

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA - CSIC

Departamento de Fisiología y Farmacología

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN DE DETERMINANTES MOLECULARES Y
GENÉTICOS COMUNES A LA SUSCEPTIBILIDAD DEL
CÁNCER DE MAMA Y AL ENVEJECIMIENTO MEDIANTE
UNA ESTRATEGIA DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS**

MENCIÓN “DOCTORADO INTERNACIONAL”

MARÍA DEL MAR SÁEZ FREIRE

Salamanca, 2016

MARÍA JESÚS MONTE RÍO, Directora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, elaborado por **Dña. María del Mar Sáez Freire** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, con el título **“IDENTIFICACIÓN DE DETERMINANTES MOLECULARES Y GENÉTICOS COMUNES A LA SUSCEPTIBILIDAD DEL CÁNCER DE MAMA Y AL ENVEJECIMIENTO MEDIANTE UNA ESTRATEGIA DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS”**, ha sido realizado bajo la dirección conjunta de la Dra. Dña. María Eugenia Muñoz Bermejo y el Dr. D. Jesús Pérez Losada, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma el presente certificado en Salamanca, a 9 de febrero de 2016.



Fdo.: Dra. Dña. María Jesús Monte Río

MARÍA EUGENIA MUÑOZ BERMEJO, Catedrática de Fisiología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y JESÚS PÉREZ LOSADA, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca,

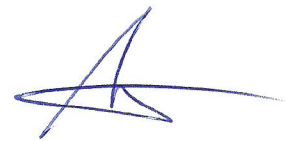
CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado **“IDENTIFICACIÓN DE DETERMINANTES MOLECULARES Y GENÉTICOS COMUNES A LA SUSCEPTIBILIDAD DEL CÁNCER DE MAMA Y AL ENVEJECIMIENTO MEDIANTE UNA ESTRATEGIA DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS”**, que presenta la doctoranda Dña. María del Mar Sáez Freire, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca, y reúne, a su juicio, las condiciones de originalidad y rigor científico necesarias para ser presentado ante el correspondiente Tribunal y optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca, a 9 de febrero de 2016.



Fdo.: Dra. Dña. María Eugenia Muñoz Bermejo



Fdo.: Dr. D. Jesús Pérez Losada

La investigación en nuestro laboratorio ha estado financiada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), el Ministerio de Economía y Competitividad (MICINN) (PLE2009-119, SAF2014-56989-R); el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) Instituto de Salud Carlos III (PI07/0057, PI10/00328, PIE14/00066); La Junta de Castilla y León (SAN673/SA26/08, SAN126/SA66/09, SA078A09, CSI034U13); La “Fundación Eugenio Rodríguez Pascual”; La “Fundación Inbiomed” (Instituto Oncológico Obra Social de la Caja Guipuzcoa-San Sebastian, Kutxa); y la “Fundación Sandra Ibarra de Solidaridad frente al Cáncer”.

Durante el transcurso de este trabajo, he sido beneficiaria de un Contrato de Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria (PIRTU), de la Junta de Castilla y León (Orden EDU/1204/2010); y de una beca con cargo a la investigación (Contrato Art.83 LOU (GRIFOLS-USAL)) con referencia LFI2.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría utilizar estas líneas para expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de este trabajo.

En primer lugar, gracias a mis directores de tesis, el Dr. D. Jesús Pérez Losada y la Dra. Dña. María Eugenia Muñoz Bermejo por confiar en mí y brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo. Jesús, gracias por todo lo que me has enseñado estos años y por darme la oportunidad de recibir una formación tan amplia y variada. Gracias también por tu apoyo y por enseñarme a trabajar de manera honesta, por ser ejemplo de tesón, esfuerzo y constancia. María Eugenia, gracias por tus enseñanzas, por tu ayuda, implicación y buenos consejos. Por darme la oportunidad de ayudarte con algunas de las tareas docentes, con las que tanto he disfrutado y aprendido. Quisiera también agradecer a los dos, todo el apoyo personal que me habéis brindado a lo largo de estos años.

A todos mis compañeros del Laboratorio 7. Andrés, muchísimas gracias por tu gran ayuda e implicación en este proyecto, sin duda, eres una de las personas de las que más he aprendido y que más me ha ayudado. Gracias por tu generosidad a la hora de transmitirme conocimientos y por mostrarme una forma de trabajar rigurosa, intentando hacer siempre las cosas de la mejor manera posible. Sonia, ha sido un placer trabajar contigo estos años, eres un torrente de energía, gracias por todo lo que me has enseñado y por haberme ayudado a nivel profesional y personal durante este tiempo. Adri, gracias por los buenos momentos compartidos y por tu ayuda y predisposición siempre que lo he necesitado. A Lourdes, por los primeros años de tesis, las risas y buenos ratos que pasamos. A Mariluz y a Isa, gracias a las dos por ayudarme tanto con la logística del proyecto, sobre todo con el trabajo de animalario y procesado y organización de las muestras. Vuestro buen hacer me ha facilitado mucho el trabajo a lo largo de estos años. A Facundo, por estar siempre dispuesto a ayudar y por su entusiasmo durante el tiempo que estuvo en el laboratorio. A Luis, por su ayuda y colaboración con el análisis de datos, y por ser ejemplo de lucha. A Elena por todo el asesoramiento con el análisis estadístico y por permitirme conocer, junto con Javier, la ciencia desde una perspectiva clínica. Por supuesto, gracias a todos ellos por la amistad y por todos los buenos momentos compartidos también fuera del laboratorio.

Al Dr. D. Lars Kaderali, del *Institute for Medical Informatics and Biometry, Medical School, University of Technology*, en Dresden, Alemania, por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio, por el asesoramiento y por estar siempre dispuesto a resolver mis dudas. Gracias también a los miembros de su laboratorio, por

la discusión y comentarios en los seminarios, y especialmente al Dr. D. Chris Lauber, por su implicación en el proyecto y su gran ayuda con la parte de programación.

Al Dr. D. Rafael Jiménez y a la Dra. Dña. Ana Isabel Galán del Departamento de Fisiología y Farmacología, por el asesoramiento en los seminarios que compartimos, y también el apoyo y consejos que me han brindado a lo largo de estos años. Gracias Anabel, por darme también la oportunidad de colaborar en la impartición de algunas de tus prácticas. Al Dr. D. Isidro Sánchez García y a todos los miembros de su laboratorio, los que están actualmente y los que ya se fueron pero con los que tuve la suerte de coincidir, gracias por la discusión y sugerencias en los seminarios, y sobre todo, gracias por vuestra ayuda y apoyo incondicional a nuestro laboratorio. Al Dr. D. Dionisio Martín Zanca, a Talía y Laura, gracias por todos los comentarios y por la interesante discusión científica. Al Dr. D. Rogelio González Sarmiento, por su apoyo en los primeros años, cuando el laboratorio formaba parte del Departamento de Medicina. A todo el personal de los servicios del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, en especial a Diego Alonso, por su ayuda y buena predisposición. Al Departamento de Estadística de la Universidad de Salamanca, por su colaboración en parte del análisis de los resultados, y a Maribel de la Secretaría del Departamento de Fisiología y Farmacología por su eficacia y disponibilidad a lo largo de estos años.

A los amigos de siempre, a los de la carrera y a todos los que he conocido durante estos años (compañeros del Centro del Cáncer, especial mención a los del laboratorio 13 y 14, los de las comidas en Farmacia, los biólogos), ¡gracias por estar ahí, por el apoyo y por todos los buenos momentos!

A todas las personas que han sumado en el día a día para que este proyecto llegue a buen puerto.

Pero sobre todo, quiero agradecer el apoyo incondicional a mi familia, a mis padres y mi hermana, gracias por vuestra confianza y cariño, por creer en mí y animarme siempre en todo lo que hago. A mis abuelos y a Álvaro, por el cariño y alegría que me dais o me habéis dado. A Moisés, por el apoyo y el ánimo durante todo este tiempo. Y a José, gracias por todo lo que me das cada día, por tu afecto y por estar siempre a mi lado apoyándome en todo lo que hago.

A mi familia

INTRODUCCIÓN	1
Generalidades	3
1. Cáncer de mama	4
1.1 Epidemiología del cáncer de mama	4
1.1.1 Factores hormonales.....	4
1.1.1.1 Factores que influyen sobre los niveles endógenos de estrógenos y progesterona	4
1.1.1.2 Papel de las hormonas exógenas sobre el riesgo de desarrollar cáncer de mama.....	6
1.1.2 Factores geográficos y ambientales	6
1.1.3 Afectación benigna previa de la mama.....	9
1.1.4 Antecedentes familiares	9
1.1.4.1 Papel de la herencia en el cáncer de mama con agregación familiar.....	10
1.1.4.2 Papel de la herencia en el cáncer de mama esporádico.....	11
1.1.5 Efecto de la edad	12
1.2 Clasificación del cáncer de mama	13
1.2.1 Tumores luminal A y B	13
1.2.2 Tumores basales.....	14
1.2.3 Tumores <i>normal-like</i>	14
1.2.4 Tumores ERBB2-positivos	15
1.3 Biología molecular del cáncer de mama	17
1.3.1 Alteraciones genómicas	17
1.3.2 Señalización antiproliferativa	18
1.3.3 Reducción de la apoptosis	19
1.3.4 Angiogénesis	20
1.3.5 Enfermedad metastásica.....	20
2. El envejecimiento	21
2.1 Aspectos moleculares y celulares del envejecimiento	22
2.1.1 Inestabilidad genómica.....	22
2.1.2 Acortamiento telomérico.....	22
2.1.3 Alteraciones epigenéticas.....	23
2.1.4 Pérdida de la proteostasis o de la homeostasis proteica	23
2.1.5 Desregulación de vías de señalización metabólicas.....	24
2.1.6 Disfunción mitocondrial	24
2.1.7 Senescencia celular	25

2.1.8	Disminución del número de células madre	26
2.1.9	Alteración de la comunicación intercelular.....	26
2.2	Edad biológica.....	26
3.	Relación entre el cáncer y el envejecimiento	27
3.1	Cáncer de mama y envejecimiento como procesos de génesis compleja.....	27
3.2	Aspectos moleculares comunes	28
3.2.1	Fenotipos intermedios relacionados con el estrés oxidativo que contribuyen a la patogenia del cáncer de mama y del envejecimiento....	30
3.2.1.1	Agentes productores de daño oxidativo y actividad metabólica	30
3.2.1.2	Agentes de protección frente al daño oxidativo	38
3.2.1.3	Biomarcadores para la cuantificación del daño celular	46
3.3	Genética de los procesos de génesis compleja.....	58
3.3.1	Técnicas para la identificación de variantes genéticas asociadas con la variabilidad de los fenotipos de génesis compleja	58
3.3.1.1	Estudios de asociación de genoma completo	58
3.3.1.2	El ratón como herramienta complementaria	59
3.3.2	Genética del cáncer de mama.....	60
3.3.2.1	Identificación de genes de susceptibilidad al cáncer de mama.....	60
3.3.3	Genética del envejecimiento.....	62
3.3.3.1	Síndromes progeroides	63
3.3.3.2	Genes asociados con la longevidad	64
3.3.3.3	Identificación de variantes genéticas que afectan al envejecimiento y la longevidad	65
	HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	69
	MATERIAL Y MÉTODOS.....	75
1.	Modelo experimental	77
1.1	Cepas de ratón utilizadas	77
1.2	Generación de los animales mediante retrocruce o backcross	78
1.3	Generación de animales genéticamente homogéneos: cepas <i>inbred</i> y animales de la F1	78
2.	Distribución temporal de los experimentos.....	79
2.1	Experimentos realizados en la población <i>backcross</i> y su distribución temporal	79

2.2 Estudios llevados a cabo en los animales de las cepas parentales y F1neu y su distribución temporal	81
3. Protocolos generales.....	82
3.1 Protocolos comunes de extracción de DNA y proteínas	82
4. Protocolos específicos.....	84
4.1 PCR para la detección del transgén cNeu	84
4.2 Genotipado de genoma completo en los ratones del <i>backcross</i>	84
4.3 Determinación de los patofenotipos relacionados con la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama	85
4.4 Determinación de los fenotipos intermedios relacionados con el estrés oxidativo	86
4.4.1 Agentes promotores del daño oxidativo relacionados con el metabolismo.....	86
4.4.2 Agentes protectores frente al daño oxidativo.....	90
4.4.3 Cuantificación del daño molecular por estrés oxidativo en el DNA, lípidos y proteínas	93
4.4.3.1 Daño en el DNA producido por el estrés oxidativo.....	93
4.4.3.2 Daño molecular producido por el estrés oxidativo a nivel lipídico.....	101
4.4.3.3 Daño molecular producido por el estrés oxidativo a nivel proteico	102
5. Análisis de los resultados	105
5.1 Análisis de la distribución de las variables.....	105
5.2 Análisis univariantes y bivalente de las asociaciones entre fenotipos	105
5.3 Análisis multivariantes de las asociaciones entre fenotipos	105
5.3.1 HJ-Biplot	105
5.3.2 Modelos de predicción.....	107
5.3.2.1 Modelo de predicción de la latencia.....	107
5.3.2.2 Modelo de predicción de la incidencia metastásica	108
5.3.2.3 Modelo para predecir la edad biológica	112
5.4 Análisis de ligamiento genético	114
5.5 Genes candidatos	118
5.6 Representación gráfica de los resultados.....	118
5.6.1 Representación mediante redes o <i>networks</i>	118
5.6.2 Representación mediante <i>heatmaps</i>	118

RESULTADOS	121
Introducción a los resultados	123
1. Comportamiento del cáncer de mama	127
1.1 Disección de la enfermedad en diferentes patofenotipos.....	127
1.2 Asociaciones entre los patofenotipos del cáncer de mama.....	127
1.3 Clasificación de los ratones en clusters de evolución en función de la variabilidad de presentación de sus patofenotipos de cáncer de mama	130
1.4 Comportamiento de la enfermedad según la edad cronológica	132
1.5 Efecto del fondo genético sobre la variabilidad de los patofenotipos	133
2. Evaluación de las vías de señalización intratumoral	135
2.1 Relación entre las proteínas de las vías de señalización tumorales	135
2.2 Relación entre las proteínas de las vías de señalización tumorales y la enfermedad	136
2.3 Relación entre las proteínas de las vías de señalización intratumoral y la edad	138
2.4 Efecto del fondo genético sobre la señalización intratumoral.....	140
3. Evaluación de los fenotipos intermedios relacionados con el estrés oxidativo que participan en la patogenia del cáncer de mama y del envejecimiento	142
3.1 Evaluación de agentes promotores de daño oxidativo: vías de señalización hepáticas, metabolitos en suero y peso.....	143
3.1.1 Evaluación de las vías de señalización hepáticas relacionadas con el metabolismo.....	143
3.1.1.1 Relación entre las proteínas de las vías de señalización hepáticas	143
3.1.1.2 Relación de las vías de señalización hepáticas con la enfermedad	144
3.1.1.3 Relación entre las proteínas de las vías de señalización hepáticas y tumorales	146
3.1.1.4 Similitud de las vías de señalización hepáticas con las de otros tejidos.....	150
3.1.1.5 Relación de las vías de señalización hepáticas con la edad	150
3.1.2 Niveles de metabolitos en el suero en animales libres de enfermedad.....	153
3.1.2.1 Relación de los niveles de metabolitos en suero con la enfermedad	154

3.1.2.2	Relación los niveles de metabolitos en suero con la edad	155
3.1.3	Peso de los ratones.....	156
3.1.3.1	Evaluación de las asociaciones con la evolución del peso en los ratones BX.....	156
3.1.3.2	Asociaciones con el peso final en ratones BX, C57BL/6J, F1neu y FVBneu	158
3.1.3.3	Relación entre los pesos determinados a distintas edades.....	160
3.2	Determinación de agentes de protección del daño oxidativo	161
3.2.1	Determinación de actividad catalasa en el hígado.....	161
3.2.2	Evaluación de niveles de glutatión total en hígado	162
3.2.3	Relación entre los niveles de glutatión total y de actividad catalasa y con la enfermedad	163
3.3	Medición del daño molecular producido por estrés oxidativo	164
3.3.1	Determinación del daño oxidativo en el DNA.....	164
3.3.1.1	Cuantificación de los niveles de 8-OH-dG	165
3.3.1.2	Longitud telomérica	166
3.3.2	Daño lipídico por estrés oxidativo determinado mediante niveles de 4-HNE	173
3.3.3	Evaluación del daño proteico por estrés oxidativo mediante la cuantificación de grupos carbonilo	174
3.3.3.1	Relaciones bivariantes entre los biomarcadores de daño oxidativo entre sí y de forma multivariante con la enfermedad	175
4.	Integración global de los fenotipos intermedios	177
4.1	Integración global de los fenotipos intermedios entre sí	177
4.1.1	Asociación entre marcadores y protectores de daño oxidativo y vías de señalización hepáticas	180
4.1.2	Asociación entre marcadores y protectores de daño oxidativo y metabolitos séricos.....	180
4.1.3	Asociación entre vías de señalización hepáticas y metabolitos séricos.....	182
4.1.4	Asociación entre las vías de señalización tumorales y metabolitos séricos.....	184
4.1.5	Asociación entre el peso y los metabolitos séricos	186
4.2	Integración global de fenotipos intermedios de estrés oxidativo con la edad.....	188
4.3	Integración global de los fenotipos intermedios de estrés oxidativo con la enfermedad	189

5. Identificación de las regiones genómicas (QTL) asociadas a la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama, y a los fenotipos intermedios comunes al cáncer y al envejecimiento	196
5.1 Identificación de las regiones QTL asociadas con la variabilidad de los patofenotipos del cáncer de mama	197
5.2 Identificación de los QTL asociados con los fenotipos intermedios relacionados con el estrés oxidativo	199
5.3 Identificación de QTL que se asociaron simultáneamente con la variabilidad de los fenotipos intermedios y con los patofenotipos del cáncer de mama	206
6. Explicación del comportamiento de la enfermedad mediante la integración de la información en modelos multivariantes	207
6.1 Modelos de predicción de la latencia	207
6.1.1 Modelo de predicción de la latencia con fin pronóstico	207
6.1.2 Modelo de predicción de la latencia con un propósito de clasificación..	210
6.2 Modelo para predecir la incidencia metastásica	212
7. Asociación entre el envejecimiento real o edad biológica y la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama	213
7.1 Modelo para la determinación del envejecimiento real o edad biológica.....	213
7.2 Relación entre la edad biológica y la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama	219
7.3 Identificación de las regiones génicas asociadas con el envejecimiento biológico	223
7.4 Identificación de las regiones QTL que se asociaron simultáneamente con los fenotipos intermedios de estrés oxidativo, los patofenotipos del cáncer de mama y la edad biológica	224
8. Resumen de los resultados	228
 DISCUSIÓN	 233
1. Análisis de la variabilidad fenotípica del cáncer de mama en el modelo	237
2. Evaluación de las vías de señalización intratumorales debajo de ERBB2	238
3. Evaluación de fenotipos intermedios asociados al estrés oxidativo como componente común de la patogenia del cáncer y el envejecimiento	242

3.1 Vías de señalización MAPK/ERK y AKT/mTOR a nivel hepático	243
3.2 Relaciones observadas entre los distintos fenotipos intermedios de estrés oxidativo	245
3.2.1 Asociaciones observadas entre los factores promotores del daño oxidativo	245
3.2.2 Relaciones observadas entre los agentes de protección de daño oxidativo	246
3.2.3 Asociaciones observadas entre los marcadores de daño molecular producido por el estrés oxidativo	247
3.3 Relación entre los fenotipos intermedios de estrés oxidativo y la edad	249
3.4 Relación entre los fenotipos intermedios de estrés oxidativo y los patofenotipos del cáncer de mama	250
3.4.1 Análisis de las correlaciones entre los fenotipos intermedios y patofenotipos.....	250
3.4.2 Integración de la información de todos los fenotipos intermedios de estrés oxidativo analizados	252
3.4.2.1 Identificación de QTL asociados con los patofenotipos del cáncer de mama y con los fenotipos intermedios.....	252
3.4.2.2 Generación de modelos multivariantes para pronosticar el comportamiento del cáncer de mama en función de los fenotipos intermedios de estrés oxidativo y las regiones QTL de susceptibilidad identificadas	254
3.4.3 Generación de un modelo multivariante para definir la edad biológica y evaluación de la heterogeneidad de presentación del cáncer de mama en función de la misma	260
3.4.3.1 Generación de un modelo multivariante para definir la edad biológica	261
3.4.3.2 Evaluación de la heterogeneidad de la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama en función de la edad biológica.	263
3.4.3.3 Identificación de las regiones génicas asociadas simultáneamente con el incremento de la edad biológica, los patofenotipos de cáncer de mama y los fenotipos intermedios de estrés oxidativo	265
3.4.3.4 Búsqueda de posibles genes candidatos en las regiones génicas que se asociaron simultáneamente con el incremento de la edad biológica, los patofenotipos de cáncer de mama y los fenotipos intermedios de estrés oxidativo	266

CONCLUSIONES 271

CONCLUSIONS 277

BIBLIOGRAFÍA 283

APÉNDICE 309

SUMMARY 351

INTRODUCCIÓN

Generalidades

Entre los factores epidemiológicos que modifican el riesgo de desarrollar cáncer de mama y su variabilidad de presentación clínica fenotípica, la edad es uno de los más importantes. Por un lado, se ha observado un aumento en la incidencia del cáncer de mama con la edad,⁽¹⁾ pero además, la aparición del cáncer de mama a edades tempranas se asocia con mayor agresividad y peor pronóstico.⁽²⁾ Teniendo en cuenta esta relación epidemiológica entre el envejecimiento/edad y el cáncer de mama, nuestro objetivo principal en este trabajo fue identificar determinantes moleculares y genéticos que definan la variabilidad fenotípica del cáncer de mama en función de la edad.

Para alcanzar este objetivo, hemos tenido en cuenta por una parte, que el cáncer y el envejecimiento son procesos de génesis compleja, influenciados por la interacción entre factores ambientales y un componente de herencia poligénica, y por otra, que en la patogenia de ambos, cáncer y envejecimiento, participan múltiples fenotipos intermedios, algunos de ellos comunes a ambos procesos, como los relacionados con el estrés oxidativo.

Así, la primera parte de la introducción está centrada en el cáncer de mama: epidemiología, clasificación general de la enfermedad, descripción del cáncer de mama ERBB2-positivo y su biología. La segunda parte profundiza en el proceso de envejecimiento: aspectos biológicos y moleculares del mismo y concepto de edad biológica. Por último, en la tercera parte, abordamos la relación entre el cáncer y el envejecimiento, haciendo hincapié en los fenotipos intermedios relacionados con el estrés oxidativo que, según la literatura, contribuyen a la patogenia del cáncer de mama y del envejecimiento, así como en la genética de ambos procesos.

1. CÁNCER DE MAMA

1.1 Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es el segundo tipo de tumor más común a nivel mundial y el más frecuente en mujeres. En el año 2012 se diagnosticaron 1.67 millones de nuevos casos de cáncer de mama, lo que supuso un 25% del total de todos los tipos de cáncer diagnosticados.⁽³⁾ Entre los factores de riesgo destacan los siguientes:

1.1.1 Factores hormonales

Muchos estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que el factor hormonal es uno de los principales determinantes del riesgo individual de padecer cáncer de mama. La ratio de incidencia en mujeres frente a hombres es de 125 frente a 1, lo que confirma que este factor es fundamental en la susceptibilidad a esta patología.⁽⁴⁾ Los niveles de estrógenos y progesterona a los que una mujer está expuesta a lo largo de su vida tienen un papel importante en el desarrollo del cáncer de mama y, a su vez, dependen de varios factores, que se exponen a continuación:

1.1.1.1 Factores que influyen sobre los niveles endógenos de estrógenos y progesterona

- **Edad a la que se presenta la menarquía y la menopausia**

Aquellas mujeres que tienen una menarquía temprana o una menopausia tardía presentan mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama. Por ejemplo, aquellas mujeres que tienen la menopausia pasados los 55 años, presentan el doble de riesgo de desarrollar cáncer de mama que las que la experimentan antes de los 45 años; y las mujeres a las que se les practica una ooforectomía bilateral antes de los 35 años presentan sólo un 40% del riesgo de desarrollar cáncer de mama comparado con el de las mujeres que tienen una menopausia natural.⁽¹⁾ Un aspecto importante sobre la menarquía es que la edad de ésta se está adelantando por razones no bien conocidas, quizás ambientales,⁽⁵⁾ y no está claro cuál podrá ser la repercusión de este hecho en el futuro sobre la incidencia de cáncer de mama y otras patologías.

- **Paridad y lactancia**

La nuliparidad y el tener el primer embarazo a edad tardía aumentan el riesgo de padecer cáncer de mama. Así, el riesgo de aquellas mujeres que tienen su primer hijo pasados los 30 años, es el doble que el que presentan las mujeres que lo tienen

antes de los 20 años. Las que presentan mayor riesgo son aquéllas que tienen su primer hijo después de los 35 años y su riesgo es incluso mayor que el de las mujeres nulíparas. Además, tener un segundo hijo a una edad temprana también reduce el riesgo de desarrollar cáncer de mama.⁽¹⁾ Existe un discreto incremento del riesgo de tener cáncer de mama durante los tres años siguientes a dar a luz; de modo que, para mujeres con una misma edad, que tuvieron su primer embarazo a la misma edad y el mismo número de embarazos a término, el riesgo de cáncer de mama tras el embarazo es tres veces mayor que el que presentan mujeres cuyo último embarazo ocurrió hace diez años.

En cuanto a la lactancia, su efecto protector probablemente se deba al retraso de la ovulación tras un embarazo completo, por lo que se reduce la exposición a los estrógenos. El riesgo de desarrollar cáncer de mama se reduce un 4.3% por cada año de lactancia.⁽⁶⁾

- **Factores antropométricos**

El efecto de la obesidad sobre la susceptibilidad al cáncer de mama es distinto en mujeres premenopáusicas y postmenopáusicas. Así, en mujeres premenopáusicas el sobrepeso y la obesidad están asociados con el incremento de ciclos anovulatorios que conllevan a una disminución de estradiol y progesterona circulantes, disminuyendo así el riesgo de desarrollar cáncer de mama.⁽⁷⁾ En las mujeres postmenopáusicas el efecto es opuesto, la obesidad incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama. La fuente primaria de estrógenos en mujeres postmenopáusicas es la conversión de la androstenediona en estrona en el tejido adiposo, por lo que el sobrepeso incrementa el riesgo.⁽⁶⁾

- **Actividad física**

El incremento de la actividad física puede reducir el riesgo a desarrollar cáncer de mama por su efecto en la reducción de los niveles de estrógenos y progesterona endógenos. En las mujeres jóvenes, el ejercicio intenso suele retrasar la menarquia e incrementa la probabilidad de padecer ciclos anovulatorios, reduciendo así la exposición a estrógenos y progesterona. En el caso de las mujeres postmenopáusicas, la actividad física reduce el riesgo de desarrollar cáncer de mama de manera indirecta, disminuyendo el porcentaje de grasa corporal, lo que conlleva también a una disminución de los niveles circulantes de estrógenos.⁽⁶⁾

- **Consumo de alcohol**

El análisis conjunto de seis estudios prospectivos con un total de 322.647 mujeres bajo seguimiento durante 11 años, de las que 4.335 desarrollaron cáncer de mama, puso de manifiesto una relación dosis-respuesta entre el consumo de alcohol y el riesgo a desarrollar cáncer de mama.⁽⁸⁾ Así, se observó que aquellas mujeres que consumían entre dos y cinco bebidas alcohólicas diariamente, presentaban un riesgo un 41% más elevado de desarrollar cáncer de mama, en comparación con las no bebedoras. Se han propuesto diversos mecanismos biológicos que pudieran explicar esta relación; el más probable es el hecho de que el consumo de alcohol afecte a los niveles de distintas hormonas. *Dorgan et al.*⁽⁹⁾ observaron que el equivalente a una o dos bebidas alcohólicas diarias en mujeres postmenopáusicas, aumentaba de manera estadísticamente significativa los niveles séricos de sulfato de estrona y de sulfato de dehidroepiandrosterona.

1.1.1.2 Papel de las hormonas exógenas sobre el riesgo de desarrollar cáncer de mama

En este sentido, durante el periodo de consumo de anticonceptivos orales y los 10 siguientes años tras dejar de consumirlos, hay una elevación moderada del riesgo de desarrollar cáncer de mama; pasado este tiempo, el riesgo no se ve afectado. Aquellas mujeres que comenzaron a consumirlos antes de los 20 años presentan un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama que las que comenzaron a consumirlos en edades más avanzadas.⁽¹⁾

También durante el tratamiento de reemplazo hormonal y en los siguientes cuatro años tras finalizarlo, aumenta el riesgo a desarrollar cáncer de mama. El riesgo es proporcional al tiempo en el que la mujer estuvo bajo tratamiento hormonal, pues éste se traduce en un retraso de la edad a la que se tiene la menopausia real. Parece que el riesgo es mayor cuando se utilizan terapias que combinan estrógenos y progesterona.⁽¹⁾

1.1.2 Factores geográficos y ambientales

El cáncer de mama es el más frecuente en mujeres, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. La tasa de incidencia es cuatro veces superior en países desarrollados como los de Europa Occidental, donde la tasa es de 96 casos nuevos por cada 100.000 mujeres, en comparación con los 27 casos nuevos que se dan en zonas de África y Asia; aunque a medida que estos países

adoptan modos de vida occidentales estas diferencias disminuyen, lo que se atribuye a cambios en los hábitos de alimentación e higiene, los cuales repercuten en la extensión de la esperanza de vida.

Sin embargo, estas diferencias observadas en la tasa de incidencia desaparecen al comparar la tasa de mortalidad (**Fig. 1**). Esto es debido a la carencia de infraestructuras y medios en los países en vías de desarrollo, lo que se traduce en que el 75% de las mujeres a las que se les diagnostica cáncer de mama en estos países presentan la enfermedad en un estadio avanzado, normalmente III o IV, mientras que en países desarrollados, aproximadamente el 70% de las mujeres diagnosticadas se encuentran en estadios poco avanzados de la enfermedad.⁽¹⁰⁾

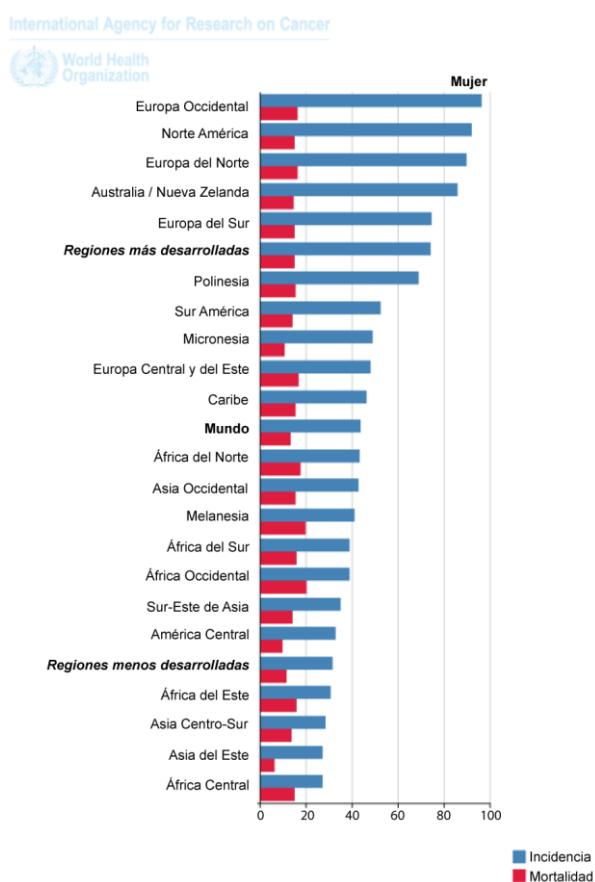


Figura 1. Tasas de incidencia (en azul) y mortalidad (en rojo) por cáncer de mama en distintas zonas del mundo. Imagen modificada del Informe de Globocan 2012.⁽³⁾

Kolonel et al.⁽¹¹⁾ analizaron los efectos de los movimientos migratorios sobre la incidencia del cáncer de mama y observaron que los factores ambientales poseen efectos tan relevantes como los genéticos. Así, compararon la incidencia del cáncer de mama entre mujeres japonesas que vivían en Japón, con la de mujeres japonesas que vivían en Hawaii (primera y segunda generación de inmigrantes) y con la de mujeres

naturales de Hawaii. Observaron que la incidencia del cáncer de mama de las mujeres japonesas en Japón era la menor, seguida de la incidencia de las inmigrantes de primera generación; sin embargo, las mujeres inmigrantes de segunda generación presentaron una incidencia similar a la de las mujeres naturales de Hawaii. Las mujeres japonesas tenían la menarquia a una edad superior que las estadounidenses, lo que podría ser una de las causas para que la incidencia del cáncer de mama en las mujeres japonesas fuera menor; además, se observó cómo la edad de la menarquia de las mujeres inmigrantes de primera generación se fue acercando a las de las mujeres de Hawaii, siendo la de las mujeres inmigrantes de segunda generación prácticamente la misma que la de las mujeres estadounidenses, lo que podría explicar que no se encontraran diferencias en la susceptibilidad al cáncer de mama entre estos dos últimos grupos.

Los movimientos migratorios y su relación con el riesgo de desarrollar cáncer de mama, evidencian la importancia del componente ambiental sobre dicho riesgo. Diversos autores defienden que el aumento en la incidencia del cáncer de mama en países desarrollados estaría relacionado con la exposición a distintos compuestos químicos con actividad estrogénica presentes en plásticos, cosméticos o detergentes, entre otros, que podrían ser los responsables del adelantamiento de la pubertad en niñas observado en los últimos años, puesto que no se relaciona con un incremento de la producción de hormonas endógenas.⁽⁵⁾ Estos compuestos se denominan *disruptores endocrinos*, y engloban a cualquier compuesto químico o contaminante medioambiental que, una vez incorporado a un organismo vivo, afecta al equilibrio hormonal. La curva dosis-respuesta de los disruptores endocrinos no suele seguir un comportamiento lineal, sino que en la mayoría de los casos, la curva presenta forma de U.⁽¹²⁾ Entre los disruptores endocrinos que afectan al riesgo de desarrollar cáncer de mama encontramos algunos metales pesados como el cadmio,⁽¹³⁾ y compuestos que no son estructuralmente similares a los estrógenos, como las dioxinas,⁽¹⁴⁾ entre los que destacan el dietilestilbestrol y el bisfenol A. El dietilestilbestrol es un fármaco que fue administrado durante más de tres décadas a cuatro millones de mujeres embarazadas que habían sufrido abortos o partos prematuros. Se observó una clara asociación entre la exposición intrauterina del feto femenino a dicho fármaco y el desarrollo del adenocarcinoma de células claras de vagina cuando dichas mujeres fueron jóvenes. En cuanto al cáncer de mama, el riesgo de las mujeres que recibieron el fármaco fue un 30% superior que el de las mujeres que no lo recibieron; y en el caso

de las mujeres expuestas al dietilestilbestrol en el útero, su riesgo de desarrollar cáncer de mama fue casi el doble a los cuarenta años, y el triple a los cincuenta.⁽¹⁵⁾

Por su parte, el bisfenol A (BPA) es un compuesto sintético que se usa generalmente en la producción de policarbonatos y resinas epoxifenólicas utilizadas para fabricar envases de comida, de bebida, material de oficina, de laboratorio y hospitalario. El BPA ejerce su efecto como disruptor endocrino a través de la unión con los receptores de estrógeno ER α y ER β , y produce efectos a dosis incluso menores que la dosis límite que se considera segura en humanos.⁽¹⁶⁾ Se han observado cambios en el cerebro, en el sistema reproductivo y en el sistema inmune de animales adultos y en fetos expuestos al BPA. En cuanto al cáncer de mama, *Howdeshell et al.*⁽¹⁷⁾ observaron que la exposición perinatal de ratones hembra a dicho compuesto alteró el crecimiento postnatal y aceleró la pubertad en estos ratones, lo que podría contribuir indirectamente a incrementar el riesgo de desarrollar cáncer de mama, ya que la menarquia temprana se considera uno de los factores de riesgo. Además, *Durando et al.*⁽¹⁸⁾ observaron que las mamas de ratas Wistar que sufrieron exposición prenatal a dicho compuesto, presentaron mayor número de ductos hiperplásicos y mayor densidad estromal.

1.1.3 Afectación benigna previa de la mama

Las mujeres con hiperplasias epiteliales atípicas severas tienen un riesgo entre 4 y 5 veces mayor de padecer cáncer de mama que aquellas que no han sufrido ningún cambio proliferativo. Mujeres con otras afectaciones como quistes palpables, fibroadenomas complejos, papilomas ductales, esclerosis adenosas e hiperplasias epiteliales moderadas o floridas, presentan un riesgo entre 1.5 y 3 veces superior que las mujeres que no presentan ninguno de estos cambios.

1.1.4 Antecedentes familiares

Tanto la susceptibilidad al cáncer hereditario, como al esporádico es el resultado de la interacción entre el componente genético y el ambiental. En el caso del cáncer hereditario, la influencia genética tiene mayor peso, y se debe al efecto de alteraciones en genes de alta penetrancia, generalmente supresores de tumores. Este efecto genético principal está influenciado por la suma de los efectos de múltiples genes de baja penetrancia y expresividad que modifican el efecto de los genes principales, por lo que en el cáncer de mama hereditario, como en cualquier proceso de herencia mendeliana, hay también un componente de herencia cuantitativa o

poligénica que contribuye a la variabilidad en la penetrancia y expresividad del cáncer hereditario.^(1, 19)

En el caso del cáncer esporádico, éste se comporta como una enfermedad de génesis compleja y tanto el componente genético como el ambiental, pero sobre todo este último, contribuyen, en gran medida, a la susceptibilidad. El componente hereditario estaría también constituido por la suma de los efectos de múltiples genes de baja penetrancia y expresividad, que siguen un modelo de herencia cuantitativa.⁽²⁰⁾

1.1.4.1 Papel de la herencia en el cáncer de mama con agregación familiar

La predisposición hereditaria al cáncer de mama determina un porcentaje discreto de la incidencia total de esta patología. Más del 10% de los cánceres de mama de los países desarrollados se pueden atribuir a factores heredables. Se han identificado dos genes, *BRCA1* y *BRCA2*, donde se ha descrito un gran número de mutaciones de pérdida de función, que confieren una elevada susceptibilidad para desarrollar cáncer de mama y ovario. *BRCA1* y *BRCA2* se localizan en los brazos largos de los cromosomas 17 y 13, respectivamente. Estos genes son los responsables de buena parte de la predisposición genética en familias que presentan riesgo elevado de desarrollar cáncer de mama que, por consenso, son aquellas con cuatro o más casos de cáncer de mama entre parientes cercanos. Ambos genes funcionan como genes supresores y en la reparación del DNA, y se testan en la clínica de manera rutinaria en mujeres que presentan una historia familiar relacionada con cáncer de mama o de ovario, con el fin de identificar mutaciones que se puedan considerar como factor de riesgo asociado a dichas patologías. Se ha observado que ciertas mutaciones en estos genes son recurrentes en ciertas poblaciones; por ejemplo, un 2% de las mujeres de etnia judía asquenazi son portadoras de una delección de dos pares de bases en la posición 185 del gen *BRCA1* (*BRCA1* 185 del AG), una delección de un solo par de bases en la posición 6174 del gen *BRCA1*, (*BRCA1* 6174 del T) o una inserción de un par de bases en la posición 5382 del mismo gen (*BRCA1* 5382 ins C); mientras que en familias islandesas afectadas por cáncer de mama hereditario, se ha encontrado con frecuencia una delección de cinco pares de bases en la posición 999 del gen *BRCA2*.⁽¹⁾

Además, se han identificado otros genes supresores de tumores de alta penetrancia, como *P53*, *PTEN* y *LKB1/STK11*, que presentan mutaciones hereditarias y se asocian con síndromes familiares como el síndrome Li-Fraumeni, de Cowden y Peutz-Jeghers, respectivamente, los cuales se asocian también con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama. Las mutaciones en estos genes son menos

prevalentes en la población que las de los genes *BRCA1* y *BRCA2*.^(21, 22) Ser portador de algunas de estas mutaciones hereditarias aumenta de forma considerable el riesgo a padecer cáncer de mama, y el riesgo es inversamente proporcional a la edad a la que los familiares de primer grado desarrollan la enfermedad.

En contraposición a estos genes de alta penetrancia que se dan de manera poco frecuente, existen algunos genes que aparecen mutados comúnmente, pero que implican un incremento más pequeño del riesgo a padecer cáncer de mama, actuando como genes modificadores; es el caso del gen *CHEK2*, que participa en la respuesta celular a la rotura del DNA de doble cadena. Aunque estos genes de baja penetrancia no sean dianas terapéuticas potenciales debido a su pequeño impacto en el riesgo, juegan un papel muy significativo en la patogénesis de algunos tipos de cáncer.⁽¹⁹⁾

Incluso en familias portadoras de alelos mutantes específicos de genes de alta penetrancia, como *BRCA1* y *BRCA2*, los fenotipos desarrollados tienden a estar influenciados por el fondo genético. Así, para una misma mutación dentro de la misma familia, presentan mayor similitud en su presentación aquellos tumores desarrollados por hermanos gemelos que los desarrollados por miembros más alejados de la misma familia.⁽²³⁻²⁵⁾ Ello se debe a que la variabilidad fenotípica de todo proceso de herencia mendeliana se ve influenciada por un componente de herencia poligénica que está formado por diferentes formas alélicas de genes de baja penetrancia que modifican la función de genes de efecto mayor. En este caso, modifican la susceptibilidad y evolución del cáncer hereditario.

1.1.4.2 Papel de la herencia en el cáncer de mama esporádico

El cáncer de mama esporádico es más común que el hereditario o familiar y supone entre el 80% y el 85% del total. Aunque surge como resultado de una serie de alteraciones genéticas somáticas adquiridas, cada vez son más numerosos los estudios que ponen de manifiesto que existe un componente de influencia hereditaria poligénica para el cáncer esporádico.

Lichtenstein et al.⁽²⁰⁾ analizaron la contribución de los factores hereditarios en la susceptibilidad a desarrollar distintos tipos de cáncer; para ello, trabajaron con parejas de gemelos y estimaron el riesgo de que un gemelo sufriera el mismo tipo de cáncer que su hermano. Así, observaron que la probabilidad de que un gemelo desarrollara cáncer cuando el otro lo había desarrollado fue del 35% para el cáncer colorrectal, del 42% para el de cáncer de próstata y del 27% para el cáncer de mama.

1.1.5 Efecto de la edad

En la **Tabla 1**, se recoge el efecto de distintos factores sobre el riesgo de desarrollar cáncer de mama, y se observa que la edad es el factor epidemiológico que confiere mayor riesgo.

Tabla 1. Efecto de los distintos factores epidemiológicos sobre la susceptibilidad del cáncer de mama. Tabla modificada de McPherson, K. et al.⁽¹⁾

Factor	Riesgo relativo	Grupo de alto riesgo
Edad	>10	Personas Mayores
Localización geográfica	5	País desarrollado
Edad de la menarquía	3	Menarquia antes de los 11 años
Edad de la menopausia	2	Menopausia después de los 54 años
Edad del primer embarazo	3	Primer hijo en torno a los 40 años
Historial familiar	≥ 2	Cáncer de mama en primer grado cuando son jóvenes
Enfermedad benigna anterior	4-5	Hiperplasia atípica
Cáncer en la otra mama	>4	
Dieta	1.5	Alta ingesta de grasas saturadas
Peso corporal:		
Premenopáusica	0.7	Índice de masa corporal >35
Posmenopáusica	2	Índice de masa corporal >35
Consumo de alcohol	1.3	Ingesta excesiva
Exposición a radiación ionizante	3	Exposición anormal en mujeres jóvenes después de los 10 años
Tomar hormonas exógenas		
Anticonceptivos orales	1.24	Uso actual
Terapia de reemplazamiento de hormonas	1.35	Tomado durante ≥ 10 años
Dietilestilbestrol	2	Tomado durante el embarazo

La incidencia del cáncer de mama aumenta con la edad, como se observa en la **Figura 2**. La edad también se asocia a un distinto comportamiento del cáncer de mama. Así, las mujeres que desarrollan cáncer de mama antes de los 40-45 años, suelen presentar una enfermedad más agresiva y peor pronóstico que las mujeres que lo desarrollan después de los 65 años. Los tumores desarrollados a edades tempranas suelen ser receptor de estrógenos (ER) negativos, son de mayor tamaño, de grado alto de malignidad y suelen presentar afectación ganglionar. Además, el periodo libre

de enfermedad suele ser mucho menor en las mujeres menores de 45 años en comparación con las mujeres mayores de 65 años.^(2, 26)

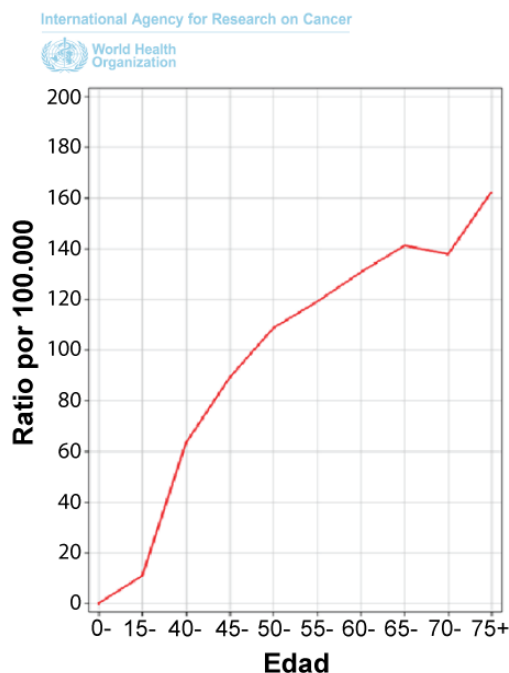


Figura 2. Gráfica en la que se representa el efecto de la edad sobre la incidencia del cáncer de mama a nivel mundial, para evitar sesgos geográficos. Imagen modificada de Globocan 2008 (IARC).⁽²⁷⁾

1.2 Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea. Tumores que son similares desde una perspectiva histopatológica pueden responder de manera diferente a las mismas terapias. Esta heterogeneidad en el comportamiento clínico se podría deber a diferencias moleculares entre los tumores, por ejemplo en su perfil de expresión génica. De acuerdo a estos perfiles de expresión, *Perou et al.*⁽²⁸⁾ y *Sorlie et al.*⁽²⁹⁾ propusieron clasificar los tumores de mama en cinco clases: luminal A, luminal B, HER-2, *normal-like* y basal.⁽³⁰⁾

1.2.1 Tumores luminal A y B

Los tumores luminal A y B expresan el ER a nivel transcripcional y proteico, aunque los tumores luminal B lo expresan a niveles más bajos y suelen ser receptor de progesterona negativos (PR-), en comparación con los tumores luminales A, que los expresan a niveles más altos y suelen ser PR-negativos. Ambos tipos de tumores expresan las citoqueratinas 8 y 18. Algunos tumores luminal B sobreexpresan HER-2. Los luminales B presentan una tasa de proliferación más elevada que los A. Los

tumores luminales representan entre el 60% y el 70% de los carcinomas ductales invasivos.⁽³¹⁾

1.2.2 Tumores basales

Estos tumores expresan las citoqueratinas 5, 6, 14 y 17, lo que sugiere que se podrían originar a partir de células basales o mioepiteliales. La mayoría de los tumores que desarrollan las mujeres portadoras de mutaciones patogénicas en *BRCA1* pertenecen a este grupo. En general, estos tumores no expresan el ER ni el PR, ni amplifican *HER-2*, por lo que se les denomina tumores *triple-negativos*.

No todos los tumores triple-negativos expresan los marcadores típicos del fenotipo basal, sino que entre los tumores triple negativos también se encuentran los denominados *normal-like*. Entre el 60% y el 80% de los tumores triple negativos se clasifican como tumores basales y suelen desarrollarse en mujeres jóvenes. Los tumores basales, presentan biomarcadores adicionales como la expresión de *P63*, *HER-3*, *HER-4*; la presencia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) y un patrón de expresión génica resultado de la activación del eje NOTCH/SURVIVINA.⁽³¹⁾

1.2.3 Tumores *normal-like*

Pertenecen a este grupo entre el 5% y el 10% de los tumores de mama. Suelen ser pequeños, aparecen en mujeres postmenopáusicas, son estables desde el punto de vista genómico, son receptor ER y PR positivos y portadores del alelo silvestre de *P53*.⁽³²⁾

Posteriormente a esta clasificación, se incorporó otro grupo que presenta niveles bajos de expresión de CLAUDINA, los denominados tumores *claudin-low*. Éstos se caracterizan por la ausencia de expresión de marcadores de diferenciación luminal, presentan un perfil de expresión génica similar al de las células madre de la mama y un enriquecimiento en la expresión de marcadores de la transición epitelio-mesénquima. Se encuadran dentro del grupo de tumores triple negativo, por lo que se asocian con mal pronóstico.⁽³³⁾

Al último grupo pertenecen los tumores ERBB2-positivos, y se hará especial hincapié en ellos, ya que ha sido el tipo de cáncer de mama estudiado en este trabajo de tesis doctoral.

1.2.4 Tumores ERBB2-positivos

Su principal característica es la amplificación y sobreexpresión del gen *HER2*; la mayor parte son ER y PR negativos, si bien, un tercio son ER positivos. El gen que codifica el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*HER2*) y el gen *Neu*, en roedores, son genes homólogos. ERBB2/HER2 es un receptor de membrana que pertenece a la familia de receptores tirosina-quinasa ERBB. Se han identificado cuatro miembros pertenecientes a esta familia: EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 y ErbB4/HER4. Son receptores transmembrana que activan vías de señalización intracelular. Su estructura consiste en un dominio extracelular que es la región a la que se une el ligando, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con función tirosina-quinasa. El dominio extracelular puede estar en un estado conformacional cerrado/inhibido o abierto/activo. Cuando el ligando se une, se produce un cambio conformacional hacia la conformación activa y promueve la dimerización del receptor, formando homodímeros o heterodímeros que activan la actividad tirosina-quinasa de los receptores. El dominio extracelular de HER2 está constitutivamente en la conformación activa y no presenta activación por unión a ligando, sino que forma heterodímeros, y es el otro receptor del dímero el que se activa por unión a ligando. La sobreexpresión de *HER2* implica un incremento de su heterodimerización con EGFR y HER3.⁽³⁴⁾ Aunque la dimerización de EGFR-HER2 evitaría la degradación endocítica e implicaría un incremento en la duración y potencia de la señalización, en general, es la dimerización HER2-HER3 la que generaría el heterodímero más activo y desempeñaría un papel esencial en muchos procesos biológicos, como la inducción de la proliferación celular a través de la vía PI3K/AKT. Además, se ha observado que los tumores generados por ratones que sobreexpresan *Neu* en su epitelio mamario, sobreexpresan también *HER3*, lo que facilitaría la formación de los heterodímeros HER2-HER3.⁽³⁵⁾

Una vez que se produce la heterodimerización del receptor, se activan distintas vías de señalización; (i) por un lado, se promueve la proliferación a través de *c-Jun*, (ii) se inhibe la adhesión celular a través de STAT3, (iii) y se promueve la capacidad invasiva a través de la vía de PI3K, RAS y PLC γ (fosfolipasa γ) y mediante la interacción con la integrina $\beta 4$. (iv) También se produce la desregulación del ciclo celular, en concreto se acorta la fase G1 y se entra prematuramente en la fase S, lo que induce un fenotipo hiperproliferativo a través de la sobreexpresión de CDK6 y de las ciclinas D1 y E, y de la degradación de P27;⁽³⁴⁾ (v) y se promueve la activación de la vía antiapoptótica de NF-kB.

Además, la sobreexpresión de *HER2* actúa sobre la expresión de otros genes; por ejemplo, (i) induce la sobreexpresión de *COX-2* que participa en el proceso de angiogénesis; (ii) favorece la expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 que se relaciona con la capacidad invasiva, de modo que se ha observado que la utilización de anticuerpos anti-CXCR4, suprimiría el incremento de la actividad migratoria producida como consecuencia de la sobreexpresión de *HER2*.⁽³⁶⁾ (iii) Incrementa la expresión del factor inducible de hipoxia (HIF-1a) a través de AKT, lo que determina el incremento de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); (iv) y también se incrementa la expresión de las metaloproteinasas de matriz 2 y 9.⁽³⁴⁾

La sobreexpresión de *HER2* mediante amplificación génica se da entre el 25% y 30% de los tumores de mama y ovario, y se asocia con mal pronóstico, aunque no es una característica exclusiva de este tipo de tumores, ya que también se ha observado en un grupo de tumores gástricos, de esófago y de endometrio. Los tumores de mama pueden presentar entre 25 y 50 copias del gen *HER2*, lo que implica que puede haber hasta dos millones de receptores HER2 en la superficie de las células tumorales. La amplificación de *HER2* se suele producir en estadios tempranos del desarrollo del cáncer de mama y se mantiene en estadios más avanzados, cuando se produce la invasión de otros tejidos. Se amplifica un segmento cromosómico del cromosoma (Cr.) 17 de unos 280kb, en concreto la región 17q12-21 que contiene numerosos genes además de *HER2*, como los genes *GRB7*, *MLN64*, *PNMT*, *MGC9753* y *MGC14832*.⁽³⁴⁾

Los tumores que amplifican *HER2*, normalmente presentan otras alteraciones genómicas características de este tipo de tumor, que incluyen la amplificación de la región 17q22-24, 20q y la delección de la región 18q. También se ha identificado un polimorfismo en el codón 655 del gen *HER2*, en el que se produce una sustitución de una Isoleucina por una Valina, lo que se traduce en un incremento de la capacidad de dimerización y en la actividad tirosina quinasa. *Chen et al.*⁽³⁷⁾ realizaron un meta-análisis y observaron una asociación entre dicho polimorfismo y un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama en la población caucásica.

Estos tumores suelen desarrollarse en mujeres mayores y un porcentaje elevado presenta inestabilidad genómica.⁽³¹⁾

1.3 Biología molecular del cáncer de mama

A continuación, se detallan las moléculas y vías de señalización implicadas en el inicio y desarrollo del cáncer de mama. La **Figura 3** muestra un esquema de lo que se expondrá en las siguientes páginas.

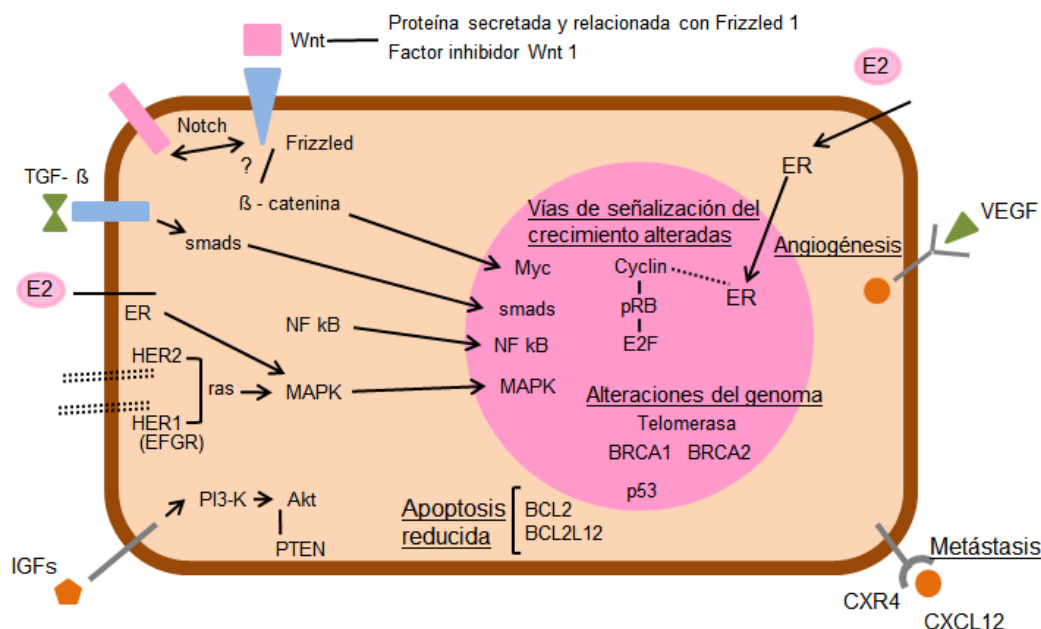


Figura 3. Vías implicadas en el desarrollo y progresión del cáncer de mama. Imagen modificada del libro "The molecular basis of cancer".⁽³⁸⁾

1.3.1 Alteraciones genómicas

La sobreexpresión oncogénica debida a la amplificación génica es muy frecuente en muchos tipos de cáncer. En el caso del cáncer de mama, los brazos cromosómicos que suelen presentar ganancias significativas son el 1q, 8q, 16p y 17q. El gen que codifica la CICLINA D1 es uno de los más comúnmente amplificados en el cáncer de mama humano, ya que entre el 13% y 21% de los tumores de mama presentan la amplificación de este *locus* genético, localizado en la región cromosómica 11q13.⁽³⁹⁾ En otros casos, se ha observado una sobreexpresión de dicho gen sin que se produzca la amplificación de 11q13; normalmente, este aumento en la expresión se observa en estadios iniciales de la carcinogénesis de mama y, sobre todo, en asociación con cáncer de mama ER+. En cuanto al posible papel que desempeña la CICLINA D1 en el cáncer de mama, se sabe que participa en la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRB) a través de su interacción con quinasas dependientes de ciclinas, como CDK4. La hiperfosforilación de pRB libera al factor de

transcripción E2F, el cual estimula la proliferación celular. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el que se asocia específicamente la CICLINA D1 con la patogenia del cáncer de mama. Existen evidencias de que la CICLINA D1 interaccionaría con el ER de manera independiente a su unión con CDK4, por lo que también actuaría de manera independiente a la activación de E2F.⁽³⁹⁾

Como ya se ha mencionado, otro oncogén sobreexpresado mediante amplificación génica en un porcentaje significativo de casos de cáncer de mama es *HER2/ERBB2/NEU*, localizado en la región 17q. La amplificación del gen *HER2* se da en un 20-25% de los cánceres invasivos y en un alto porcentaje de carcinomas ductales *in situ* de alto grado.

El brazo largo del Cr. 8 es otra región que se amplifica frecuentemente en el cáncer de mama; en ella se encuentra el oncogén *cMYC*, concretamente en la región 8q24. Se ha observado que un porcentaje de tumores portadores de mutaciones en *BRCA1* presentan también amplificación del oncogén *cMYC*.⁽⁴⁰⁾

En los tumores que se producen como consecuencia de una oncogénesis retroviral, ciertos genes se convierten en oncogenes por mutagénesis insercional. Aunque este mecanismo, tras múltiples estudios, no se ha descrito como causa de cáncer de mama en humanos, es muy frecuente en ratón. Así, en el caso del carcinoma mamario de ratón, el *virus tumoral mamario murino (MMTV)* promueve el desarrollo tumoral mediante la activación de algunos genes, como *Wnt* y *Notch*, que también se han implicado en la patogenia del cáncer de mama humano. *WNT* codifica una proteína que se une a un receptor denominado FRIZZLED (perteneciente a la familia de receptores acoplados a proteínas G) e inhibe la fosforilación de β -CATENINA, impidiendo así su degradación. β -CATENINA se trasloca al núcleo y activa la transcripción de *c-MYC* y la CICLINA D1. Se ha observado que la vía de WNT está activa en cáncer de mama en humanos, por los elevados niveles de β -CATENINA presentes en los tumores.⁽⁴¹⁾ Además, se ha observado una disminución en la expresión de dos genes antagonistas de *WNT*, los genes *SFRP* y *WIF1*, ambos son silenciados mediante metilación de sus promotores.⁽⁴²⁾

1.3.2 Señalización antiproliferativa

La pérdida de los genes supresores de tumores está implicada en la progresión tumoral; de modo que la pérdida de heterocigosidad en genes supresores como *BRCA1*, *BRCA2* y *P53*, es uno de los pasos iniciales en la oncogénesis o desarrollo

tumoral. De hecho, la simple disminución de la expresión de dichos genes puede promover el desarrollo del cáncer.

Una de las vías antiproliferativas principales en el epitelio mamario normal es la de TGF- β . Sin embargo, se han observado niveles elevados de TGF- β en muchos tumores de mama. Ello se debe a que la vía de TGF- β presenta un efecto dual sobre la tumorigénesis. En estadios iniciales funciona como supresor tumoral de la carcinogénesis epitelial, ya que inhibe la proliferación celular, induce la apoptosis, promueve la senescencia, participa en el mantenimiento de la estabilidad genómica e interfiere con el proceso de inmortalización celular. Todas estas propiedades contribuyen a la supresión tumoral. En contraposición, una de las características de muchos tumores humanos en estadios avanzados, es la elevada expresión de TGF- β que se asocia con mal pronóstico. En este caso, TGF- β se asocia con un incremento de la capacidad invasiva y promueve la angiogénesis, por lo que TGF- β ejerce un papel pro-oncogénico en estadios avanzados.⁽⁴³⁾

1.3.3 Reducción de la apoptosis

Otra de las características que adquieren las células tumorales es la disminución de su susceptibilidad a la apoptosis; el bloqueo de la función proapoptótica de P53 es uno de los principales mecanismos; los tumores mamarios son un ejemplo de dicho bloqueo en la actividad de P53, por la aparición frecuente de mutaciones somáticas en dicho gen. Además, en muchos tumores de mama se activan rutas antiapoptóticas, o de supervivencia, como es el caso del gen *BCL2*, perteneciente a una familia de genes antiapoptóticos, que se sobreexpresa en el 65% de tumores mamarios invasivos. El potencial tumorigénico de la proteína BCL2 se observó inicialmente como resultado de una translocación cromosómica que afectaba a dicho gen, presente en pacientes con linfoma no Hodgkin donde se asoció a un mal pronóstico. Sin embargo, en el cáncer de mama su expresión se asocia con tumores de bajo grado de malignidad, baja tasa de proliferación y ER+. Una de las explicaciones sobre este efecto favorable “paradójico” en el cáncer de mama, podría ser el hecho de que la sobreexpresión de BCL2 afectaría al equilibrio de otros miembros de la familia de esta proteína, incluyendo a la expresión de otras proteínas con función pro-apoptótica.⁽⁴⁴⁾

La ruta de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) es un mediador importante de la supervivencia en células del epitelio mamario. La activación descontrolada de esta ruta contribuye a la transformación celular y a la progresión tumoral en varios tipos de tumores, incluyendo el de mama. Su activación conduce a la fosforilación de AKT,

presente entre el 35% y el 80% de los tumores de mama invasivos, y también a la fosforilación de la proteína SGK, molécula relacionada con AKT, cuya fosforilación se ha encontrado en la mitad de los tumores de mama.⁽⁴⁵⁾

Otra ruta antiapoptótica es la de NF-κB, la cual estimula la proliferación celular y bloquea la muerte celular programada en distintos tipos tumorales, incluyendo el de mama en humanos. Así, *Biswas et al.*⁽⁴⁶⁾ detectaron niveles elevados de NF-κB activado en el núcleo de células de tumores ER negativos y ERBB2-positivos, y comprobaron que esta vía de señalización desactivaba la muerte celular y promovía la proliferación celular.

1.3.4 Angiogénesis

La angiogénesis es una de las capacidades intrínsecas de los tumores, como la de cualquier otro tejido en crecimiento. Su objetivo es permitir el intercambio de oxígeno y la retirada de material metabólico, y juega un papel esencial en el crecimiento tumoral local y en la capacidad invasiva de la enfermedad.

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) son una familia de enzimas proteolíticas que degradan la membrana basal y la matriz extracelular. La expresión de las metaloproteinasas se incrementa de manera gradual con la transición de enfermedades benignas a preinvasivas y metastásicas, al igual que se incrementa la expresión de VEGF. De hecho, la expresión de VEGF estaría relacionada con el riesgo de desarrollar cáncer de mama y su evolución; así, diversos estudios han puesto de manifiesto la existencia de una correlación inversa entre la expresión de VEGF y la supervivencia en mujeres con esta enfermedad.⁽⁴⁷⁾

1.3.5 Enfermedad metastásica

El cáncer de mama es una patología que afecta a un órgano fácilmente accesible y no vital, por lo que su diseminación es la causante de la gran mayoría de las muertes debidas a esta enfermedad. La capacidad de invasión incluye la habilidad para romper las barreras tisulares normales, como la membrana basal, transportarse a través del sistema circulatorio y colonizar un tejido distal.⁽³⁸⁾

El riesgo de desarrollar metástasis se incrementa cuando los ganglios linfáticos están afectados. En el caso de que los ganglios linfáticos no estén afectados, la invasión de los vasos es otro predictor adicional. Las metástasis del cáncer de mama se suelen formar en varios órganos, desarrollándose con más frecuencia en el hueso, pulmón e hígado. El lugar donde se produce la metástasis está relacionado con el tipo

de tumor primario; así, tumores que son ER+ suelen metastatizar al hueso, mientras que los carcinomas lobulares invasivos lo hacen en el tracto gastrointestinal y en los ovarios.⁽⁴⁸⁾

En los últimos años se han desarrollado técnicas para detectar las células circulantes antes de que éstas aniden en el tejido diana, a través de tinciones inmunohistoquímicas o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); estos métodos se basan en la detección de marcadores epiteliales de la mama en sangre periférica, en la médula ósea y en los nódulos linfáticos. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora no son indicativos de la capacidad metastásica del tumor, ya que se ha observado que sólo menos del 0.1% de las células cancerígenas que entran en la circulación sanguínea serían capaces de producir metástasis en el tejido diana. De ahí que se estén estudiando otros parámetros que sirvan como marcadores de la capacidad metastásica. Es el caso de moléculas que forman parte del sistema activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA). Este sistema está formado por la serina proteasa uPA, su receptor uPAR y los dos inhibidores del activador del plasminógeno tipo 1 y 2 (PAI1 y PAI2). uPA convierte el plasminógeno en plasmina, la cual degrada los componentes de la matriz extracelular y activa a las metaloproteinasas latentes. El inhibidor PAI1 no se produce en las células epiteliales, sino en las estromales, lo que indica que el estroma y las células tumorales presentan efectos coordinados sobre la proteólisis y contribuyen así a la progresión del cáncer. Además de presentar actividad inhibitoria de la actividad proteasa, el inhibidor PAI1 también está relacionado con la migración celular y promueve la invasión tumoral y la angiogénesis. En un estudio en el que se realizó un seguimiento de 8.377 pacientes de cáncer de mama durante más de seis años, se puso de manifiesto que además de la afectación de los nódulos linfáticos, los niveles elevados de uPA y PAI1 fueron los marcadores pronósticos más importantes para determinar el tiempo de recidiva y la supervivencia total.⁽⁴⁸⁾

2. EL ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un proceso de génesis compleja, en el que ocurren cambios a nivel molecular y fisiológico que contribuyen a la degeneración y desgaste funcional de los órganos, lo que conlleva al incremento del riesgo de desarrollar patologías y al aumento de la mortalidad. El grado de envejecimiento presenta variabilidad entre individuos que se explicaría por la interacción entre un componente genético de herencia poligénica constituido por genes de baja penetrancia que interaccionan entre sí y con el ambiente.

2.1 Aspectos moleculares y celulares del envejecimiento

Entre los mecanismos moleculares implicados en el proceso de envejecimiento, se encuentran los siguientes:

2.1.1 Inestabilidad genómica

A lo largo de la vida se produce la acumulación de daño en el DNA. La integridad y estabilidad del mismo se ve afectada por *agentes exógenos* físicos, químicos y biológicos; y también por *factores endógenos*, entre los que destacan los errores producidos durante la replicación del DNA, reacciones hidrolíticas espontáneas y el efecto de los radicales libres. El daño molecular producido por estos factores puede ser cuantificado a varios niveles: (i) Por un lado, a nivel del DNA nuclear se producen mutaciones somáticas que se acumulan con la edad, y también variaciones en el número de copias. Estas alteraciones en el DNA pueden afectar a distintas vías de señalización perturbando, en última instancia, la homeostasis tisular. Se han llevado a cabo estudios en ratón y en humanos en los que se ha observado que las deficiencias en los mecanismos de reparación del DNA causan una aceleración del proceso de envejecimiento, y ello es particularmente evidente en algunas progerias, que son síndromes de envejecimiento prematuro.⁽⁴⁹⁾ (ii) Por otra parte, los defectos producidos en la lámina nuclear pueden causar también inestabilidad genómica. Las mutaciones en genes que codifican proteínas que forman parte de dicha estructura que confiere estabilidad mecánica a la envoltura nuclear, también se relacionan con síndromes de envejecimiento prematuro.⁽⁵⁰⁾

2.1.2 Acortamiento telomérico

Hay ciertas regiones cromosómicas particularmente susceptibles al daño que se produce en el DNA con la edad, como son los telómeros. La mayoría de las células somáticas no expresan la enzima telomerasa y esto conlleva al progresivo acortamiento de la longitud telomérica. Se ha comprobado que hay relación entre el acortamiento telomérico, la senescencia celular y el envejecimiento en modelos de ratones modificados genéticamente. En ellos se observa que los ratones con telómeros cortos tienen una supervivencia más corta que aquéllos con telómeros largos.⁽⁵¹⁾

2.1.3 Alteraciones epigenéticas

Diversas alteraciones epigenéticas afectan a todas las células y tejidos con la edad. Entre ellas destacaríamos: (i) las modificaciones de las histonas, éstas se relacionan con el envejecimiento; se ha observado que la delección de componentes del complejo de metilación de histonas aumenta la longevidad en invertebrados. Las sirtuinas (SIRT), que son una familia de desacetilasas de histonas, también se relacionan con el envejecimiento. Así, *Herranz et al.*⁽⁵²⁾ observaron que la sobreexpresión de la SIRT1 supuso un incremento de la estabilidad genómica y eficiencia metabólica y mejoró el estado global fisiológico durante el envejecimiento, aunque no se asoció con la extensión de la longevidad. Por otro lado, ratones deficientes en la proteína SIRT6, que regula la estabilidad genómica, la vía de NF- κ B y la homeostasis de la glucosa, presentaron un envejecimiento acelerado.⁽⁵³⁾ En cuanto a SIRT3, ésta participaría en algunos de los efectos beneficiosos de la restricción calórica sobre la longevidad a través de la deacetilación de proteínas mitocondriales.⁽⁵⁴⁾ (ii) La metilación del DNA también se relaciona con el envejecimiento. Así, se ha observado que las células de pacientes y ratones con progerias presentan un patrón de metilación del DNA similar al encontrado en el proceso de envejecimiento.⁽⁵⁵⁾ (iii) En cuanto a la remodelación de la cromatina, las modificaciones epigenéticas en histonas y la metilación del DNA conllevarían a cambios conformacionales en la cromatina. Diversos estudios muestran la asociación entre las alteraciones en la cromatina y el envejecimiento, como es el caso de *Larson et al.*⁽⁵⁶⁾ que observaron que moscas con mutaciones en el gen que codifica la proteína de la heterocromatina 1 α (HP1 α) presentaron un acortamiento en su supervivencia. (iv) El envejecimiento también se relaciona con alteraciones transcripcionales, ya que con la edad se produce un incremento en la producción y maduración aberrantes de mRNAs. Por otro lado, al comparar el perfil de expresión de tejidos de individuos jóvenes y viejos de varias especies, se han observado cambios asociados con la edad en genes implicados en procesos inflamatorios y en vías de degradación lisosomal.⁽⁵⁷⁾

2.1.4 Pérdida de la proteostasis o de la homeostasis proteica

Con la edad se pierde la capacidad de mantener la homeostasis proteica, disminuye la síntesis de proteínas del tipo chaperonas inducida por estrés, tanto citosólicas como específicas de las organelas, por lo que se pierde la estabilización y

plegamiento proteico mediado por dichas chaperonas.⁽⁵⁸⁾ Con la edad también disminuye la actividad de los dos sistemas principales proteolíticos, el sistema de autofagia-lisosomal y el sistema ubiquitina-proteosoma.^(59, 60)

2.1.5 Desregulación de vías de señalización metabólicas

Muchos tipos celulares producen el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) en respuesta a la hormona del crecimiento (GH). Este factor forma parte de la vía de señalización de la insulina; por otra parte, el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (vía de señalización de la insulina IIS, que responde fundamentalmente a carbohidratos) entre sus múltiples dianas cuenta con la familia de factores de transcripción FOXO y los complejos mTOR, ambos muy relacionados con el proceso de envejecimiento. Los polimorfismos genéticos que reducen la funcionalidad de la hormona del crecimiento, del receptor al que se une (GHR), del IGF-1, del receptor de insulina o de sus efectores intracelulares como mTOR, AKT o FOXO, se asocian con un incremento de la longevidad, presentan tasas más bajas de crecimiento celular y de metabolismo y menores tasas de daño celular. La sobreexpresión de la proteína PTEN conlleva un descenso en la vía IIS, por lo que se ha observado que ratones que sobreexpresan el gen *Pten* presentan una supervivencia mayor.⁽⁶¹⁾

Otras vías como la de mTOR, sensible a las altas concentraciones de aminoácidos, la vía de AMPK, que detecta estados de baja energía a través de la detección de niveles elevados de AMPc, y la vía de las sirtuinas, que también detecta niveles bajos de energía, pero en este caso a través de la detección de elevados niveles de NAD⁺, se asocian con los procesos metabólicos que tienen lugar durante el envejecimiento. En este caso, la disminución de los niveles de mTORC1/S6K1 tras el tratamiento con rapamicina y el incremento de los niveles de AMPK y de las sirtuinas, se asocian con un aumento de la longevidad.⁽⁶¹⁾

2.1.6 Disfunción mitocondrial

Los radicales libres se generan a lo largo de la vida y producen daño molecular a nivel de proteínas, lípidos y DNA. La teoría de los radicales libres mitocondriales propone que la disfunción mitocondrial que tiene lugar con la edad, conlleva un aumento en la producción de radicales libres que a su vez causa mayor deterioro mitocondrial y daño celular global y, por tanto, tendría un papel pro-envejecimiento.^{(62,}

⁶³⁾ Sin embargo, diversos estudios muestran que existe controversia en cuanto al

papel que desempeñan los radicales libres sobre el envejecimiento. Así, *Doonan et al.*⁽⁶⁴⁾ observaron que el incremento de los niveles de radicales libres prolongó la supervivencia en levaduras y en *C. elegans*. Otros estudios en ratón concluyeron que el incremento de radicales libres y daño oxidativo no aceleraba el proceso de envejecimiento, ni tampoco se observó un aumento en la supervivencia de los ratones con niveles elevados de la actividad del sistema de defensa antioxidante.^(65, 66) De hecho, se ha observado que los radicales libres desencadenarían una respuesta de proliferación y supervivencia en respuesta a condiciones de estrés. No obstante, la disfunción mitocondrial podría contribuir al envejecimiento por una vía independiente a la de los radicales libres, a través de la acumulación de mutaciones y deleciones en el DNA mitocondrial (mtDNA), a través de la oxidación de proteínas mitocondriales o de la desestabilización de la organización del complejo de la cadena respiratoria.⁽⁶¹⁾

2.1.7 Senescencia celular

La senescencia es una respuesta al daño en la que se produce una parada estable del ciclo celular. Se puede entender como un mecanismo de compensación que contribuiría a eliminar las células dañadas que son potencialmente oncogénicas. Para que de verdad funcione como tal mecanismo de compensación, es necesario un sistema que elimine las células senescentes y movilice a los progenitores para reestablecer el equilibrio celular. Sin embargo, en los organismos envejecidos, este sistema de recambio celular se vuelve ineficiente, lo que se traduce en la acumulación de células senescentes que incrementan la insuficiencia funcional de los tejidos y contribuyen al envejecimiento.

Wang et al.⁽⁶⁷⁾ compararon los niveles de células senescentes en distintos tejidos de ratones jóvenes y viejos, y observaron un incremento con la edad en el hígado, en la piel, en los pulmones y en el bazo, pero no observaron diferencias en el corazón, músculo esquelético, ni en riñones, comprobando además que la senescencia es específica de tejido.⁽⁶⁷⁾

La senescencia se puede producir como consecuencia del acortamiento telomérico, también por el daño al DNA no telomérico y en respuesta a una elevada señalización mitogénica a través de las vías p16^{INK4a}/Rb y p19^{ARF}/p53. Los genes que codifican las proteínas p16^{INK4a} y p19^{ARF} se sitúan en el *locus INK4a/ARF*; dicho *locus* se asocia con un gran número de patologías asociadas al envejecimiento, como la diabetes, el glaucoma, la *enfermedad de Alzheimer* o patologías cardiovasculares.⁽⁶⁸⁾

2.1.8 Disminución del número de células madre

Una de las principales características del envejecimiento es la disminución de la capacidad de regeneración tisular y esto sería en parte consecuencia de la disminución del número de células madre que se produce con la edad.⁽⁶¹⁾

2.1.9 Alteración de la comunicación intercelular

Además de las alteraciones autónomo-celulares ya explicadas, el envejecimiento también implica cambios en la comunicación intercelular. Por ejemplo, con el envejecimiento se produce una inflamación asociada a la edad como consecuencia de la acumulación de tejido proinflamatorio dañado, errores en el sistema inmune, la secreción de citoquinas proinflamatorias por parte de las células senescentes, respuesta autofágica defectuosa y la activación de vías de señalización inflamatorias como NFκ-β. *Osorio et al.*⁽⁶⁹⁾ observaron que la inhibición química o genética de NFκ-β previno el desarrollo de características asociadas al envejecimiento en modelos de ratón con envejecimiento prematuro.

2.2 Edad biológica

Alex Comfort propuso en 1969 que los numerosos cambios a niveles celular, tisular y sistémico que se producen con la edad podrían cuantificarse, identificando así biomarcadores del envejecimiento.⁽⁷⁰⁾ Dichos biomarcadores se pueden integrar en modelos matemáticos para definir una variable que se conoce como edad biológica,⁽⁷¹⁾ que representa el estado funcional de un individuo en comparación con el estado funcional de otros individuos de su misma edad cronológica.⁽⁷²⁾

Para determinar la edad biológica, se aplican modelos matemáticos que integran variables o biomarcadores relacionados con el envejecimiento y que definen la edad cronológica. La edad predicha por el modelo es lo que se denomina edad biológica.⁽⁷³⁾ Los modelos matemáticos que se utilizan, dependen de si se utiliza una sola variable explicativa o independiente, en cuyo caso se suelen aplicar regresiones lineales; o si se utilizan varias variables explicativas, utilizando entonces aproximaciones multivariantes, como modelos de regresión múltiple o análisis de componentes principales, entre otros.⁽⁷³⁾

Se suele utilizar la diferencia entre la edad predicha o biológica y la edad cronológica; algunos autores denominan a esta diferencia *incremento de edad biológica*,^(72, 74) otros la refieren como *tasa de envejecimiento*.^(75, 76) Si la diferencia

es positiva, ese individuo envejece más rápido de lo que le correspondería para su edad cronológica y, por tanto, sería biológicamente más viejo de lo que le correspondería; si la diferencia es negativa, el individuo envejecería de forma más lenta de lo que le correspondería para su edad cronológica y, por tanto, sería biológicamente más joven de lo que le correspondería.⁽⁷²⁾

En cuanto a los parámetros o biomarcadores que mejor definen la edad biológica, los primeros autores que abordaron este concepto, utilizaron principalmente parámetros físicos y psicológicos que presentaran una correlación positiva o negativa con la edad.⁽⁷⁷⁾ En otros estudios más recientes se han utilizado índices ya definidos, como *Cho et al.*⁽⁷³⁾ quienes usaron el denominado *Work Ability Index (WAI)*, que es un índice empleado para analizar la capacidad física, mental y social de los trabajadores, y que utiliza parámetros físicos y cognitivos. Por su parte, *Goggins et al.*⁽⁷⁸⁾ usaron los marcadores que se emplean en el *índice de fragilidad*, diseñado para investigar la pérdida de funcionalidad en la población de edad avanzada. En los últimos años, los autores han incorporado marcadores bioquímicos y moleculares al estudio de la edad biológica. Así, *Krištić et al.*⁽⁷⁹⁾ observaron que existían patrones concretos de glicosilación de la IgG que serían buenos biomarcadores de la edad biológica. Otros estudios señalan que la metilación del DNA podría ser considerada como un *relaj epigenético* que refeja la edad biológica.⁽⁸⁰⁻⁸²⁾

3. RELACIÓN ENTRE EL CÁNCER Y EL ENVEJECIMIENTO

3.1 Cáncer de mama y envejecimiento como procesos de génesis compleja

Los procesos de génesis compleja están influenciados por la interacción entre factores ambientales y por un componente de herencia poligénica y se caracterizan por presentar gran heterogeneidad fenotípica entre individuos. A esta heterogeneidad contribuyen distintos fenotipos intermedios que están implicados en su patogenia y que se sitúan a distintos niveles.⁽⁸³⁾ Uno de los principales problemas al estudiar la genética de las enfermedades de génesis compleja es que la enfermedad es producto de la suma del efecto de diferentes formas alélicas que interaccionan entre sí; por tanto, el efecto de cada una de ellas es pequeño, lo que dificulta su identificación.⁽⁸⁴⁾

A continuación, se profundiza en aspectos moleculares comunes a ambos procesos de génesis compleja, haciendo especial hincapié en los fenotipos

intermedios relacionados con el estrés oxidativo que contribuyen a la patogenia de ambos. Finalmente, se describe la genética de los dos procesos.

3.2 Aspectos moleculares comunes

Diversos estudios epidemiológicos muestran que el envejecimiento es el factor que presenta mayor influencia sobre el riesgo de desarrollar cáncer. Con la edad, además de producirse la acumulación de mutaciones, se producen muchos cambios a nivel celular y también en procesos relacionados con el sistema endocrino o el sistema inmune, generando un microambiente tisular que es más proclive a favorecer el inicio y la progresión del cáncer.⁽⁸⁵⁾

La acumulación de daño celular se considera uno de los principales factores desencadenantes del envejecimiento y del cáncer. Por lo tanto, aquellos mecanismos que protegen a las células del daño, deberían proteger al organismo del desarrollo del cáncer y del envejecimiento, y se denominan mecanismos convergentes; por otra parte, aquellos mecanismos de protección frente al cáncer que limitan el potencial proliferativo de las células y desencadenan efectos que potencian fenotipos relacionados con el envejecimiento, se denominan divergentes.⁽⁸⁶⁾

Entre los **mecanismos convergentes** destacan, (i) la eficiencia metabólica, que implica la disminución en la generación de daño, confiriendo protección frente al cáncer y al envejecimiento. Esto se consigue, por ejemplo, al disminuir la actividad de la vía GH/IGF1 o aumentando la actividad de la familia de factores de transcripción FOXO, que se activan en respuesta a estímulos de estrés a través de la vía de JUN. En ambos casos, el resultado es la extensión de la longevidad y la protección frente al cáncer. Otra vía para aumentar la eficiencia metabólica es incrementando la actividad de SIRT1, proteína que participa en el efecto que produce la restricción calórica sobre la extensión de la longevidad; y también de la proteína KLOTTHO, que retrasa el envejecimiento a través de la disminución de la actividad de la vía IGF1-insulina.⁽⁸⁶⁾

(ii) Otro de los mecanismos convergentes incluye al sistema de defensa antioxidante. Se han llevado a cabo numerosos estudios de sobreexpresión y delección de genes que codifican enzimas del sistema de defensa antioxidante, para analizar su efecto sobre el envejecimiento, y sólo hay algunos ejemplos en los que se ha encontrado una relación directa entre la disminución de los niveles de daño oxidativo y el incremento de la supervivencia, como es el caso de los ratones *knockout* para una proteína que participa en la generación de radicales libres, la proteína P66^{shc},⁽⁸⁷⁾ y en los ratones que sobreexpresan el gen de la tioredoxina humana.⁽⁸⁸⁾ No se observó un incremento en la resistencia al desarrollo de cáncer en esos ratones, pero tampoco un aumento de la susceptibilidad. *De Flora et al.*⁽⁸⁹⁾ realizaron un estudio con ratones

suplementando su dieta con el antioxidante N-acetilcisteína y observaron un efecto protector frente al desarrollo de cáncer de pulmón por inducción química.

(iii) Otro mecanismo convergente es la señalización desencadenada por el supresor tumoral P53, que participa en los mecanismos de defensa que se activan en la célula bajo estímulos de estrés. Durante la tumorigénesis las células adquieren la capacidad de sobrevivir y proliferar bajo condiciones de estrés, como son la falta de nutrientes y de oxígeno, el ataque de las células del sistema inmune, daño al DNA o el metabolismo aberrante. Ante este nivel elevado de estrés, P53 reacciona activando programas transcripcionales que intentan restablecer la homeostasis, y si el estrés persiste, activa mecanismos para prevenir la propagación de las células dañadas a través del proceso de apoptosis o senescencia. En cuanto al envejecimiento, los niveles normales endógenos de estrés que se generan con la edad, mantienen una actividad basal de P53 que activa un programa transcripcional de protección, que mejora la eficiencia de la respiración mitocondrial y disminuye la generación de radicales libres.⁽⁸⁶⁾

Entre los **mecanismos divergentes**, se encuentran: (i) el acortamiento telomérico. Los telómeros se acortan con cada ciclo de división celular, ya que los tejidos somáticos adultos no expresan la enzima telomerasa, hasta que llegan a un punto crítico a partir del cual las células entran en senescencia, por lo que se considera que el acortamiento telomérico ejerce un efecto protector frente a la proliferación celular descontrolada característica del fenotipo tumoral. En cuanto a su relación con el envejecimiento, los telómeros se acortan con la edad y dado que son esenciales para la estabilidad cromosómica, en edades avanzadas los telómeros no pueden proteger a los cromosomas de procesos de degradación o de fusión cromosómica, produciéndose una acumulación de daño que potencia el desarrollo del envejecimiento; de hecho, los ratones deficientes en la enzima telomerasa envejecen prematuramente.⁽⁹⁰⁾

(ii) Otro de los mecanismos divergentes se produce a través del *locus INK4a/ARF* que codifica dos supresores tumorales, P16^{INK4a} y ARF (P14^{ARF} en humanos o P19^{ARF} en ratón). ARF estabiliza a P53 al inhibir a MDM2. P16^{INK4a} se une e inhibe a las quinasas dependientes de CICLINA-D, CDK4 y CDK6, que tienen potencial oncogénico; por lo tanto, este *locus* actúa como supresor tumoral y es habitual que se produzca la inactivación del mismo a través de su delección completa o por metilación del promotor en muchos tumores. En cuanto al envejecimiento, el *locus INK4a/ARF* se mantiene silenciado durante el desarrollo embrionario y durante la mayoría de la fase postnatal, pero se activa en edades avanzadas debido a los

elevados niveles de estímulos mitogénicos; de hecho, la activación de dicho *locus* es uno de los cambios más característicos que se produce en los perfiles de expresión durante el envejecimiento.⁽⁸⁶⁾

3.2.1 Fenotipos intermedios relacionados con el estrés oxidativo que contribuyen a la patogenia del cáncer de mama y del envejecimiento

El estrés oxidativo es un fenotipo intermedio que participa de forma simultánea en la patogenia del cáncer y del envejecimiento.⁽⁸⁶⁾ El estrés oxidativo es asimismo un fenotipo complejo y las diferencias observadas en el comportamiento de distintos aspectos o fenotipos intermedios del mismo podrían explicar, la distinta susceptibilidad y comportamiento del cáncer de mama en función de la edad. Basándonos en la bibliografía, hemos seleccionado diferentes fenotipos intermedios relacionados con el estrés oxidativo, entre los que diferenciamos los siguientes grupos: (i) *Agentes productores de daño oxidativo*, principalmente relacionados con el metabolismo, por su importancia en la producción de estrés oxidativo, como las vías de señalización AKT/mTOR y MAPK; (ii) *Agentes de protección del daño oxidativo*; entre ellos, por su importancia, elegimos la actividad catalasa y los niveles de glutatión; y (iii) *biomarcadores de cuantificación del daño molecular al DNA, lípidos y proteínas*.

En todos los casos, en primer lugar se abordan aspectos generales del fenotipo intermedio y, a continuación, se recoge información sobre dicho fenotipo intermedio en el contexto del envejecimiento y de la enfermedad.

3.2.1.1 Agentes productores de daño oxidativo y actividad metabólica

El metabolismo sistémico tiene un papel esencial en el proceso de envejecimiento y en el desarrollo del cáncer al generar estrés oxidativo. Pero además, en el caso del cáncer, también es importante tener en cuenta los cambios metabólicos que se producen en las propias células tumorales. Así, se ha descrito lo que se conoce como *efecto Warburg* en el metabolismo de las células tumorales, donde se produce un aumento de la captación de la glucosa para generar mayoritariamente lactato aún en presencia de oxígeno. En las células tumorales la glucosa no se utiliza para la producción de NADH y ATP por vía mitocondrial; en cambio, se activan otras vías de biosíntesis de moléculas que permiten el crecimiento celular rápido, como el glicerol-3-fosfato y la producción de NADPH implicado en el proceso de división celular.

Además, en las células tumorales se produce un incremento de la síntesis de lípidos *de novo*, que no suele darse en las células normales. Para ello, como se observa en la **Figura 4**, en las células tumorales aumenta el flujo de glutamina hacia el

ciclo de Krebs, debido a la mutación en la isocitrato dehidrogenasa-1 (IDH1), lo que proporciona la cantidad suficiente de acetil-coenzima A para la biosíntesis de lípidos, ya que la mayoría del piruvato en las células tumorales se convierte en lactato. Además, un aumento en la vía de las pentosas fosfato genera la suficiente ribosa-5-fosfato, requerida para la síntesis de DNA, y el NADPH, necesario para las reacciones anabólicas que se producen en la biosíntesis de lípidos; por el contrario, se produce menor cantidad de NADH a través de la piruvato-deshidrogenasa o a través del ciclo de Krebs.⁽⁹¹⁾

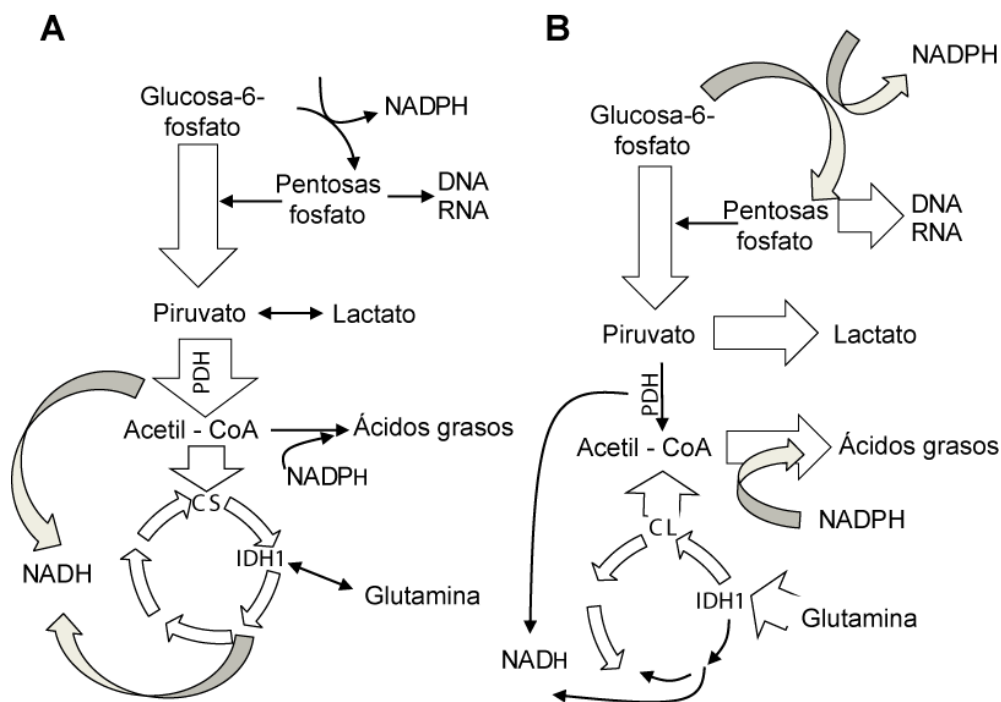


Figura 4. Esquema de los principales procesos metabólicos en células normales (A) y en células tumorales (B). El grosor de las flechas indica la intensidad del flujo. CL= citrato-líasa; CS = citrato-sintasa; IDH1 = Isocitrato-dehidrogenasa; PDH = piruvato-deshidrogenasa; Imagen modificada de Denkert et al.⁽⁹¹⁾

Sin embargo, en los últimos años se ha observado que no todos los tumores o incluso no todas las células dentro de un mismo tumor, siguen el patrón metabólico descrito en el *efecto Warburg*, sino que presentan un incremento en la fosforilación oxidativa mitocondrial;⁽⁹²⁾ En el caso del cáncer de mama, se han observado diferencias metabólicas entre los distintos tipos de cáncer de mama y entre las células de tumores de distinto grado, aun tratándose del mismo tipo de tumor.

Si nos centramos en el papel que ejerce el metabolismo general del organismo sobre el envejecimiento y el cáncer, los ritmos circadianos que controlan diversas funciones metabólicas y fisiológicas son un buen ejemplo del nexo entre los tres

procesos. Por ejemplo, el modelo de ratón *knockout* para el gen *Bmal1* presenta un desequilibrio en el ritmo circadiano y, además, presenta síntomas de envejecimiento prematuro por un exceso de estrés oxidativo. Por otro lado, la expresión de *Per* disminuye en las células de cáncer de mama y diversos estudios en modelos de ratón exponen que *Per1*, *Per2* y *Per3*, genes que participan en la regulación de los ciclos circadianos, funcionan como supresores tumorales en ratón.⁽⁹³⁾ También se ha observado que el defecto de *Per3* en ratón, así como las mutaciones que afectan a otro de los genes del ritmo circadiano, *NPaS2*, se asocian con un incremento del riesgo de desarrollar de cáncer de mama.

Otro de los nexos entre el metabolismo y el cáncer es el *síndrome metabólico*, que se caracteriza por la acumulación de grasa abdominal, intolerancia a la glucosa, hipertensión, niveles bajos de lipoproteína de alta densidad (HDL) en suero y niveles séricos de triglicéridos elevados. Los datos epidemiológicos ponen de manifiesto la relación existente entre el síndrome metabólico y el cáncer colorrectal, el cáncer de próstata y con la recidiva del cáncer de mama.⁽⁹⁴⁾

Teniendo todo ello en cuenta, y para dilucidar los aspectos biológicos y moleculares subyacentes en la asociación que existe entre estos procesos, en los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios donde se han analizado los niveles de metabolitos en el suero para estudiar su posible asociación con el proceso de envejecimiento y con la susceptibilidad y desarrollo de distintos tipos de cáncer.^(95, 96) También se está estudiando la activación y las interacciones que existen entre las distintas moléculas que forman parte de las vías de señalización relacionadas con el metabolismo, como por ejemplo las vías de señalización de PI3K/AKT/mTOR y RAF/MEK/ERK, que se describen a continuación.

Vías de señalización de PI3K/AKT/mTOR y RAF/MEK/ERK

La dimerización de los receptores ERBB2 conlleva la fosforilación y activación de numerosos sustratos intracelulares, incluyendo las vías de señalización RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR y otras vías implicadas en el proceso de apoptosis, la síntesis de proteínas y la proliferación celular (**Fig. 5**).⁽⁹⁷⁾

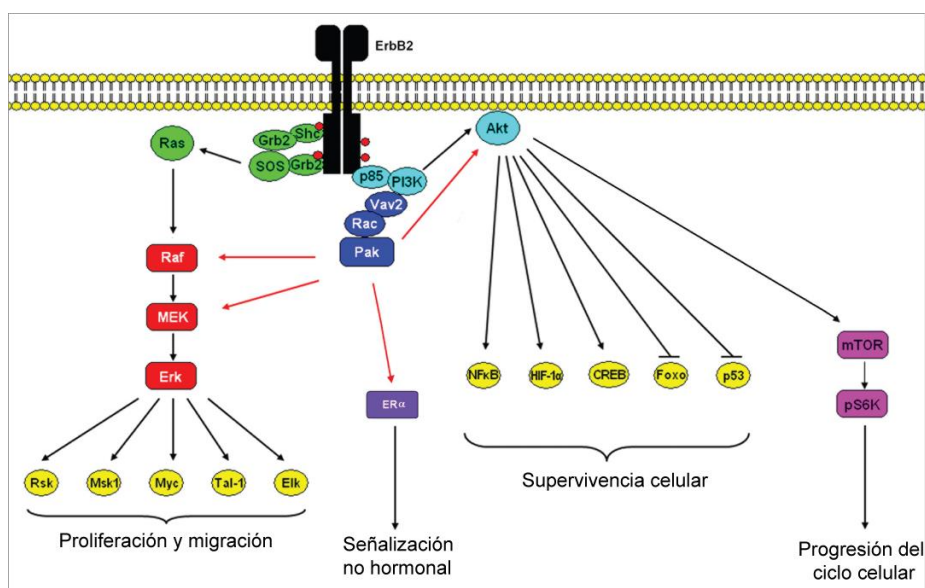


Figura 5. Dimerización del receptor ERBB2 y activación de las vías de señalización PI3K/AKT/mTOR y RAF/MEK/ERK. Imagen modificada de Arias-Romero y Chernoff.⁽⁹⁷⁾

Los niveles elevados de componentes activados de las vías RAS/RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR se suelen asociar con el desarrollo de envejecimiento prematuro y con mal pronóstico, en pacientes con cáncer.⁽⁹⁸⁾ En la vía de RAS/RAF/MEK/ERK, tras la activación del receptor ERBB2, la proteína adaptadora SHC se une al dominio C-terminal del receptor activado. SHC recluta a la proteína GRB2 y a SOS. SOS activa a la proteína RAS y ésta recluta a RAF y lo lleva hacia la membrana donde es activado. RAF es el responsable de la fosforilación en residuos serina/treonina de MEK1 y dicha proteína fosforila, a su vez, a ERK1/2 en residuos específicos de treonina y tirosina. Las proteínas ERK1/2 activadas tienen numerosos sustratos que finalmente pueden participar en diferentes procesos de proliferación y migración.

En cuanto a la vía PI3K/AKT/mTOR, la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) es una proteína heterodimérica con una subunidad reguladora de 85 KDa y una subunidad catalítica de 110 KDa. La activación de PI3K se produce por la unión de la subunidad reguladora p85 de la PI3K con los sitios fosfotirosina del receptor a través de los dominios SH2 de dicha subunidad reguladora. A continuación, la subunidad catalítica p110 transfiere grupos fosfatos a fosfolípidos de membrana, entre ellos el fosfatidil-inositol 3,4,5 trifosfato que atrae a distintas quinasas a la membrana plasmática iniciando la cascada de señalización. Bajo PI3K, la primera molécula efectora en dicha cascada es AKT, que se activa mediante la fosforilación de dos de sus residuos, T308 y S473. AKT se activa a través de quinasas dependientes de fosfatidilinositol (PDK). PDK1 es la responsable de la fosforilación del residuo T308 de

AKT. Tras la activación de AKT, ésta puede translocarse hasta el núcleo donde afecta a la actividad de numerosos reguladores transcripcionales que pueden afectar a la proliferación celular, supervivencia celular y transición epitelio-mesénquima, como CREB, E2F, NFκB o MDM2 el cual regula la actividad de P53. AKT también regula la actividad de mTOR; para ello, AKT fosforila TSC2, el cual asociado con TSC1 inactiva la proteína RHEB. La fosforilación de TSC2 inhibe su acción, permitiendo la acumulación de RHEB-GTP el cual activa la actividad proteína quinasa de mTOR unido a RAPTOR, DEPTOR y mLST8 o complejo mTOR/RAPTOR/mLST8 (mTORC1), éste inhibe a AKT mediante un bucle de retroalimentación negativa. AKT también fosforila PRAS40, un inhibidor de mTORC1 que al ser fosforilado deja de ejercer su efecto inhibitorio, siendo éste otro de los medios a través de los cuales AKT activa a mTORC1. Por otro lado, mTORC2 (mTOR/RICTOR) fosforila AKT en S473 *in vitro* y ello facilita la fosforilación de la T308; sin embargo, el complejo mTORC1 puede antagonizar la formación del complejo mTORC2 y reducir la actividad de AKT. Existe además relación entre ambas vías, PI3K/AKT/mTOR y RAF/MEK/ERK (Fig. 6).⁽⁹⁸⁾

La vía de señalización RAS/RAF/MEK/ERK influye sobre mTORC1; de hecho, ERK1/2 fosforilan TSC2, suprimiendo su capacidad inhibitoria. Además, Carracedo *et al.*⁽⁹⁹⁾ aplicaron un inhibidor de mTORC1, análogo de rapamicina, en pacientes de cáncer de mama, melanoma y colon, y observaron que se producía una activación de la vía de MAPK, con aumento de los niveles de ERK1/2 fosforilado.

En el caso de AKT, existen tres isoformas, AKT1, AKT2 y AKT3. Estudios con ratones *knockout* para cada una de esas isoformas, demostraron que la deficiencia independiente de las mismas no presentaba fenotipos solapantes. Así, los ratones *knockout* para AKT1 presentaron un retardo en el crecimiento y letalidad perinatal; los ratones *knockout* para AKT2 desarrollaron diabetes por resistencia a la insulina y se observó que AKT2 es la isoforma principal que contribuye a la señalización metabólica en el hígado. Por último, los ratones *knockout* para AKT3 presentaron un menor tamaño cerebral, lo que está de acuerdo con el hecho de que ésta es la isoforma presente en mayor medida en las neuronas.⁽¹⁰⁰⁾

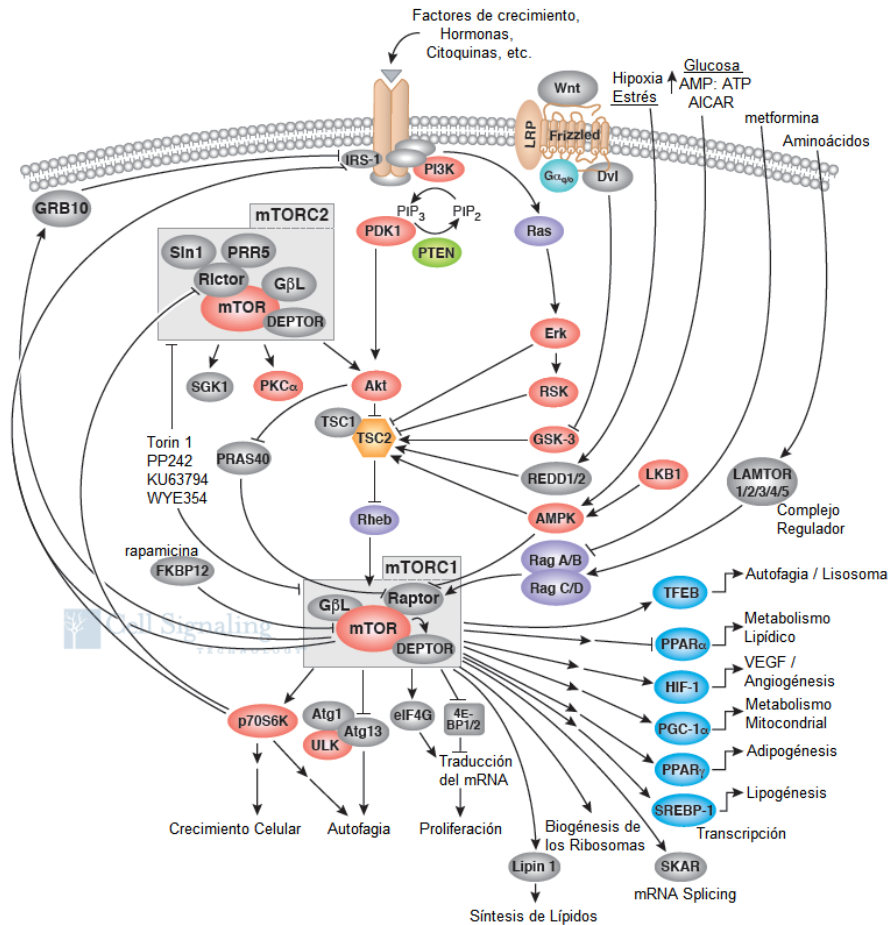


Figura 6. Esquema de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR y RAF/MEK/ERK. Imagen modificada de la web www.cellsignal.com.

En cuanto a mTOR (*mammalian target of rapamycin*), se sabe que participa en la transcripción y la traducción de proteínas en respuesta a concentraciones intracelulares de aminoácidos y otros nutrientes esenciales, y está implicado en el crecimiento y la progresión del ciclo celular. Existen dos complejos que contienen mTOR, el complejo sensible a rapamicina mTORC1, que responde a nutrientes y a factores de crecimiento y regula el crecimiento celular y la proliferación a través de p70S6K y 4EBPs, y el complejo insensible a rapamicina mTORC2, que regula a AKT y regula la polaridad celular y el citoesqueleto. La desregulación de mTOR promueve el desarrollo de enfermedades metabólicas, cáncer y envejecimiento.⁽¹⁰¹⁾

En el caso de ERK, es un componente de la familia de las MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) y cuenta con dos isoformas, p44 ERK1 y p42 ERK2. Al ser fosforilado por MEK, dimeriza y se distribuye por toda la célula, tiene un gran número de sustratos distribuidos en distintos compartimentos, incluidos factores de transcripción nucleares como MYC y ELK, receptores y otras proteínas de membrana,

como EGFr; proteínas citoplasmáticas, como STAT5 y COX2, y componentes del citoesqueleto y proteínas mitocondriales, como BCL-2; por ello ERK1/2 está implicado en numerosos procesos biológicos.⁽¹⁰²⁾

➤ **Las vías de señalización PI3K/AKT/mTOR y RAF/MEK/ERK en el contexto del envejecimiento**

En los últimos años, se ha observado que las vías de señalización relacionadas con el metabolismo de nutrientes y con el estrés oxidativo tienen un papel importante en el proceso de envejecimiento y, por ello, numerosos estudios se han centrado en observar el papel que ejerce mTOR sobre dichos procesos. Así, se ha demostrado la importancia de mTOR sobre el envejecimiento y sobre la supervivencia en distintas especies.^(103, 104)

mTOR participa en el proceso de envejecimiento a distintos niveles. A nivel celular, el complejo mTORC1 estimula la función mitocondrial, lo que se traduce en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y daño producido por el estrés oxidativo. Además, mTORC1 inhibe la autofagia, lo que implica la acumulación de los productos generados por daño del estrés oxidativo. La inhibición de mTORC1 conlleva al aumento de la expresión de genes que ejercen una función protectora y de genes relacionados con la regulación de la supervivencia. A nivel tisular, la activación constitutiva de mTORC1 a través de la delección de *TSC1* implica un aumento de la expresión de P16, P19 y P21, los cuales limitan la proliferación celular y hacen que la célula entre finalmente en fase de senescencia.⁽¹⁰¹⁾

La restricción calórica es uno de los mecanismos que favorece la longevidad y retrasa el proceso de envejecimiento a través de mTOR. Parece que la restricción calórica actuaría principalmente a través de la inhibición de mTORC1. Así, *Selman et al.*⁽¹⁰⁵⁾ observaron que la delección de S6K1, un componente de la vía de señalización de mTOR, inducía un patrón de expresión génica similar al provocado por la restricción calórica, confirmando que la restricción calórica ejercería su efecto a través de la inhibición de mTORC1.

Inhibiendo mTOR se pueden eliminar sus efectos sobre el proceso de envejecimiento. Por ejemplo, el resveratrol inhibe mTOR y, en consecuencia, la senescencia celular. La metformina, que se utiliza para tratar la diabetes tipo II, inhibe también mTOR y previene el envejecimiento celular.⁽⁹⁸⁾ Como las vías de RAF/MEK/ERK y PI3K/PTEN/AKT/mTOR interaccionan para regular la actividad de mTOR, se postula que inhibiendo algunas de estas vías es posible prevenir el

envejecimiento celular. *Demidenko et al.*⁽¹⁰⁶⁾ comprobaron que utilizando un inhibidor de MEK, el U0126, o bien uno de la PI3K, el LY294002, se inhibía la senescencia celular a través de la inhibición indirecta de mTOR.

➤ **Las vías de señalización PI3K/AKT/mTOR y RAF/MEK/ERK en el contexto patológico**

Los componentes de las dos vías se han asociado con diversas patologías. Se ha relacionado a AKT con la diabetes tipo II, en concreto la deficiencia de AKT2 es suficiente para observar el desarrollo de diabetes en estudios realizados en ratón y también en humanos.⁽¹⁰⁷⁾ En el caso de mTOR, existe una alta asociación con enfermedades metabólicas y, dependiendo del contexto fisiológico, el efecto es distinto. Así, durante el ayuno disminuyen los niveles de glucosa, aminoácidos e insulina en sangre, lo que implica una menor activación de mTORC1 y un aumento de la sensibilidad a la insulina. Por el contrario, en caso de una situación en la que haya un exceso de nutrientes, el mTORC1 se activa de forma crónica y genera un estado resistente a la insulina y diabetes tipo II.⁽¹⁰¹⁾ También se ha observado una relación entre mTOR y la enfermedad de Alzheimer; en concreto, los niveles de p-mTOR (Ser2481) en el cerebro de personas afectadas con esta patología fueron 3 veces más elevados que los niveles detectados en el cerebro de controles sanos.⁽¹⁰⁸⁾

En cuanto al cáncer, algunos de los componentes de estas vías pueden sufrir mutaciones, pueden amplificarse o deleccionarse haciendo que se desarrollen distintos tipos de cáncer. Comenzando por la vía RAS/RAF/MEK/ERK, las mutaciones suelen darse en RAS y RAF, y no se suelen encontrar mutaciones por debajo de RAF en el cáncer humano. En algunos casos, como el carcinoma hepatocelular, se ha observado la activación de dicha vía en el 100% de las muestras analizadas en comparación con el tejido adyacente sano, aún en ausencia de mutaciones en RAS y RAF.⁽⁹⁸⁾

En cuanto a la vía PI3K/AKT/mTOR, el gen que codifica la subunidad catalítica de PI3K, p110 α , se encuentra mutado en el 25% de los tumores de mama, 32% de tumores colorrectales, 30% de endometrio, 27% de cerebro, 25% gástrico y 4% de pulmón. Se han detectado niveles elevados de AKT en carcinomas de mama, ovario y próstata, y se asocian con mal pronóstico. AKT1 se encuentra mutado entre el 2% y el 8% de los tumores de mama, en el 6% de los tumores colorrectales y el 2% de los tumores de ovario. AKT2 no suele aparecer con mutaciones puntuales en el cáncer humano; sin embargo, sí se han observado amplificaciones del gen en el 12% de los

tumores de ovario y en el 3% de los carcinomas de mama. En cuanto a AKT3, se han encontrado mutaciones en melanoma.⁽⁹⁸⁾

Con respecto a mTOR, se han observado niveles elevados de expresión de mTOR total en lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado de malignidad, niveles elevados de p-mTOR en carcinomas de células escamosas, y también se han encontrado niveles elevados de ambos, mTOR total y p-mTOR, en colangiocarcinomas extrahepáticos y en tumores colorrectales.⁽¹⁰⁹⁾ Además, aquellos pacientes con adenocarcinoma del tracto biliar, cuyos tumores presentaron niveles elevados de p-mTOR, mostraron una supervivencia significativamente más corta que la de los pacientes cuyos tumores exhibieron niveles mínimos de expresión de p-mTOR.⁽¹¹⁰⁾

Con respecto al cáncer de mama, AKT1 activado en tumores ERBB2-positivos se asoció con latencias menores y con menor capacidad metastásica.^(111, 112) La inhibición de ésta última fue específica de isoforma, ya que mientras que AKT1 se relacionó con el bloqueo de la capacidad migratoria; AKT2 promovió la capacidad invasiva. En cuanto a ERK, también se observó una relación entre ésta y el desarrollo de metástasis; en concreto, su inhibición se asoció con una disminución de la capacidad invasiva.⁽¹¹³⁾

En cuanto a mTOR, sus niveles elevados se asocian con la progresión del cáncer de mama *in vivo*. Otras moléculas que están por debajo de mTOR en la vía de señalización, como el factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E), también presentan niveles elevados en distintos tipos de cáncer y se asocian con mal pronóstico. *Nasr et al.*⁽¹¹⁴⁾ observaron que la supresión de la actividad de mTOR y, por lo tanto, la del factor eIF4E, retrasaba la progresión tumoral del cáncer de mama y el desarrollo de metástasis pulmonares *in vivo*, ya que se inhibía la traducción de los mRNAs que codificaban el VEGF, MMP-9 y la ciclina D1, todos ellos implicados con la capacidad invasiva celular.

3.2.1.2 Agentes de protección frente al daño oxidativo

Para eliminar los radicales libres, la célula dispone de dos sistemas principales de defensa antioxidante, un sistema de defensa enzimático y otro no enzimático. Del *sistema de defensa antioxidante enzimático* forman parte las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR); éste es el principal sistema de defensa frente a los radicales libres *in vivo*. Hay dos tipos principales de SOD, la CuZnSOD o SOD1 que tiene cobre (Cu) y

zinc (Zn) en el centro activo y se localiza en el citoplasma celular; la otra es la MnSOD o SOD2, que presenta manganeso en su centro activo y se localiza en la matriz mitocondrial. Catalizan la dismutación de radicales superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno que se convierte en agua y oxígeno por la CAT y la GPx. Ambas enzimas no actúan a la par, la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 mientras que la GPx lo hace en concentraciones bajas. La CAT es una de las enzimas redox más eficientes y se localiza principalmente en el peroxisoma (el 80%, el 20% restante se localiza en el citosol). La GPx elimina el peróxido de hidrógeno a través de la oxidación del glutatión y es la GR la que convierte al glutatión oxidado de nuevo a su forma reducida (**Fig. 7**).⁽¹¹⁵⁾

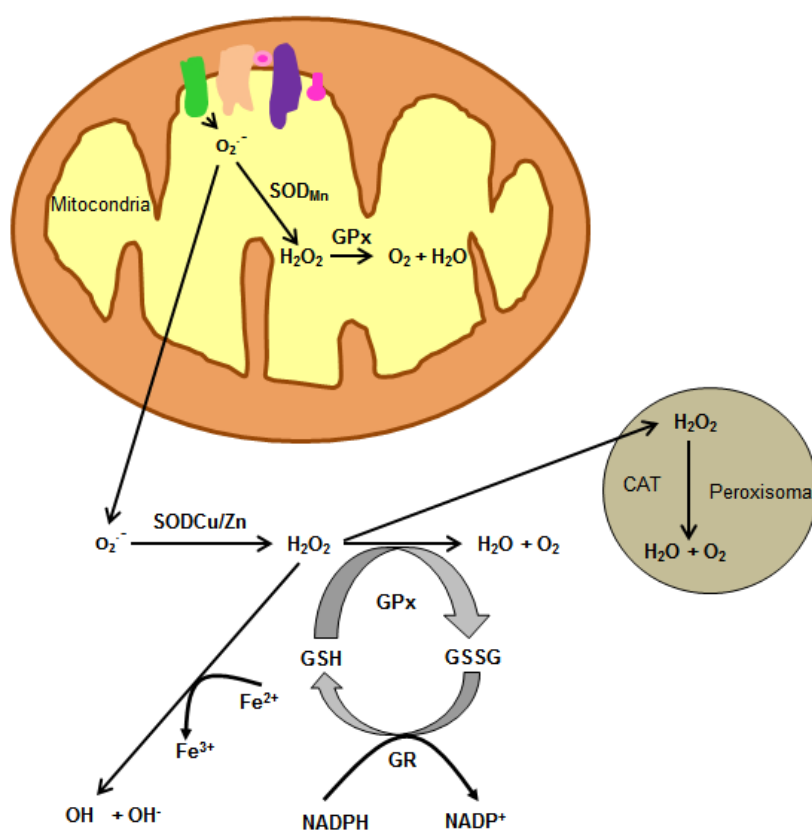
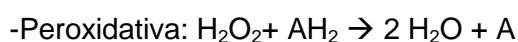
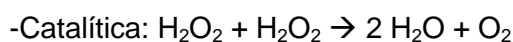


Figura 7. Esquema del sistema enzimático de defensa antioxidante.

En cuanto al *sistema no enzimático de defensa antioxidante*, cabe destacar las vitaminas C, E y el glutatión. No obstante, algunos estudios han revelado que bajo ciertas circunstancias podrían actuar como prooxidantes.⁽¹¹⁶⁾ A parte de dichas vitaminas, otras muchas moléculas pequeñas actúan como antioxidantes no enzimáticos, como fenoles, flavonoides y carotenoides.⁽¹¹⁵⁾

Actividad catalasa

La CAT es una hemoproteína tetramérica que consta de cuatro subunidades idénticas, cada una con un grupo prostético de protoporfirina IX. Está ampliamente distribuida en el organismo, aunque su actividad varía dependiendo del tejido; existe una actividad elevada en el hígado y el riñón, una actividad baja en el tejido conectivo y células epiteliales, y una actividad prácticamente nula en el tejido nervioso. La CAT puede catalizar dos tipos de reacciones:



La primera reacción, catalítica, es una óxido-reducción bielectrónica en la que a partir de dos moléculas de peróxido de hidrógeno, se forman una de oxígeno y dos de agua. En la segunda reacción, la catalasa utiliza como sustrato del H_2O_2 y requiere de otra molécula diferente donadora de electrones (representada como AH_2), como el metanol, etanol, ácido fórmico, formol y formaldehído.^(117, 118)

➤ **La actividad catalasa en el contexto del envejecimiento**

Existe controversia en cuanto al comportamiento que sigue la actividad CAT a lo largo de la edad. Tanto *Inal et al.*⁽¹¹⁹⁾ como *Rizvi y Maurya*⁽¹²⁰⁾ analizaron los cambios en los niveles de distintas enzimas que forman parte del sistema de defensa antioxidante a lo largo de la edad; en el caso de la CAT observaron que los niveles en plasma humano aumentan con la edad, aunque no lo hacen de forma lineal, sino que hay un incremento muy pronunciado en edades tempranas hasta los treinta años, y a partir de ese momento se alcanza una meseta hasta los sesenta años, momento en el que los niveles de CAT sufren un discreto incremento.

Por su parte, *Palomero et al.*⁽¹²¹⁾ tampoco encontraron un comportamiento lineal de la actividad catalasa con la edad, en el hígado de ratas Wistar. En concreto, observaron una disminución significativa entre los 2 y 4 meses de edad, seguida de un incremento hasta los 24 meses.

En cuanto al comportamiento de la CAT en ratón, *Hamilton et al.*⁽¹²²⁾ analizaron los niveles de MnSOD, CuZnSOD, CAT y GPx en el hígado, el corazón y el cerebro de ratones hembra C57BL/6, jóvenes (de 6-7 meses) y viejos (de 26-28 meses) y no encontraron diferencias en los niveles de ninguna de las enzimas entre los dos grupos. Por su parte, *Muradian et al.*⁽¹²³⁾ determinaron los niveles de SOD, CAT y GPx en el hígado de ratones de la cepa CBA jóvenes (entre 3-5 meses) y viejos (23-26 meses).

Observaron que la actividad de las tres enzimas era menor en el grupo de ratones viejos; sin embargo, sólo la disminución de la SOD fue estadísticamente significativa. En otro estudio llevado a cabo por *Perichon y Bourre*⁽¹²⁴⁾ en el hígado de ratones hembra de la cepa CSWV a distintas edades, observaron que los niveles hepáticos de CAT no seguían un comportamiento lineal, sino que la actividad aumentó desde el nacimiento hasta los 22 días, tras el destete la actividad sufrió una disminución puntual para sufrir un incremento pronunciado hasta los dos meses y medio; a partir de este momento se mantuvo constante hasta los 10 meses y a partir de esta edad hasta, aproximadamente, los 18 meses la actividad disminuyó de forma significativa. Todos estos estudios ponen de manifiesto que a la hora de estudiar el comportamiento de un fenotipo determinado a lo largo de la edad, es importante realizar un estudio en un rango de edad amplio y estudiando también puntos de edad intermedios, no sólo los extremos, pues el comportamiento en muchos casos no es lineal.

➤ **La actividad catalasa en el contexto patológico**

El aumento de los niveles de radicales libres junto una disminución de los niveles de compuestos del sistema de defensa antioxidante, es un patrón observado en diversas patologías. Así, *Marcus et al.*⁽¹²⁵⁾ observaron que en el cerebro de personas con *enfermedad de Alzheimer* el grado de estrés oxidativo era mayor que en personas sanas y presentaban menores actividades de SOD y CAT; en otras enfermedades neurodegenerativas, como la *enfermedad de Parkinson*, también se observó una disminución en las actividades de algunas enzimas antioxidantes. Así, *Ambani et al.*⁽¹²⁶⁾ comprobaron que el cerebro de individuos con dicha enfermedad presentaba menor actividad de GPx y CAT que el de personas sanas.

En cuanto a su relación con el cáncer, *Ishii et al.*⁽¹²⁷⁾ realizaron un estudio para comprobar si ratones con actividad CAT baja, producían tumores espontáneos en mayor medida que los ratones con actividad normal, y además para determinar si la carcinogénesis podía prevenirse utilizando vitamina E, gracias a su capacidad antioxidante. Para ello, utilizaron ratones de la cepa C3H, acatalasémicos e hipocatalasémicos, los cuales presentaban la décima parte y la mitad de la actividad CAT que presentan los ratones normales, respectivamente. A los quince meses de edad, los ratones acatalasémicos desarrollaron mayor número de tumores de mama espontáneos que lo hipocatalasémicos. Los ratones normales no desarrollaron tumores en este periodo de tiempo. Suplementaron la dieta de dichos animales con vitamina E para comprobar si se podía prevenir el desarrollo de los tumores

espontáneos de mama y observaron que los ratones acatalasémicos que no consumieron vitamina E desarrollaron más tumores de mama espontáneos que los ratones acatalasémicos que sí habían recibido vitamina E en su dieta.

Con respecto a la relación con el cáncer de mama en humanos, *Ray et al.*⁽¹²⁸⁾ compararon la sangre de controles sanos con la de pacientes con cáncer de mama, y observaron que en la de estos últimos los niveles de SOD y GPx eran más elevados; sin embargo, en el caso de la CAT los niveles fueron menores en las muestras de las pacientes con cáncer de mama que en los controles sanos. Estos resultados podrían interpretarse por el hecho de que los radicales hidroxilo inactivan a la CAT, pero no a la SOD ni a la GPx.⁽¹²⁹⁾

En el estudio realizado por *Ahn et al.*⁽¹³⁰⁾ observaron que las mujeres portadoras de un polimorfismo asociado con alta actividad CAT presentaron una reducción de un 17% del riesgo de padecer cáncer de mama.

En cuanto a la relación entre la actividad CAT y la capacidad invasiva del cáncer de mama, *Zheng et al.*⁽¹³¹⁾ desarrollaron un modelo de melanoma metastásico que diseminaba a hueso, en ratón. Para ello inyectaron células de la línea celular de melanoma murino B16, procedentes de la cepa C57BL/6, en ratones de ese mismo fondo genético, y observaron que al administrar CAT dirigida al hueso se inhibió la formación de metástasis. *Nishikawa et al.*⁽¹³²⁾ observaron resultados similares con adenocarcinoma de colon y metástasis hepáticas y pulmonares. Estos resultados sugieren que la aplicación directa de CAT en los órganos donde se produce la metástasis podría ser una opción de tratamiento para inhibir el desarrollo metastásico. *Goh et al.*⁽¹³³⁾ cruzaron ratones transgénicos que sobreexpresan el gen de la CAT humana con transgénicos *MMTV-PyMT* que desarrollan cáncer de mama metastásico y observaron que los ratones con la actividad CAT humana desarrollaron menos tumores de mama y tenían menor capacidad metastásica. Además, la expresión de la CAT incrementó la resistencia al estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno, y se asoció con una disminución en la activación de P38MAPK.

El glutatión

El glutatión es un tripéptido formado por los aminoácidos ácido glutámico, cisteína y glicina. Es un antioxidante celular esencial presente en todos los órganos y tejidos, especialmente en el hígado donde se encuentran las mayores concentraciones y se relaciona con la función que presenta dicho órgano en la detoxificación y eliminación de compuestos xenobióticos.⁽¹³⁴⁾

La concentración total de glutatión es la suma de la fracción de glutatión libre y la unida a proteínas, a su vez, la fracción libre puede estar en forma de glutatión reducido (GSH) u oxidado (GSSG). La forma reducida es la forma activa y abundante; en condiciones fisiológicas la relación GSSG:GSH suele estar entre 1:100 y 1:1000; sin embargo, si los niveles de estrés oxidativo aumentan el GSSG se acumula y la ratio GSSG:GSH también lo hace.

La síntesis de GSH sólo ocurre en el citoplasma y la mayor parte del GSH celular se encuentra repartido entre el citoplasma y la mitocondria; en el caso del GSSG, la mayor parte se encuentra en el retículo endoplasmático. En la mitocondria, el GSH es el encargado de inactivar el peróxido de hidrógeno presente en la matriz mitocondrial, ya que en ésta no se encuentra la catalasa.

La molécula de GSH tiene dos características estructurales que le permiten llevar a cabo sus funciones (**Fig. 8**). Una de ellas es la unión γ -glutamil entre los aminoácidos glutamato y cisteína; gracias a este enlace la estabilidad intracelular del GSH es muy elevada y sólo puede ser degradado fuera de la célula por la enzima γ -glutamiltanspeptidasa. La presencia del grupo sulfhidrilo del residuo de cisteína le hace muy reactivo y ello facilita su participación en numerosas funciones celulares.

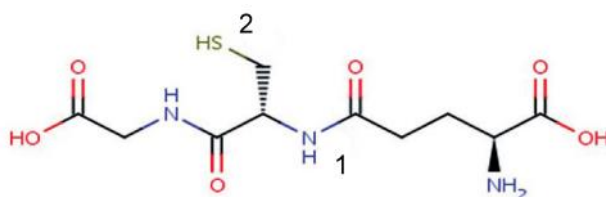


Figura 8. Glutatión. Estructura de la molécula de GSH, se observa el enlace γ -glutamil entre el grupo amino de la cisteína y el γ -carboxilo del glutamato (1); y el grupo sulfhidrilo del residuo de cisteína (2). Imagen modificada del trabajo de Denzoin et al.⁽¹³⁴⁾

Entre las funciones del GSH se encuentran: (i) la destoxificación de xenobióticos y sus metabolitos; se conjuga con dichos compuestos para después excretarse por orina o por heces como derivados mercaptúricos.⁽¹³⁵⁾ (ii) Se encarga del mantenimiento del balance redox intracelular, ya que la concentración de GSH y la relación molar GSH/GSSG contribuyen a mantener el balance redox dentro de la célula. (iii) Desempeña un papel importante como agente antioxidante, ya que la enzima GPx reduce el peróxido de hidrógeno utilizando el GSH como dador de electrones y se forma GSSG. La reacción ocurre tanto en el citosol como en la mitocondria. El GSSG es reducido para formar nuevamente GSH por acción de la enzima GR usando NADPH. En condiciones de estrés oxidativo elevado la célula no

puede reducir todo el GSSG a GSH, por lo que el GSSG se acumula; para evitar un cambio en el equilibrio redox celular, se transporta el GSSG activamente al exterior de la célula o reacciona con los grupos sulfhidrilo de las proteínas formando disulfuros mixtos.⁽¹³⁶⁾ (iv) El glutatión también sirve de almacén del aminoácido cisteína. (v) Además, está implicado en la regulación del crecimiento, ya que el GSH modula la síntesis del DNA manteniendo reducida la tioredoxina que es necesaria para la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa.⁽¹³⁶⁾ (vi) También está implicado en el proceso de muerte celular, pues se ha observado que una disminución de los niveles de GSH, especialmente a nivel mitocondrial, implican una disfunción mitocondrial que puede desembocar finalmente en la activación de caspasas y progresión de los mecanismos de muerte celular.⁽¹³⁴⁾

➤ **El glutatión en el contexto del envejecimiento**

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la concentración de glutatión total plasmático en humanos disminuye con la edad.⁽¹³⁷⁻¹³⁹⁾ Dicha reducción se ha observado en plasma y diversos tejidos; el cerebro es uno de los tejidos donde la disminución es más pronunciada.⁽¹⁴⁰⁾ Esta tendencia no sólo se ha observado en humanos; *Sohal et al.*⁽¹⁴¹⁾ analizaron los niveles de glutatión total en el hígado, el corazón y el cerebro de ratón, rata, conejillo de Indias, conejo, cerdo y vaca, y confirmaron que los niveles de glutatión descienden con la edad. Por su parte, *Palomero et al.*⁽¹²¹⁾ observaron también un descenso en los niveles de glutatión total en el hígado de ratas Wistar de 24 meses, al comparar sus niveles con los que presentaron las ratas de 4 meses. No obstante, en los primeros meses de vida, encontraron el efecto contrario, observando un incremento en los niveles, desde el primer mes de vida hasta el cuarto.

➤ **El glutatión en el contexto patológico**

La disminución de los niveles de glutatión conlleva un aumento del estrés oxidativo que, a su vez, implica un incremento en los niveles de daño celular relacionados con el inicio y progresión de numerosas patologías. Así, se ha observado que las personas portadoras de mutaciones en las enzimas implicadas en el metabolismo del GSH, pueden desarrollar diversas patologías, como afecciones coronarias, desórdenes neurológicos o cáncer.⁽¹⁴²⁾ Existe una fuerte asociación entre los niveles bajos de glutatión y enfermedades neurodegenerativas, lo que se atribuye a

que el cerebro es particularmente sensible a la falta del GSH, pues los niveles de GSH en este órgano son más bajos que en el resto de tejidos. Una de las hipótesis que se barajan para explicar la susceptibilidad del sistema nervioso central a los cambios en los niveles de GSH, sería la de un posible papel del GSH como neuromodulador o neurotransmisor. *Sian et al.*⁽¹⁴³⁾ analizaron los niveles de GSH en la sustancia negra de pacientes con *enfermedad de Parkinson* y observaron que eran menores que en controles sanos. En cuanto a los niveles de GSH en el cerebro de personas con *enfermedad de Alzheimer*, no hay una tendencia clara y existe controversia entre los resultados obtenidos en distintos estudios.⁽¹⁴²⁾

En lo referente al cáncer, los niveles elevados de GSH se han asociado con una respuesta proliferativa en células normales y tumorales, a través del mantenimiento de la tioredoxina reducida, la cual, como hemos indicado, se necesita para mantener la actividad de la ribonucleótido reductasa. Además, se ha observado una asociación entre los niveles de GSH y la capacidad metastásica; *Carretero et al.*⁽¹⁴⁴⁾ comprobaron que al inocular células de la línea celular de melanoma murino B16 en ratones C57BL/6J se producían metástasis en distintos órganos; el número y tamaño de las metástasis fue mucho mayor si las células inoculadas contenían niveles elevados de GSH. En cuanto al cáncer de mama, *Perry et al.*⁽¹⁴⁵⁾ observaron que los niveles de glutatión total en los tumores primarios de mama, fueron más del doble que los niveles registrados en el tejido normal, aunque encontraron gran heterogeneidad en los niveles en distintas áreas incluso dentro de un mismo tumor. Los niveles de glutatión en los nódulos linfáticos afectados fueron más de cuatro veces superiores a los niveles del tejido normal, lo que sugería que podría ser considerado como marcador de la capacidad de diseminación tumoral. No se observó ninguna correlación entre los niveles de glutatión tumoral y los parámetros clínicos de la enfermedad, como el tamaño tumoral, el estadio tumoral, o los niveles de ER o de progesterona. Por otra parte, *Yeh et al.*⁽¹⁴⁶⁾ analizaron los niveles de GSH, GSSG y su ratio en la sangre y en los tejidos de pacientes con cáncer de mama, y observaron que los niveles fueron significativamente menores en la sangre de las pacientes en comparación con controles sanos. Por el contrario, el nivel de dichas moléculas en el tejido tumoral fue significativamente mayor que el tejido sano adyacente. Propusieron que los niveles elevados de GSH se relacionarían con el incremento de la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis en las células tumorales, y que la disminución de dichas moléculas en la sangre de los pacientes podría ser resultado del incremento de la capacidad detoxificadora y de la defensa frente al estrés oxidativo; además, sugirieron

que los niveles elevados de GSH podrían ser utilizados como biomarcador para la detección del tumor de mama.

3.2.1.3 Biomarcadores para la cuantificación del daño celular

Daño en el DNA producido por estrés oxidativo

o Generación de 8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OHdG)

Cuando el DNA está bajo los efectos del estrés oxidativo producido por radicales libres de oxígeno, por la luz ultravioleta o por agentes genotóxicos, la guanina es fácilmente oxidada a 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua). La presencia de esta guanina oxidada puede causar transversiones, como el paso de G:C a T:A, otras mutaciones y con ello muerte celular. Las células de mamíferos tienen distintos sistemas de reparación, como la reparación por escisión de bases o la reparación por escisión de nucleótidos, las cuales contrarrestan los efectos de la 8-oxoGua. La 8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OHdG) es un nucleósido que se genera por el mecanismo de escisión de nucleótidos a partir de oligómeros dañados que contienen 8-oxoGua o a partir de nucleótidos citoplasmáticos oxidados como el 8-hidroxi-deoxiguanosina trifosfato (8-hidroxi-dGTP).⁽¹⁴⁷⁾

➤ El 8-OHdG en el contexto del envejecimiento

Diversos estudios han puesto de manifiesto que el cambio en los niveles de 8-OHdG con la edad no es homogéneo; así, en el caso del ratón depende del fondo genético; dentro de un mismo individuo el comportamiento de esos niveles es específico de tejido e incluso de la técnica de detección empleada.

Colantoni et al.⁽¹⁴⁸⁾ analizaron el nivel de 8-OHdG en el hígado de ratones hembra de la cepa BALB/c jóvenes (de entre 3 y 5 meses de edad) y viejos (de entre 18 y 24 meses) y observaron que los niveles de 8-OHdG en el hígado de los ratones viejos era el doble que el que presentaban los jóvenes.

Se han observado discrepancias entre los resultados obtenidos en distintos trabajos, incluso cuando la cepa de ratón utilizada, los tejidos y la técnica empleados eran los mismos; así, *Fraga et al.*⁽¹⁴⁹⁾ comprobaron que el daño oxidativo en el DNA es un proceso ubicuo que ocurre bajo situaciones fisiológicas en todos los tejidos. Cuantificaron el nivel de daño al DNA en diversos tejidos de ratas Fischer macho de distintas edades (entre 1 mes y 24 meses de edad) y comprobaron que en el hígado, riñón e intestino los niveles de 8-OHdG eran significativamente más elevados en las ratas de dos años en comparación con las ratas de 1 mes; sin embargo, no se

detectaron diferencias en el cerebro o testículos de dichos animales. En el caso de *Kaneko et al.*⁽¹⁵⁰⁾ cuantificaron también los niveles de 8-OHdG en ratas Fischer macho en edades comprendidas entre los 2 y 30 meses, y observaron que en el corazón, hígado y riñón los niveles eran estables entre los 2 y 24 meses, y a partir de ese momento, los niveles se incrementaron progresivamente hasta los 30 meses, momento en el cual la concentración de 8-OHdG fue el doble que la presente entre los 2 y 24 meses. En estos dos trabajos también se pone de manifiesto la importancia del rango de edad analizado, pues los cambios que sufren los distintos parámetros con la edad no siempre siguen un comportamiento lineal.

➤ **El 8-OHdG en el contexto patológico**

En el DNA nuclear y mitocondrial, uno de los productos resultantes del estrés oxidativo es el 8-OHdG y, por ello, ha sido utilizado en muchos estudios como biomarcador para la determinación del grado de daño oxidativo endógeno y como factor de riesgo de diversas patologías incluidas la diabetes,⁽¹⁵¹⁾ la aterosclerosis⁽¹⁵²⁾ y diversos tipos de cáncer, como el colorrectal,⁽¹⁵³⁾ de próstata y vejiga,⁽¹⁵⁴⁾ de pulmón⁽¹⁵⁵⁾ y de mama.⁽¹⁵⁶⁾

Sin embargo, cada vez hay más estudios que demuestran que la generación de esta molécula puede ser uno de los mecanismos que utilizan las células en respuesta a la inflamación inducida por el estrés oxidativo. *Ock et al.*⁽¹⁴⁷⁾ observaron que el 8-OHdG ejerce su acción antiinflamatoria a través de la inhibición de la actividad de RAC1, disminuyendo así la generación de radicales libres de oxígeno y bloqueando la vía de NF-κB. Además, RAC1 se une a STAT3 controlando su actividad, por lo que la cantidad de STAT3 fosforilado en relación con la cantidad de STAT3 total disminuye cuando aumentan los niveles de 8-OHdG.

En cuanto a su relación con el cáncer de mama, *Matsui et al.*⁽¹⁵⁷⁾ observaron que los niveles de 8-OHdG en las células de este tumor eran significativamente mayores que los niveles en las células no tumorales, y que había una correlación negativa entre el estadio clínico y el nivel medio de 8-OHdG en el DNA del tejido tumoral. Investigaron también si algunos polimorfismos en genes que codifican enzimas implicadas en la generación y eliminación de radicales libres de oxígeno presentaban asociación con los niveles de 8-OHdG en el tejido tumoral mamario. Así, observaron que las pacientes portadoras de un genotipo que confería una elevada actividad de la glutatión s-transferasa p1 presentaban niveles menores de 8-OHdG en el DNA del tejido tumoral de la mama que en otros tejidos. Por el contrario, los niveles

de 8-OHdG en el DNA del tejido tumoral mamario fueron más elevados entre las pacientes con un genotipo que incrementaba la actividad de la catecol-o-metiltransferasa.

Kuo et al.⁽¹⁵⁸⁾ midieron los niveles de 8-OHdG en la orina de pacientes con cáncer de mama en distintos estadios de la enfermedad para poder así relacionar los niveles de 8-OHdG con la progresión del mismo. Observaron que los niveles de 8-OHdG fueron significativamente mayores en los pacientes con cáncer de mama que en mujeres sanas de la misma edad.

o Acortamiento telomérico

Los telómeros son estructuras especializadas situadas en los extremos de los cromosomas, cuya principal función consiste en proteger al DNA localizado en los extremos cromosómicos de la degradación por nucleasas tras cada división celular. Los telómeros están implicados en los procesos de senescencia e inmortalización celular.⁽¹⁵⁹⁾ Protegen a los cromosomas de la degradación y de mecanismos de reparación del DNA.⁽¹⁶⁰⁾

Su caracterización molecular no tuvo lugar hasta que fueron secuenciados por primera vez en *Tetrahymena thermophila* por Gally y Blackburn. Se descubrió entonces que los telómeros consisten en un conjunto de repeticiones ricas en guaninas. Además, se observó que los telómeros están altamente conservados en los organismos eucariotas, a excepción de algunos tipos de *Drosophila melanogaster*.⁽¹⁶¹⁾ En los vertebrados, los telómeros están compuestos por un conjunto de repeticiones de la secuencia TTAGGG y en su extremo 3' presentan una estructura de cadena de DNA sencilla protuberante (denominada *G-strand overhang*).⁽¹⁶⁰⁾

Hayflick observó que la capacidad replicativa *in vitro* de fibroblastos normales humanos no era infinita. Las células se replicaban hasta alcanzar un estado de senescencia o en algunos casos de muerte celular; este punto se denominó *límite de Hayflick*. Olovnikov hipotetizó que el *límite de Hayflick* era resultado de la pérdida gradual de secuencias repetitivas de DNA en el extremo de los cromosomas, ya que la DNA polimerasa convencional necesitaba un cebador para poder iniciar la síntesis del DNA. Este problema se conoce como *problema de replicación terminal*.⁽¹⁵⁹⁾

Sin embargo, se observó que algunas células presentaban la capacidad de alargar sus telómeros, lo que implica la existencia de mecanismos de elongación telomérica. Fue Elisabeth Blackburn quien descubrió la existencia de una enzima, la

telomerasa, que cumplía esta función y sintetizaba repeticiones teloméricas *de novo*.⁽¹⁶²⁾ La telomerasa es una ribonucleoproteína que actúa como transcriptasa inversa, contiene una hebra de RNA con la secuencia apropiada para actuar como molde para la síntesis de la secuencia telomérica de DNA, que se le añade a los extremos 3' de cada cadena molde parental. Estos extremos añadidos en 3' actúan como molde para que se sintetice primero un RNA cebador y luego un fragmento de DNA en cada hebra hija, alargando así el telómero en una unidad de repetición.⁽¹⁶³⁾ Las células germinales humanas presentan actividad telomerasa; sin embargo, las células somáticas no presentan dicha actividad y ésta es la razón por la que los telómeros se acortan en cada división celular. En cuanto a las células tumorales, se ha observado que las células del 90% de los tumores presentan actividad telomerasa, lo que permite mantener una longitud telomérica tumoral estable, aunque los telómeros son más cortos que los de las células no tumorales.

El DNA telomérico de los mamíferos se encuentra asociado a un complejo de seis proteínas, denominadas *shelterinas*, cuya principal función es proteger a los telómeros de la actividad de degradación que se desencadena como respuesta ante las roturas de cadena en el DNA bicatenario; además, las *shelterinas* participan en el reclutamiento de la telomerasa.

La longitud telomérica varía de manera considerable entre distintas especies, entre distintos tejidos, entre células e incluso entre los cromosomas de una misma célula. En levaduras la longitud se mantiene en 300 ± 75 bp;⁽¹⁶⁴⁾ sin embargo, en los mamíferos, la longitud es variable. Así, los telómeros de los ratones son muy largos en comparación con los de otras especies, su longitud oscila entre 20 y 150 Kb, y es específica de cada cepa de ratón.⁽¹⁶⁵⁾ Las células somáticas humanas presentan telómeros de una longitud entre 5 y 15 kb.⁽¹⁶⁶⁾ La longitud telomérica está sincronizada entre diferentes tejidos fetales⁽¹⁶⁷⁾ y en los tejidos de los recién nacidos,⁽¹⁶⁸⁾ y a partir de ese momento, la longitud telomérica en diferentes tejidos puede variar.⁽¹⁶⁹⁾ Las diferencias en la longitud telomérica en distintos tejidos, así como las observadas entre individuos, están influenciadas por varios factores: (i) el primer factor es el componente genético. Hay varias pruebas de este control, por ejemplo, la *disqueratosis congénita* es un síndrome hereditario asociado a mutaciones en un gen recesivo ligado al Cr. X, el *DKC1*, o en dos genes autosómicos dominantes, *TERC* y *TERT*. Las mutaciones en estos genes se asocian con fallos en el mantenimiento de la longitud telomérica. Los individuos afectados por dicho síndrome

presentan telómeros muy cortos.⁽¹⁷⁰⁾ Además, estudios realizados en gemelos demostraron que existe un control genético responsable de las diferencias en la longitud telomérica entre individuos por diferentes causas de tipo genético, desde distintas variantes alélicas en genes asociados a la actividad telomerasa, hasta diferencias genéticas asociadas con la variabilidad en la respuesta al daño producido por distintos agentes. Otra prueba de la regulación genética de la longitud telomérica la encontramos en las personas con *síndrome de Down*, quienes presentan un acortamiento telomérico mayor que las personas que no presentan la trisomía del Cr. 21, lo que indicaría la presencia en dicho cromosoma de genes asociados con el control de la longitud telomérica.⁽¹⁷¹⁾ (ii) Otro de los factores que influyen en la longitud telomérica es el sexo. Aunque en recién nacidos no se observan diferencias asociadas al sexo, sí se observan en edades avanzadas, momento en el que las mujeres presentan telómeros más largos que los hombres de su misma edad. Esta diferencia podría estar asociada con la mayor esperanza de vida observada en mujeres con respecto a la de los hombres. (iii) El tercer factor que influye sobre la longitud telomérica es el componente ambiental, en el que se englobarían factores relacionados con el estilo de vida que afectan a la longitud telomérica, como serían la actividad física o el dormir suficientes horas; mientras que la obesidad, fumar o el sedentarismo favorecerían un acortamiento telomérico.⁽¹⁷²⁾

➤ Longitud telomérica en el contexto del envejecimiento

Las células madre embrionarias de ratón presentan telómeros largos, que se van acortando durante la embriogénesis; el acortamiento sigue durante la vida adulta del ratón y con cada división celular; una vez que se alcanza una longitud telomérica crítica, la célula entra en fase de senescencia replicativa. La tasa de acortamiento telomérico no es constante, sino que existe un comportamiento bimodal, con una velocidad de acortamiento mayor en los primeros años de vida y un acortamiento más lento y gradual en edades más avanzadas.⁽¹⁵⁹⁾

Para algunos autores, la longitud telomérica y la actividad telomerasa se consideran como biomarcadores del envejecimiento y factores limitantes de la longevidad, pues el acortamiento telomérico produce defectos en la capacidad regenerativa de los tejidos. Así, en ratones sin actividad telomerasa se observaron patologías relacionadas con el envejecimiento prematuro; además, ratones con ausencia de algunas de las proteínas que forman el complejo de las *shelterinas*, como TRF1 y TPP1, desarrollaron patologías degenerativas.⁽¹⁷³⁾

➤ **Longitud telomérica en el contexto patológico**

Existe una asociación entre el acortamiento telomérico y diversas patologías.⁽¹⁷⁴⁾ Así, Hastie *et al.*⁽¹⁷⁵⁾ observaron que los telómeros de tejido de carcinomas colorrectales humanos son más cortos que los del tejido sano periférico. Se ha observado asociación entre el acortamiento telomérico acelerado y algunas progerias, como los *síndromes de Werner, de Bloom y de Hutchinson-Gilford*; también con el aumento del riesgo a desarrollar algunos tipos de cáncer,^(176, 177) aterosclerosis,⁽¹⁷⁸⁾ diabetes mellitus⁽¹⁷⁹⁾ y *enfermedad de Alzheimer*.⁽¹⁸⁰⁾

En cuanto a la relación entre la longitud telomérica y el cáncer de mama, los resultados obtenidos por diversos autores son contradictorios. Pooley *et al.*⁽¹⁸¹⁾ observaron que los linfocitos de las mujeres portadoras de mutaciones en *BRCA*, presentaron mayor longitud telomérica que los de los familiares que no portaban las mutaciones. Este comportamiento fue más evidente en las portadoras de mutaciones en *BRCA2*; sin embargo, no se encontró asociación entre la longitud telomérica y el riesgo de desarrollar cáncer de mama, por lo que, en base a este estudio, la longitud telomérica no se podría considerar un buen biomarcador para este tipo de cáncer. En otro trabajo publicado por Martínez-Delgado *et al.*⁽¹⁸²⁾ se observó que la longitud telomérica en leucocitos de sangre periférica de mujeres portadoras de mutaciones en los genes *BRCA1/2* presentaban telómeros más cortos que en los controles sanos; pero, sin embargo, no se observó este comportamiento en un grupo de pacientes con cáncer de mama esporádico y cuya longitud telomérica fue similar a la de los controles. Además, se observó que la longitud telomérica de las mujeres portadoras de las mutaciones en *BRCA1/2* era menor que la de las hermanas de la misma familia que no habían heredado la mutación, presentando éstas últimas longitudes teloméricas similares a la de los controles; los autores concluyeron que los telómeros cortos de las mujeres portadoras de la mutación, no eran consecuencia de una predisposición asociada a otros componentes de su fondo genético, ni de los factores ambientales, pues ambos factores eran compartidos por las hermanas sanas, por lo que debían ser consecuencia de la mutación en los genes *BRCA1/2*.

Por su parte, Heaphy *et al.*⁽¹⁸³⁾ observaron que los tumores de mama de tipo luminal B, HER-2 positivos y triple negativos, que son los subtipos más agresivos, presentan telómeros más cortos que los luminales A, que son menos agresivos.

Daño molecular producido por el estrés oxidativo a nivel lipídico

Los niveles elevados de radicales libres pueden causar daño directo sobre los lípidos. Los dos radicales libres que principalmente afectan a los lípidos son el hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) y el hidropéroxilo ($\text{HOO}\cdot$). La peroxidación lipídica es el proceso por el que especies oxidativas, como los radicales libres, atacan a los lípidos que contienen dobles enlaces entre sus carbonos, especialmente ácidos grasos poliinsaturados, lo que implica la eliminación de un hidrógeno de uno de los carbonos y la inserción de una molécula de oxígeno, formando radicales lipídicos peróxilos e hidroperóxidos. La peroxidación lipídica consta de tres pasos, iniciación, propagación y terminación (**Fig. 9**). En el paso de iniciación, los agentes prooxidantes, como los radicales hidroxilo, sustraen el hidrógeno alílico formando el radical lipídico ($\text{L}\cdot$). El radical tiende a estabilizarse mediante un reordenamiento molecular formando un dieno conjugado (paso 1, **Fig. 9**). En la fase de propagación, el radical lipídico rápidamente reacciona con oxígeno para formar un radical peróxilo ($\text{LOO}\cdot$) (paso 2, **Fig. 9**), el cual sustrae un átomo de hidrógeno de otro lípido para formar un hidroperóxido lipídico (LOOH) y un nuevo radical lipídico, que inicia de nuevo la secuencia de propagación (paso 3, **Fig. 9**). En la fase de terminación, antioxidantes como la vitamina E, donan un átomo de hidrógeno a las especies $\text{LOO}\cdot$, dando lugar a productos no radicales muy estables (paso 4, **Fig. 9**).⁽¹⁸⁴⁾

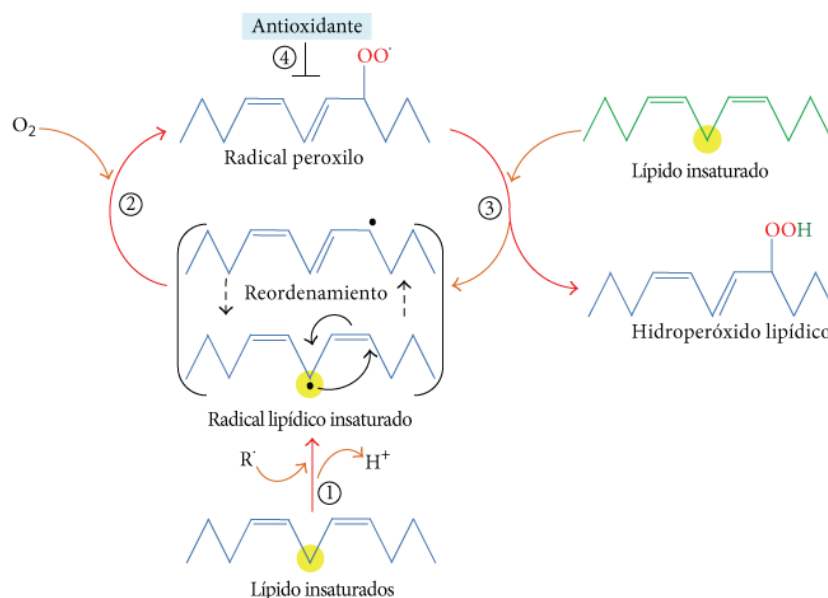


Figura 9. Esquema del proceso de peroxidación lipídica. Imagen modificada del trabajo de Ayala et al.⁽¹⁸⁴⁾

El principal producto primario de la peroxidación lipídica son los hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Entre todos los posibles aldehídos que se pueden formar como

productos secundarios durante la peroxidación lipídica, los más estudiados han sido el malondialdehído (MDA), el propanal, hexanal y 4-hidroxi-nonenal (4-HNE). En este trabajo nos hemos centrado en la cuantificación del 4-HNE.

Éste es el principal producto generado por la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados omega-6, como el ácido araquidónico, el ácido linoleico y el γ -linolénico a través de procesos que pueden ser *enzimáticos*, en los que participan enzimas como la lipooxigenasa, hidroperóxido liasa, oxigenasa y peroxigenasas, y *no enzimáticos*, a través de procesos autocatalíticos iniciados por el ataque de los radicales libres sobre los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana.⁽¹⁸⁵⁾

El 4-HNE es un compuesto muy reactivo que contiene tres grupos funcionales: (i) un doble enlace entre dos carbonos donde se pueden producir *reacciones de Michael*, que consisten en la adición de un compuesto carbonílico; (ii) además posee un grupo carbonilo que puede ser utilizado para la formación de una *base de Schiff*, o para llevar a cabo reacciones de oxidación o reducción; (iii) presenta también un grupo hidroxilo que puede ser oxidado a cetona.⁽¹⁸⁴⁾

Una vez formado, dependiendo de los niveles de 4-HNE, del tipo celular y del metabolismo de dicha célula, el 4-HNE puede promover la supervivencia o la muerte celular. Así, en el caso de que los niveles de 4-HNE se encuentren dentro del rango fisiológico, pueden ser metabolizados. Cuando los niveles de 4-HNE son bajos, pero están por encima de lo que se consideran niveles fisiológicos y, por tanto, la concentración basal de enzimas antioxidantes no es suficiente para neutralizarlo, juega un papel como molécula de señalización, estimulando la expresión de genes que aumentan la capacidad antioxidante celular y ejercen una respuesta adaptativa, por lo que la célula sobrevive. Así, se ha comprobado que NRF2, un regulador del estrés oxidativo, se activa en respuesta a la presencia de 4-HNE y es traslocado hasta el núcleo, donde media en la transcripción de genes antioxidantes al unirse al elemento de respuesta antioxidante (ARE) de genes que protegen del estrés oxidativo. La vía NRF2-ARE está implicada en distintas enfermedades como enfermedades neurodegenerativas,⁽¹⁸⁶⁾ el cáncer,⁽¹⁸⁷⁾ y la diabetes.⁽¹⁸⁸⁾ Los principales genes regulados por la vía NRF2-ARE inducida por 4-HNE, codifican las siguientes proteínas: (i) la hemo-oxigenasa 1 (HO-1), una proteína antioxidante que cataliza la degradación del grupo hemo a biliverdina, que es transformada posteriormente a bilirrubina; tanto la biliverdina como la bilirrubina tienen propiedades antioxidantes; (ii) tioredoxina, una proteína antioxidante y tioredoxina-reductasa, la cual reduce a la tioredoxina en presencia de NADPH; (iii) glutamato-cistein-ligasa, que participa en la síntesis del glutatión reducido (GSH).⁽¹⁸⁴⁾ Además, dependiendo del tipo celular, el 4-HNE puede

activar o inhibir la vía de NF- κ B; puede activar la expresión de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), que actúan como reguladores transcripcionales del metabolismo lipídico y del sistema de defensa antioxidante;⁽¹⁸⁹⁾ puede activar la vía de PI3K/AKT a través de la modificación e inhibición de PTEN; y podría participar en la producción de metaloproteinasas.⁽¹⁸⁴⁾

Cuando los niveles de 4-HNE celulares son medios, se produce daño a nivel proteico y se induce el proceso de autofagia, senescencia o parada del ciclo celular. La autofagia es uno de los principales procesos para mantener la señalización metabólica y redox a través de la degradación de proteínas dañadas. Se han descrito varios mecanismos a través de los cuales 4-HNE induciría autofagia; por ejemplo, tras promover la formación de aductos proteicos que se acumulan en el retículo endoplasmático y activando la vía PKR-like ER-quinasa (PERK) y JNK.

En cuanto a la senescencia o parada del ciclo celular en fase G₀, el 4-HNE puede inducir senescencia prematura a través de la supresión directa de la actividad telomerasa, pues afectaría la expresión de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana, *hTERT*. Además, el 4-HNE induce la senescencia celular al activar P53.⁽¹⁸⁴⁾ En cuanto al efecto que ejerce sobre el ciclo celular y la proliferación, el 4-HNE puede modular la expresión de componentes del ciclo celular y parar a las células en la fase G₁ o G₂. Diversos estudios muestran que, en general, el 4-HNE induce parada del ciclo celular en células tumorales. Por ejemplo, en la línea celular de cáncer de mama MCF7, el incremento de los niveles de 4-HNE, al tratar las células con ácido linoleico conjugado, inhibió la proliferación celular a través de un mecanismo dependiente de P53.⁽¹⁹⁰⁾ En contraposición, el efecto del 4-HNE sobre las células normales, es el de promover la proliferación celular, principalmente a través del factor de transcripción E2F.⁽¹⁸⁴⁾

Por último, si los niveles celulares de 4-HNE son elevados, promueven la formación de aductos proteicos y la apoptosis e incluso la necrosis celular (con niveles muy elevados). A la hora de formar los aductos proteicos, la preferencia por la modificación de aminoácidos por parte del 4-HNE es Cys > His > Lys. La reacción entre aminos primarias y el grupo carbonilo del 4-HNE lleva a la formación de una *base de Schiff* y a la adición de un grupo tiol o amino en el carbono que presenta doble enlace de la molécula de 4-HNE, produciendo los aductos proteicos que sirven como marcadores del daño celular producido por oxidación endógena.

➤ **El 4-HNE en el contexto del envejecimiento**

Existe controversia en cuanto a las variaciones en los niveles de 4-HNE con la edad; así, en algunos estudios se han observado aumentos en sus niveles con la edad, mientras que en otros no se han observado diferencias significativas. Además, el comportamiento es muy heterogéneo incluso dentro de un mismo individuo, encontrándose diferencias en el patrón de cambio en los niveles de 4-HNE en diferentes tejidos o incluso en distintos compartimentos de un mismo tejido. Así, *Sakul et al.*⁽¹⁹¹⁾ al comparar los niveles de 4-HNE en ratas viejas y jóvenes, observaron que los niveles fueron significativamente más elevados en cerebro, en riñón y en el ventrículo de las ratas viejas, pero dichas diferencias no se encontraron en el hígado. Por su parte, *Judge et al.*⁽¹⁹²⁾ describieron que, en el citosol de tejido miocárdico de rata y en las mitocondrias subsarcolemales, los niveles de 4-HNE no cambiaron con la edad; por el contrario, en las mitocondrias interfibrilares observaron un aumento significativo asociado a la edad.

➤ **El 4-HNE en el contexto patológico**

El daño producido por la peroxidación lipídica se ha relacionado con numerosas patologías vasculares, como la aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, diabetes y enfermedades relacionadas con el embarazo como la preeclampsia y la diabetes gestacional.⁽¹⁹³⁾ En cuanto a su relación con el cáncer, algunos estudios muestran menores niveles de 4-HNE en el tejido tumoral en comparación con el tejido sano, como es el caso del carcinoma hepatocelular⁽¹⁹⁴⁾ y el cáncer de riñón.⁽¹⁹⁵⁾ Los niveles bajos de 4-HNE se han relacionado con una disminución en los niveles de TGF- β , lo que fomentaría la progresión tumoral en fases tempranas.⁽¹⁹⁶⁾ En contraposición, otros estudios han puesto de manifiesto que existen niveles altos de 4-HNE en tejido tumoral, como en el caso del cáncer colorrectal⁽¹⁹⁷⁾ y de tiroides.⁽¹⁹⁸⁾ En el caso del cáncer de mama, *Jin et al.*⁽¹⁹⁹⁾ describieron que los niveles de los aductos de 4-HNE fueron significativamente más bajos en el suero de mujeres con cáncer de mama invasivo que en el de los controles. Por su parte, *Karihtala et al.*⁽²⁰⁰⁾ observaron que los niveles de 4-HNE fueron más elevados en carcinomas de mama invasivos tras compararlos con lesiones no invasivas.

Daño molecular producido por el estrés oxidativo a nivel proteico

En presencia de radicales libres de oxígeno, las proteínas sufren distintas modificaciones estructurales que, en general, suponen la pérdida total o parcial de su función. El producto de la oxidación proteica más ampliamente estudiado es la formación de grupos carbonilo debido a su estabilidad, ya que es un proceso irreversible y de fácil detección. Su cuantificación es un buen reflejo del nivel de daño oxidativo celular.⁽²⁰¹⁾

Se pueden generar grupos carbonilo por diversos mecanismos: (i) por un lado, se pueden formar en las cadenas laterales de los aminoácidos, especialmente en los residuos de prolina, arginina, lisina y treonina, que son oxidados a derivados aldehídos o cetonas. Estas modificaciones se suelen producir como consecuencia del ataque del radical hidroxilo, el cual puede ser originado por radiación ionizante o por la *reacción de Fenton*, es decir, la reacción de cationes metálicos con el peróxido de hidrógeno. La mayoría de los grupos carbonilo formados mediante la oxidación catalizada por cationes metálicos son el semialdehído glutámico, derivado de la arginina y el semialdehído aminoadípico, derivado de la lisina. (ii) se pueden formar también por proteólisis de las proteínas tras el ataque de radicales hidroxilo, vía alfa-amidación; (iii) por la reacción con productos generados durante la peroxidación lipídica como el 4-HNE o el MDA, reacción denominada *adición de Michael*, mediante la cual se agregan grupos aldehídos reactivos a las cadenas laterales de los residuos de cisteína, histidina o lisina; (iv) finalmente, también se pueden generar por reacciones del grupo amino de los residuos de lisina con azúcares reducidos.⁽²⁰¹⁾

Existen diferentes motivos por los que se produce la carbonilación proteica: (i) una disminución del sistema de defensa antioxidante, (ii) el aumento de la producción de radicales libres, (iii) disminución de la capacidad para eliminar proteínas oxidadas, que se acentúa con la edad, pues se ha observado que la funcionalidad del proteosoma disminuye con la edad en numerosos tejidos humanos, lo que se traduce en la acumulación de proteínas dañadas, y (iv) un aumento de la producción de sustratos proteicos susceptibles de ser atacados. Esta cuarta vía de generación de grupos carbonilo es independiente de los tres mecanismos anteriores, es menos específica y está fuertemente asociada con la producción de isoformas proteicas aberrantes. Es decir, la rápida formación de grupos carbonilo en proteínas aberrantes no requiere de la generación de radicales libres de oxígeno y, además, hace que dichas proteínas sean más sensibles a la degradación proteolítica, lo que pone de manifiesto el importante papel que ejerce la carbonilación sobre la calidad y metabolismo proteicos. Sin embargo, mientras que unos niveles intermedios de

carbonilación ejercen un papel positivo para la célula, ya que marca a las proteínas para su proteólisis, si las proteínas presentan niveles de oxidación muy elevados, forman agregados que pueden incluso inhibir la actividad del proteasoma. De hecho, se ha sugerido que la disminución de la actividad del proteasoma que se observa con la edad estaría relacionada con la acumulación gradual de estos agregados formados por proteínas oxidadas, que son resistentes a la proteólisis.⁽²⁰²⁾

➤ **Los grupos carbonilo en el contexto del envejecimiento**

Un gran número de estudios muestran que los niveles de proteínas carboniladas se incrementan con la edad. Incluso en algunos casos, los niveles de proteínas carboniladas se asocian con la edad fisiológica y con la esperanza de vida más que con la edad cronológica.⁽²⁰³⁾ Los niveles de grupos carbonilo aumentarían con la edad alcanzando una tasa en la que una de cada tres proteínas portarían esta modificación; de hecho, el contenido en grupos carbonilo aumentaría de manera muy acelerada en el último tercio de la vida de un animal, esto es, cuando finaliza el periodo reproductivo, con la interpretación teleológica de que así la descendencia no se vería afectada.⁽²⁰⁴⁾

Oliver et al.⁽²⁰⁵⁾ examinaron los niveles de proteínas carboniladas en fibroblastos de personas sanas entre nueve y ochenta años de edad, y en fibroblastos de pacientes con progeria y *Síndrome de Werner*, y observaron que en los individuos sanos los niveles de proteínas carboniladas se mantenían hasta los sesenta años, pero a partir de esa edad los niveles eran dos veces más elevados. En cuanto a los individuos con progeria y *Síndrome de Werner*, los niveles de proteínas carboniladas eran muy superiores a los de los individuos sanos de la misma edad.

Por otro lado, *Zipprich et al.*⁽²⁰⁶⁾ realizaron un estudio en mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama y observaron que en las que habían estado bajo tratamiento de reemplazo hormonal, los niveles de grupos carbonilo disminuían con la edad; sin embargo, cuando excluyeron del estudio a ese grupo de mujeres, los niveles de grupos carbonilo en el plasma se mantuvieron constantes entre los 18 y 59 años de edad, mientras que a partir de los 60 años los niveles de grupos carbonilo en plasma comenzaron a incrementarse. Por su parte, *Chaudhuri et al.*⁽²⁰⁷⁾ observaron niveles mayores de grupos carbonilo en el hígado de ratones C57BL/6 macho con 22-23 meses de edad, en comparación con los ratones jóvenes de 4-6 meses de edad.

➤ **Los grupos carbonilo en el contexto patológico**

Se han detectado niveles elevados de grupos carbonilo en diversas patologías en humanos. Así, el nivel de grupos carbonilo en el plasma de niños con artritis reumatoide juvenil es mayor que en niños sanos. También se han detectado niveles mayores en el plasma de pacientes con sepsis severa, con pancreatitis aguda o con diabetes tipo I,⁽²⁰⁸⁾ en pacientes con linfoma de Hodgkin⁽²⁰⁹⁾ y con cáncer de vejiga.⁽²¹⁰⁾ En cuanto al cáncer de mama, *Rossner et al.*⁽²¹¹⁾ realizaron un estudio de casos y controles, y observaron que las mujeres con niveles más elevados de grupos carbonilo en el plasma presentaban un 60% más de probabilidad de desarrollar cáncer de mama que las mujeres con niveles bajos. Por su parte, *Zipprich et al.*⁽²⁰⁶⁾ realizaron un estudio en mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama y observaron también que los niveles de grupos carbonilo en plasma estaban asociados con un incremento del riesgo de padecer cáncer de mama. La relación entre los niveles de grupos carbonilo y el riesgo a desarrollar cáncer de mama siguió una tendencia sigmoidal, con un incremento del riesgo entre los niveles bajos hasta alcanzar los valores del tercer cuartil, y observándose una disminución del riesgo en las mujeres con los niveles de grupos carbonilo más elevados.

3.3 Genética de los procesos de génesis compleja

La variabilidad fenotípica de los procesos de génesis compleja está influenciada por un componente de herencia poligénica que interacciona con el componente ambiental.⁽²¹²⁾ La proporción de la variabilidad fenotípica debida al componente genético es lo que se conoce como *heredabilidad*. Cuanto mayor es la variabilidad fenotípica explicada por el componente genético, menor es la explicada por el componente ambiental y viceversa.

3.3.1 Técnicas para la identificación de variantes genéticas asociadas con la variabilidad de los fenotipos de génesis compleja

3.3.1.1 Estudios de asociación de genoma completo

Para la identificación de variantes genéticas asociadas a la variabilidad fenotípica de los procesos de génesis compleja, entre otras técnicas, se utilizan los estudios de asociación de genoma completo (*Genome Wide Association Studies*, *GWAS*), en los que se comparan las frecuencias alélicas en miles de sitios polimórficos entre individuos con la enfermedad/rasgo complejo (casos) e individuos

sanos (controles). Se asume que cada variante alélica contribuye a la variabilidad fenotípica del proceso de génesis compleja, pero el efecto independiente de ninguna de ellas sería lo suficientemente fuerte como para inducir el fenotipo por sí sola.

No obstante, los GWAS presentan algunas limitaciones: (i) sólo un número pequeño de variantes génicas se identifica en cada GWAS; (ii) cada *locus* presenta un efecto pequeño sobre la susceptibilidad tumoral; y (iii) hay una falta de reproducibilidad en los resultados obtenidos entre diferentes GWAS.⁽²¹³⁾ Esto se debería, al menos en parte, al hecho de que el nivel de significación en estos estudios es muy estricto, y así variantes génicas con valores de $P < 10^{-8}$, se consideran reales, mientras que variantes con valores de P entre 10^{-5} y 10^{-6} pueden considerarse falsos positivos;^(214, 215) de hecho, la posibilidad de que una variante con valores de $P = 10^{-5}$ muestre una asociación real es menor del 1%.^(216, 217)

Por todo ello, la extrapolación de los resultados obtenidos en los GWAS a otras poblaciones es extremadamente difícil, ya que un SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) identificado como marcador de un gen modificador de un fenotipo en una población determinada, puede carecer de efecto, o incluso presentar un efecto contrario en otra población que presente un fondo genético diferente.

Se ha propuesto el complementar los estudios genéticos realizados en humanos mediante GWAS con el análisis de QTL en ratón, que podrían ser estrategias complementarias para ayudar a comprender las bases genéticas de las enfermedades humanas.⁽²¹⁸⁾

3.3.1.2 El ratón como herramienta complementaria

La utilización de modelos de ratón permite limitar la variabilidad genética y la exposición a factores ambientales mediante cruce de cepas genéticamente homogéneas (*inbred*). Las estrategias *intercross* y *backcross* generadas a partir de dos cepas de ratones *inbred* con fenotipos divergentes, genera una descendencia donde cada animal es genética y fenotípicamente único para distintos rasgos complejos influenciados por QTL.⁽²¹⁸⁾ Para desarrollar estas estrategias, existe un gran número de cepas *inbred* y *outbred*, cepas *inbred* recombinantes, animales congénitos, consómicos y animales modificados genéticamente. El uso posterior de ratones modificados genéticamente portadores de alelos *knock-out* y *knock-in* localizados en los QTL, permite en una situación ideal, comprobar si ese gen está implicado en el fenotipo asociado con dicho QTL.⁽²¹⁹⁾

Además, se han observado similitudes entre los resultados obtenidos en ratón y en humanos. Así, el cáncer de mama en ratón presenta similitudes con la enfermedad humana; por ejemplo, ambas especies acumulan mutaciones que afectan a los mismos genes y a las mismas vías de señalización.⁽²²⁰⁾ De hecho, se ha observado que QTL identificados en ratón son equivalentes a *loci* de susceptibilidad en humanos no sólo en cáncer, sino también en otras patologías.^(221, 222) Estos datos sugieren que los estudios llevados a cabo en ratón pueden complementar a los realizados en humanos, y ayudarnos a obtener información sobre el componente genético asociado con la susceptibilidad y evolución de las patologías de génesis compleja.

3.3.2 Genética del cáncer de mama

Al describir el papel de la herencia sobre la incidencia del cáncer de mama hereditario y esporádico, hicimos hincapié en que el componente genético está influenciado principalmente por el efecto de distintas variantes genéticas de baja penetrancia que interaccionan entre sí y con el ambiente.⁽²²³⁾ Se asume que cada variante alélica contribuye al riesgo total de desarrollar cáncer y a la heterogeneidad de su evolución, pero el efecto independiente de una sola de ellas no sería lo suficientemente elevado como para inducir el desarrollo tumoral o un efecto concreto por sí sola.

3.3.2.1 Identificación de genes de susceptibilidad al cáncer de mama

Los primeros estudios para identificar genes de susceptibilidad al cáncer de mama, se centraron en la detección de genes de alta penetrancia mediante el *análisis de genealogías* en familias en las que varios de sus miembros habían sufrido la enfermedad. Estos estudios de cáncer hereditario o familiar requieren de pocos pacientes y precisan de un menor número de marcadores que los GWAS. Los análisis de genealogías se basan en la transmisión de alelos causantes de la enfermedad entre miembros de una misma familia. Las mutaciones heredadas en los dos genes de susceptibilidad al cáncer de mama más conocidos, *BRCA1* y *BRCA2*, suponen el 20% del cáncer hereditario.⁽²²⁴⁾ Se han identificado algunos genes adicionales,^(225, 226) pero suponen sólo un pequeño porcentaje de los cánceres familiares, y menos del 5% de la susceptibilidad total al cáncer de mama. En un estudio de análisis de ligamiento llevado a cabo con familias españolas que sufrían cáncer de mama hereditario, se

descubrieron tres nuevas regiones de interés, localizadas en las regiones cromosómicas 3q25, 6q24 and 21q22.⁽²²⁶⁾

Para identificar a los genes modificadores o de baja penetrancia, en la mayoría de los trabajos se han utilizado GWAS, y así se han identificado numerosas variantes genéticas asociadas con la susceptibilidad al cáncer de mama. Así, se ha observado que el *locus* 5p12 se asocia con el cáncer de mama ER+,⁽²²⁷⁾ mientras que el *locus* 2q35 se asocia inicialmente también con tumores ER+, pero estudios posteriores mostraron resultados similares con tumores ER-,⁽²²⁸⁾ lo que pone de manifiesto la necesidad de validar los resultados de los GWAS en distintas poblaciones. Las variantes genéticas de baja penetrancia identificadas presentan efectos débiles y aportan sólo un pequeño porcentaje de la heredabilidad del cáncer de mama esporádico, en comparación con las mutaciones presentes en genes de alta penetrancia que afectan al cáncer hereditario, como *BRCA1* y *BRCA2*. Existe un porcentaje significativo de la susceptibilidad al cáncer de mama sin caracterizar, que probablemente sea consecuencia de la suma de las interacciones de los genes de baja penetrancia y del efecto ambiental.

Además, es interesante tener en cuenta que el cáncer es un proceso no autónomo-celular; es decir, el microambiente juega un papel muy importante sobre la evolución tumoral, ya que el crecimiento del tumor, como el de un tejido normal, depende de procesos intrínsecos de las células tumorales, como son la proliferación, la apoptosis o la reparación del DNA, y de procesos que tienen fundamentalmente su acción en otros compartimentos, tanto locales como a distancia; entre ellos se incluirían el estroma, la angiogénesis local, el sistema inmune local y sistémico, el sistema endocrino-metabólico, entre otros.

Estos compartimentos no son independientes, sino que se mantienen en continua interacción, de modo que los procesos intrínsecos o intracelulares del parénquima tumoral son capaces de reclutar a los extrínsecos. Así, las células tumorales en proliferación envían señales al estroma y al sistema inmune local que determinan la activación del estroma, la transformación de fibroblastos en miofibroblastos y, con ello, el incremento de la angiogénesis. Por otra parte, esta actividad extrínseca a la célula tumoral a su vez determina la actividad celular intrínseca, puesto que sin la angiogénesis no se produce la proliferación tumoral. Básicamente, como hemos indicado, esto también sucede en el crecimiento de los tejidos normales, por lo que las conexiones entre las células tumorales y el resto del organismo se sustentan en los mecanismos de respuestas fisiológicas responsables del mantenimiento de la homeostasis tisular.^(229, 230)

Por ello, para que los tumores evolucionen hacia un estado de mayor malignidad, deben modificar su propio microambiente mediante señales enviadas al estroma por las células tumorales, o bien por mutaciones que ocurran directamente en las células estromales.⁽²³¹⁻²³⁴⁾

Así, se ha observado que la inactivación genética de *Pten* en miofibroblastos estromales de las glándulas mamarias de ratón, acelerarían la iniciación, transformación maligna y progresión de los tumores epiteliales mamarios.⁽²³⁴⁾ Una de las vías que controlan los procesos inflamatorios y también el microambiente tumoral, es la vía de señalización de TGF- β ; diversos estudios de asociación de genoma completo han identificado SNPs cercanos a genes de la vía de TGF- β , como los genes *GREM1* y *SMAD7*. Además, se ha observado que la reducción constitutiva de la expresión del receptor tipo-1 de TGF- β es un modificador importante de la susceptibilidad al cáncer colorrectal, lo que sugiere un papel importante en la susceptibilidad a dicho tumor.⁽²³⁵⁾ Otro ejemplo de la regulación de la función estromal por genes modificadores de la susceptibilidad tumoral, es el caso del gen que codifica la proteína fosfolipasa A2, *PLA2S*; es un gen modificador de la función del gen *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), y se ha comprobado que juega un papel importante en la patogénesis del cáncer del tracto digestivo en humanos.⁽²³⁶⁾ Se localiza en el QTL denominado *Mom* (“Modificador de *Min1*”, donde *Min* hace referencia a la *Neoplasia Intestinal Múltiple-1*). Se ha observado que dicha proteína modifica el número de pólipos tras alterar el microambiente celular en las criptas intestinales.⁽²³⁷⁾ Además, este gen está implicado en procesos inflamatorios⁽²³⁸⁾ y en la angiogénesis; por otro lado, se ha descrito que tendría actividad proaterogénica.⁽²³⁹⁾

Por todo ello, es esencial profundizar en el conocimiento del efecto del componente genético sobre la enfermedad para estimar la susceptibilidad genética que presenta cada individuo a desarrollar cáncer, para mejorar la detección y el diagnóstico precoz de la enfermedad, para entender las principales vías bioquímicas y fisiológicas afectadas por el efecto de estos genes de baja penetrancia y, en última instancia, para poder desarrollar tratamientos más eficaces.⁽²¹³⁾

3.3.3 Genética del envejecimiento

El envejecimiento es un proceso multifactorial determinado por la interacción entre factores genéticos y ambientales. La identificación de los factores que regulan el envejecimiento está limitada por la complejidad del proceso y la heterogeneidad que

se observa entre individuos e incluso entre los distintos tejidos de un mismo individuo. El envejecimiento se caracteriza por un declive progresivo de la capacidad física, mental y reproductiva. A nivel celular, uno de los eventos más característicos que ocurre en los tejidos envejecidos es la senescencia celular, que se caracteriza por una acumulación del daño al DNA y por cambios epigenéticos. La acumulación de daño que se produce con la edad dependerá del balance entre nuestro sistema de reparación del daño y de la intensidad de la agresión que produce el daño. Mutaciones en genes que forman parte de los sistemas de defensa frente al daño y en genes que forman parte de vías metabólicas y endocrinas, pueden explicar parte de la heterogeneidad que se observa en el envejecimiento entre distintos individuos. ⁽²⁴⁰⁾

3.3.3.1 Síndromes progeroides

Uno de los ejemplos más claros que pone de manifiesto la conexión entre daño al DNA y el envejecimiento son las progerias, que son desórdenes monogénicos, producidos en su mayoría por mutaciones en genes relacionados con la reparación del DNA y que se asocian con una exacerbación de fenotipos relacionados con el envejecimiento, produciéndose un acortamiento muy acusado en la supervivencia de los individuos afectados por dichas patologías. ⁽²⁴⁰⁾

Entre los síndromes progeroides encontramos el síndrome de Werner, causado por una mutación en el gen *WRN*, el cual codifica una proteína de la familia de helicasas RecQ, implicadas en el sistema de reparación del DNA. Los individuos con esta patología presentan, entre otros fenotipos característicos del envejecimiento, telómeros cortos en sus fibroblastos, junto con deficiencias en los sistemas de reparación del DNA, lo que implica una acumulación de mutaciones que conlleva un aumento de la incidencia de distintos tipos de cáncer. ⁽²⁴¹⁾ Otra de las progerias conocidas, y ya citadas en esta introducción, es el *síndrome de Hutchinson-Gilford*. Esta patología es una laminopatía causada por la sustitución de una base (GGC>GGT) en la posición 1824 del exón 11 del gen *LMNA*, que codifica la lamina A, que forma parte de la lámina nuclear, la cual participa en la estabilidad de la envoltura nuclear. Los individuos con dicha afectación presentan fenotipos de envejecimiento prematuro durante la infancia, por lo que en muchos casos, la esperanza de vida no alcanza la adolescencia. ⁽²⁴²⁾ Otro de los síndromes progeroides es el *síndrome de Bloom*, que se produce por una mutación en el gen *BLM*, que codifica una proteína de la familia de helicasas del ADN. Las personas afectadas por este síndrome presentan inestabilidad cromosómica producida por una frecuencia elevada de roturas y

reordenamientos cromosómicos y mayor predisposición a desarrollar cáncer.⁽²⁴⁰⁾ Por último, los individuos afectados por el *síndrome de Rothmund – Thomson* presentan algunos rasgos como la poiquilodermia, estatura baja, ausencia de pestañas y cejas, envejecimiento prematuro y predisposición al desarrollo de osteosarcomas. Existen dos subtipos del síndrome, el de tipo II, causado por mutaciones en el gen de la helicasa *RECQ4*, y el tipo I que no presenta afectación en dicho gen y parece que presenta heterogeneidad genética.⁽²⁴³⁾

3.3.3.2 Genes asociados con la longevidad

El envejecimiento y la longevidad están muy relacionados, y no es fácil disociar ambos conceptos. Los procesos fisiológicos y las vías moleculares relacionadas con el envejecimiento, en última instancia, tienen un efecto sobre la longevidad. Por ello, en muchos de los trabajos en los que se ha intentado identificar genes relacionados con el envejecimiento, se analiza el efecto que las mutaciones en dichos genes tienen sobre la longevidad.

Así, en estudios llevados a cabo en *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) se han identificado mutaciones en dos tipos de genes que alargan la supervivencia. Los primeros, son genes con actividad en la cadena transportadora de electrones, como el *clk-1* y el gen *isp-1*, cuyas mutaciones reducen la capacidad de fosforilación oxidativa y prolongan la vida.⁽²⁴⁴⁾ Estas mutaciones establecieron el primer vínculo entre el metabolismo y la longevidad. El segundo tipo de genes, está relacionado con la vía insulina/IGF-I (IIS), y entre ellos se encuentran los genes *daf-2* y *age-1* y mutaciones en dichos genes también se relacionan con la extensión de la supervivencia en gusanos, moscas y ratones.⁽²⁴⁵⁾ *Tissenbaum* y *Guarente*⁽²⁴⁶⁾ observaron que mutaciones que aumentaban la actividad de la proteína SIR-2 o disminuían la señalización de la vía IIS, incrementaban la supervivencia en *C. elegans*, a través de la activación de la proteína DAF-16/FOXO.

También en ratón se ha observado una asociación entre la vía IIS y la longevidad. Así, *Bonkowski et al.*⁽²⁴⁷⁾ observaron que los ratones *knockout* para el gen del receptor de la hormona de crecimiento, *Ghr*, presentaban un aumento de la longevidad; en otros estudios llevados a cabo en ratón, se observó que otras mutaciones en la vía IIS, generan un impacto sobre la longevidad.⁽²⁴⁸⁾

3.3.3.3 Identificación de variantes genéticas que afectan al envejecimiento y la longevidad

Se han llevado a cabo numerosos estudios de ligamiento y asociación con individuos longevos para intentar identificar variantes genéticas asociadas con el envejecimiento y la longevidad. Aunque la longevidad está influida no sólo por un componente genético, sino también por un componente ambiental, la influencia del componente genético sobre la misma es evidente; así, *Atzmon et al.*⁽²⁴⁹⁾ observaron que los progenitores de los individuos centenarios tenían 9 veces más probabilidades de alcanzar edades longevas en comparación con individuos controles. Además, los hermanos de las personas centenarias presentaron 18 veces más probabilidad de alcanzar también edades longevas que los individuos control.⁽²⁵⁰⁾ Por lo tanto, utilizando dichas poblaciones de individuos centenarios, se podrían identificar determinantes genéticos asociados con vías relacionadas con el envejecimiento y la longevidad.

Así, *Singh et al.*⁽²⁵¹⁾ describieron la asociación entre tres polimorfismos de tres genes que codifican proteínas HSP70 y que se asociaron con supervivencias largas, *HSPA1A* (-110A>C), *HSPA1B* (1267A>G) y *HSPA1L* (2437T>C). En una cohorte de mujeres nonagenarias danesas observaron que los genotipos *HSPA1A*-AA y *HSPA1B*-AA se asociaron con supervivencias menores.

Teniendo en cuenta la relación existente entre los radicales libres de oxígeno y el envejecimiento, mutaciones en los genes que codifican las proteínas detoxificadoras de los radicales libres, presentan un efecto sobre el envejecimiento y la supervivencia. Así, *Soerensen et al.*⁽²⁵²⁾ realizaron un estudio en nonagenarios daneses y observaron un efecto sinérgico en los individuos portadores de los genotipos CC o CT en el SNP rs4880 de la *MnSOD* y los genotipos TT o CT en el SNP rs1050450 de la *GPX1*, indicando que dicha combinación genética influye en la longevidad humana de forma positiva.

También se han identificado polimorfismos asociados con la vía IIS. *Pawlikowska et al.*⁽²⁵³⁾ identificaron polimorfismos específicos asociados con una disminución en la concentración plasmática de IGF-1, en individuos centenarios. Por su parte, *Wilcox et al.*⁽²⁴⁸⁾ describieron tres SNPs en el gen *FOXO3A*, un homólogo de *daf-16* en *C. elegans*, asociados con la longevidad.

Además, en otros trabajos, los polimorfismos se asociaron también con patologías asociadas a la edad. Tal es el caso de *Rosvall et al.*⁽²⁵⁴⁾ quienes identificaron variaciones genéticas en los genes *APOE* y *PCDH11X* asociadas con la

enfermedad de Alzheimer. En el caso del gen APOE, éste presenta tres alelos principales, ApoE2, ApoE3 y ApoE4. Los individuos portadores del alelo ApoE2 en homocigosis, presentaron mayor supervivencia que los portadores de los alelos ApoE3 y ApoE4, los cuales se asociaron con un mayor riesgo de padecer enfermedades coronarias. Además, el alelo ApoE4 se asoció con el riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer familiar y esporádica a edades tempranas.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo

El cáncer de mama es el segundo tipo de tumor más común a nivel mundial y el más frecuente en mujeres. Entre los factores que modifican el riesgo de desarrollar cáncer de mama, el factor epidemiológico más importante es la edad. Por un lado, la incidencia del cáncer de mama aumenta con la edad, pero además, las mujeres que desarrollan cáncer de mama a edades tempranas presentan peor pronóstico que las mujeres que desarrollan la enfermedad a edades más avanzadas. Ambos, cáncer y envejecimiento, son procesos de génesis compleja, en cuya patogénesis participan una serie de fenotipos intermedios o endofenotipos localizados a distintos niveles como el intracelular, el tejido local y a nivel sistémico. Algunos de estos fenotipos intermedios son comunes a la patogénesis de ambos, cáncer y envejecimiento, como son los implicados en el estrés oxidativo.

Por ello, nuestra **hipótesis de trabajo** fue que la variabilidad fenotípica que presenta el cáncer de mama con la edad se podría explicar, al menos en parte: (i) por el distinto comportamiento con la edad de las vías de señalización intratumorales debajo del receptor ERBB2 y (ii) por la relación patogénica que existe entre el cáncer de mama y el envejecimiento, sobre todo a través de fenotipos intermedios de estrés oxidativo.

Objetivo global

El objetivo global de este proyecto fue identificar marcadores o determinantes moleculares y genéticos asociados al distinto comportamiento del cáncer de mama en susceptibilidad y evolución en función de la edad.

Objetivos específicos

Para lograr el objetivo global, se plantearon los siguientes objetivos específicos, recogidos en la **Figura 10**:

Objetivo 1: Identificar la heterogeneidad fenotípica en susceptibilidad y evolución del cáncer de mama ERBB2-positivo en función de la edad cronológica en una población de ratones de variabilidad genética controlada.

Objetivo 2: Analizar si la variabilidad con la edad en los niveles de algunas de las vías de señalización intratumorales activadas por el receptor ERBB2, se asocia con la heterogeneidad fenotípica en susceptibilidad y evolución del cáncer de mama.

Objetivo 3: Evaluar si fenotipos intermedios relacionados con el estrés oxidativo, se asocian a la heterogeneidad fenotípica en susceptibilidad y evolución del cáncer de mama ERBB2-positivo.

Objetivo 4: Identificar las regiones genómicas de rasgo cuantitativo o complejo (QTL) asociadas a la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama, a la señalización intratumoral y a los fenotipos intermedios de estrés oxidativo estudiados.

Objetivo 5: Pronosticar mediante modelos de análisis multivariante el comportamiento del cáncer de mama en función de los fenotipos intermedios de estrés oxidativo y las regiones QTL identificadas.

Objetivo 6: Generar un modelo multivariante que defina la edad biológica y evaluar la heterogeneidad de la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama en función de dicha edad biológica.

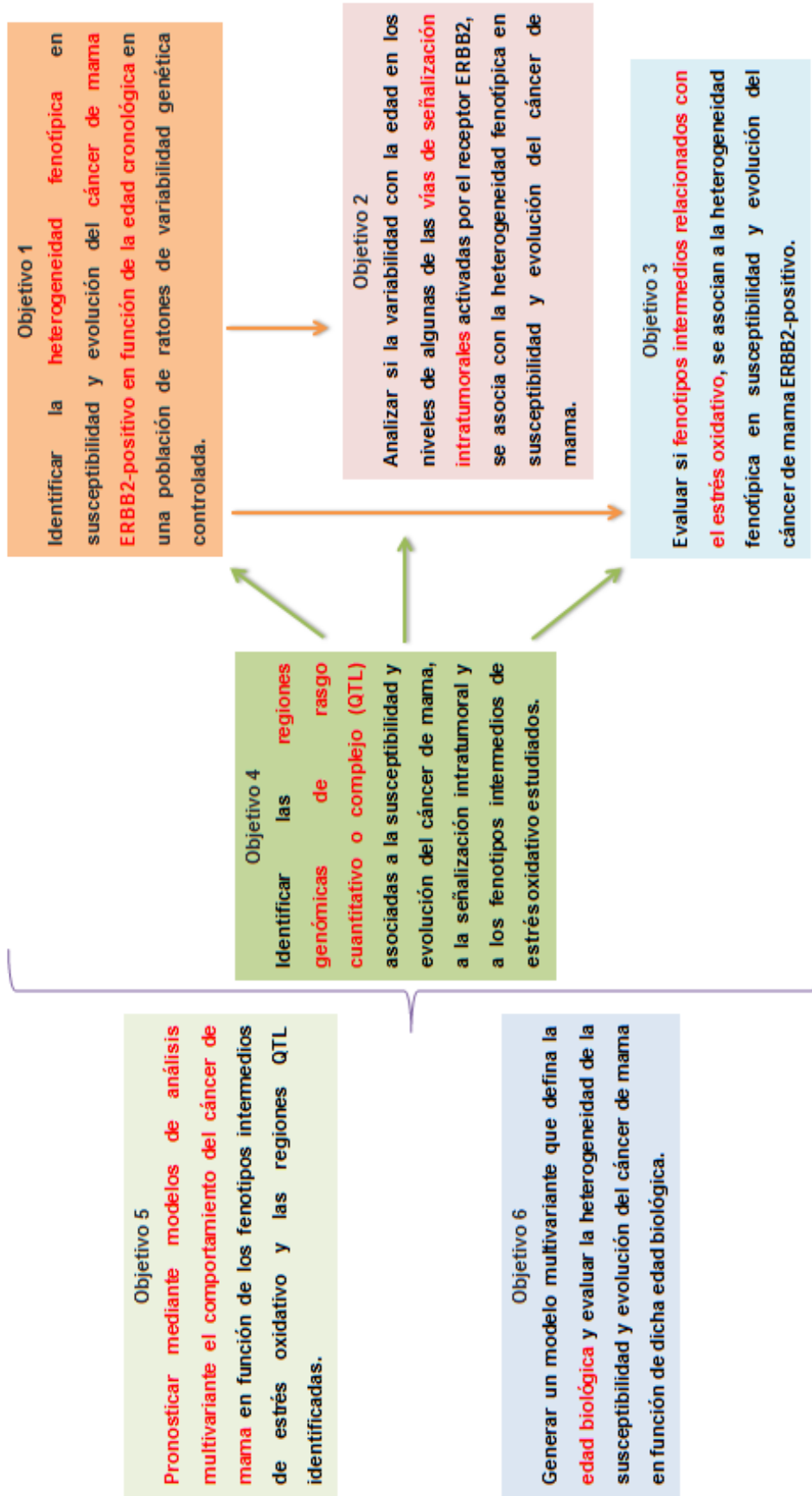


Figura 10. Relación entre los objetivos específicos planteados.

CONCLUSIONES

Conclusión global

Hemos identificado, en nuestro modelo experimental, un conjunto de marcadores genéticos y moleculares que han permitido definir la heterogeneidad de la presentación del cáncer de mama ERBB2-positivo, en relación con la edad, para lo que hemos considerado una serie de fenotipos intermedios de estrés oxidativo que participan en la patogenia del cáncer y del envejecimiento.

Conclusiones específicas, por objetivos:

PRIMERA:

Hemos analizado la variabilidad de la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama ERBB2-positivo *per se* y en función de la edad cronológica. Nuestros resultados demuestran claramente que los animales que desarrollaron el cáncer a edades más avanzadas presentaron una enfermedad menos agresiva y, al contrario, los ratones más jóvenes desarrollaron una enfermedad de peor evolución.

SEGUNDA:

Hemos demostrado que los niveles elevados de las formas fosforiladas de AKT se asociaron con una latencia tumoral y supervivencia mayores y con una menor capacidad para metastatizar. Estos resultados ponen de manifiesto que la variabilidad en las vías de señalización intratumoral activadas por ERBB2, en función de la edad, está relacionada con la heterogeneidad fenotípica del cáncer de mama.

TERCERA:

Los fenotipos intermedios analizados, relacionados con el estrés oxidativo, se asociaron a la variabilidad fenotípica del cáncer de mama. En concreto:

- La mayor latencia y supervivencia junto con el menor número de tumores y la menor velocidad de crecimiento tumoral, se asociaron con los niveles hepáticos elevados de las formas fosforiladas de AKT y ERK1/2. Este hecho, unido a un comportamiento similar de estas formas, tanto en el hígado como en el tejido tumoral, permite sugerir que el tumor refleja, como un tejido más, el comportamiento global de al menos algunas de las vías de señalización.
- El patofenotipo que se asoció con mayor número de metabolitos séricos, determinados en el periodo libre de enfermedad, fue el número de

metástasis. La mayoría de ellos fueron ácidos grasos que se asociaron de forma negativa con éste. Además la actividad elevada de la catalasa también se relacionó con el desarrollo de un menor número de metástasis.

- Los niveles elevados de 4-HNE se asociaron con tiempos de latencia y supervivencia menores y con un desarrollo de mayor número de tumores. De entre todos los biomarcadores de estrés oxidativo analizados, las lesiones oxidativas causadas a lípidos fueron las que presentaron mayor número de asociaciones con los patofenotipos del cáncer de mama, en nuestro modelo.

CUARTA:

Hemos identificado regiones génicas asociadas simultáneamente a la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama, a la señalización intratumoral y a los fenotipos intermedios de estrés oxidativo analizados.

QUINTA:

Hemos generado modelos multivariantes con fenotipos intermedios de estrés oxidativo y marcadores genéticos que predicen la latencia tumoral y la incidencia metastásica, antes del desarrollo de la enfermedad.

SEXTA:

Hemos generado un modelo multivariante para definir la edad biológica. En concreto:

- Los ratones biológicamente más viejos de lo que le correspondía para su edad cronológica, presentaron una enfermedad más agresiva que los que fueron biológicamente más jóvenes, y se incluyeron en los *clusters* de peor evolución.
- Hemos identificado una región en el Cr. 2 de ratón, asociada simultáneamente con el incremento de la edad biológica, la latencia tumoral y los niveles de la amilasa sérica.

Ello demuestra que el comportamiento y la evolución del cáncer de mama en nuestro modelo difieren en función de la edad biológica.

CONCLUSIONS

MAIN CONCLUSION

We have identified several genetic and molecular markers that define ERBB2-breast cancer heterogeneity associated with age. To tackle this issue, we have analyzed intermediate phenotypes of oxidative stress that are involved in the pathogenesis of cancer and biological age.

SPECIFIC CONCLUSIONS

First: We have defined ERBB2-breast cancer phenotypic variability associated with chronological age. Mice that developed the first tumor when they were old, displayed less aggressive disease than mice that developed the first tumor at early age.

Second: Higher levels of phospho-AKT proteins were associated with longer latency and survival, and with fewer lung metastases. Thus, the variability of tumor signaling pathways downstream of ERBB2 receptor associated with age, were related to ERBB2-breast cancer phenotypic variability.

Third: The intermediate phenotypes of oxidative stress were associated with breast cancer phenotypic variability:

- Higher levels of hepatic phospho-AKT and phospho-ERK proteins were associated with longer latency and survival, fewer tumors and smaller tumor growth rates. It seems that the levels of these signalling molecules in the tumor followed, at least partly, similar behaviour than in healthy tissues from the same organism.
- The number of metastases was negatively associated with several serum metabolites, mainly fatty acids, measured when the animals were still tumor-free. Higher levels of catalase activity showed association with smaller number of metastasis.
- Higher levels of 4-HNE were associated with shorter tumor latency and survival, and with higher number of tumors. Thus, among the biomarkers of oxidative stress studied, 4-HNE (a measure of lipid damage), was the one associated with more tumor pathophenotypes.

Fourth: We have identified QTL simultaneously associated with breast cancer susceptibility and evolution, tumor signaling pathways downstream of ERBB2 receptor, and intermediate phenotypes of oxidative stress.

Fifth: We have generated multivariate models using genetic markers and intermediate phenotypes of oxidative stress to predict tumor latency and metastasis incidence before the onset of the disease.

Sixth: We have generated a multivariate model to define biological age that allowed us to show that:

- Biologically older mice developed more aggressive disease than biologically younger mice, and were grouped in the worst evolution clusters.
- A QTL located in chromosome 2 is simultaneously associated with the increment of biological age, tumor latency and seric levels of amylase.

Thus, biological age is indeed a modifier of breast cancer susceptibility and evolution in the mouse model we have studied.

BIBLIOGRAFÍA

1. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *Bmj*. 2000;321(7261):624-8.
2. Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, et al. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(20):3324-30.
3. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. GLOBOCAN 2012. Lyon, France:: International Agency for Research on Cancer 2013.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2007;57(1):43-66.
5. Mouritsen A, Aksglaede L, Sorensen K, Mogensen SS, Leffers H, Main KM, et al. Hypothesis: exposure to endocrine-disrupting chemicals may interfere with timing of puberty. *International journal of andrology*. 2010;33(2):346-59.
6. Setiawan VW, Feigelson, H.S., Henderson, Epidemiology and risk factors: an update. En: *Textbook of Breast Cancer: A Clinical Guide to Therapy*. Eds.: Bonadonna, G.; Hortobagyi, GN.; Valagussa, P. Healthcare/Taylor & Francis; Abingdon, England. 2006. pp:1-16.
7. van den Brandt PA, Spiegelman D, Yaun SS, Adami HO, Beeson L, Folsom AR, et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *American journal of epidemiology*. 2000;152(6):514-27.
8. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, et al. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *Jama*. 1998;279(7):535-40.
9. Dorgan JF, Baer DJ, Albert PS, Judd JT, Brown ED, Corle DK, et al. Serum hormones and the alcohol-breast cancer association in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(9):710-5.
10. Anderson BO, Braun S, Carlson RW, Gralow JR, Lagios MD, Lehman C, et al. Overview of breast health care guidelines for countries with limited resources. *The breast journal*. 2003;9 Suppl 2:S42-50.
11. Kolonel LN, Altshuler D, Henderson BE. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(7):519-27.
12. vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M, et al. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reproductive toxicology*. 2007;24(2):131-8.
13. Kortenkamp A. Are cadmium and other heavy metal compounds acting as endocrine disruptors? *Metal ions in life sciences*. 2011;8:305-17.
14. Viel JF, Clement MC, Hagi M, Grandjean S, Challier B, Danzon A. Dioxin emissions from a municipal solid waste incinerator and risk of invasive breast cancer: a population-based case-control study with GIS-derived exposure. *International journal of health geographics*. 2008;7:4.
15. Brisken C. Endocrine Disruptors and Breast Cancer. *Chimia*. 2008;62:406–9.
16. Abdel-Rahman WM, Moustafa, Y.M., Ahmed, B.O., Mostafa, R.M. Endocrine Disruptors and Breast Cancer Risk – Time to Consider the Environment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012;13(12) 5937-5946).

17. Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature*. 1999;401(6755):763-4.
18. Durando M, Kass L, Piva J, Sonnenschein C, Soto AM, Luque EH, et al. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environmental health perspectives*. 2007;115(1):80-6.
19. Weischer M, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Axelsson CK, Nordestgaard BG. Increased risk of breast cancer associated with CHEK2*1100delC. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(1):57-63.
20. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England journal of medicine*. 2000;343(2):78-85.
21. Kleihues P, Schauble B, zur Hausen A, Esteve J, Ohgaki H. Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *The American journal of pathology*. 1997;150(1):1-13.
22. Schrag CA, Schneider D, Gruener AC, Tsou HC, Peacocke M. Clinical and pathological features of breast disease in Cowden's syndrome: an underrecognized syndrome with an increased risk of breast cancer. *Human pathology*. 1998;29(1):47-53.
23. Balmain A. Cancer as a complex genetic trait: tumor susceptibility in humans and mouse models. *Cell*. 2002;108(2):145-52.
24. Fodor FH, Weston A, Bleiweiss IJ, McCurdy LD, Walsh MM, Tartter PI, et al. Frequency and carrier risk associated with common BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer patients. *American journal of human genetics*. 1998;63(1):45-51.
25. Nathanson KL, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nature medicine*. 2001;7(5):552-6.
26. Gabriel CA, Domchek SM. Breast cancer in young women. *Breast cancer research*: 2010;12(5):212.
27. Globocan 2008. Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
28. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
29. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(19):10869-74.
30. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(16):5678-85.
31. Lønning PE. Molecular classes of breast cancer and their clinical relevance *Current Breast Cancer Reports* 2009;1:183-9.
32. Calza S, Hall P, Auer G, Bjohle J, Klaar S, Kronenwett U, et al. Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients. *Breast cancer research* : 2006;8(4):R34.

33. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2010;12(5):R68.
34. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-87.
35. Siegel PM, Ryan ED, Cardiff RD, Muller WJ. Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *The EMBO journal*. 1999;18(8):2149-64.
36. Li YM, Pan Y, Wei Y, Cheng X, Zhou BP, Tan M, et al. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer cell*. 2004;6(5):459-69.
37. Chen W, Yang H, Tang WR, Feng SJ, Wei YL. Updated meta-analysis on HER2 polymorphisms and risk of breast cancer: evidence from 32 studies. *Asian Pacific journal of cancer prevention* : 2014;15(22):9643-7.
38. Arrick BA. The molecular basis of cancer. *The molecular basis of cancer*
39. Arnold A, Papanikolaou A. Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(18):4215-24.
40. Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, Tapia C, Zaharieva B, Novotny H, et al. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer research*. 2004;64(23):8534-40.
41. Howe LR, Brown AM. Wnt signaling and breast cancer. *Cancer biology & therapy*. 2004;3(1):36-41.
42. Lo PK, Mehrotra J, D'Costa A, Fackler MJ, Garrett-Mayer E, Argani P, et al. Epigenetic suppression of secreted frizzled related protein 1 (SFRP1) expression in human breast cancer. *Cancer biology & therapy*. 2006;5(3):281-6.
43. Tang B, Vu M, Booker T, Santner SJ, Miller FR, Anver MR, et al. TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(7):1116-24.
44. Dawson SJ, Makretsov N, Blows FM, Driver KE, Provenzano E, Le Quesne J, et al. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *British journal of cancer*. 2010;103(5):668-75.
45. Sahoo S, Brickley DR, Kocherginsky M, Conzen SD. Coordinate expression of the PI3-kinase downstream effectors serum and glucocorticoid-induced kinase (SGK-1) and Akt-1 in human breast cancer. *European journal of cancer*. 2005;41(17):2754-9.
46. Biswas DK, Shi Q, Baily S, Strickland I, Ghosh S, Pardee AB, et al. NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(27):10137-42.
47. Schneider BP, Miller KD. Angiogenesis of breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(8):1782-90.
48. Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(8):591-602.
49. Gregg SQ, Gutierrez V, Robinson AR, Woodell T, Nakao A, Ross MA, et al. A mouse model of accelerated liver aging caused by a defect in DNA repair. *Hepatology*. 2012;55(2):609-21.

50. Cabanillas R, Cadinanos J, Villameytide JA, Perez M, Longo J, Richard JM, et al. Nestor-Guillermo progeria syndrome: a novel premature aging condition with early onset and chronic development caused by BANF1 mutations. *American journal of medical genetics Part A*. 2011;155A(11):2617-25.
51. Armanios M, Alder JK, Parry EM, Karim B, Strong MA, Greider CW. Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. *American journal of human genetics*. 2009;85(6):823-32.
52. Herranz D, Munoz-Martin M, Canamero M, Mulero F, Martinez-Pastor B, Fernandez-Capetillo O, et al. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nature communications*. 2010;1:3.
53. Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*. 2006;124(2):315-29.
54. Someya S, Yu W, Hallows WC, Xu J, Vann JM, Leeuwenburgh C, et al. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell*. 2010;143(5):802-12.
55. Osorio FG, Varela I, Lara E, Puente XS, Espada J, Santoro R, et al. Nuclear envelope alterations generate an aging-like epigenetic pattern in mice deficient in Zmpste24 metalloprotease. *Aging cell*. 2010;9(6):947-57.
56. Larson K, Yan SJ, Tsurumi A, Liu J, Zhou J, Gaur K, et al. Heterochromatin formation promotes longevity and represses ribosomal RNA synthesis. *PLoS genetics*. 2012;8(1):e1002473.
57. de Magalhaes JP, Curado J, Church GM. Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics*. 2009;25(7):875-81.
58. Calderwood SK, Murshid A, Prince T. The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging--a mini-review. *Gerontology*. 2009;55(5):550-8.
59. Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell*. 2011;146(5):682-95.
60. Tomaru U, Takahashi S, Ishizu A, Miyatake Y, Gohda A, Suzuki S, et al. Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *The American journal of pathology*. 2012;180(3):963-72.
61. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
62. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology*. 1956;11(3):298-300.
63. Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxidants & redox signaling*. 2003;5(5):557-61.
64. Doonan R, McElwee JJ, Matthijssens F, Walker GA, Houthoofd K, Back P, et al. Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes & development*. 2008;22(23):3236-41.
65. Van Remmen H, Ikeno Y, Hamilton M, Pahlavani M, Wolf N, Thorpe SR, et al. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiological genomics*. 2003;16(1):29-37.

-
66. Zhang Y, Ikeno Y, Qi W, Chaudhuri A, Li Y, Bokov A, et al. Mice deficient in both Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 have increased oxidative damage and a greater incidence of pathology but no reduction in longevity. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2009;64(12):1212-20.
67. Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging cell*. 2009;8(3):311-23.
68. Jeck WR, Siebold AP, Sharpless NE. Review: a meta-analysis of GWAS and age-associated diseases. *Aging cell*. 2012;11(5):727-31.
69. Osorio FG, Barcena C, Soria-Valles C, Ramsay AJ, de Carlos F, Cobo J, et al. Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF-kappaB activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. *Genes & development*. 2012;26(20):2311-24.
70. Comfort A. Test-battery to measure ageing-rate in man. *Lancet*. 1969;2(7635):1411-4.
71. Levine ME. Modeling the rate of senescence: can estimated biological age predict mortality more accurately than chronological age? *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2013;68(6):667-74.
72. Karasik D, Demissie S, Cupples LA, Kiel DP. Disentangling the genetic determinants of human aging: biological age as an alternative to the use of survival measures. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2005;60(5):574-87.
73. Cho IH, Park KS, Lim CJ. An empirical comparative study on biological age estimation algorithms with an application of Work Ability Index (WAI). *Mechanisms of ageing and development*. 2010;131(2):69-78.
74. Karasik D, Hannan MT, Cupples LA, Felson DT, Kiel DP. Genetic contribution to biological aging: the Framingham Study. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2004;59(3):218-26.
75. Horvath S. Erratum to: DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome biology*. 2015;16:96.
76. Chen W, Qian W, Wu G, Chen W, Xian B, Chen X, et al. Three-dimensional human facial morphologies as robust aging markers. *Cell research*. 2015;25(5):574-87.
77. Borkan GA, Norris AH. Assessment of biological age using a profile of physical parameters. *Journal of gerontology*. 1980;35(2):177-84.
78. Goggins WB, Woo J, Sham A, Ho SC. Frailty index as a measure of biological age in a Chinese population. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2005;60(8):1046-51.
79. Kristic J, Vuckovic F, Menni C, Klaric L, Keser T, Beceheli I, et al. Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2014;69(7):779-89.
80. Marioni RE, Shah S, McRae AF, Chen BH, Colicino E, Harris SE, et al. DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome biology*. 2015;16:25.
81. Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, et al. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome biology*. 2014;15(2):R24.
82. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome biology*. 2013;14(10):R115.

83. Cho DY, Kim YA, Przytycka TM. Chapter 5: Network biology approach to complex diseases. *PLoS computational biology*. 2012;8(12):e1002820.
84. Pritchard JK. Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases? *American journal of human genetics*. 2001;69(1):124-37.
85. de Magalhaes JP. How ageing processes influence cancer. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(5):357-65.
86. Serrano M, Blasco MA. Cancer and ageing: convergent and divergent mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(9):715-22.
87. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, et al. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell*. 2005;122(2):221-33.
88. Mitsui A, Hamuro J, Nakamura H, Kondo N, Hirabayashi Y, Ishizaki-Koizumi S, et al. Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span. *Antioxidants & redox signaling*. 2002;4(4):693-6.
89. De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis*. 2001;22(7):999-1013.
90. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature reviews Genetics*. 2005;6(8):611-22.
91. Denkert C, Bucher E, Hilvo M, Salek R, Oresic M, Griffin J, et al. Metabolomics of human breast cancer: new approaches for tumor typing and biomarker discovery. *Genome medicine*. 2012;4(4):37.
92. Martínez-Costa OH. Glicolisis, efecto Warburg y flexibilidad metabólica tumoral. *SEBBM Divulgación*. 2015.
93. Sahar S, Sassone-Corsi P. Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(12):886-96.
94. Zhou JR, Blackburn GL, Walker WA. Symposium introduction: metabolic syndrome and the onset of cancer. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;86(3):s817-9.
95. Asiago VM, Alvarado LZ, Shanaiah N, Gowda GA, Owusu-Sarfo K, Ballas RA, et al. Early detection of recurrent breast cancer using metabolite profiling. *Cancer research*. 2010;70(21):8309-18.
96. Bertone-Johnson ER, Chen WY, Holick MF, Hollis BW, Colditz GA, Willett WC, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and 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*. 2005;14(8):1991-7.
97. Arias-Romero LE, Chernoff J. p21-activated kinases in ErbB2-positive breast cancer: A new therapeutic target? *Small GTPases*. 2010;1(2):124-8.
98. Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging*. 2011;3(3):192-222.
99. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(9):3065-74.

-
100. Toker A. Achieving specificity in Akt signaling in cancer. *Advances in biological regulation*. 2012;52(1):78-87.
101. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011;12(1):21-35.
102. Crespo P. La ruta RAS-ERK como diana antitumoral. In: Farmacia RANd, editor. *Monografía XXIV Redes de señalización y estrategias terapéuticas*. Madrid 2009.
103. Kapahi P, Zid BM, Harper T, Koslover D, Sapin V, Benzer S. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Current biology : CB*. 2004;14(10):885-90.
104. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*. 2009;460(7253):392-5.
105. Selman C, Tullet JM, Wieser D, Irvine E, Lingard SJ, Choudhury AI, et al. Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science*. 2009;326(5949):140-4.
106. Demidenko ZN, Shtutman M, Blagosklonny MV. Pharmacologic inhibition of MEK and PI-3K converges on the mTOR/S6 pathway to decelerate cellular senescence. *Cell cycle*. 2009;8(12):1896-900.
107. Hay N. Akt isoforms and glucose homeostasis - the leptin connection. *Trends in endocrinology and metabolism*: 2011;22(2):66-73.
108. Li X, Alafuzoff I, Soininen H, Winblad B, Pei JJ. Levels of mTOR and its downstream targets 4E-BP1, eEF2, and eEF2 kinase in relationships with tau in Alzheimer's disease brain. *The FEBS journal*. 2005;272(16):4211-20.
109. Wang D, Chen J, Guo F, Chen H, Duan Z, Wei MY, et al. Clinical significance of mTOR and p-mTOR protein expression in human colorectal carcinomas. *Asian Pacific journal of cancer prevention : 2011;12(10):2581-4*.
110. Herberger B, Puhalla H, Lehnert M, Wrba F, Novak S, Brandstetter A, et al. Activated mammalian target of rapamycin is an adverse prognostic factor in patients with biliary tract adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(16):4795-9.
111. Hutchinson JN, Jin J, Cardiff RD, Woodgett JR, Muller WJ. Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer research*. 2004;64(9):3171-8.
112. Yoeli-Lerner M, Chin YR, Hansen CK, Toker A. Akt/protein kinase b and glycogen synthase kinase-3beta signaling pathway regulates cell migration through the NFAT1 transcription factor. *Molecular cancer research : MCR*. 2009;7(3):425-32.
113. Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandran P, Kothari N, et al. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of cell biology*. 2005;171(6):1023-34.
114. Nasr Z, Robert F, Porco JA, Jr., Muller WJ, Pelletier J. eIF4F suppression in breast cancer affects maintenance and progression. *Oncogene*. 2013;32(7):861-71.
115. Peng C, Wang X, Chen J, Jiao R, Wang L, Li YM, et al. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *BioMed research international*. 2014;2014:831841.
116. Weinberg RB, VanderWerken BS, Anderson RA, Stegner JE, Thomas MJ. Pro-oxidant effect of vitamin E in cigarette smokers consuming a high polyunsaturated fat diet. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21(6):1029-33.

117. Kodykova J, Vavrova L, Kocik M, Zak A. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia biologica*. 2014;60(4):153-67.
118. Adiazola MA, Olivera, P.L. Enzimas antioxidantes eritrocitarias en sujetos de altura: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú.; 2005.
119. Inal ME, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2001;305(1-2):75-80.
120. Rizvi SI, Maurya PK. Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans. *Molecular biotechnology*. 2007;37(1):58-61.
121. Palomero J, Galan AI, Munoz ME, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J, Jimenez R. Effects of aging on the susceptibility to the toxic effects of cyclosporin A in rats. Changes in liver glutathione and antioxidant enzymes. *Free radical biology & medicine*. 2001;30(8):836-45.
122. Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, Yang H, Guo ZM, Kewitt K, et al. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(18):10469-74.
123. Muradian KK, Utko NA, Fraifeld V, Mozzhukhina TG, Pishel IN, Litoshenko AY. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the liver of young and old mice: linear regression and correlation. *Archives of gerontology and geriatrics*. 2002;35(3):205-14.
124. Perichon R, Bourre JM. Peroxisomal beta-oxidation activity and catalase activity during development and aging in mouse liver. *Biochimie*. 1995;77(4):288-93.
125. Marcus DL, Thomas C, Rodriguez C, Simberkoff K, Tsai JS, Strafaci JA, et al. Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Experimental neurology*. 1998;150(1):40-4.
126. Ambani LM, Van Woert MH, Murphy S. Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease. *Archives of neurology*. 1975;32(2):114-8.
127. Ishii K, Zhen LX, Wang DH, Funamori Y, Ogawa K, Taketa K. Prevention of mammary tumorigenesis in acatalasemic mice by vitamin E supplementation. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 1996;87(7):680-4.
128. Ray G, Batra S, Shukla NK, Deo S, Raina V, Ashok S, et al. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2000;59(2):163-70.
129. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mechanisms of ageing and development*. 1990;51(3):283-97.
130. Ahn J, Gammon MD, Santella RM, Gaudet MM, Britton JA, Teitelbaum SL, et al. Associations between breast cancer risk and the catalase genotype, fruit and vegetable consumption, and supplement use. *American journal of epidemiology*. 2005;162(10):943-52.
131. Zheng Y, Nishikawa M, Ikemura M, Yamashita F, Hashida M. Development of bone-targeted catalase derivatives for inhibition of bone metastasis of tumor cells in mice. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2012;101(2):552-7.
132. Nishikawa M, Hyoudou K, Kobayashi Y, Umeyama Y, Takakura Y, Hashida M. Inhibition of metastatic tumor growth by targeted delivery of antioxidant enzymes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2005;109(1-3):101-7.

133. Goh J, Enns L, Fatemie S, Hopkins H, Morton J, Pettan-Brewer C, et al. Mitochondrial targeted catalase suppresses invasive breast cancer in mice. *BMC cancer*. 2011;11:191.
134. Denzoin LA, Soraci, A.L., Tapia, M.O. Glutathione homeostasis. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*: 2013;47 (3):529-39.
135. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2003;333(1):19-39.
136. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine*. 2009;30(1-2):42-59.
137. Yang CS, Chou ST, Liu L, Tsai PJ, Kuo JS. Effect of ageing on human plasma glutathione concentrations as determined by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of chromatography B, Biomedical applications*. 1995;674(1):23-30.
138. Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P, Jr., Reed RL, et al. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free radical biology & medicine*. 1998;24(5):699-704.
139. Lang CA, Naryshkin S, Schneider DL, Mills BJ, Lindeman RD. Low blood glutathione levels in healthy aging adults. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1992;120(5):720-5.
140. Maher P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing research reviews*. 2005;4(2):288-314.
141. Sohal RS, Sohal BH, Brunk UT. Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. *Mechanisms of ageing and development*. 1990;53(3):217-27.
142. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological chemistry*. 2009;390(3):191-214.
143. Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Annals of neurology*. 1994;36(3):348-55.
144. Carretero J, Obrador E, Anasagasti MJ, Martin JJ, Vidal-Vanaclocha F, Estrela JM. Growth-associated changes in glutathione content correlate with liver metastatic activity of B16 melanoma cells. *Clinical & experimental metastasis*. 1999;17(7):567-74.
145. Perry RR, Mazetta JA, Levin M, Barranco SC. Glutathione levels and variability in breast tumors and normal tissue. *Cancer*. 1993;72(3):783-7.
146. Yeh CC, Hou MF, Wu SH, Tsai SM, Lin SK, Hou LA, et al. A study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer. *Cell biochemistry and function*. 2006;24(6):555-9.
147. Ock CY, Kim EH, Choi DJ, Lee HJ, Hahm KB, Chung MH. 8-Hydroxydeoxyguanosine: not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(4):302-8.
148. Colantoni A, Idilman R, de Maria N, Duffner LA, Van Thiel DH, Witte PL, et al. Evidence of oxidative injury during aging of the liver in a mouse model. *Journal of the American Aging Association*. 2001;24(2):51-7.

149. Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(12):4533-7.
150. Kaneko T, Tahara S, Matsuo M. Non-linear accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidized DNA damage, during aging. *Mutation research*. 1996;316(5-6):277-85.
151. Kanauchi M, Nishioka H, Hashimoto T. Oxidative DNA damage and tubulointerstitial injury in diabetic nephropathy. *Nephron*. 2002;91(2):327-9.
152. Martinet W, Knaapen MW, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 2002;106(8):927-32.
153. Sato T, Takeda H, Otake S, Yokozawa J, Nishise S, Fujishima S, et al. Increased plasma levels of 8-hydroxydeoxyguanosine are associated with development of colorectal tumors. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2010;47(1):59-63.
154. Chiou CC, Chang PY, Chan EC, Wu TL, Tsao KC, Wu JT. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2003;334(1-2):87-94.
155. Erhola M, Toyokuni S, Okada K, Tanaka T, Hiai H, Ochi H, et al. Biomarker evidence of DNA oxidation in lung cancer patients: association of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion with radiotherapy, chemotherapy, and response to treatment. *FEBS letters*. 1997;409(2):287-91.
156. Musarrat J, Arezina-Wilson J, Wani AA. Prognostic and aetiological relevance of 8-hydroxyguanosine in human breast carcinogenesis. *European journal of cancer*. 1996;32A(7):1209-14.
157. Matsui A, Ikeda T, Enomoto K, Hosoda K, Nakashima H, Omae K, et al. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer letters*. 2000;151(1):87-95.
158. Kuo HW, Chou SY, Hu TW, Wu FY, Chen DJ. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and genetic polymorphisms in breast cancer patients. *Mutation research*. 2007;631(1):62-8.
159. Bekaert S, De Meyer, T., Van Oostveldt, P. . Telomere Attrition as Ageing Biomarker. *Anticancer Research*. 2005;25:3011-22.
160. de Lange T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*. 2002;21(4):532-40.
161. Blackburn E.H. GJG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J Mol Biol*. 1978;120(1):33-53.
162. Shampay J, Szostak JW, Blackburn EH. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature*. 1984;310(5973):154-7.
163. Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene*. 2002;21(4):564-79.
164. Shampay J, Blackburn EH. Generation of telomere-length heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(2):534-8.

-
165. Kipling D, Cooke HJ. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature*. 1990;347(6291):400-2.
166. Brown WR. Molecular cloning of human telomeres in yeast. *Nature*. 1989;338(6218):774-6.
167. Youngren K, Jeanclos E, Aviv H, Kimura M, Stock J, Hanna M, et al. Synchrony in telomere length of the human fetus. *Human genetics*. 1998;102(6):640-3.
168. Okuda K, Bardeguet A, Gardner JP, Rodriguez P, Ganesh V, Kimura M, et al. Telomere length in the newborn. *Pediatric research*. 2002;52(3):377-81.
169. Butler MG, Tilburt J, DeVries A, Muralidhar B, Aue G, Hedges L, et al. Comparison of chromosome telomere integrity in multiple tissues from subjects at different ages. *Cancer genetics and cytogenetics*. 1998;105(2):138-44.
170. Alter BP, Baerlocher GM, Savage SA, Chanock SJ, Weksler BB, Willner JP, et al. Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. *Blood*. 2007;110(5):1439-47.
171. Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *American journal of human genetics*. 1994;55(5):876-82.
172. Starkweather AR, Alhaeri AA, Montpetit A, Brumelle J, Filler K, Montpetit M, et al. An integrative review of factors associated with telomere length and implications for biobehavioral research. *Nursing research*. 2014;63(1):36-50.
173. Donat LE, Blasco MA. Telomeres in cancer and ageing. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2011;366(1561):76-84.
174. Haussmann MF, Winkler DW, O'Reilly KM, Huntington CE, Nisbet IC, Vleck CM. Telomeres shorten more slowly in long-lived birds and mammals than in short-lived ones. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society*. 2003;270(1522):1387-92.
175. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*. 1990;346(6287):866-8.
176. Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, et al. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature*. 2000;406(6796):641-5.
177. Artandi SE, DePinho RA. A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Current opinion in genetics & development*. 2000;10(1):39-46.
178. Samani NJ, Boulby R, Butler R, Thompson JR, Goodall AH. Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet*. 2001;358(9280):472-3.
179. Obana N, Takagi S, Kinouchi Y, Tokita Y, Sekikawa A, Takahashi S, et al. Telomere shortening of peripheral blood mononuclear cells in coronary disease patients with metabolic disorders. *Internal medicine*. 2003;42(2):150-3.
180. Panossian LA, Porter VR, Valenzuela HF, Zhu X, Reback E, Masterman D, et al. Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status. *Neurobiology of aging*. 2003;24(1):77-84.
181. Pooley KA, McGuffog L, Barrowdale D, Frost D, Ellis SD, Fineberg E, et al. Lymphocyte telomere length is long in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers regardless of cancer-affected status. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American*

Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2014;23(6):1018-24.

182. Martínez-Delgado B, Yanowsky K, Inglada-Perez L, Domingo S, Urioste M, Osorio A, et al. Genetic anticipation is associated with telomere shortening in hereditary breast cancer. *PLoS genetics*. 2011;7(7):e1002182.

183. Heaphy CM, Subhawong AP, Gross AL, Konishi Y, Kouprina N, Argani P, et al. Shorter telomeres in luminal B, HER-2 and triple-negative breast cancer subtypes. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2011;24(2):194-200.

184. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014;2014:360438.

185. Dalleau S, Baradat M, Gueraud F, Huc L. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell death and differentiation*. 2013;20(12):1615-30.

186. Gan L, Johnson JA. Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1842(8):1208-18.

187. Na HK, Surh YJ. Oncogenic potential of Nrf2 and its principal target protein heme oxygenase-1. *Free radical biology & medicine*. 2014;67:353-65.

188. Seo HA, Lee IK. The role of Nrf2: adipocyte differentiation, obesity, and insulin resistance. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013;2013:184598.

189. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, et al. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature medicine*. 2013;19(5):557-66.

190. Albright CD, Klem E, Shah AA, Gallagher P. Breast cancer cell-targeted oxidative stress: enhancement of cancer cell uptake of conjugated linoleic acid, activation of p53, and inhibition of proliferation. *Experimental and molecular pathology*. 2005;79(2):118-25.

191. Sakul A, Cumaoglu A, Aydin E, Ari N, Dilsiz N, Karasu C. Age- and diabetes-induced regulation of oxidative protein modification in rat brain and peripheral tissues: consequences of treatment with antioxidant pyridindole. *Experimental gerontology*. 2013;48(5):476-84.

192. Judge S, Jang YM, Smith A, Hagen T, Leeuwenburgh C. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(3):419-21.

193. Chapple SJ, Cheng X, Mann GE. Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease. *Redox biology*. 2013;1:319-31.

194. Tjalkens RB, Cook LW, Petersen DR. Formation and export of the glutathione conjugate of 4-hydroxy-2, 3-E-nonenal (4-HNE) in hepatoma cells. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1999;361(1):113-9.

195. Oberley TD, Toyokuni S, Szweda LI. Localization of hydroxynonenal protein adducts in normal human kidney and selected human kidney cancers. *Free radical biology & medicine*. 1999;27(5-6):695-703.

196. Biasi F, Tessitore L, Zanetti D, Cutrin JC, Zingaro B, Chiarpotto E, et al. Associated changes of lipid peroxidation and transforming growth factor beta1 levels in human colon cancer during tumour progression. *Gut*. 2002;50(3):361-7.
197. Skrzydlewska E, Stankiewicz A, Sulkowska M, Sulkowski S, Kasacka I. Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2001;64(3):213-22.
198. Young O, Crotty T, O'Connell R, O'Sullivan J, Curran AJ. Levels of oxidative damage and lipid peroxidation in thyroid neoplasia. *Head & neck*. 2010;32(6):750-6.
199. Jin H, Daly DS, Marks JR, Zangar RC. Oxidatively modified proteins as plasma biomarkers in breast cancer. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. 2013;13(3):193-200.
200. Karihtala P, Kauppila S, Puistola U, Jukkola-Vuorinen A. Divergent behaviour of oxidative stress markers 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in breast carcinogenesis. *Histopathology*. 2011;58(6):854-62.
201. Irazusta V, Moreno-Cermeño, A., Ros, J., Tamarit, J. Estrategias proteómicas para el análisis de grupos carbonilo como marcadores de daño oxidativo en proteínas. 2008. In: *Proteómica [Internet]*.
202. Grune T, Jung T, Merker K, Davies KJ. Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(12):2519-30.
203. Sohal RS, Agarwal S, Dubey A, Orr WC. Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(15):7255-9.
204. Nyström T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO journal*. 2005;24(7):1311-7.
205. Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1987;262(12):5488-91.
206. Zipprich J, Terry MB, Liao Y, Agrawal M, Gurchich I, Senie R, et al. Plasma protein carbonyls and breast cancer risk in sisters discordant for breast cancer from the New York site of the Breast Cancer Family Registry. *Cancer research*. 2009;69(7):2966-72.
207. Chaudhuri AR, de Waal EM, Pierce A, Van Remmen H, Ward WF, Richardson A. Detection of protein carbonyls in aging liver tissue: A fluorescence-based proteomic approach. *Mechanisms of ageing and development*. 2006;127(11):849-61.
208. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2006;10(2):389-406.
209. Morabito F, Cristani M, Saija A, Stelitano C, Callea V, Tomaino A, et al. Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma. *Mediators of inflammation*. 2004;13(5-6):381-3.
210. Yilmaz IA, Akcay T, Cakatay U, Telci A, Ataus S, Yalcin V. Relation between bladder cancer and protein oxidation. *International urology and nephrology*. 2003;35(3):345-50.
211. Rossner P, Jr., Terry MB, Gammon MD, Agrawal M, Zhang FF, Ferris JS, et al. Plasma protein carbonyl levels and breast cancer risk. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2007;11(5):1138-48.

212. Reich DE, Lander ES. On the allelic spectrum of human disease. *Trends in genetics : TIG*. 2001;17(9):502-10.
213. Galvan A, Ioannidis JP, Dragani TA. Beyond genome-wide association studies: genetic heterogeneity and individual predisposition to cancer. *Trends in genetics : TIG*. 2010;26(3):132-41.
214. Hoggart CJ, Clark TG, De Iorio M, Whittaker JC, Balding DJ. Genome-wide significance for dense SNP and resequencing data. *Genetic epidemiology*. 2008;32(2):179-85.
215. Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nature genetics*. 2001;29(3):306-9.
216. Khoury MJ, Bertram L, Boffetta P, Butterworth AS, Chanock SJ, Dolan SM, et al. Genome-wide association studies, field synopses, and the development of the knowledge base on genetic variation and human diseases. *American journal of epidemiology*. 2009;170(3):269-79.
217. Ioannidis JP. Calibration of credibility of agnostic genome-wide associations. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2008;147B(6):964-72.
218. Hunter KW, Crawford NP. The future of mouse QTL mapping to diagnose disease in mice in the age of whole-genome association studies. *Annual review of genetics*. 2008;42:131-41.
219. To MD, Perez-Losada J, Mao JH, Hsu J, Jacks T, Balmain A. A functional switch from lung cancer resistance to susceptibility at the *Pas1* locus in *Kras2LA2* mice. *Nature genetics*. 2006;38(8):926-30.
220. Balmain A, Harris CC. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):371-7.
221. Crawford NP, Qian X, Ziogas A, Papageorge AG, Boersma BJ, Walker RC, et al. *Rrp1b*, a new candidate susceptibility gene for breast cancer progression and metastasis. *PLoS genetics*. 2007;3(11):e214.
222. Ewart-Toland A, Dai Q, Gao YT, Nagase H, Dunlop MG, Farrington SM, et al. *Aurora-A/STK15 T+91A* is a general low penetrance cancer susceptibility gene: a meta-analysis of multiple cancer types. *Carcinogenesis*. 2005;26(8):1368-73.
223. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996;273(5281):1516-7.
224. Stratton MR, Rahman N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nature genetics*. 2008;40(1):17-22.
225. Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R, et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to *CHEK2*(*)1100delC in noncarriers of *BRCA1* or *BRCA2* mutations. *Nature genetics*. 2002;31(1):55-9.
226. Rosa-Rosa JM, Pita G, Urioste M, Llort G, Brunet J, Lazaro C, et al. Genome-wide linkage scan reveals three putative breast-cancer-susceptibility loci. *American journal of human genetics*. 2009;84(2):115-22.
227. Stacey SN, Manolescu A, Sulem P, Thorlacius S, Gudjonsson SA, Jonsson GF, et al. Common variants on chromosome 5p12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nature genetics*. 2008;40(6):703-6.

228. Milne RL, Benitez J, Nevanlinna H, Heikkinen T, Aittomaki K, Blomqvist C, et al. Risk of estrogen receptor-positive and -negative breast cancer and single-nucleotide polymorphism 2q35-rs13387042. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(14):1012-8.
229. Donjacour AA, Cunha GR. Stromal regulation of epithelial function. *Cancer treatment and research*. 1991;53:335-64.
230. Perez-Losada J, Balmain A. Stem-cell hierarchy in skin cancer. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(6):434-43.
231. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer research*. 1999;59(19):5002-11.
232. Kurose K, Gilley K, Matsumoto S, Watson PH, Zhou XP, Eng C. Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nature genetics*. 2002;32(3):355-7.
233. Weaver VM, Gilbert P. Watch thy neighbor: cancer is a communal affair. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 8):1287-90.
234. Trimboli AJ, Cantemir-Stone CZ, Li F, Wallace JA, Merchant A, Creasap N, et al. Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. *Nature*. 2009;461(7267):1084-91.
235. Bellam N, Pasche B. Tgf-beta signaling alterations and colon cancer. *Cancer treatment and research*. 2010;155:85-103.
236. Leung SY, Chen X, Chu KM, Yuen ST, Mathy J, Ji J, et al. Phospholipase A2 group IIA expression in gastric adenocarcinoma is associated with prolonged survival and less frequent metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(25):16203-8.
237. MacPhee M, Chepenik KP, Liddell RA, Nelson KK, Siracusa LD, Buchberg AM. The secretory phospholipase A2 gene is a candidate for the Mom1 locus, a major modifier of ApcMin-induced intestinal neoplasia. *Cell*. 1995;81(6):957-66.
238. Pruzanski W, Vadas P. Phospholipase A2--a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunology today*. 1991;12(5):143-6.
239. Jaross W, Eckey R, Menschikowski M. Biological effects of secretory phospholipase A(2) group IIA on lipoproteins and in atherogenesis. *European journal of clinical investigation*. 2002;32(6):383-93.
240. Rodriguez-Rodero S, Fernandez-Morera JL, Menendez-Torre E, Calvanese V, Fernandez AF, Fraga MF. Aging genetics and aging. *Aging and disease*. 2011;2(3):186-95.
241. Orren DK. Werner syndrome: molecular insights into the relationships between defective DNA metabolism, genomic instability, cancer and aging. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2006;11:2657-71.
242. Dominguez-Gerpe L, Araujo-Vilar D. Prematurely aged children: molecular alterations leading to Hutchinson-Gilford progeria and Werner syndromes. *Curr Aging Sci*. 2008;1(3):202-12.
243. Larizza L, Roversi G, Volpi L. Rothmund-Thomson syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*. 2010;5:2.

244. Dillin A, Hsu AL, Arantes-Oliveira N, Lehrer-Graiwer J, Hsin H, Fraser AG, et al. Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. *Science*. 2002;298(5602):2398-401.
245. Piper MD, Selman C, McElwee JJ, Partridge L. Separating cause from effect: how does insulin/IGF signalling control lifespan in worms, flies and mice? *Journal of internal medicine*. 2008;263(2):179-91.
246. Tissenbaum HA, Guarente L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2001;410(6825):227-30.
247. Bonkowski MS, Pamerter RW, Rocha JS, Masternak MM, Panici JA, Bartke A. Long-lived growth hormone receptor knockout mice show a delay in age-related changes of body composition and bone characteristics. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2006;61(6):562-7.
248. Willcox BJ, Donlon TA, He Q, Chen R, Grove JS, Yano K, et al. FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(37):13987-92.
249. Atzmon G, Schechter C, Greiner W, Davidson D, Rennert G, Barzilai N. Clinical phenotype of families with longevity. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2004;52(2):274-7.
250. Perls TT, Wilmoth J, Levenson R, Drinkwater M, Cohen M, Bogan H, et al. Life-long sustained mortality advantage of siblings of centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(12):8442-7.
251. Singh R, Kolvraa S, Bross P, Christensen K, Bathum L, Gregersen N, et al. Anti-inflammatory heat shock protein 70 genes are positively associated with human survival. *Current pharmaceutical design*. 2010;16(7):796-801.
252. Soerensen M, Christensen K, Stevnsner T, Christiansen L. The Mn-superoxide dismutase single nucleotide polymorphism rs4880 and the glutathione peroxidase 1 single nucleotide polymorphism rs1050450 are associated with aging and longevity in the oldest old. *Mechanisms of ageing and development*. 2009;130(5):308-14.
253. Pawlikowska L, Hu D, Huntsman S, Sung A, Chu C, Chen J, et al. Association of common genetic variation in the insulin/IGF1 signaling pathway with human longevity. *Aging cell*. 2009;8(4):460-72.
254. Rosvall L, Rizzuto D, Wang HX, Winblad B, Graff C, Fratiglioni L. APOE-related mortality: effect of dementia, cardiovascular disease and gender. *Neurobiology of aging*. 2009;30(10):1545-51.
255. Rowse GJ, Ritland SR, Gendler SJ. Genetic modulation of neu proto-oncogene-induced mammary tumorigenesis. *Cancer research*. 1998;58(12):2675-9.
256. Davie SA, Maglione JE, Manner CK, Young D, Cardiff RD, MacLeod CL, et al. Effects of FVB/NJ and C57Bl/6J strain backgrounds on mammary tumor phenotype in inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Transgenic research*. 2007;16(2):193-201.
257. Guy CT, Webster MA, Schaller M, Parsons TJ, Cardiff RD, Muller WJ. 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*. 1992;89(22):10578-82.
258. Muller WJ, Sinn E, Pattengale PK, Wallace R, Leder P. Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell*. 1988;54(1):105-15.

259. Yuan R, Tsaih SW, Petkova SB, Marin de Evsikova C, Xing S, Marion MA, et al. Aging in inbred strains of mice: study design and interim report on median lifespans and circulating IGF1 levels. *Aging cell*. 2009;8(3):277-87.
260. Castellanos-Martin A, Castillo-Lluva S, Saez-Freire Mdel M, Blanco-Gomez A, Hontecillas-Prieto L, Patino-Alonso C, et al. Unraveling heterogeneous susceptibility and the evolution of breast cancer using a systems biology approach. *Genome biology*. 2015;16:40.
261. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1989;24(3):148-54.
262. Mosca E, Barcella M, Alfieri R, Bevilacqua A, Canti G, Milanese L. Systems biology of the metabolic network regulated by the Akt pathway. *Biotechnology advances*. 2012;30(1):131-41.
263. Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2002;13(10):444-51.
264. Fiehn O WG, Scholz M. Setup and Annotation of Metabolomic Experiments by Integrating Biological and Mass Spectrometric Metadata. In *Data Integration in the Life Sciences*. Volume 3615. Ed.: Ludäscher B, Raschid L, Springer, Berlin Heidelberg, 2005. pp. 224-39
265. <http://fiehnlab.ucdavis.edu/> Metabolite-Library-2007/.
266. Steinfath M, Groth D, Lisek J, Selbig J. Metabolite profile analysis: from raw data to regression and classification. *Physiologia plantarum*. 2008;132(2):150-61.
267. <http://www.hmdb.ca/metabolites/>.
268. Choi SI, Kim TI, Kim KS, Kim BY, Ahn SY, Cho HJ, et al. Decreased catalase expression and increased susceptibility to oxidative stress in primary cultured corneal fibroblasts from patients with granular corneal dystrophy type II. *The American journal of pathology*. 2009;175(1):248-61.
269. Imre S, Toth F, Fachel J. Superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in liver of young mice of different ages. *Mechanisms of ageing and development*. 1984;28(2-3):297-304.
270. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(1):44-84.
271. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature protocols*. 2006;1(6):3159-65.
272. Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation research*. 1997;387(3):147-63.
273. Alzoubi K, Khabour O, Khader M, Mhaidat N, Al-Azzam S. Evaluation of vitamin B12 effects on DNA damage induced by paclitaxel. *Drug and chemical toxicology*. 2014;37(3):276-80.
274. Callicott RJ, Womack JE. Real-time PCR assay for measurement of mouse telomeres. *Comparative medicine*. 2006;56(1):17-22.
275. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic acids research*. 2002;30(10):e47.

276. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
277. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine*. 1991;11(1):81-128.
278. Onorato JM, Thorpe SR, Baynes JW. Immunohistochemical and ELISA assays for biomarkers of oxidative stress in aging and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;854:277-90.
279. DuPont JJ, Ramick MG, Farquhar WB, Townsend RR, Edwards DG. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species contribute to impaired cutaneous microvascular function in chronic kidney disease. *American journal of physiology Renal physiology*. 2014;306(12):F1499-506.
280. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. 1994;233:346-57.
281. Caimi G, Hopps E, Noto D, Canino B, Montana M, Lucido D, et al. Protein oxidation in a group of subjects with metabolic syndrome. *Diabetes & metabolic syndrome*. 2013;7(1):38-41.
282. Zhang ZD, Paccanaro A, Fu Y, Weissman S, Weng Z, Chang J, et al. Statistical analysis of the genomic distribution and correlation of regulatory elements in the ENCODE regions. *Genome research*. 2007;17(6):787-97.
283. KR G. The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika*. 1971;58:453-67.
284. M G. An alternative for simultaneous representations. *HJ-Biplot. Qüestiió*. 1986;10:13-23.
285. V V. MULTBILOT: A package for Multivariate Analysis using Biplots. Departamento de Estadística. Universidad de Salamanca.; 2010.
286. <http://biplot.usal.es/multbiplot>.
287. Doménech JM, Navarro, J.B. Análisis de la supervivencia y modelo de riesgos proporcionales de Cox2011.
288. Posada S, Rosero-Noguera, R. Comparison of mathematical models: an application for evaluation of animal food. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2007.
289. Parmar MKB MD. *Survival analysis: A practical approach*. Eds.:Sons JW, Chichester, England, 1995.
290. Bernal-de Lázaro J, Prieto-Moreno, A., Llanes-Santiago, O.,García-Moreno, E. Estudio comparativo de clasificadores empleados en el diagnóstico de fallos de sistemas industriales. *Ingeniería Mecánica*. 2011;14(2):87-98.
291. Karatzoglou A, Meyer, D. , Hornik, K. *Support Vector Machines in R*. Department of Statistics and Mathematics, 21. Department of Statistics and Mathematics, WU Vienna University of Economics and Business, Vienna, 2005.
292. Davis JG, M. , editor *The Relationship Between Precision-Recall and ROC Curves*. Proceedings of the 23 rd International Conference on Machine Learning,; 2006.
293. *Accurately Measuring Model Prediction Error (2012)* by Scott Fortmann-Roe.

294. Cox A, Ackert-Bicknell CL, Dumont BL, Ding Y, Bell JT, Brockmann GA, et al. A new standard genetic map for the laboratory mouse. *Genetics*. 2009;182(4):1335-44.
295. <http://cgd.jax.org/mousemapconverter/>.
296. Nyholt DR. All LODs are not created equal. *American journal of human genetics*. 2000;67(2):282-8.
297. Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature genetics*. 1995;11(3):241-7.
298. Broman KW. Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. *Lab animal*. 2001;30(7):44-52.
299. www.cytoscape.org.
300. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*. 2004;18(16):1926-45.
301. Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing. *Nature*. 2007;448(7155):767-74.
302. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*. 2014;4(1):177-97.
303. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*. 2009;136(3):521-34.
304. Holl D, Kuckenberger P, Woynecki T, Egert A, Becker A, Huss S, et al. Transgenic overexpression of Tcfap2c/AP-2gamma results in liver failure and intestinal dysplasia. *PloS one*. 2011;6(7):e22034.
305. Klein D, Alvarez-Cubela S, Lanzoni G, Vargas N, Prabakar KR, Boulina M, et al. BMP-7 Induces Adult Human Pancreatic Exocrine-to-Endocrine Conversion. *Diabetes*. 2015;64(12):4123-34.
306. Guo JP, Coppola D, Cheng JQ. IKBKE protein activates Akt independent of phosphatidylinositol 3-kinase/PDK1/mTORC2 and the pleckstrin homology domain to sustain malignant transformation. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(43):37389-98.
307. Jiang T, Qiu Y. Interaction between Src and a C-terminal proline-rich motif of Akt is required for Akt activation. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(18):15789-93.
308. Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, Klos KS, Lan KH, Yang Y, et al. Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(20):6779-88.
309. Schmitz KJ, Otterbach F, Callies R, Levkau B, Holscher M, Hoffmann O, et al. Prognostic relevance of activated Akt kinase in node-negative breast cancer: a clinicopathological study of 99 cases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2004;17(1):15-21.
310. Cicenias J, Urban P, Vuaroqueaux V, Labuhn M, Kung W, Wight E, et al. Increased level of phosphorylated akt measured by chemiluminescence-linked immunosorbent assay is a predictor of poor prognosis in primary breast cancer overexpressing ErbB-2. *Breast cancer research : BCR*. 2005;7(4):R394-401.
311. Nadasi E, Anga B, Sandor J, Megyesi J, Kelemen D, Mottolèse M, et al. Prognostic factors in Hungarian breast cancer patients. *Anticancer Res*. 2007;27(1A):279-82.

312. Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, Grund D, Hemminger G, Muller V, et al. Expression and prognostic relevance of activated extracellular-regulated kinases (ERK1/2) in breast cancer. *British journal of cancer*. 2005;92(12):2206-15.
313. Bartholomeusz C, Gonzalez-Angulo AM, Liu P, Hayashi N, Lluch A, Ferrer-Lozano J, et al. High ERK protein expression levels correlate with shorter survival in triple-negative breast cancer patients. *The oncologist*. 2012;17(6):766-74.
314. Eccles SA. Differentiation and neoplasia. Invasion and metastasis; experimental systems. *The Journal of pathology*. 1983;141(3):333-53.
315. Herrera-Gayol A, Royal A, Babai F. Correlation between cell differentiation stage, types of invasion, and hematogenous metastasis in experimental rhabdomyosarcomas. *Experimental and molecular pathology*. 1995;63(1):1-15.
316. Dillon RL, Muller WJ. Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. *Cancer research*. 2010;70(11):4260-4.
317. Cybulski N, Polak P, Auwerx J, Ruegg MA, Hall MN. mTOR complex 2 in adipose tissue negatively controls whole-body growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(24):9902-7.
318. Bi L, Chiang JY, Ding WX, Dunn W, Roberts B, Li T. Saturated fatty acids activate ERK signaling to downregulate hepatic sortilin 1 in obese and diabetic mice. *Journal of lipid research*. 2013;54(10):2754-62.
319. Coll T, Jove M, Rodriguez-Calvo R, Eyre E, Palomer X, Sanchez RM, et al. Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *Diabetes*. 2006;55(10):2779-87.
320. Brown JM, Boysen MS, Chung S, Fabiyi O, Morrison RF, Mandrup S, et al. Conjugated linoleic acid induces human adipocyte delipidation: autocrine/paracrine regulation of MEK/ERK signaling by adipocytokines. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(25):26735-47.
321. Passos JF, Saretzki G, von Zglinicki T. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic acids research*. 2007;35(22):7505-13.
322. Osterod M, Hollenbach S, Hengstler JG, Barnes DE, Lindahl T, Epe B. Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice. *Carcinogenesis*. 2001;22(9):1459-63.
323. Lans H, Vermeulen W. Tissue specific response to DNA damage: *C. elegans* as role model. *DNA repair*. 2015;32:141-8.
324. Canela A, Vera E, Klatt P, Blasco MA. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(13):5300-5.
325. Walter M. Interrelationships among HDL metabolism, aging, and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(9):1244-50.
326. Fay MP, Freedman LS, Clifford CK, Midthune DN. Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer research*. 1997;57(18):3979-88.
327. Hilakivi-Clarke L, Onojafe I, Raygada M, Cho E, Clarke R, Lippman ME. Breast cancer risk in rats fed a diet high in n-6 polyunsaturated fatty acids during pregnancy. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996;88(24):1821-7.

328. Ermolaeva MA, Schumacher B. Systemic DNA damage responses: organismal adaptations to genome instability. *Trends in genetics : TIG*. 2014;30(3):95-102.
329. Maher B. Personal genomes: The case of the missing heritability. *Nature*. 2008;456(7218):18-21.
330. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009;461(7265):747-53.
331. Zuk O, Hechter E, Sunyaev SR, Lander ES. The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(4):1193-8.
332. Yang N, Liu C, Peck AR, Girono MA, Yanac AF, Tran TH, et al. Prolactin-Stat5 signaling in breast cancer is potently disrupted by acidosis within the tumor microenvironment. *Breast cancer research : BCR*. 2013;15(5):R73.
333. Svenson U, Nordfjall K, Stegmayr B, Manjer J, Nilsson P, Tavelin B, et al. Breast cancer survival is associated with telomere length in peripheral blood cells. *Cancer research*. 2008;68(10):3618-23.
334. Wentzensen IM, Mirabello L, Pfeiffer RM, Savage SA. The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2011;20(6):1238-50.
335. Crawley DJ, Holmberg L, Melvin JC, Loda M, Chowdhury S, Rudman SM, et al. Serum glucose and risk of cancer: a meta-analysis. *BMC cancer*. 2014;14:985.
336. Boyle P, Koechlin A, Pizot C, Boniol M, Robertson C, Mullie P, et al. Blood glucose concentrations and breast cancer risk in women without diabetes: a meta-analysis. *European journal of nutrition*. 2013;52(5):1533-40.
337. Young CD, Nolte EC, Lewis A, Serkova NJ, Anderson SM. Activated Akt1 accelerates MMTV-c-ErbB2 mammary tumorigenesis in mice without activation of ErbB3. *Breast cancer research : BCR*. 2008;10(4):R70.
338. Saadatian-Elahi M, Toniolo P, Ferrari P, Goudable J, Akhmedkhanov A, Zeleniuch-Jacquotte A, et al. Serum fatty acids and risk of breast cancer in a nested case-control study of the New York University Women's Health Study. *IARC scientific publications*. 2002;156:227-30.
339. Hubbard NE, Lim D, Erickson KL. Conjugated linoleic acid alters matrix metalloproteinases of metastatic mouse mammary tumor cells. *The Journal of nutrition*. 2007;137(6):1423-9.
340. Vatten LJ, Bjerve KS, Andersen A, Jellum E. Polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids and risk of breast cancer: a case-control study from the Janus serum bank in Norway. *European journal of cancer*. 1993;29A(4):532-8.
341. Barbagallo M, Belvedere M, Dominguez LJ. Magnesium homeostasis and aging. *Magnesium research : official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium*. 2009;22(4):235-46.
342. Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Holli K, Collins C, Kowbel D, et al. Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: prognostic implications. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1995;1(12):1455-61.

343. Zhao C, Yasui K, Lee CJ, Kurioka H, Hosokawa Y, Oka T, et al. Elevated expression levels of NCOA3, TOP1, and TFAP2C in breast tumors as predictors of poor prognosis. *Cancer*. 2003;98(1):18-23.
344. Florez JC, Agapakis CM, Burt NP, Sun M, Almgren P, Rastam L, et al. Association testing of the protein tyrosine phosphatase 1B gene (PTPN1) with type 2 diabetes in 7,883 people. *Diabetes*. 2005;54(6):1884-91.
345. Olivier M, Hsiung CA, Chuang LM, Ho LT, Ting CT, Bustos VI, et al. Single nucleotide polymorphisms in protein tyrosine phosphatase 1beta (PTPN1) are associated with essential hypertension and obesity. *Human molecular genetics*. 2004;13(17):1885-92.
346. Wiener JR, Kerns BJ, Harvey EL, Conaway MR, Iglehart JD, Berchuck A, et al. Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994;86(5):372-8.
347. Bentires-Alj M, Neel BG. Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer. *Cancer research*. 2007;67(6):2420-4.
348. Csoka AB, English SB, Simkevich CP, Ginzinger DG, Butte AJ, Schatten GP, et al. Genome-scale expression profiling of Hutchinson-Gilford progeria syndrome reveals widespread transcriptional misregulation leading to mesodermal/mesenchymal defects and accelerated atherosclerosis. *Aging cell*. 2004;3(4):235-43.
349. Woodfield GW, Horan AD, Chen Y, Weigel RJ. TFAP2C controls hormone response in breast cancer cells through multiple pathways of estrogen signaling. *Cancer research*. 2007;67(18):8439-43.
350. Alarmo EL, Parssinen J, Ketolainen JM, Savinainen K, Karhu R, Kallioniemi A. BMP7 influences proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells. *Cancer letters*. 2009;275(1):35-43.
351. Buijs JT, Henriquez NV, van Overveld PG, van der Horst G, Que I, Schwaninger R, et al. Bone morphogenetic protein 7 in the development and treatment of bone metastases from breast cancer. *Cancer research*. 2007;67(18):8742-51.
352. Martin LJ, Blangero J, Rogers J, Mahaney MC, Hixson JE, Carey KD, et al. A quantitative trait locus influencing estrogen levels maps to a region homologous to human chromosome 20. *Physiological genomics*. 2001;5(2):75-80.
353. Lee YS, Poh LK, Loke KY. A novel melanocortin 3 receptor gene (MC3R) mutation associated with severe obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(3):1423-6.
354. Beale EG, Hammer RE, Antoine B, Forest C. Disregulated glyceroneogenesis: PCK1 as a candidate diabetes and obesity gene. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2004;15(3):129-35.
355. Beale EG, Harvey BJ, Forest C. PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes. *Cell biochemistry and biophysics*. 2007;48(2-3):89-95.
356. Wiesmann F, Veeck J, Galm O, Hartmann A, Esteller M, Knuchel R, et al. Frequent loss of endothelin-3 (EDN3) expression due to epigenetic inactivation in human breast cancer. *Breast cancer research* : 2009;11(3):R34.
357. Chiu CL, Jackson KL, Hearn NL, Steiner N, Head GA, Lind JM. Identification of genes with altered expression in male and female Schlager hypertensive mice. *BMC medical genetics*. 2014;15:101.

358. Shann YJ, Cheng C, Chiao CH, Chen DT, Li PH, Hsu MT. Genome-wide mapping and characterization of hypomethylated sites in human tissues and breast cancer cell lines. *Genome research*. 2008;18(5):791-801.
359. Krishnan V, Liu B, Zhou Z. 'Relax and Repair' to restrain aging. *Aging*. 2011;3(10):943-54.

