Las reacciones de QPCR se llevaron a cabo siguiendo los mismos procesos que para la cuantificación de los receptores de la somatostatina en mamas de ratón (sección 4.9. de material y métodos).

Después, el análisis de los datos se hizo mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ²⁶⁵. Como muestras de referencia (controles positivos) se utilizó cerebro de ratón en los análisis de la línea celular HC11, y tumor de piel de origen humano para los estudios de las líneas celulares humanas.

8. Análisis de los datos

8.1. Análisis de la distribución de las variables

Para las distintas variables estudiadas, se examinó su distribución y se determinó si se ajustaban o no a una distribución normal mediante el *test de Shapiro-Wilk*, con el programa estadístico *JMP 12*.

8.2. Análisis univariante y bivariante de las asociaciones entre las variables

Para comparar el valor tomado por una variable entre dos grupos, si la distribución de esta siguió una distribución normal, se utilizó el *test t de Student*. En cambio, si la variable no se ajustó a una distribución normal, se utilizó el *test no paramétrico, U de Mann Whitney*. Cuando las comparaciones fueron de medidas pareadas o repetidas, se utilizaron las versiones pareadas de dichos *tests*. Así, en el caso de que la distribución se ajustase a una normal se utilizó el *test t para muestras pareadas*; en cambio, se usó la *prueba de rangos con signo de Wilcoxon* para variables cuya distribución en las muestras no se ajustasen a una normal.

De la misma forma, cuando se compararon variables con distribución normal entre más de dos grupos, el *test* utilizado fue el *análisis de la varianza o ANOVA de una vía*, y en el caso de que las variables no siguiesen una distribución normal el *test* empleado fue el de *Kruskal-Wallis*. Tras la comparación global entre los grupos, en el caso de que se detectasen diferencias estadísticamente significativas, se realizó un *test post-hoc* para determinar en qué grupos se encontraban las diferencias. En el caso de haber realizado un *ANOVA* para muestras con distribución normal, se realizó un *post-test de Tukey*, y en el caso de muestras que no siguieron una distribución normal, después de realizar el *test de Kruskal-Wallis*, se aplicó el *post-test de Dunn*.

Para la comparación de variables categóricas entre grupos, se realizó el *test exacto de Fisher*.

Para la evaluación de la correlación entre variables continuas, en el caso de que se ajustasen a una distribución normal, se utilizó el *test de Pearson*, en cambio si no se ajustaron a la normalidad, el *test* empleado fue el de *Spearman*.

Para realizar las curvas de supervivencia empleadas en los estudios de variables temporales, se utilizó el estimador no paramétrico de *Kaplan-Meier*, y la significación estadística se determinó mediante el *test Log-Rank*.

8.3. Análisis estadístico de RNAseq

Para el análisis de la secuenciación del RNA, primero, se filtró y se descartaron las lecturas de mala calidad (con contaminación de adaptadores, con un 10% o más de nucleótidos indeterminados, o con un 50% o más de nucleótidos de mala calidad). Las lecturas filtradas se alinearon con el genoma de referencia mediante *HISAT2*, v2.0.5. La cuantificación de la expresión se llevó a cabo con *HTSeq* v0.6.1. y se utilizaron

unidades FPKM. Los genes expresados significativamente fueron aquellos que superaron un umbral de FPKM de 1. Los análisis de expresión diferencial para muestras con réplica biológica se realizaron con *StringTie-eB*. Los transcritos con $p < 0.05$ fueron considerados como expresados significativamente y se representaron mediante el diagrama *Volcano plot*. Se llevaron a cabo estudios de enriquecimiento para identificar procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares (*Gene Ontology*, mediante el algoritmo *GOSeq* y *topGO v1.34.1.*) y vías asociadas significativamente a los grupos de genes expresados diferencialmente (*KEGG*, mediante *software KOBAS v3.0.*).

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians* **71**, 209-249, doi:10.3322/caac.21660 (2021).
- 2 Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. & Jemal, A. Cancer statistics, 2022. *CA: a cancer journal for clinicians* **72**, 7-33, doi:10.3322/caac.21708 (2022).
- 3 Youlten, D. R. *et al.* The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer epidemiology* **36**, 237-248, doi:10.1016/j.canep.2012.02.007 (2012).
- 4 Warner, E. *et al.* Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in unselected Ashkenazi Jewish women with breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **91**, 1241-1247, doi:10.1093/jnci/91.14.1241 (1999).
- 5 Torre, L. A., Islami, F., Siegel, R. L., Ward, E. M. & Jemal, A. Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **26**, 444-457, doi:10.1158/1055-9965.EPI-16-0858 (2017).
- 6 Althuis, M. D., Dozier, J. M., Anderson, W. F., Devesa, S. S. & Brinton, L. A. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *International journal of epidemiology* **34**, 405-412, doi:10.1093/ije/dyh414 (2005).
- 7 Jemal, A., Ward, E. & Thun, M. J. Recent trends in breast cancer incidence rates by age and tumor characteristics among U.S. women. *Breast cancer research : BCR* **9**, R28, doi:10.1186/bcr1672 (2007).
- 8 Daubisse-Marliac, L. *et al.* Breast cancer incidence and time trend in France from 1990 to 2007: a population-based study from two French cancer registries. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **22**, 329-334, doi:10.1093/annonc/mdq396 (2011).
- 9 Heer, E. *et al.* Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study. *The Lancet. Global health* **8**, e1027-e1037, doi:10.1016/S2214-109X(20)30215-1 (2020).
- 10 Renehan, A. G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R. F. & Zwahlen, M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* **371**, 569-578, doi:10.1016/S0140-6736(08)60269-X (2008).
- 11 Porter, P. "Westernizing" women's risks? Breast cancer in lower-income countries. *The New England journal of medicine* **358**, 213-216, doi:10.1056/NEJMp0708307 (2008).
- 12 Bray, F., McCarron, P. & Parkin, D. M. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast cancer research : BCR* **6**, 229-239, doi:10.1186/bcr932 (2004).
- 13 Jedy-Agba, E., McCormack, V., Adebamowo, C. & Dos-Santos-Silva, I. Stage at diagnosis of breast cancer in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Global health* **4**, e923-e935, doi:10.1016/S2214-109X(16)30259-5 (2016).
- 14 Ferlay, J. *et al.* Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/tomorrow> (accessed February 21, 2022). (2020).
- 15 Rakha, E. A. *et al.* Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast cancer research : BCR* **12**, 207, doi:10.1186/bcr2607 (2010).
- 16 Amin, M. B. *et al.* The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA: a cancer journal for clinicians* **67**, 93-99, doi:10.3322/caac.21388 (2017).
- 17 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**, 10869-10874, doi:10.1073/pnas.191367098 (2001).

Bibliografía

- 18 Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752, doi:10.1038/35021093 (2000).
- 19 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, doi:10.1016/j.ctrv.2011.11.005 (2012).
- 20 Dai, X. *et al.* Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American journal of cancer research* **5**, 2929-2943 (2015).
- 21 Vieira, A. F. & Schmitt, F. An Update on Breast Cancer Multigene Prognostic Tests-Emergent Clinical Biomarkers. *Frontiers in medicine* **5**, 248, doi:10.3389/fmed.2018.00248 (2018).
- 22 Gyorffy, B. *et al.* Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast cancer research : BCR* **17**, 11, doi:10.1186/s13058-015-0514-2 (2015).
- 23 Goldhirsch, A. *et al.* Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **22**, 1736-1747, doi:10.1093/annonc/mdr304 (2011).
- 24 Giuliano, A. E., Edge, S. B. & Hortobagyi, G. N. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Annals of surgical oncology* **25**, 1783-1785, doi:10.1245/s10434-018-6486-6 (2018).
- 25 Broca, P. *Traité des tumeurs*. Vol. 13 (Librairie De La Faculte De Medecine) (1866).
- 26 Miki, Y. *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**, 66-71, doi:10.1126/science.7545954 (1994).
- 27 Wooster, R. *et al.* Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* **378**, 789-792, doi:10.1038/378789a0 (1995).
- 28 Kuchenbaecker, K. B. *et al.* Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Jama* **317**, 2402-2416, doi:10.1001/jama.2017.7112 (2017).
- 29 Zhang, H. *et al.* Genome-wide association study identifies 32 novel breast cancer susceptibility loci from overall and subtype-specific analyses. *Nature genetics* **52**, 572-581, doi:10.1038/s41588-020-0609-2 (2020).
- 30 Easton, D. F. *et al.* Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* **447**, 1087-1093, doi:10.1038/nature05887 (2007).
- 31 Shiovitz, S. & Korde, L. A. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **26**, 1291-1299, doi:10.1093/annonc/mdv022 (2015).
- 32 Lane, T. F. *et al.* Expression of Brca1 is associated with terminal differentiation of ectodermally and mesodermally derived tissues in mice. *Genes & development* **9**, 2712-2722, doi:10.1101/gad.9.21.2712 (1995).
- 33 ElShamy, W. M. & Livingston, D. M. Identification of BRCA1-IRIS, a BRCA1 locus product. *Nature cell biology* **6**, 954-967, doi:10.1038/ncb1171 (2004).
- 34 Wilson, C. A. *et al.* Differential subcellular localization, expression and biological toxicity of BRCA1 and the splice variant BRCA1-delta11b. *Oncogene* **14**, 1-16, doi:10.1038/sj.onc.1200924 (1997).
- 35 Deng, C. X. & Brodie, S. G. Roles of BRCA1 and its interacting proteins. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **22**, 728-737, doi:10.1002/1521-1878(200008)22:8<728::AID-BIES6>3.0.CO;2-B (2000).
- 36 Deng, C. X. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic acids research* **34**, 1416-1426, doi:10.1093/nar/gkl010 (2006).
- 37 Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* **386**, 761, 763, doi:10.1038/386761a0 (1997).

- 38 Antoniou, A. *et al.* Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *American journal of human genetics* **72**, 1117-1130, doi:10.1086/375033 (2003).
- 39 Chen, S. & Parmigiani, G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**, 1329-1333, doi:10.1200/JCO.2006.09.1066 (2007).
- 40 Evans, D. G. *et al.* Penetrance estimates for BRCA1 and BRCA2 based on genetic testing in a Clinical Cancer Genetics service setting: risks of breast/ovarian cancer quoted should reflect the cancer burden in the family. *BMC cancer* **8**, 155, doi:10.1186/1471-2407-8-155 (2008).
- 41 Roy, R., Chun, J. & Powell, S. N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature reviews. Cancer* **12**, 68-78, doi:10.1038/nrc3181 (2011).
- 42 Diez, O. *et al.* Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Human mutation* **22**, 301-312, doi:10.1002/humu.10260 (2003).
- 43 Janavicius, R. Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control. *The EPMA journal* **1**, 397-412, doi:10.1007/s13167-010-0037-y (2010).
- 44 Malkin, D. *et al.* Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250**, 1233-1238, doi:10.1126/science.1978757 (1990).
- 45 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**, 1250-1256, doi:10.1200/JCO.2008.16.6959 (2009).
- 46 Masciari, S. *et al.* Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort. *Breast cancer research and treatment* **133**, 1125-1130, doi:10.1007/s10549-012-1993-9 (2012).
- 47 Melhem-Bertrandt, A. *et al.* Early onset HER2-positive breast cancer is associated with germline TP53 mutations. *Cancer* **118**, 908-913, doi:10.1002/cncr.26377 (2012).
- 48 Lynch, E. D. *et al.* Inherited mutations in PTEN that are associated with breast cancer, cowden disease, and juvenile polyposis. *American journal of human genetics* **61**, 1254-1260, doi:10.1086/301639 (1997).
- 49 Marsh, D. J. *et al.* Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Human molecular genetics* **7**, 507-515, doi:10.1093/hmg/7.3.507 (1998).
- 50 Tan, M. H. *et al.* Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 400-407, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2283 (2012).
- 51 Hemminki, A. *et al.* [A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome]. *Duodecim; laaketieteellinen aikakauskirja* **114**, 667-668 (1998).
- 52 Hearle, N. *et al.* Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**, 3209-3215, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0083 (2006).
- 53 Beggs, A. D. *et al.* Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. *Gut* **59**, 975-986, doi:10.1136/gut.2009.198499 (2010).
- 54 Guilford, P. *et al.* E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* **392**, 402-405, doi:10.1038/32918 (1998).

Bibliografía

- 55 Pharoah, P. D., Guilford, P., Caldas, C. & International Gastric Cancer Linkage, C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology* **121**, 1348-1353, doi:10.1053/gast.2001.29611 (2001).
- 56 Kaurah, P. *et al.* Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *Jama* **297**, 2360-2372, doi:10.1001/jama.297.21.2360 (2007).
- 57 Apostolou, P. & Fostira, F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *BioMed research international* **2013**, 747318, doi:10.1155/2013/747318 (2013).
- 58 Cox, A. *et al.* A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nature genetics* **39**, 352-358, doi:10.1038/ng1981 (2007).
- 59 Michailidou, K. *et al.* Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. *Nature* **551**, 92-94, doi:10.1038/nature24284 (2017).
- 60 Ferreira, M. A. *et al.* Genome-wide association and transcriptome studies identify target genes and risk loci for breast cancer. *Nature communications* **10**, 1741, doi:10.1038/s41467-018-08053-5 (2019).
- 61 Wu, L. *et al.* A transcriptome-wide association study of 229,000 women identifies new candidate susceptibility genes for breast cancer. *Nature genetics* **50**, 968-978, doi:10.1038/s41588-018-0132-x (2018).
- 62 Mavaddat, N. *et al.* Polygenic Risk Scores for Prediction of Breast Cancer and Breast Cancer Subtypes. *American journal of human genetics* **104**, 21-34, doi:10.1016/j.ajhg.2018.11.002 (2019).
- 63 Key, T. J., Verkasalo, P. K. & Banks, E. Epidemiology of breast cancer. *The Lancet. Oncology* **2**, 133-140, doi:10.1016/S1470-2045(00)00254-0 (2001).
- 64 Mesa-Eguiagaray, I. *et al.* Distinct temporal trends in breast cancer incidence from 1997 to 2016 by molecular subtypes: a population-based study of Scottish cancer registry data. *British journal of cancer* **123**, 852-859, doi:10.1038/s41416-020-0938-z (2020).
- 65 Morris, D. H., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A. & Swerdlow, A. J. Secular trends in age at menarche in women in the UK born 1908-93: results from the Breakthrough Generations Study. *Paediatric and perinatal epidemiology* **25**, 394-400, doi:10.1111/j.1365-3016.2011.01202.x (2011).
- 66 Sorensen, K. *et al.* Recent secular trends in pubertal timing: implications for evaluation and diagnosis of precocious puberty. *Hormone research in paediatrics* **77**, 137-145, doi:10.1159/000336325 (2012).
- 67 Wyshak, G. & Frisch, R. E. Evidence for a secular trend in age of menarche. *The New England journal of medicine* **306**, 1033-1035, doi:10.1056/NEJM198204293061707 (1982).
- 68 Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, C. 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**, 1141-1151, doi:10.1016/S1470-2045(12)70425-4 (2012).
- 69 Behie, A. M. & O'Donnell, M. H. Prenatal smoking and age at menarche: influence of the prenatal environment on the timing of puberty. *Human reproduction* **30**, 957-962, doi:10.1093/humrep/dev033 (2015).
- 70 Howdeshell, K. L., Hotchkiss, A. K., Thayer, K. A., Vandenberg, J. G. & vom Saal, F. S. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* **401**, 763-764, doi:10.1038/44517 (1999).
- 71 Frisch, R. E. & Revelle, R. Height and weight at menarche and a hypothesis of critical body weights and adolescent events. *Science* **169**, 397-399, doi:10.1126/science.169.3943.397 (1970).

- 72 Elks, C. E. *et al.* Thirty new loci for age at menarche identified by a meta-analysis of genome-wide association studies. *Nature genetics* **42**, 1077-1085, doi:10.1038/ng.714 (2010).
- 73 He, Q. & Karlberg, J. Bmi in childhood and its association with height gain, timing of puberty, and final height. *Pediatric research* **49**, 244-251, doi:10.1203/00006450-200102000-00019 (2001).
- 74 Kaplowitz, P. B., Slora, E. J., Wasserman, R. C., Pedlow, S. E. & Herman-Giddens, M. E. Earlier onset of puberty in girls: relation to increased body mass index and race. *Pediatrics* **108**, 347-353, doi:10.1542/peds.108.2.347 (2001).
- 75 Nichols, H. B. *et al.* From menarche to menopause: trends among US Women born from 1912 to 1969. *American journal of epidemiology* **164**, 1003-1011, doi:10.1093/aje/kwj282 (2006).
- 76 Rodstrom, K. *et al.* Evidence for a secular trend in menopausal age: a population study of women in Gothenburg. *Menopause* **10**, 538-543, doi:10.1097/01.GME.0000094395.59028.0F (2003).
- 77 Gottschalk, M. S., Eskild, A., Hofvind, S., Gran, J. M. & Bjelland, E. K. Temporal trends in age at menarche and age at menopause: a population study of 312 656 women in Norway. *Human reproduction* **35**, 464-471, doi:10.1093/humrep/dez288 (2020).
- 78 Gold, E. B. The timing of the age at which natural menopause occurs. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* **38**, 425-440, doi:10.1016/j.ogc.2011.05.002 (2011).
- 79 Stolk, L. *et al.* Meta-analyses identify 13 loci associated with age at menopause and highlight DNA repair and immune pathways. *Nature genetics* **44**, 260-268, doi:10.1038/ng.1051 (2012).
- 80 He, C. *et al.* Genome-wide association studies identify loci associated with age at menarche and age at natural menopause. *Nature genetics* **41**, 724-728, doi:10.1038/ng.385 (2009).
- 81 Dall, G. V. & Britt, K. L. Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk. *Frontiers in oncology* **7**, 110, doi:10.3389/fonc.2017.00110 (2017).
- 82 Ramazzini, B. *De Morbis Artificum Diatriba*. Modena: Antonio Capponi; 1700.
- 83 MacMahon, B. *et al.* Age at first birth and breast cancer risk. *Bulletin of the World Health Organization* **43**, 209-221 (1970).
- 84 Albrektsen, G., Heuch, I., Hansen, S. & Kvale, G. Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects. *British journal of cancer* **92**, 167-175, doi:10.1038/sj.bjc.6602302 (2005).
- 85 Schedin, P. Pregnancy-associated breast cancer and metastasis. *Nature reviews. Cancer* **6**, 281-291, doi:10.1038/nrc1839 (2006).
- 86 Lambe, M. *et al.* Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. *The New England journal of medicine* **331**, 5-9, doi:10.1056/NEJM199407073310102 (1994).
- 87 Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, C. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* **347**, 1713-1727, doi:10.1016/s0140-6736(96)90806-5 (1996).
- 88 Morch, L. S. *et al.* Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. *The New England journal of medicine* **377**, 2228-2239, doi:10.1056/NEJMoa1700732 (2017).
- 89 Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, C. Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence. *Lancet* **394**, 1159-1168, doi:10.1016/S0140-6736(19)31709-X (2019).

Bibliografía

- 90 Bhaskaran, K. *et al.* Body-mass index and risk of 22 specific cancers: a population-based cohort study of 5.24 million UK adults. *Lancet* **384**, 755-765, doi:10.1016/S0140-6736(14)60892-8 (2014).
- 91 Neuhouser, M. L. *et al.* Overweight, Obesity, and Postmenopausal Invasive Breast Cancer Risk: A Secondary Analysis of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials. *JAMA oncology* **1**, 611-621, doi:10.1001/jamaoncol.2015.1546 (2015).
- 92 Picon-Ruiz, M., Morata-Tarifa, C., Valle-Goffin, J. J., Friedman, E. R. & Slingerland, J. M. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA: a cancer journal for clinicians* **67**, 378-397, doi:10.3322/caac.21405 (2017).
- 93 Suzuki, R., Orsini, N., Saji, S., Key, T. J. & Wolk, A. Body weight and incidence of breast cancer defined by estrogen and progesterone receptor status--a meta-analysis. *International journal of cancer* **124**, 698-712, doi:10.1002/ijc.23943 (2009).
- 94 Gaudet, M. M. *et al.* Risk factors by molecular subtypes of breast cancer across a population-based study of women 56 years or younger. *Breast cancer research and treatment* **130**, 587-597, doi:10.1007/s10549-011-1616-x (2011).
- 95 Pierobon, M. & Frankenfeld, C. L. Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. *Breast cancer research and treatment* **137**, 307-314, doi:10.1007/s10549-012-2339-3 (2013).
- 96 Hamajima, N. *et al.* Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *British journal of cancer* **87**, 1234-1245, doi:10.1038/sj.bjc.6600596 (2002).
- 97 Chen, W. Y., Rosner, B., Hankinson, S. E., Colditz, G. A. & Willett, W. C. Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *Jama* **306**, 1884-1890, doi:10.1001/jama.2011.1590 (2011).
- 98 Singletary, K. W. & Gapstur, S. M. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *Jama* **286**, 2143-2151, doi:10.1001/jama.286.17.2143 (2001).
- 99 Wu, Y., Zhang, D. & Kang, S. Physical activity and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Breast cancer research and treatment* **137**, 869-882, doi:10.1007/s10549-012-2396-7 (2013).
- 100 Lynch, B. M., Neilson, H. K. & Friedenreich, C. M. Physical activity and breast cancer prevention. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* **186**, 13-42, doi:10.1007/978-3-642-04231-7_2 (2011).
- 101 Friedenreich, C. M., Ryder-Burbidge, C. & McNeil, J. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Molecular oncology* **15**, 790-800, doi:10.1002/1878-0261.12772 (2021).
- 102 Grazioli, E. *et al.* Physical activity in the prevention of human diseases: role of epigenetic modifications. *BMC genomics* **18**, 802, doi:10.1186/s12864-017-4193-5 (2017).
- 103 Brewer, H. R., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A. & Swerdlow, A. J. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast cancer research and treatment* **165**, 193-200, doi:10.1007/s10549-017-4325-2 (2017).
- 104 Hartmann, L. C. *et al.* Benign breast disease and the risk of breast cancer. *The New England journal of medicine* **353**, 229-237, doi:10.1056/NEJMoa044383 (2005).
- 105 Britt, K. L., Cuzick, J. & Phillips, K. A. Key steps for effective breast cancer prevention. *Nature reviews. Cancer* **20**, 417-436, doi:10.1038/s41568-020-0266-x (2020).
- 106 Slepicka, P. F., Cyrill, S. L. & Dos Santos, C. O. Pregnancy and Breast Cancer: Pathways to Understand Risk and Prevention. *Trends in molecular medicine* **25**, 866-881, doi:10.1016/j.molmed.2019.06.003 (2019).

- 107 Stingl, J., Eaves, C. J., Zandieh, I. & Emerman, J. T. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast cancer research and treatment* **67**, 93-109, doi:10.1023/a:1010615124301 (2001).
- 108 Eirew, P. *et al.* A method for quantifying normal human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative ability. *Nature medicine* **14**, 1384-1389, doi:10.1038/nm.1791 (2008).
- 109 Shehata, M. *et al.* Phenotypic and functional characterisation of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast cancer research : BCR* **14**, R134, doi:10.1186/bcr3334 (2012).
- 110 Asselin-Labat, M. L. *et al.* Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nature cell biology* **9**, 201-209, doi:10.1038/ncb1530 (2007).
- 111 Visvader, J. E. & Stingl, J. Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes & development* **28**, 1143-1158, doi:10.1101/gad.242511.114 (2014).
- 112 Fu, N. Y., Nolan, E., Lindeman, G. J. & Visvader, J. E. Stem Cells and the Differentiation Hierarchy in Mammary Gland Development. *Physiological reviews* **100**, 489-523, doi:10.1152/physrev.00040.2018 (2020).
- 113 Lim, E. *et al.* Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature medicine* **15**, 907-913, doi:10.1038/nm.2000 (2009).
- 114 Molyneux, G. *et al.* BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell stem cell* **7**, 403-417, doi:10.1016/j.stem.2010.07.010 (2010).
- 115 Cristea, S. & Polyak, K. Dissecting the mammary gland one cell at a time. *Nature communications* **9**, 2473, doi:10.1038/s41467-018-04905-2 (2018).
- 116 Jindal, S. *et al.* Postpartum breast involution reveals regression of secretory lobules mediated by tissue-remodeling. *Breast cancer research : BCR* **16**, R31, doi:10.1186/bcr3633 (2014).
- 117 Medina, D. & Smith, G. H. Chemical carcinogen-induced tumorigenesis in parous, involuted mouse mammary glands. *Journal of the National Cancer Institute* **91**, 967-969, doi:10.1093/jnci/91.11.967 (1999).
- 118 Raafat, A. *et al.* Effects of age and parity on mammary gland lesions and progenitor cells in the FVB/N-RC mice. *PloS one* **7**, e43624, doi:10.1371/journal.pone.0043624 (2012).
- 119 Thordarson, G. *et al.* Refractoriness to mammary tumorigenesis in parous rats: is it caused by persistent changes in the hormonal environment or permanent biochemical alterations in the mammary epithelia? *Carcinogenesis* **16**, 2847-2853, doi:10.1093/carcin/16.11.2847 (1995).
- 120 Sivaraman, L. & Medina, D. Hormone-induced protection against breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **7**, 77-92, doi:10.1023/a:1015774524076 (2002).
- 121 Husby, A., Wohlfahrt, J., Oyen, N. & Melbye, M. Pregnancy duration and breast cancer risk. *Nature communications* **9**, 4255, doi:10.1038/s41467-018-06748-3 (2018).
- 122 Gonzalez-Jimenez, E., Garcia, P. A., Aguilar, M. J., Padilla, C. A. & Alvarez, J. Breastfeeding and the prevention of breast cancer: a retrospective review of clinical histories. *Journal of clinical nursing* **23**, 2397-2403, doi:10.1111/jocn.12368 (2014).
- 123 Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, C. 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**, 187-195, doi:10.1016/S0140-6736(02)09454-0 (2002).

Bibliografía

- 124 Andrieu, N. *et al.* Pregnancies, breast-feeding, and breast cancer risk in the International BRCA1/2 Carrier Cohort Study (IBCCS). *Journal of the National Cancer Institute* **98**, 535-544, doi:10.1093/jnci/djj132 (2006).
- 125 Ursin, G. *et al.* Reproductive factors and subtypes of breast cancer defined by hormone receptor and histology. *British journal of cancer* **93**, 364-371, doi:10.1038/sj.bjc.6602712 (2005).
- 126 Jernstrom, H. *et al.* Breast-feeding and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute* **96**, 1094-1098, doi:10.1093/jnci/djh211 (2004).
- 127 Russo, J., Rivera, R. & Russo, I. H. Influence of age and parity on the development of the human breast. *Breast cancer research and treatment* **23**, 211-218, doi:10.1007/BF01833517 (1992).
- 128 Russo, J. & Russo, I. H. Toward a physiological approach to breast cancer prevention. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **3**, 353-364 (1994).
- 129 Russo, J., Lynch, H. & Russo, I. H. Mammary gland architecture as a determining factor in the susceptibility of the human breast to cancer. *The breast journal* **7**, 278-291, doi:10.1046/j.1524-4741.2001.21033.x (2001).
- 130 Maller, O. *et al.* Collagen architecture in pregnancy-induced protection from breast cancer. *Journal of cell science* **126**, 4108-4110, doi:10.1242/jcs.121590 (2013).
- 131 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 research : BCR* **15**, R36, doi:10.1186/bcr3419 (2013).
- 132 Choudhury, S. *et al.* Molecular profiling of human mammary gland links breast cancer risk to a p27(+) cell population with progenitor characteristics. *Cell stem cell* **13**, 117-130, doi:10.1016/j.stem.2013.05.004 (2013).
- 133 Russo, J. *et al.* Molecular basis of pregnancy-induced breast cancer protection. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation* **15**, 306-342, doi:10.1097/00008469-200608000-00006 (2006).
- 134 Santucci-Pereira, J. *et al.* Genomic signature of parity in the breast of premenopausal women. *Breast cancer research : BCR* **21**, 46, doi:10.1186/s13058-019-1128-x (2019).
- 135 Peri, S. *et al.* Defining the genomic signature of the parous breast. *BMC medical genomics* **5**, 46, doi:10.1186/1755-8794-5-46 (2012).
- 136 Russo, J., Balogh, G. A. & Russo, I. H. Full-term pregnancy induces a specific genomic signature in the human breast. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **17**, 51-66, doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-0678 (2008).
- 137 Blakely, C. M. *et al.* Hormone-induced protection against mammary tumorigenesis is conserved in multiple rat strains and identifies a core gene expression signature induced by pregnancy. *Cancer research* **66**, 6421-6431, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4235 (2006).
- 138 Katz, T. A. Potential Mechanisms underlying the Protective Effect of Pregnancy against Breast Cancer: A Focus on the IGF Pathway. *Frontiers in oncology* **6**, 228, doi:10.3389/fonc.2016.00228 (2016).
- 139 Holmes, M. D., Pollak, M. N. & Hankinson, S. E. Lifestyle correlates of plasma insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 3 concentrations. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American*

- Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology **11**, 862-867 (2002).
- 140 Feigman, M. J. *et al.* Pregnancy reprograms the epigenome of mammary epithelial cells and blocks the development of premalignant lesions. *Nature communications* **11**, 2649, doi:10.1038/s41467-020-16479-z (2020).
- 141 Russo, J. *et al.* Pregnancy-induced chromatin remodeling in the breast of postmenopausal women. *International journal of cancer* **131**, 1059-1070, doi:10.1002/ijc.27323 (2012).
- 142 Katz, T. A. *et al.* Targeted DNA Methylation Screen in the Mouse Mammary Genome Reveals a Parity-Induced Hypermethylation of Igf1r That Persists Long after Parturition. *Cancer prevention research* **8**, 1000-1009, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-15-0178 (2015).
- 143 Huh, S. J. *et al.* Age- and pregnancy-associated DNA methylation changes in mammary epithelial cells. *Stem cell reports* **4**, 297-311, doi:10.1016/j.stemcr.2014.12.009 (2015).
- 144 Ranke, M. B. & Wit, J. M. Growth hormone - past, present and future. *Nature reviews. Endocrinology* **14**, 285-300, doi:10.1038/nrendo.2018.22 (2018).
- 145 Lu, M., Flanagan, J. U., Langley, R. J., Hay, M. P. & Perry, J. K. Targeting growth hormone function: strategies and therapeutic applications. *Signal transduction and targeted therapy* **4**, 3, doi:10.1038/s41392-019-0036-y (2019).
- 146 Tao, Y., Pinzi, V., Bourhis, J. & Deutsch, E. Mechanisms of disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway--therapeutic perspectives in cancer. *Nature clinical practice. Oncology* **4**, 591-602, doi:10.1038/ncponc0934 (2007).
- 147 Wang, Y., Bikle, D. D. & Chang, W. Autocrine and Paracrine Actions of IGF-I Signaling in Skeletal Development. *Bone research* **1**, 249-259, doi:10.4248/BR201303003 (2013).
- 148 Giustina, A., Mazziotti, G. & Canalis, E. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocrine reviews* **29**, 535-559, doi:10.1210/er.2007-0036 (2008).
- 149 Lamberts, S. W., de Herder, W. W. & Hofland, L. J. Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **13**, 451-457, doi:10.1016/s1043-2760(02)00667-7 (2002).
- 150 de Vos, A. M., Ultsch, M. & Kossiakoff, A. A. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* **255**, 306-312, doi:10.1126/science.1549776 (1992).
- 151 Cunningham, B. C. *et al.* Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* **254**, 821-825, doi:10.1126/science.1948064 (1991).
- 152 Brooks, A. J. & Waters, M. J. The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications. *Nature reviews. Endocrinology* **6**, 515-525, doi:10.1038/nrendo.2010.123 (2010).
- 153 Adams, T. E., Epa, V. C., Garrett, T. P. & Ward, C. W. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **57**, 1050-1093, doi:10.1007/PL00000744 (2000).
- 154 Yakar, S. & Adamo, M. L. Insulin-like growth factor 1 physiology: lessons from mouse models. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* **41**, 231-247, v, doi:10.1016/j.ecl.2012.04.008 (2012).
- 155 Chalabi, M. *et al.* Somatostatin analogs: does pharmacology impact antitumor efficacy? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **25**, 115-127, doi:10.1016/j.tem.2013.11.003 (2014).
- 156 Murray, R. D. *et al.* Central and peripheral actions of somatostatin on the growth hormone-IGF-I axis. *The Journal of clinical investigation* **114**, 349-356, doi:10.1172/JCI19933 (2004).
- 157 Pyronnet, S. *et al.* Antitumor effects of somatostatin. *Molecular and cellular endocrinology* **286**, 230-237, doi:10.1016/j.mce.2008.02.002 (2008).

Bibliografía

- 158 Duran-Prado, M., Malagon, M. M., Gracia-Navarro, F. & Castano, J. P. Dimerization of G protein-coupled receptors: new avenues for somatostatin receptor signalling, control and functioning. *Molecular and cellular endocrinology* **286**, 63-68, doi:10.1016/j.mce.2007.12.006 (2008).
- 159 Rocheville, M. *et al.* Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *The Journal of biological chemistry* **275**, 7862-7869, doi:10.1074/jbc.275.11.7862 (2000).
- 160 Rocheville, M. *et al.* Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* **288**, 154-157, doi:10.1126/science.288.5463.154 (2000).
- 161 Kumar, U. Cross-talk and modulation of signaling between somatostatin and growth factor receptors. *Endocrine* **40**, 168-180, doi:10.1007/s12020-011-9524-8 (2011).
- 162 Ohlsson, C., Bengtsson, B. A., Isaksson, O. G., Andreassen, T. T. & Słotweg, M. C. Growth hormone and bone. *Endocrine reviews* **19**, 55-79, doi:10.1210/edrv.19.1.0324 (1998).
- 163 Velloso, C. P. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *British journal of pharmacology* **154**, 557-568, doi:10.1038/bjp.2008.153 (2008).
- 164 Vijayakumar, A., Novosyadlyy, R., Wu, Y., Yakar, S. & LeRoith, D. Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* **20**, 1-7, doi:10.1016/j.ghir.2009.09.002 (2010).
- 165 Ipsa, E., Cruzat, V. F., Kagize, J. N., Yovich, J. L. & Keane, K. N. Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor Action in Reproductive Tissues. *Frontiers in endocrinology* **10**, 777, doi:10.3389/fendo.2019.00777 (2019).
- 166 Nieto-Estevez, V., Defterali, C. & Vicario-Abejon, C. IGF-I: A Key Growth Factor that Regulates Neurogenesis and Synaptogenesis from Embryonic to Adult Stages of the Brain. *Frontiers in neuroscience* **10**, 52, doi:10.3389/fnins.2016.00052 (2016).
- 167 Clark, R. The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocrine reviews* **18**, 157-179, doi:10.1210/edrv.18.2.0296 (1997).
- 168 Mol, J. A., van Garderen, E., Rutteman, G. R. & Rijnberk, A. New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **57**, 67-71, doi:10.1016/0960-0760(95)00251-0 (1996).
- 169 Raccurt, M. *et al.* High stromal and epithelial human gh gene expression is associated with proliferative disorders of the mammary gland. *The Journal of endocrinology* **175**, 307-318, doi:10.1677/joe.0.1750307 (2002).
- 170 Lyons, W. R., Li, C. H. & Johnson, R. E. The hormonal control of mammary growth and lactation. *Recent progress in hormone research* **14**, 219-248; discussion 248-254 (1958).
- 171 Nandi, S. Endocrine control of mammary gland development and function in the C3H/He Crgl mouse. *Journal of the National Cancer Institute* **21**, 1039-1063 (1958).
- 172 Feldman, M., Ruan, W., Cunningham, B. C., Wells, J. A. & Kleinberg, D. L. Evidence that the growth hormone receptor mediates differentiation and development of the mammary gland. *Endocrinology* **133**, 1602-1608, doi:10.1210/endo.133.4.8404600 (1993).
- 173 Kleinberg, D. L., Feldman, M. & Ruan, W. IGF-I: an essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **5**, 7-17, doi:10.1023/a:1009507030633 (2000).
- 174 Richards, R. G., Klotz, D. M., Walker, M. P. & Diaugustine, R. P. Mammary gland branching morphogenesis is diminished in mice with a deficiency of insulin-like growth

- factor-I (IGF-I), but not in mice with a liver-specific deletion of IGF-I. *Endocrinology* **145**, 3106-3110, doi:10.1210/en.2003-1112 (2004).
- 175 Divisova, J. *et al.* The growth hormone receptor antagonist pegvisomant blocks both mammary gland development and MCF-7 breast cancer xenograft growth. *Breast cancer research and treatment* **98**, 315-327, doi:10.1007/s10549-006-9168-1 (2006).
- 176 Kleinberg, D. L., Wood, T. L., Furth, P. A. & Lee, A. V. Growth hormone and insulin-like growth factor-I in the transition from normal mammary development to preneoplastic mammary lesions. *Endocrine reviews* **30**, 51-74, doi:10.1210/er.2008-0022 (2009).
- 177 Kleinberg, D. L. & Barcellos-Hoff, M. H. The pivotal role of insulin-like growth factor I in normal mammary development. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* **40**, 461-471, vii, doi:10.1016/j.ecl.2011.06.001 (2011).
- 178 Macias, H. & Hinck, L. Mammary gland development. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* **1**, 533-557, doi:10.1002/wdev.35 (2012).
- 179 Subramani, R., Nandy, S. B., Pedroza, D. A. & Lakshmanaswamy, R. Role of Growth Hormone in Breast Cancer. *Endocrinology* **158**, 1543-1555, doi:10.1210/en.2016-1928 (2017).
- 180 Perry, J. K., Mohankumar, K. M., Emerald, B. S., Mertani, H. C. & Lobie, P. E. The contribution of growth hormone to mammary neoplasia. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **13**, 131-145, doi:10.1007/s10911-008-9070-z (2008).
- 181 Luft, R., Olivecrona, H. & Sjogren, B. [Hypophysectomy in man]. *Nordisk medicin* **47**, 351-354 (1952).
- 182 Ray, B. S. & Pearson, O. H. Hypophysectomy in treatment of disseminated breast cancer. *The Surgical clinics of North America* **42**, 419-433, doi:10.1016/s0039-6109(16)36638-5 (1962).
- 183 Wagner, K., Hemminki, K. & Forsti, A. The GH1/IGF-1 axis polymorphisms and their impact on breast cancer development. *Breast cancer research and treatment* **104**, 233-248, doi:10.1007/s10549-006-9411-9 (2007).
- 184 Renehan, A. G. *et al.* Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet* **363**, 1346-1353, doi:10.1016/S0140-6736(04)16044-3 (2004).
- 185 Shi, R., Yu, H., McLarty, J. & Glass, J. IGF-I and breast cancer: a meta-analysis. *International journal of cancer* **111**, 418-423, doi:10.1002/ijc.20233 (2004).
- 186 Hankinson, S. E. *et al.* Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* **351**, 1393-1396, doi:10.1016/S0140-6736(97)10384-1 (1998).
- 187 Shevah, O. & Laron, Z. Patients with congenital deficiency of IGF-I seem protected from the development of malignancies: a preliminary report. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* **17**, 54-57, doi:10.1016/j.ghir.2006.10.007 (2007).
- 188 Steuerman, R., Shevah, O. & Laron, Z. Congenital IGF1 deficiency tends to confer protection against post-natal development of malignancies. *European journal of endocrinology* **164**, 485-489, doi:10.1530/EJE-10-0859 (2011).
- 189 Pollak, M., Blouin, M. J., Zhang, J. C. & Kopchick, J. J. Reduced mammary gland carcinogenesis in transgenic mice expressing a growth hormone antagonist. *British journal of cancer* **85**, 428-430, doi:10.1054/bjoc.2001.1895 (2001).
- 190 Swanson, S. M. & Unterman, T. G. The growth hormone-deficient Spontaneous Dwarf rat is resistant to chemically induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* **23**, 977-982, doi:10.1093/carcin/23.6.977 (2002).
- 191 Shen, Q. *et al.* Advanced rat mammary cancers are growth hormone dependent. *Endocrinology* **148**, 4536-4544, doi:10.1210/en.2007-0513 (2007).
- 192 Thordarson, G. *et al.* Mammary tumorigenesis in growth hormone deficient spontaneous dwarf rats; effects of hormonal treatments. *Breast cancer research and treatment* **87**, 277-290, doi:10.1007/s10549-004-9504-2 (2004).

Bibliografía

- 193 Jones, R. A. *et al.* Transgenic overexpression of IGF-IR disrupts mammary ductal morphogenesis and induces tumor formation. *Oncogene* **26**, 1636-1644, doi:10.1038/sj.onc.1209955 (2007).
- 194 Kim, H. J. *et al.* Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF-kappaB and snail. *Molecular and cellular biology* **27**, 3165-3175, doi:10.1128/MCB.01315-06 (2007).
- 195 Wu, Z. S. *et al.* Tumor expression of human growth hormone and human prolactin predict a worse survival outcome in patients with mammary or endometrial carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **96**, E1619-1629, doi:10.1210/jc.2011-1245 (2011).
- 196 Mukhina, S. *et al.* Phenotypic conversion of human mammary carcinoma cells by autocrine human growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15166-15171, doi:10.1073/pnas.0405881101 (2004).
- 197 Yang, X. F., Beamer, W. G., Huynh, H. & Pollak, M. Reduced growth of human breast cancer xenografts in hosts homozygous for the lit mutation. *Cancer research* **56**, 1509-1511 (1996).
- 198 Zhu, T. *et al.* Oncogenic transformation of human mammary epithelial cells by autocrine human growth hormone. *Cancer research* **65**, 317-324 (2005).
- 199 Lombardi, S. *et al.* Growth hormone is secreted by normal breast epithelium upon progesterone stimulation and increases proliferation of stem/progenitor cells. *Stem cell reports* **2**, 780-793, doi:10.1016/j.stemcr.2014.05.005 (2014).
- 200 Emerald, B. S. *et al.* AlphaCP1 mediates stabilization of hTERT mRNA by autocrine human growth hormone. *The Journal of biological chemistry* **282**, 680-690, doi:10.1074/jbc.M600224200 (2007).
- 201 Mertani, H. C. *et al.* Autocrine human growth hormone (hGH) regulation of human mammary carcinoma cell gene expression. Identification of CHOP as a mediator of hGH-stimulated human mammary carcinoma cell survival. *The Journal of biological chemistry* **276**, 21464-21475, doi:10.1074/jbc.M100437200 (2001).
- 202 Kaulsay, K. K. *et al.* Autocrine stimulation of human mammary carcinoma cell proliferation by human growth hormone. *Experimental cell research* **250**, 35-50, doi:10.1006/excr.1999.4492 (1999).
- 203 Brunet-Dunand, S. E. *et al.* Autocrine human growth hormone promotes tumor angiogenesis in mammary carcinoma. *Endocrinology* **150**, 1341-1352, doi:10.1210/en.2008-0608 (2009).
- 204 Baskari, S. *et al.* Influence of autocrine growth hormone on NF-kappaB activation leading to epithelial-mesenchymal transition of mammary carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **39**, 1010428317719121, doi:10.1177/1010428317719121 (2017).
- 205 D'Esposito, V. *et al.* Adipocyte-released insulin-like growth factor-1 is regulated by glucose and fatty acids and controls breast cancer cell growth in vitro. *Diabetologia* **55**, 2811-2822, doi:10.1007/s00125-012-2629-7 (2012).
- 206 Tian, J. *et al.* Transgenic insulin-like growth factor-1 stimulates activation of COX-2 signaling in mammary glands. *Molecular carcinogenesis* **51**, 973-983, doi:10.1002/mc.20868 (2012).
- 207 de Ostrovich, K. K. *et al.* Paracrine overexpression of insulin-like growth factor-1 enhances mammary tumorigenesis in vivo. *The American journal of pathology* **173**, 824-834, doi:10.2353/ajpath.2008.071005 (2008).

- 208 Hofland, L. J. & Lamberts, S. W. The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance. *Endocrine reviews* **24**, 28-47, doi:10.1210/er.2000-0001 (2003).
- 209 Moller, L. N., Stidsen, C. E., Hartmann, B. & Holst, J. J. Somatostatin receptors. *Biochimica et biophysica acta* **1616**, 1-84, doi:10.1016/s0005-2736(03)00235-9 (2003).
- 210 Kumar, U. *et al.* Somatostatin receptors in primary human breast cancer: quantitative analysis of mRNA for subtypes 1--5 and correlation with receptor protein expression and tumor pathology. *Breast cancer research and treatment* **92**, 175-186, doi:10.1007/s10549-005-2414-0 (2005).
- 211 van Eijck, C. H. *et al.* Somatostatin-receptor scintigraphy in primary breast cancer. *Lancet* **343**, 640-643, doi:10.1016/s0140-6736(94)92637-9 (1994).
- 212 Orlando, C. *et al.* Measurement of somatostatin receptor subtype 2 mRNA in breast cancer and corresponding normal tissue. *Endocrine-related cancer* **11**, 323-332, doi:10.1677/erc.0.0110323 (2004).
- 213 Frati, A. *et al.* Expression of somatostatin type-2 and -4 receptor and correlation with histological type in breast cancer. *Anticancer research* **34**, 3997-4003 (2014).
- 214 Pilichowska, M. *et al.* Expression of somatostatin type 2A receptor correlates with estrogen receptor in human breast carcinoma. *Endocrine pathology* **11**, 57-67, doi:10.1385/ep:11:1:57 (2000).
- 215 Xu, Y., Song, J., Berelowitz, M. & Bruno, J. F. Estrogen regulates somatostatin receptor subtype 2 messenger ribonucleic acid expression in human breast cancer cells. *Endocrinology* **137**, 5634-5640, doi:10.1210/endo.137.12.8940394 (1996).
- 216 Kimura, N., Takamatsu, N., Yaoita, Y., Osamura, R. Y. & Kimura, N. Identification of transcriptional regulatory elements in the human somatostatin receptor sst2 promoter and regions including estrogen response element half-site for estrogen activation. *Journal of molecular endocrinology* **40**, 75-91, doi:10.1677/JME-07-0108 (2008).
- 217 He, Y. *et al.* The antiproliferative effects of somatostatin receptor subtype 2 in breast cancer cells. *Acta pharmacologica Sinica* **30**, 1053-1059, doi:10.1038/aps.2009.59 (2009).
- 218 Duran-Prado, M. *et al.* The new truncated somatostatin receptor variant sst5TMD4 is associated to poor prognosis in breast cancer and increases malignancy in MCF-7 cells. *Oncogene* **31**, 2049-2061, doi:10.1038/onc.2011.389 (2012).
- 219 War, S. A., Kim, B. & Kumar, U. Human somatostatin receptor-3 distinctively induces apoptosis in MCF-7 and cell cycle arrest in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Molecular and cellular endocrinology* **413**, 129-144, doi:10.1016/j.mce.2015.06.019 (2015).
- 220 Anthony, L. & Freda, P. U. From somatostatin to octreotide LAR: evolution of a somatostatin analogue. *Current medical research and opinion* **25**, 2989-2999, doi:10.1185/03007990903328959 (2009).
- 221 Chanson, P., Timsit, J. & Harris, A. G. Clinical pharmacokinetics of octreotide. Therapeutic applications in patients with pituitary tumours. *Clinical pharmacokinetics* **25**, 375-391, doi:10.2165/00003088-199325050-00004 (1993).
- 222 Gillis, J. C., Noble, S. & Goa, K. L. Octreotide long-acting release (LAR). A review of its pharmacological properties and therapeutic use in the management of acromegaly. *Drugs* **53**, 681-699, doi:10.2165/00003495-199753040-00009 (1997).
- 223 Ronchi, C. L. *et al.* Efficacy of a slow-release formulation of lanreotide (Autogel) 120 mg in patients with acromegaly previously treated with octreotide long acting release (LAR): an open, multicentre longitudinal study. *Clinical endocrinology* **67**, 512-519, doi:10.1111/j.1365-2265.2007.02917.x (2007).
- 224 Caplin, M. E. *et al.* Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors. *The New England journal of medicine* **371**, 224-233, doi:10.1056/NEJMoa1316158 (2014).

Bibliografía

- 225 Vinik, A. I. *et al.* Evaluation of Lanreotide Depot/Autogel Efficacy and Safety as a Carcinoid Syndrome Treatment (Elect): A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* **22**, 1068-1080, doi:10.4158/EP151172.OR (2016).
- 226 Schmid, H. A. Pasireotide (SOM230): development, mechanism of action and potential applications. *Molecular and cellular endocrinology* **286**, 69-74, doi:10.1016/j.mce.2007.09.006 (2008).
- 227 Bruns, C., Lewis, I., Briner, U., Meno-Tetang, G. & Weckbecker, G. SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *European journal of endocrinology* **146**, 707-716, doi:10.1530/eje.0.1460707 (2002).
- 228 Huynh, H. & Pollak, M. Enhancement of tamoxifen-induced suppression of insulin-like growth factor I gene expression and serum level by a somatostatin analogue. *Biochemical and biophysical research communications* **203**, 253-259, doi:10.1006/bbrc.1994.2175 (1994).
- 229 Weckbecker, G., Tolcsvai, L., Stolz, B., Pollak, M. & Bruns, C. Somatostatin analogue octreotide enhances the antineoplastic effects of tamoxifen and ovariectomy on 7,12-dimethylbenz(alpha)anthracene-induced rat mammary carcinomas. *Cancer research* **54**, 6334-6337 (1994).
- 230 Ingle, J. N. *et al.* A randomized trial of tamoxifen alone or combined with octreotide in the treatment of women with metastatic breast carcinoma. *Cancer* **85**, 1284-1292, doi:10.1002/(sici)1097-0142(19990315)85:6<1284::aid-cnrc10>3.0.co;2-p (1999).
- 231 Pritchard, K. I. *et al.* Randomized trial of tamoxifen versus combined tamoxifen and octreotide LAR Therapy in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer in postmenopausal women: NCIC CTG MA.14. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 3869-3876, doi:10.1200/JCO.2010.33.7006 (2011).
- 232 Chereau, E. *et al.* Evaluation of the Effects of Pasireotide LAR Administration on Lymphocele Prevention after Axillary Node Dissection for Breast Cancer: Results of a Randomized Non-Comparative Phase 2 Study. *PloS one* **11**, e0156096, doi:10.1371/journal.pone.0156096 (2016).
- 233 Singh, B. *et al.* Insulin-like growth factor-I inhibition with pasireotide decreases cell proliferation and increases apoptosis in pre-malignant lesions of the breast: a phase 1 proof of principle trial. *Breast cancer research : BCR* **16**, 463, doi:10.1186/s13058-014-0463-1 (2014).
- 234 Ruan, W. *et al.* SOM230 inhibits insulin-like growth factor-I action in mammary gland development by pituitary independent mechanism: mediated through somatostatin subtype receptor 3? *Molecular endocrinology* **20**, 426-436, doi:10.1210/me.2005-0283 (2006).
- 235 Kleinberg, D. L., Ameri, P. & Singh, B. Pasireotide, an IGF-I action inhibitor, prevents growth hormone and estradiol-induced mammary hyperplasia. *Pituitary* **14**, 44-52, doi:10.1007/s11102-010-0257-0 (2011).
- 236 van der Hoek, J. *et al.* The somatostatin analogue SOM230, compared with octreotide, induces differential effects in several metabolic pathways in acromegalic patients. *Clinical endocrinology* **63**, 176-184, doi:10.1111/j.1365-2265.2005.02322.x (2005).
- 237 Novartis Pharmaceuticals Signifor LAR Prescribing Information. 2019. Available from: http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/signifor_lar.pdf (accessed April 8, 2022).
- 238 Hartmann, L. C. *et al.* Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer. *The New England journal of medicine* **340**, 77-84, doi:10.1056/NEJM199901143400201 (1999).

- 239 Rebbeck, T. R. *et al.* Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **22**, 1055-1062, doi:10.1200/JCO.2004.04.188 (2004).
- 240 Domchek, S. M. *et al.* Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *Jama* **304**, 967-975, doi:10.1001/jama.2010.1237 (2010).
- 241 Barton, M. B. *et al.* Complications following bilateral prophylactic mastectomy. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 61-66, doi:10.1093/jncimonographs/lgi039 (2005).
- 242 den Heijer, M. *et al.* Body image and psychological distress after prophylactic mastectomy and breast reconstruction in genetically predisposed women: a prospective long-term follow-up study. *European journal of cancer* **48**, 1263-1268, doi:10.1016/j.ejca.2011.10.020 (2012).
- 243 Cuzick, J. *et al.* Selective oestrogen receptor modulators in prevention of breast cancer: an updated meta-analysis of individual participant data. *Lancet* **381**, 1827-1834, doi:10.1016/S0140-6736(13)60140-3 (2013).
- 244 Cuzick, J. *et al.* Tamoxifen for prevention of breast cancer: extended long-term follow-up of the IBIS-I breast cancer prevention trial. *The Lancet. Oncology* **16**, 67-75, doi:10.1016/S1470-2045(14)71171-4 (2015).
- 245 Nelson, H. D., Smith, M. E., Griffin, J. C. & Fu, R. Use of medications to reduce risk for primary breast cancer: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of internal medicine* **158**, 604-614, doi:10.7326/0003-4819-158-8-201304160-00005 (2013).
- 246 Cummings, S. R. *et al.* The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *Jama* **281**, 2189-2197, doi:10.1001/jama.281.23.2189 (1999).
- 247 Vogel, V. G. *et al.* Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *Jama* **295**, 2727-2741, doi:10.1001/jama.295.23.joc60074 (2006).
- 248 Freedman, A. N. *et al.* Benefit/risk assessment for breast cancer chemoprevention with raloxifene or tamoxifen for women age 50 years or older. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 2327-2333, doi:10.1200/JCO.2010.33.0258 (2011).
- 249 Goss, P. E. *et al.* Exemestane for breast-cancer prevention in postmenopausal women. *The New England journal of medicine* **364**, 2381-2391, doi:10.1056/NEJMoa1103507 (2011).
- 250 Cuzick, J. *et al.* Anastrozole for prevention of breast cancer in high-risk postmenopausal women (IBIS-II): an international, double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **383**, 1041-1048, doi:10.1016/S0140-6736(13)62292-8 (2014).
- 251 Cuzick, J. *et al.* Use of anastrozole for breast cancer prevention (IBIS-II): long-term results of a randomised controlled trial. *Lancet* **395**, 117-122, doi:10.1016/S0140-6736(19)32955-1 (2020).
- 252 Cuzick, J. Aromatase inhibitors for breast cancer prevention. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**, 1636-1643, doi:10.1200/JCO.2005.11.027 (2005).
- 253 Liede, A. *et al.* Preferences for breast cancer risk reduction among BRCA1/BRCA2 mutation carriers: a discrete-choice experiment. *Breast cancer research and treatment* **165**, 433-444, doi:10.1007/s10549-017-4332-3 (2017).

Bibliografía

- 254 Roetzheim, R. G. *et al.* Acceptance and adherence to chemoprevention among women at increased risk of breast cancer. *Breast* **24**, 51-56, doi:10.1016/j.breast.2014.11.006 (2015).
- 255 Skandarajah, A. R. *et al.* Patient and medical barriers preclude uptake of tamoxifen preventative therapy in women with a strong family history. *Breast* **32**, 93-97, doi:10.1016/j.breast.2017.01.002 (2017).
- 256 Liu, X. *et al.* Somatic loss of BRCA1 and p53 in mice induces mammary tumors with features of human BRCA1-mutated basal-like breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 12111-12116, doi:10.1073/pnas.0702969104 (2007).
- 257 Jonkers, J. *et al.* Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nature genetics* **29**, 418-425, doi:10.1038/ng747 (2001).
- 258 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**, 10578-10582, doi:10.1073/pnas.89.22.10578 (1992).
- 259 Luche, H., Weber, O., Nageswara Rao, T., Blum, C. & Fehling, H. J. Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in "knock-in" Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. *European journal of immunology* **37**, 43-53, doi:10.1002/eji.200636745 (2007).
- 260 Walls, G. V. *et al.* Pasireotide Therapy of Multiple Endocrine Neoplasia Type 1-Associated Neuroendocrine Tumors in Female Mice Deleted for an Men1 Allele Improves Survival and Reduces Tumor Progression. *Endocrinology* **157**, 1789-1798, doi:10.1210/en.2015-1965 (2016).
- 261 Pickering, C. R. *et al.* Mutational landscape of aggressive cutaneous squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**, 6582-6592, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1768 (2014).
- 262 Rowse, G. J., Ritland, S. R. & Gendler, S. J. Genetic modulation of neu proto-oncogene-induced mammary tumorigenesis. *Cancer research* **58**, 2675-2679 (1998).
- 263 Smalley, M. J. Isolation, culture and analysis of mouse mammary epithelial cells. *Methods in molecular biology* **633**, 139-170, doi:10.1007/978-1-59745-019-5_11 (2010).
- 264 Porter, A. G. & Janicke, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation* **6**, 99-104, doi:10.1038/sj.cdd.4400476 (1999).
- 265 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**, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262 (2001).
- 266 Ball, R. K., Friis, R. R., Schoenenberger, C. A., Doppler, W. & Groner, B. Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *The EMBO journal* **7**, 2089-2095 (1988).
- 267 Castillo-Lluva, S. *et al.* A new role of SNAI2 in postlactational involution of the mammary gland links it to luminal breast cancer development. *Oncogene* **34**, 4777-4790, doi:10.1038/onc.2015.224 (2015).
- 268 Tomlinson, G. E. *et al.* Characterization of a breast cancer cell line derived from a germ-line BRCA1 mutation carrier. *Cancer research* **58**, 3237-3242 (1998).
- 269 Lorenzo Pisarello, M. *et al.* Combination of a Histone Deacetylase 6 Inhibitor and a Somatostatin Receptor Agonist Synergistically Reduces Hepatorenal Cystogenesis in an Animal Model of Polycystic Liver Disease. *The American journal of pathology* **188**, 981-994, doi:10.1016/j.ajpath.2017.12.016 (2018).

- 270 Masyuk, T. V. *et al.* TGR5 contributes to hepatic cystogenesis in rodents with polycystic liver diseases through cyclic adenosine monophosphate/Galphas signaling. *Hepatology* **66**, 1197-1218, doi:10.1002/hep.29284 (2017).
- 271 Smith, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* **150**, 76-85, doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7 (1985).
- 272 Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**, 55-63, doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4 (1983).
- 273 Guy, C. T., Cardiff, R. D. & Muller, W. J. Activated neu induces rapid tumor progression. *The Journal of biological chemistry* **271**, 7673-7678, doi:10.1074/jbc.271.13.7673 (1996).
- 274 Kuperwasser, C. *et al.* Development of spontaneous mammary tumors in BALB/c p53 heterozygous mice. A model for Li-Fraumeni syndrome. *The American journal of pathology* **157**, 2151-2159, doi:10.1016/S0002-9440(10)64853-5 (2000).
- 275 Gendzekhadze, K., Gaidulis, L. & Senitzer, D. Chimerism testing by quantitative PCR using Indel markers. *Methods in molecular biology* **1034**, 221-237, doi:10.1007/978-1-62703-493-7_11 (2013).
- 276 Vicente, D. C., Laranjeira, A. B., Miranda, E. C., Yunes, J. A. & de Souza, C. A. Chimerism interpretation with a highly sensitive quantitative PCR method: 6 months median latency before chimerism drop below 0.1. *Bone marrow transplantation* **51**, 874-875, doi:10.1038/bmt.2016.5 (2016).
- 277 Watson, C. J. & Kreuzaler, P. A. Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *The International journal of developmental biology* **55**, 757-762, doi:10.1387/ijdb.113414cw (2011).
- 278 Lofgren, K. A. *et al.* Mammary gland specific expression of Brk/PTK6 promotes delayed involution and tumor formation associated with activation of p38 MAPK. *Breast cancer research : BCR* **13**, R89, doi:10.1186/bcr2946 (2011).
- 279 Rossi, V. *et al.* Estrogens Modulate Somatostatin Receptors Expression and Synergize With the Somatostatin Analog Pasireotide in Prostate Cells. *Frontiers in pharmacology* **10**, 28, doi:10.3389/fphar.2019.00028 (2019).
- 280 Treppiedi, D. *et al.* Somatostatin analogs regulate tumor corticotrophs growth by reducing ERK1/2 activity. *Molecular and cellular endocrinology* **483**, 31-38, doi:10.1016/j.mce.2018.12.022 (2019).
- 281 Pasquali, D. *et al.* Effects of somatostatin analog SOM230 on cell proliferation, apoptosis, and catecholamine levels in cultured pheochromocytoma cells. *Journal of molecular endocrinology* **40**, 263-271, doi:10.1677/JME-08-0012 (2008).
- 282 Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods* **184**, 39-51, doi:10.1016/0022-1759(95)00072-i (1995).
- 283 Strosberg, J. & Kvols, L. Antiproliferative effect of somatostatin analogs in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *World journal of gastroenterology* **16**, 2963-2970, doi:10.3748/wjg.v16.i24.2963 (2010).
- 284 Pollak, M. N., Schernhammer, E. S. & Hankinson, S. E. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nature reviews. Cancer* **4**, 505-518, doi:10.1038/nrc1387 (2004).
- 285 Normanno, N. *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* **366**, 2-16, doi:10.1016/j.gene.2005.10.018 (2006).
- 286 Simons, M., Gordon, E. & Claesson-Welsh, L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **17**, 611-625, doi:10.1038/nrm.2016.87 (2016).

Bibliografía

- 287 Bi, W. L. *et al.* Artificial intelligence in cancer imaging: Clinical challenges and applications. *CA: a cancer journal for clinicians* **69**, 127-157, doi:10.3322/caac.21552 (2019).
- 288 Day, R., National Surgical Adjuvant, B. & Bowel Project, P. s. Quality of life and tamoxifen in a breast cancer prevention trial: a summary of findings from the NSABP P-1 study. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project. *Annals of the New York Academy of Sciences* **949**, 143-150 (2001).
- 289 Waters, E. A., Cronin, K. A., Graubard, B. I., Han, P. K. & Freedman, A. N. Prevalence of tamoxifen use for breast cancer chemoprevention among U.S. women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **19**, 443-446, doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0930 (2010).
- 290 Nelson, H. D., Fu, R., Zakher, B., Pappas, M. & McDonagh, M. Medication Use for the Risk Reduction of Primary Breast Cancer in Women: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *Jama* **322**, 868-886, doi:10.1001/jama.2019.5780 (2019).
- 291 National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology and End Results Program. Cancer Stat Facts: Female Breast Cancer Subtypes. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast-subtypes.html> (accessed April 8, 2022). .
- 292 Matthews, T. J. & Hamilton, B. E. First births to older women continue to rise. *NCHS data brief*, 1-8 (2014).
- 293 Martin, J. A., Hamilton, B. E., Osterman, M. J. K. & Driscoll, A. K. Births: Final Data for 2018. *National vital statistics reports : from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System* **68**, 1-47 (2019).
- 294 Louro, J. *et al.* A systematic review and quality assessment of individualised breast cancer risk prediction models. *British journal of cancer* **121**, 76-85, doi:10.1038/s41416-019-0476-8 (2019).
- 295 Morgan, M. B. & Mates, J. L. Applications of Artificial Intelligence in Breast Imaging. *Radiologic clinics of North America* **59**, 139-148, doi:10.1016/j.rcl.2020.08.007 (2021).
- 296 Ruan, W., Catanese, V., Wiczorek, R., Feldman, M. & Kleinberg, D. L. Estradiol enhances the stimulatory effect of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on mammary development and growth hormone-induced IGF-I messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* **136**, 1296-1302, doi:10.1210/endo.136.3.7867584 (1995).
- 297 Ruan, W. & Kleinberg, D. L. Insulin-like growth factor I is essential for terminal end bud formation and ductal morphogenesis during mammary development. *Endocrinology* **140**, 5075-5081, doi:10.1210/endo.140.11.7095 (1999).
- 298 Ruan, W., Powell-Braxton, L., Kopchick, J. J. & Kleinberg, D. L. Evidence that insulin-like growth factor I and growth hormone are required for prostate gland development. *Endocrinology* **140**, 1984-1989, doi:10.1210/endo.140.5.6721 (1999).
- 299 Hadsell, D. L. & Abdel-Fattah, G. Regulation of cell apoptosis by insulin-like growth factor I. *Advances in experimental medicine and biology* **501**, 79-85, doi:10.1007/978-1-4615-1371-1_9 (2001).
- 300 Stull, M. A., Rowzee, A. M., Loladze, A. V. & Wood, T. L. Growth factor regulation of cell cycle progression in mammary epithelial cells. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **9**, 15-26, doi:10.1023/B:JOMG.0000023585.95430.f4 (2004).
- 301 Christov, K. *et al.* Cell proliferation, apoptosis, and expression of cyclin D1 and cyclin E as potential biomarkers in tamoxifen-treated mammary tumors. *Breast cancer research and treatment* **77**, 253-264, doi:10.1023/a:1021804121171 (2003).
- 302 Guvakova, M. A. & Surmacz, E. Tamoxifen interferes with the insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer research* **57**, 2606-2610 (1997).

- 303 Bonnette, S. G. & Hadsell, D. L. Targeted disruption of the IGF-I receptor gene decreases cellular proliferation in mammary terminal end buds. *Endocrinology* **142**, 4937-4945, doi:10.1210/endo.142.11.8500 (2001).
- 304 Evans, D. G. *et al.* Young age at first pregnancy does protect against early onset breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast cancer research and treatment* **167**, 779-785, doi:10.1007/s10549-017-4557-1 (2018).
- 305 Jernstrom, H. *et al.* Pregnancy and risk of early breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2. *Lancet* **354**, 1846-1850, doi:10.1016/s0140-6736(99)04336-6 (1999).
- 306 Jerry, D. J. *et al.* Delayed involution of the mammary epithelium in BALB/c-p53null mice. *Oncogene* **17**, 2305-2312, doi:10.1038/sj.onc.1202157 (1998).
- 307 Matthews, J. R. & Clarke, A. R. p53 mediates a default programme of mammary gland involution in the absence of STAT3. *Oncogene* **24**, 3083-3090, doi:10.1038/sj.onc.1208512 (2005).
- 308 Kastan, M. B., Canman, C. E. & Leonard, C. J. P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer metastasis reviews* **14**, 3-15, doi:10.1007/BF00690207 (1995).
- 309 Fridman, J. S. & Lowe, S. W. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**, 9030-9040, doi:10.1038/sj.onc.1207116 (2003).
- 310 Sharma, K. & Srikant, C. B. Induction of wild-type p53, Bax, and acidic endonuclease during somatostatin-signaled apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *International journal of cancer* **76**, 259-266, doi:10.1002/(sici)1097-0215(19980413)76:2<259::aid-ijc14>3.0.co;2-7 (1998).
- 311 Buckbinder, L. *et al.* Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* **377**, 646-649, doi:10.1038/377646a0 (1995).
- 312 Stambolic, V. *et al.* Regulation of PTEN transcription by p53. *Molecular cell* **8**, 317-325, doi:10.1016/s1097-2765(01)00323-9 (2001).
- 313 Werner, H., Karnieli, E., Rauscher, F. J. & LeRoith, D. Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8318-8323, doi:10.1073/pnas.93.16.8318 (1996).
- 314 Worthington, J., Bertani, M., Chan, H. L., Gerrits, B. & Timms, J. F. Transcriptional profiling of ErbB signalling in mammary luminal epithelial cells--interplay of ErbB and IGF1 signalling through IGFBP3 regulation. *BMC cancer* **10**, 490, doi:10.1186/1471-2407-10-490 (2010).
- 315 Dong, Q. *et al.* Aging is associated with an expansion of CD49f(hi) mammary stem cells that show a decline in function and increased transformation potential. *Aging* **8**, 2754-2776, doi:10.18632/aging.101082 (2016).
- 316 Bousquet, C. *et al.* Somatostatin receptors and regulation of cell proliferation. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* **36 Suppl 1**, S2-7, doi:10.1016/j.dld.2003.11.007 (2004).
- 317 Teijeiro, R. *et al.* Activation of human somatostatin receptor 2 promotes apoptosis through a mechanism that is independent from induction of p53. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **12**, 31-38, doi:10.1159/000047824 (2002).
- 318 Sharma, K., Patel, Y. C. & Srikant, C. B. Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3. *Molecular endocrinology* **10**, 1688-1696, doi:10.1210/mend.10.12.8961277 (1996).
- 319 Pasquali, D. *et al.* Somatostatin receptor gene expression and inhibitory effects of octreotide on primary cultures of orbital fibroblasts from Graves' ophthalmopathy. *Journal of molecular endocrinology* **25**, 63-71, doi:10.1677/jme.0.0250063 (2000).

Bibliografía

- 320 Tompa, A. *et al.* The somatostatin analogue peptide TT-232 induces apoptosis and chromosome breakage in cultured human lymphocytes. *Mutation research* **465**, 61-68, doi:10.1016/s1383-5718(99)00212-0 (2000).
- 321 Lattuada, D., Casnici, C., Venuto, A. & Marelli, O. The apoptotic effect of somatostatin analogue SMS 201-995 on human lymphocytes. *Journal of neuroimmunology* **133**, 211-216, doi:10.1016/s0165-5728(02)00364-8 (2002).
- 322 Thompson, J. S. Somatostatin analogue predisposes enterocytes to apoptosis. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* **2**, 167-173, doi:10.1016/s1091-255x(98)80009-7 (1998).
- 323 Guillermet, J. *et al.* Somatostatin receptor subtype 2 sensitizes human pancreatic cancer cells to death ligand-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 155-160, doi:10.1073/pnas.0136771100 (2003).
- 324 Theodoropoulou, M. & Stalla, G. K. Somatostatin receptors: from signaling to clinical practice. *Frontiers in neuroendocrinology* **34**, 228-252, doi:10.1016/j.yfrne.2013.07.005 (2013).
- 325 Lukanova, A. *et al.* Insulin-like growth factor I in pregnancy and maternal risk of breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **15**, 2489-2493, doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0625 (2006).
- 326 Toriola, A. T. *et al.* Circulating insulin-like growth factor-I in pregnancy and maternal risk of breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **20**, 1798-1801, doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-0441 (2011).
- 327 Loladze, A. V. *et al.* Epithelial-specific and stage-specific functions of insulin-like growth factor-I during postnatal mammary development. *Endocrinology* **147**, 5412-5423, doi:10.1210/en.2006-0427 (2006).
- 328 Richert, M. M. & Wood, T. L. The insulin-like growth factors (IGF) and IGF type I receptor during postnatal growth of the murine mammary gland: sites of messenger ribonucleic acid expression and potential functions. *Endocrinology* **140**, 454-461, doi:10.1210/endo.140.1.6413 (1999).
- 329 Walden, P. D., Ruan, W., Feldman, M. & Kleinberg, D. L. Evidence that the mammary fat pad mediates the action of growth hormone in mammary gland development. *Endocrinology* **139**, 659-662, doi:10.1210/endo.139.2.5718 (1998).
- 330 Villa-Osaba, A. *et al.* Obesity alters gene expression for GH/IGF-I axis in mouse mammary fat pads: differential role of cortistatin and somatostatin. *PLoS one* **10**, e0120955, doi:10.1371/journal.pone.0120955 (2015).
- 331 Schmid, H. A. & Brueggen, J. Effects of somatostatin analogs on glucose homeostasis in rats. *The Journal of endocrinology* **212**, 49-60, doi:10.1530/JOE-11-0224 (2012).
- 332 Bolanowski, M., Kaluzny, M., Witek, P. & Jawiarczyk-Przybyłowska, A. Pasireotide-a novel somatostatin receptor ligand after 20 years of use. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, doi:10.1007/s11154-022-09710-3 (2022).

