



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA - CSIC**

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN DE DETERMINANTES GENÉTICOS Y  
MOLECULARES ASOCIADOS A LOS MIRNAS EN LA  
VARIABILIDAD DE LA EVOLUCIÓN Y RESPUESTA AL  
TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA**

JULIE MILENA GALVIS JIMÉNEZ

Salamanca, 2020

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

MARINA HOLGADO MADRUGA, Profesor Titular en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca

ADRIAN BLANCO GÓMEZ, Postdoctoral Researcher. CRUK Manchester Institute

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo titulado **“IDENTIFICACIÓN DE DETERMINANTES GENÉTICOS Y MOLECULARES ASOCIADOS A LOS MIRNAS EN LA VARIABILIDAD DE LA EVOLUCIÓN Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA”**, que presenta la doctorando D. Julie Milena Galvis Jiménez, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca, y reúne, a su juicio, las condiciones de originalidad y rigor científico necesarias para ser presentado ante el correspondiente Tribunal y optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a 26 de octubre de 2020.

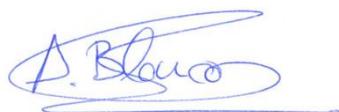
Fdo.:



Dr. Jesús Pérez Losada



Dra. Marina Holgado Madruga



Dr. Adrian Blanco Gómez

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

Durante el transcurso de este trabajo, he sido beneficiaria del programa de Becas Internacionales de Doctorado del Banco Santander y la Universidad de Salamanca durante los periodos 2016/2017 al 2019/2020



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero en este momento dar gracias a Dios por su gracias, por ser quien hizo posible todas las cosas, por cada una de las personas que ha puesto en mi camino y que de una u otra manera han participado dando un aporte importante para que este trabajo se llevara a cabo.

A mis tres directores de tesis, el Dr. Jesús Pérez Losada quien desde el primer instante que me comuniqué con él me brindó su apoyo, y me permitió formar parte de su equipo de trabajo. Admiro su carisma y su don de gente que hizo que me sentiera muy bien y que a pesar de la distancia de mi país y de las diversas situaciones que tuve que vivir, su apoyo y sus palabras siempre estuvieron presentes en el momento preciso. Gracias Jesús por enseñarme tantas cosas de la ciencia y de la vida misma.

A la Dra. Marina Holgado, por haber llegado a formar parte de este proyecto en el momento preciso, gracias por ser esa persona que le dio un impulso a las nuevas etapas que fueron surgiendo para desarrollo de este trabajo.

A el Dr. Adrian Blanco por enseñarnos el cuidado, la precisión y el buen juicio del proceso de investigación. Gracias por cada vez que dejaste de lado tu ordenador para prestarme atención. Sé que te molesté mucho jefe.

A cada uno de mis compañeros del Laboratorio 7, a Aurora por haberme recibido con una sonrisa desde el primer día, por todos los cafés y una que otra lágrima compartida. A Roberto por su personalidad, por la energía que infundía cada día. A Natalia por su serenidad y la atención que siempre prestaba ante las situaciones diarias. A Isa y Marina por ser ese apoyo vital en las actividades del animalario. A Javier Cañueto por mostrarnos la parte más clínica de los miRNAs y por su risa contagiosa.

A Marina Mendiburu por su valioso trabajo, por toda la dedicación en el asesoramiento y análisis estadístico de este trabajo. A Carlos Prieto del departamento de Bioinformática y a Diego Alonso por su colaboración en el análisis de los resultados.

A los Dres. Juan Luis García y Manuel Sánchez por su aporte científico y la buena energía que siempre tenían. Al Dr. Dionisio Martín Zanca por sus aportes y su amabilidad desde el primer momento que le conocí. Al Dr. Javier García Criado y a la Dra. Begoña García Cenador del Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, por su valioso aporte en el asesoramiento durante la cirugía de los ratones utilizados en este estudio.

A la Dra. Carolina Wiesner del Instituto Nacional de Cancerología de Colombia, gracias por creer en mi, por su apoyo durante el tiempo que estuve fuera de Colombia y ahora que he vuelto a casa.

Al Dr. Isidro Sánchez y a su equipo de trabajo del laboratorio 13, Carolina, Inés, Ana y Javier y a aquellos que ya no están Idoia, Alberto, Guille, Ana y Xiomara, por cada uno de los momentos que se compartieron en los seminarios.

A los integrantes del laboratorio 9, Natalia, Laura, Yazmín y Fernandito por los buenos momentos compartidos, valoro mucho su presencia en mi vida.

Expreso mi agradecimiento a Ana y Ángel del Servicio de Citometría por todas las jornadas que estuvieron allí dando lo mejor de si para con mis ensayos. A la Dra. Carmen Macías del Servicio de Patología Molecular Comparada por su carisma, por el aporte científico y personal que siempre tuvo para conmigo y a su gran equipo de trabajo. Y también quiero dar las gracias a todo el personal de los servicios del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca que de una u otra manera están presentes en este trabajo.

Finalmente quiero dar las gracias a mi familia, por apoyarme, por estar presente en todos los momentos, por todos los viajes que hicieron para visitarme durante estos años. Gracias papi y mami por ser los mejores padres y abuelos, por enseñarme a volar, por creer en mi y apoyarme en todo, por el esfuerzo que hicieron en esta parte final de la tesis para que la pudiera culminar, por su tiempo, por sus oraciones y su amor inigualable. Gracias a mis hermanas Andrea y Lorena porque ante cada situación ellas estuvieron presentes de forma literal, gracias por su ayuda en cada fase de esta tesis. A David, porque es como un hermano que la vida me ha dado, y junto a Andrea me apoyaron en los momentos difíciles de la escritura.

Gracias a quienes fueron unos segundos padres aquí, Germán Gutierrez y Rocío Guarrín, y a sus hijos, gracias por acogernos en su hogar las primeras semanas, por las oraciones y los consejos para nosotros.

Al regalo que Dios me dio en España, mi hermosa Antonella, gracias por estar siempre conmigo, por enseñarme a ser valiente, porque tu eres mas fuerte que yo y te acoplas mejor que nadie a cada situación nueva que se presenta, desde que entraste al jardín siendo aún tan pequeña, has sido la mejor. A Jean porque desde el principio Dios tuvo un propósito contigo y lo cumplirá.

# Contenido

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
1. CANCER DE MAMA.....	9
1.1 LA MAMA NORMAL.....	9
1.2 CÁNCER DE MAMA.....	11
1.2.1 Estadificación.....	11
Estadio 0 (carcinoma in situ).....	12
Estadio I.....	12
Estadio IIA.....	12
Estadio IIB.....	12
Estadio IIIA.....	13
Estadio IIIB.....	13
Estadio IIIC.....	13
Estadio IV.....	14
1.2.2 Características histopatológicas y clasificación.....	14
1.2.3 Características genéticas, biológicas y moleculares.....	15
1.2.3.1 Receptores de estrógenos y progesterona.....	16
1.2.3.2 Receptor de andrógenos (AR).....	18
1.2.3.3 Receptores de factores de crecimiento.....	19
EGFR.....	21
HER2.....	22
VEGFR.....	22
PDGFR.....	23
FGFR.....	23
1.2.3.4 Proliferación.....	23
1.2.3.5 Expresión de genes implicados en la clasificación, evolución y pronóstico.....	24

1.3 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA .....	29
1.3.1 Factores de riesgo.....	30
1.3.1.1 Factores genéticos.....	31
Penetrancia de genes de susceptibilidad. ....	31
1.3.1.2 Factores hormonales .....	38
Obesidad.....	41
Edad avanzada .....	42
Consumo de alcohol .....	43
Hormonas exógenas .....	43
1.4 DIAGNÓSTICO.....	44
1.4.1 Marcadores Tumorales.....	44
Características que debe tener un marcador sérico.....	45
1.5 Tratamiento farmacológico del cáncer de mama.....	45
1.5.1 Terapia hormonal .....	45
1.5.2 Quimioterapia con agentes citotóxicos .....	46
1.5.3 Terapias dirigidas .....	47
1.6 MICRORNAs .....	49
1.6.1 Procesamiento de los miRNA.....	50
1.6.2 Mecanismos de acción .....	51
1.6.3 Participación de los miRNA en el cáncer .....	53
1.6.3.1 Mecanismos que alteran los niveles de expresión de los miRNAs ....	53
Amplificación o deleción.....	53
Mecanismos epigenéticos, metilación .....	54
Polimorfismos presentes en miRNAs .....	54
Polimorfismos en los sitios de unión con la diana del miRNA.....	54
1.6.4 Participación de los miRNAs en el desarrollo del cáncer de mama .....	55
Familia Let.....	57
miRNA-21 .....	57

miRNA-200b .....	58
miRNA-128 .....	59
miRNA-130 .....	59
miRNA-152 .....	59
miRNA-125b .....	60
miRNA-100 .....	60
miRNA-214 .....	61
miRNA-34a .....	61
miRNA-374 .....	62
miRNA-497 .....	62
miRNA-210 .....	63
miRNA-29b .....	63
miRNA-451 .....	64
1.6.5. miRNAs extracelulares como marcadores tumorales .....	64
1.6.5.1 miRNAs circulantes.....	65
1.6.6 miRNAs y resistencia al tratamiento en cáncer de mama .....	67
Resistencia a la quimioterapia .....	67
Resistencia a la radioterapia.....	67
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>69</b>
HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	70
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>73</b>
1. MODELO EXPERIMENTAL.....	74
1.1 Cepas de ratón .....	74
1.2 Generación de la primera cohorte con heterogeneidad genética y fenotípica mediante retrocruce o backcross .....	75
1.3 Aoinjerto de tumores generados en la cohorte F1BX1 en receptores F1.....	76
1.4 Generación de la segunda cohorte con heterogeneidad genética y fenotípica limitadas mediante retrocruce o backcross .....	78

2. EVALUACIÓN DE LOS PATOFENOTIPOS RELACIONADOS CON EL COMPORTAMIENTO CLÍNICO EL CÁNCER DE MAMA .....	78
2.1 <i>Determinación de los patofenotipos en condiciones de libre evolución de la enfermedad</i> .....	79
2.2 <i>Caracterización de la respuesta al tratamiento</i> .....	80
2.2.1 Administración de quimioterapia.....	80
2.2.1.1 Grupos de tratamiento .....	80
2.2.1.2 Protocolo de tratamiento .....	81
2.2.2 Determinación de los fenotipos de respuesta al tratamiento.....	81
3. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS TUMORALES .....	84
3.1 <i>Cirugía y obtención de biopsia tumoral</i> .....	84
3.2 <i>Necropsia</i> .....	85
3.3 <i>Procesamiento de los tumores de mama</i> .....	85
4. PROTOCOLOS GENERALES.....	86
4.1 <i>Extracción de DNA de tejidos</i> .....	86
4.2 <i>Extracción de RNA de tumores</i> .....	87
4.3 <i>Cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos</i> .....	88
4.4 <i>Extracción de proteínas de los tumores</i> .....	88
4.5 <i>Cuantificación de la concentración de proteínas</i> .....	88
4.6 <i>Cuantificación de la expresión de microRNAs mediante PCR cuantitativa</i> .....	89
4.6.1 Síntesis de cDNA .....	90
4.6.1.1 Reacción de poliadenilación .....	90
4.6.1.2 Reacción de ligación.....	91
4.6.1.3 Reacción de transcripción inversa o reversa (RT).....	92
4.6.2 Reacción de pre-amplificación.....	92
4.6.3 Reacción de Q-PCR.....	93
4.6.3.1 Sistema Fluidigm de Q-PCR .....	95
4.6.3.2 Análisis de la QCR.....	96
4.7 <i>Array microRNAs</i> .....	97

<i>4.8 Material y métodos utilizados para la determinación del papel de let-7b-5p en la respuesta al tratamiento con Doxorubicina</i> .....	97
4.8.1 Cultivo celular.....	97
4.8.2 Transfección.....	98
4.8.3 Concentración inhibitoria (IC50) para el tratamiento con doxorubicina .	100
4.8.4 Ensayo de MTT .....	100
4.8.5 Ensayo de senescencia.....	101
4.8.7 Detección de la apoptosis .....	102
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	103
5.1 <i>Análisis de las variables</i> .....	103
5.2 <i>Análisis de LiGamiento genético</i> .....	103
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>137</b>
CONCLUSIONS .....	108
<i>Primera</i> .....	108
<i>Segunda</i> .....	108
<i>Tercera</i> .....	108
<i>Cuarta</i> .....	108
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>109</b>

# INTRODUCCIÓN

# 1. CANCER DE MAMA

## 1.1 LA MAMA NORMAL

La mama madura es un órgano compuesto por una parte de tejido epitelial glandular exocrino, de estructura túbulo-alveolar dispuesta en, aproximadamente, 15 a 20 lóbulos separados por un componente de tejido conectivo. Cada lóbulo secreta sus productos a un sistema de conductos intralobulares e interlobulares, formados por un epitelio cúbico biestratificado. Estos drenan finalmente hacia conductos galactóforos extralobulares, los cuales a su vez terminan en el pezón, el cual se encuentra revestido por tejido escamoso que se extiende hacia la superficie.

La glándula mamaria está compuesta por un parénquima, conformado a su vez, por alvéolos y conductos y por un estroma. Cada célula alveolar se comporta como una unidad de secreción, de modo que produce leche completa, mediante la síntesis y transporte de sustancias como proteínas, grasas, hidratos de carbonos, sales, anticuerpos y agua desde el plasma sanguíneo hasta los conductos excretores (Valdés *et al.*, 1994).

El desarrollo embrionario glandular de la mama se inicia entre las semanas 18 y 19 de la vida prenatal, cuando las yemas mamarias epidérmicas invaden el mesénquima subepidérmico en la región anterior del tórax y parte del mesénquima se introduce bajo la dermis para formar un cojinete graso. En forma simultánea, se originan los conductos, que se extienden y ramifican para formar un sistema ductal rudimentario (Neville, 1999). En el período prepuberal, las vesículas mamarias se transforman en conductos, pero aún no hay alvéolos. Con el inicio de la pubertad, comienza a funcionar el eje endocrino hipotálamo-hipófisis-ovario, de modo que la creciente producción de estrógenos por parte de los folículos ováricos, en conjunto con la hormona hipofisiaria de crecimiento (GH), estimulan el crecimiento, tanto del tejido glandular como del estroma que lo rodea. Al comenzar los ciclos ovulatorios, se inicia la producción cíclica de progesterona que, sumándose a los estrógenos, determina un nuevo crecimiento de la glándula con formación de los primeros alvéolos (Ceriani, 1970; Valdés *et al.*, 1994; Russo y Russo 2004).

Durante el ciclo ovárico ocurren cambios hormonales: mientras los estrógenos en la fase folicular estimulan el desarrollo del parénquima y la ramificación de los conductos, durante la fase lútea la progesterona estimula la diferenciación de células alveolares y la dilatación de los conductos.

Durante el embarazo, en las glándulas mamarias de la madre se activa un proceso de diferenciación lobular, que da origen a la transición progresiva de lóbulos de tipo 1 a tipos 2, 3 y 4, y se acompaña de alta actividad proliferativa. De esta manera, se adquiere la masa celular necesaria para la función de secreción de leche. Debido a esto, la presencia de lóbulos de tipo 4 es la máxima expresión de desarrollo y diferenciación funcional de la glándula adulta, mientras que la presencia de lóbulos de tipo 3 puede indicar que la glándula ya se desarrolló.

El desarrollo de la glándula mamaria durante la gestación comprende dos fases importantes: en la fase temprana, ocurre la proliferación del árbol ductal y se forman los alvéolos, dentro de los lóbulos denominados tipo 3 y 4. Durante esta fase, las mamas aumentan de tamaño y las venas superficiales de la glándula mamaria se dilatan. La formación progresiva de alvéolos continúa hasta después de la semana 20, momento en el cual la proliferación se reduce al mínimo, para dar comienzo a la actividad secretora. Las células mioepiteliales perialveolares se alargan y adquieren una forma más estrecha (Valdés *et al.*, 1994) y cada una de las células que constituyen los alvéolos adquieren la capacidad para producir leche completa.

Durante la lactancia, los únicos cambios morfológicos notables son la dilatación de los alveolos y el aumento consecuente en el tamaño de los lóbulos. Una vez sintetizada la leche, se libera en la luz de los alvéolos y en el sistema ductal (Russo *et al.*, 1987). Cuando la madre desteta al bebé, la leche se acumula, tanto en la luz ducto-alveolar como en el citoplasma de las propias células secretoras, evento que tiene el efecto de inhibir la síntesis lactogénica. En forma simultánea el volumen de las células secretoras se reduce y disminuye su actividad secretora.

Este proceso de involución puede obedecer a mecanismos de autólisis celular, con estrechamiento del sistema ductal e infiltración de fagocitos en los lóbulos en desintegración, después del cual ocurre regeneración del tejido conectivo periductal y lobular y proliferación de los túbulos terminales. Es por esta razón que las mujeres que han sido gestantes poseen mayor cantidad de tejido glandular, que aquellas que no han gestado y/o lactado (Russo y Russo 2004).

En la menopausia ocurre una regresión del tejido mamario, tanto en mujeres nulíparas como multíparas, y se observa un incremento en los lóbulos de tipo 1 y una disminución en los lóbulos de tipos 2 y 3; sin embargo, la clave para el entendimiento de la aparición de neoplasias mamarias radica en los sucesos que ocurren en años previos al inicio de la menopausia. En las mujeres nulíparas, predominan los lóbulos de tipo 1 (65-80%),

tipo 2 (10-35%) y, en menor medida, los de tipo 3 (0-5%), mientras que en las multíparas predomina los de tipo 3 (70-90%) (Russo y Russo, 2004).

Después de la menopausia disminuye el número de lóbulos, en especial de tipos 2 y 3. Debido que el cáncer de mama ductal se origina en los lóbulos de tipo 1, las mujeres nulíparas tienen un riesgo elevado de desarrollar cáncer de mama, mientras que mujeres que han tenido hijos permanecen protegidas. Esta observación surge del hecho de que en las mujeres con hijos sus lóbulos son sometidos a diferenciación, mientras que las nulíparas rara vez alcanzan a desarrollar lóbulos de tipo 3. Esto indica que, aunque en ambos grupos de mujeres predomina los lóbulos de tipo 1 durante la menopausia, es posible que las nulíparas sean más susceptibles de sufrir transformación tumoral (Russo *et al.*, 2000).

Se ha propuesto que la aparición del cáncer de mama en mujeres con hijos pudiera ocurrir debido a la falta de respuesta del tejido lobular a las condiciones hormonales propias del embarazo y lactancia, lo que hace que no se diferencien completamente y conserven la estructura lobular de las mujeres nulíparas, lo que aumentaría el riesgo de carcinogénesis. Este hecho es de gran importancia para conocer la posible respuesta del tejido glandular mamario a la quimioterapia y la quimiopprofilaxis (Russo y Russo, 2004).

## 1.2 CÁNCER DE MAMA

El *National Cancer Institute* de Estados Unidos define el cáncer de mama como aquella lesión tumoral que se forma en los tejidos de la mama, por lo general en los conductos (tubos que llevan la leche al pezón) y los lobulillos (glándulas que producen la leche). Ocurre tanto en hombres como mujeres, aunque el cáncer de mama masculino es raro. Encontrándose el mayor número de casos en mujeres mayores de 45 años. En los Estados Unidos en el año 2019, el número de casos nuevos de cáncer de mama fue 268.600 y el número de defunciones fue de 41.760 (*National Cancer Institute*, 2019).

### 1.2.1 Estadificación

De acuerdo con lo publicado por la Sociedad Española de Oncología Médica, el cáncer de mama se clasifica en los siguientes estadios, considerando la clasificación TNM (Tumor-Nódulo-Metástasis) (SEOM, 2017).

### **Estadio 0 (carcinoma in situ)**

El carcinoma *in situ* es una lesión tumoral localizada en el epitelio que no ha roto la membrana basal. Hay dos tipos de carcinoma de mama *in situ*:

Carcinoma ductal *in situ* (CDIS): es una afección no invasora en la que se encuentran células anormales en el revestimiento del conducto de la mama. Las células anómalas no se diseminan fuera de este conducto hasta otros tejidos de la glándula. Algunas veces, el CDIS se puede volver cáncer invasor y diseminarse hasta otros tejidos, aunque por el momento no se sabe cómo predecir qué lesiones se volverán invasoras.

Carcinoma lobular *in situ* (CLIS): afección en la que se encuentran células anormales en los lóbulos de la mama. Muy raras veces esta afección se transforma en cáncer invasor; sin embargo, el padecer de carcinoma lobular *in situ* en una mama aumenta el riesgo de padecer un cáncer de mama en cualquier de las dos mamas.

### **Estadio I**

En el estadio I, el cáncer se ha formado. El tumor mide dos centímetros o menos y no se ha diseminado fuera de la mama.

### **Estadio IIA**

- El tumor mide dos centímetros o menos y está diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares; o
- El tumor mide más de dos centímetros, pero no más de cinco centímetros y no se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares.

### **Estadio IIB**

En el estadio IIB, el tumor tiene alguna de las siguientes características:

- Mide más de dos centímetros, pero no más de cinco centímetros y se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares; o
- Mide más de cinco centímetros, pero no se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares.

### **Estadio IIIA**

- El cáncer se encuentra en los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras estructuras; o se puede encontrar en los ganglios linfáticos cercanos al esternón; o
- El tumor mide dos centímetros o menos. El cáncer se diseminó hasta los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras estructuras, o el cáncer se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón; o
- El tumor mide más de dos centímetros, pero no más de cinco centímetros. El cáncer se diseminó hasta los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras estructuras, o el cáncer se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón.
- El tumor mide más de cinco centímetros. El cáncer se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras estructuras, o el cáncer se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón.

### **Estadio IIIB**

En el estadio IIIB, el tumor puede tener cualquier tamaño y el cáncer:

- Se ha diseminado a la pared del pecho o a la piel de la mama; o
- Se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras estructuras, o el cáncer se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón. El cáncer que ha diseminado hasta la piel de la mama se llama cáncer de mama inflamatorio.

### **Estadio IIIC**

En el estadio IIIC, puede no haber signos de cáncer en la mama o el tumor puede tener cualquier tamaño y se puede haber diseminado hasta la pared del pecho o a la piel de la mama. Así mismo, el cáncer:

- Se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos por arriba o debajo de la clavícula.
- Se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares o hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón.

El cáncer de mama en estadio IIIC se divide en estadio IIIC operable y estadio IIIC inoperable.

En el estadio IIIC operable, el cáncer:

- Se encuentra en 10 o más ganglios linfáticos axilares; o
- Se encuentra en los ganglios linfáticos debajo de la clavícula; o
- Se encuentra en ganglios linfáticos axilares y en los ganglios linfáticos cercanos al esternón.

En el estadio IIIC no operable del cáncer de mama, éste se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos por encima de la clavícula.

#### **Estadio IV**

En el estadio IV, el cáncer se ha diseminado hasta otros órganos del cuerpo, con mayor frecuencia hasta los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro.

De acuerdo con estudios realizados, el 40,5% de los casos recién diagnosticados, consultaron en estadios mayores al IIB, de acuerdo con la clasificación TNM basada en la descripción del tumor primario, la invasión de ganglios regionales y la presencia de metástasis (Piñeros *et al.*, 2004).

#### **1.2.2 Características histopatológicas y clasificación**

El pronóstico de una paciente con cáncer de mama se basa en dos grupos distintos de variables. Las primeras son variables dependientes del tiempo que influyen en el estadio del tumor, como el tamaño, la presencia y extensión de la enfermedad metastásica en los ganglios linfáticos y la presencia de enfermedad metastásica sistémica. El segundo grupo de variables, a veces denominadas características intrínsecas, está relacionado con la biología inherente del tumor individual e incluye el grado histológico, el tipo de tumor, la fracción de crecimiento, el grado de expresión de receptores de las hormonas (estrógenos, progesterona y, más recientemente, andrógenos) y HER2/ERBB2/NEU, el factor de crecimiento y otras características genéticas y moleculares.

El grado histológico es un importante factor pronóstico que permite clasificar los carcinomas de mama invasivos basándose en la evaluación de múltiples variables celulares y arquitectónicas del tejido y de variables nucleares. Los primeros sistemas, además de una evaluación histológica subjetiva, carecían de criterios escritos estrictamente definidos (Patey y Scarff, 1928; Bloom y Richardson, 1957). Se observó que el método de

Elston y Ellis (1991) era reproducible (Dalton *et al.*, 1994; Frierson *et al.*, 1995; Robbins *et al.*, 1995) y fue adoptado internacionalmente como el método estándar de evaluación histopatológica del cáncer de mama (NHSBSP, 2005; Perry *et al.*, 2006; Lakhani *et al.*, 2012). Este método evalúa tres características principales del tumor: grado de formación de túbulos como expresión de diferenciación glandular, presencia de pleomorfismo nuclear (núcleos con diferentes formas) y recuento del número de células en mitosis. Después de evaluar cada factor individualmente, un sistema de puntuación numérico asigna una calificación y clasificación tumoral en función del grado de diferenciación, de la siguiente manera:

- Grado 1: bien diferenciado; 3-5 puntos.
- Grado 2: moderadamente diferenciado; 6–7 puntos.
- Grado 3: pobremente diferenciado; 8–9 puntos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido 21 tipos histológicos de cáncer de mama, basándose únicamente en la histomorfología y los patrones de crecimiento (Dieci, 2014). Hay dos grandes categorías, el carcinoma *in situ* y el carcinoma invasivo. Dentro del primero, ya hemos indicado que hay que distinguir entre el carcinoma ductal *in situ* (DCIS) y el carcinoma lobular *in situ* (LCIS). Ambos se diferencian por los patrones de crecimiento y las características citológicas; además, el DCIS se caracteriza por la arquitectura de la lesión (Malhotra, 2010).

El carcinoma ductal infiltrante (IDC), se clasifica en grados tumorales (bien, moderada y pobremente diferenciado) según el índice mitótico, la formación de túbulos y el polimorfismo o pleomorfismo nuclear, lo que ayuda a definir el pronóstico (Dieci, 2014; Mueller, 2018).

El carcinoma ductal infiltrante, representa el 70–80% de los tumores de mama invasivos femeninos. Este subtipo representa la mayoría de los casos de cáncer de mama observados en las cohortes del *Consortio Internacional de Taxonomía Molecular del Cáncer de Mama* (METABRIC) (Curtis, 2012; Miliolo, 2015). Existen otros subtipos más raros que se revisan en otra parte (Weigelt, 2010).

### **1.2.3 Características genéticas, biológicas y moleculares**

Los carcinomas de mama invasivos se caracterizan por varias alteraciones moleculares. Algunas de éstas están relacionadas con la supervivencia y forman parte de patrones

moleculares específicos o que al menos se expresarían de forma predominante en el tumor. Ello ha sugerido la posibilidad de desarrollar terapias dirigidas hacia esas moléculas, y, en algunos casos, así ha sido, como con los tumores HER2-positivos (IARC, *Breast cancer screening*, 2014).

La biología mamaria molecular es compleja, pero ofrece la oportunidad de buscar biomarcadores que puedan diferenciar entre tumores que vayan a tener un crecimiento indolente o agresivo; así como predecir la respuesta al tratamiento.

Tradicionalmente, los tumores de mama se han clasificado según la expresión molecular de una serie de marcadores detectados por inmunohistoquímica (IHC); incluidos marcadores de proliferación (Ki-67), receptores hormonales, como el receptor de estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ), el de progesterona (PR) y el de andrógenos (AR)); la expresión de HER2/ERBB2/NEU; así como la presencia/ausencia de citoqueratinas específicas (CK) (Weigelt, 2010; Hill, 2017).

### **1.2.3.1 Receptores de estrógenos y progesterona**

Los receptores de estrógeno ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ ) son factores de transcripción activados por ligandos que desempeñan diferentes funciones en la regulación génica y muestran patrones de distribución tisular específicos.  $ER\alpha$  funciona como un receptor dependiente de ligando, los estrógenos (González, 2019), que promueve la proliferación celular; mientras que  $ER\beta$  puede antagonizar a  $ER\alpha$  (Powell, 2012).

La fosforilación del  $ER\alpha$  en los aminoácidos Ser118 y Ser167 da como resultado una mayor actividad transcripcional global, y su fosforilación en el residuo Ser305 se asocia, de forma específica, a una mayor transcripción de la ciclina D1 (Arpino, 2008).

El  $ER\beta$  a diferencia del  $ER\alpha$  oncogénico, actúa como oncosupresor en varios casos (Nelson, 2017), disminuye la proliferación celular inducida por el  $ER\alpha$ , aumenta la apoptosis e invierte la activación transcripcional y la represión por el  $ER\alpha$ . Además,  $ER\beta$  interactúa físicamente con p53, reduce la unión de  $ER\alpha$ -p53 y antagoniza la regulación transcripcional mediada por  $ER\alpha$ -p53. El  $ER\alpha$  dirige el ensamblaje de heterocromatina de trimetilación lys9 de SUV39H1/H2 e histona H3 (H3K9me3) en genes reprimidos por estrógenos para silenciar la transcripción activada por p53. La co-presencia del  $ER\beta$  en células  $ER\alpha$  positivas anula la conformación de heterocromatina represiva H3K9me3 regulando negativamente SUV39H1 y SUV39H2, liberando así el bloqueo transcripcional inducido por  $ER\alpha$  (Lu, 2017). Sin embargo, el papel exacto de  $ER\beta$  en la carcinogénesis y la progresión tumoral aún no se comprende completamente (Sellitto, 2020).

Como se describió anteriormente, los estrógenos actúan como un mitógeno importante, y la expresión de su receptor (ER) en el tumor está asociada con la respuesta a la terapia hormonal (Osborne, 1998; Bundred, 2001; Isaacs *et al.*, 2001; Ali y Coombes, 2002; Davies *et al.*, 2011). Los moduladores selectivos del receptor de estrógenos (tamoxifeno y raloxifeno) utilizados en la terapia, exhiben actividad agonista y antagonista sobre el ER. (Nelson, 2017). Así, los tumores ER-positivos tienen un pronóstico inicial más favorable que los tumores ER-negativos (Ali y Coombes, 2002). El ER se expresa en, aproximadamente, el 80% de los tumores de mama invasivos.

En cuanto al receptor de progesterona (PR) es un regulador clave en los tejidos reproductivos femeninos que controla los procesos de desarrollo y la proliferación y diferenciación durante el ciclo reproductivo y el embarazo (Proietti, 2017). La hormona esteroidea ovárica Progesterona y su receptor nuclear, el PR, desempeñan un papel fundamental en estos procesos de regulación de la proliferación y diferenciación celular en la glándula mamaria (Cenciarini, 2019), así como en la progresión del cáncer de mama endocrino-dependiente. Como miembro de la familia de receptores nucleares de factores de transcripción dependientes de ligandos, la acción principal de la RP es regular las redes de expresión génica diana en respuesta a la unión de su hormona esteroidea afín, la progesterona (Proietti, 2017).

Es conocido que la expresión del receptor de progesterona (PR) se regula por acción de los estrógenos, considerándose como un indicador del estímulo y la señalización de los estrógenos. En consecuencia, se ha demostrado que su expresión también predice qué pacientes responderán a la terapia hormonal (Bardou *et al.*, 2003; Andre y Pusztai, 2006). Así mismo, existe una asociación tanto con la supervivencia libre de enfermedad, como con la supervivencia global en los cánceres de mama tratados con tamoxifeno, presentando los cánceres de mama PR-positivos mejor respuesta que los cánceres PR-negativos (Bardou, 2003).

En resumen, el estado de ER y PR predice la sensibilidad del tumor a la terapia endocrina. Siendo ER y PR reguladores transcripcionales que pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares, que incluye los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), los receptores para esteroides, para hormonas tiroideas, vitamina D y otras proteínas liposolubles. Los tumores ER y PR positivos se asocian con un pronóstico favorable en comparación con un pobre pronóstico para los pacientes con tumores de mama ER negativos (Duffy, 2017). El análisis de ER y PR por IHC considera tanto

el porcentaje de células positivas como la intensidad de tinción (puntuación de Allred) (Phillips, 2007).

Actualmente, el umbral de positividad de ER es de  $\geq 1\%$  de las células tumorales. La positividad para el ER indica una mayor probabilidad de respuesta a la terapia endocrina, no sólo por los moduladores de los receptores de estrógenos sino también para los inhibidores de la aromatasa. Sin embargo, la respuesta al tratamiento entre pacientes no es uniforme y en un subconjunto de pacientes con tumor ER+ se desarrolla resistencia al tratamiento. Aun así, el estado de ER y PR representa el principal esquema de clasificación clínico-patológica para guiar la terapia endocrina (Mueller, 2018).

### **1.2.3.2 Receptor de andrógenos (AR)**

Como es bien conocido los estrógenos y la progesterona están fisiológicamente asociados con la mama, sin embargo, son los andrógenos las hormonas sexuales circulantes que predominan en nuestro cuerpo (Burguer, 2002; Vasiliou, 2019). Los andrógenos son hormonas esteroideas que regulan un importante número de procesos biológicos por su acción a través de la unión al receptor de andrógenos (AR). El AR es un miembro de la familia de receptores nucleares de esteroides que media los efectos biológicos de los andrógenos (Bandini, 2019).

Existen cinco tipos de andrógenos: sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona (AS), testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT). Sin embargo, solo T y DHT pueden unirse al AR. Los primeros tres tipos se denominan pro-andrógenos porque se metabolizan a testosterona, que es el precursor de la DHT, el andrógeno más activo. Hay dos enzimas principales productoras de andrógenos, el miembro C3 de la familia 1 de aldo-ceto reductasa (AKR1C3) y la esteroide 5 alfa-reductasa (SRD5A). AKR1C3, convierte AS en testosterona y SRD5A convierte a esta última en DHT (Vasiliou, 2019).

En las mujeres, los andrógenos se producen fisiológicamente en las glándulas suprarrenales, los ovarios y los adipocitos (Burguer, 2002). En la mama normal, la testosterona también se puede convertir en 17 $\beta$ -estradiol a través de la aromatización con la enzima citocromo P450 familia 19 subfamilia A miembro 1 (CYP19A1), conocida como aromatasa.

Generalmente, los andrógenos y el AR son necesarios para el desarrollo fisiológico de la mama. Por lo tanto, las vías de señalización AR y ER $\alpha$  afectan el desarrollo de la mama, según el destino de la testosterona (Hickey, 2017). La aromatasa regula negati-

vamente la producción de DHT en la mama al promover el metabolismo de la testosterona a estrógeno. Sin embargo, otros estudios han sugerido que los niveles de estrógeno circulante definen la dirección del metabolismo de testosterona en DHT o estradiol, como un circuito de retroalimentación. Específicamente, la testosterona se convierte en estradiol solo cuando los niveles de estrógeno son muy bajos, para poder mantenerse en rangos fisiológicos, según las necesidades hormonales y el estado menopáusico (Christopoulos, 2017).

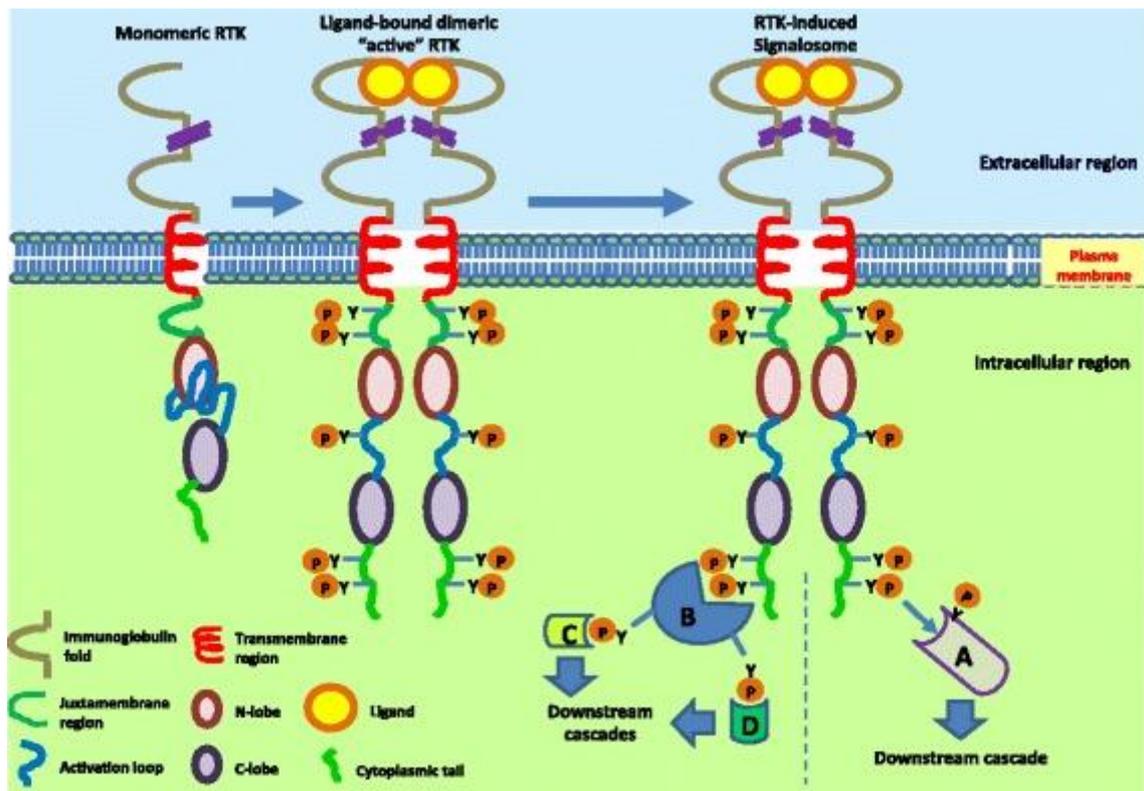
Varios estudios se han centrado en conocer el papel del AR en los tumores de mama ER+, debido a que parece existir una correlación entre su grado de expresión y algunas ventajas clínicas. Los altos niveles de AR se asocian con una menor afectación de los ganglios linfáticos, mejor supervivencia libre de enfermedad (SLE), supervivencia libre de recaída (SLR) y supervivencia global (SG), respuesta a las terapias endocrinas y quimioterapia, menor grado tumoral, expresión de Ki67, menor tamaño del tumor y menos necrosis, lo que sugiere que el AR podría tener un papel en la restricción de la progresión tumoral en células epiteliales mamarias malignas ( Peters, 2009 ; Castellano, 2010 ; Vera-Badillo, 2014 ).

Un subgrupo de tumores que expresan receptores de andrógenos representa aproximadamente el 30% de todos los tumores triple negativos. El receptor de andrógenos y sus vías de señalización tienen un papel biológico central en esta entidad tumoral. Estos tumores positivos para el receptor de andrógenos triple negativo se presentan en pacientes mayores y no parecen tener un buen pronóstico en comparación con otros tumores triple negativos (Grellety, 2020).

### ***1.2.3.3 Receptores de factores de crecimiento***

Los receptores del factor de crecimiento y sus ligandos regulan la proliferación celular, que es un factor clave en el proceso de la oncogénesis. Estos receptores tirosina quinasa (RTK) son proteínas transmembrana con características estructurales y biológicas especializadas que responden a señales ambientales iniciando cascadas de señalización apropiadas en las células tumorales. Se expresan en varios tipos de células, incluidas las del microambiente tumoral, donde se encargan de regular la proliferación celular, angiogénesis y metástasis, a través de su actividad de tirosina quinasa, debido a que los RTK regulan varias vías de señalización corriente abajo como MAPK, PI3K / AKT y JAK / STAT, las cuales tienen un papel fundamental en la regulación de estos procesos. Estas vías también son necesarias para una interacción recíproca de células tumorales y estromales (Tomiguchi, 2016).

Existen 58 familias de RTK en humanos y se han clasificado en 20 subfamilias de acuerdo con las características estructurales (Butii, 2018). Algunos de los implicados en cáncer de mama son el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2, HER3 y HER4), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y el receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF1-R), entre otros. Su mecanismo de activación implica la dimerización de los receptores y la fosforilación cruzada entre ellos (Moasser, 2007). El dominio intracelular de RTK tiene actividad de tirosina quinasa (dominio de tirosina quinasa; TKD). Este dominio puede fosforilar residuos de tirosina en *cis* (dentro de la misma molécula) o en *trans* (que residen en una molécula diferente) (Figura 1); este diseño de consenso de RTK se ha conservado a lo largo de la evolución. (Butii, 2018).



**Figura 1. Estructura de un receptor tirosin-quinasa (RTK).** Los RTK se caracterizan por tener los segmentos estructurales desde el extremo N al C terminal: pliegues de inmunoglobulina, región transmembrana, región yuxtamembrana, lóbulo N, bucle de activación, lóbulo C y cola citoplásmica. Los RTK residen en la membrana plasmática como monómero. La unión de ligandos reticula las moléculas receptoras e induce cambios conformacionales que conducen a la autofosforilación y activación del receptor.

*El RTK fosforilado sirve de sitio de acoplamiento para proteínas adaptadoras (B) o puede fosforilar directamente moléculas de señalización (A). Las proteínas adaptadoras o moléculas de señalización se unen al receptor fosforilado a través de la homología Src 2 (SH2) o el dominio de unión a fosfotirosina (PTB). Las proteínas adaptadoras acopladas transducen aún más la señal mediante la fosforilación de otras moléculas corriente abajo (C, D) (Tomado de Mol Cancer. 2018; 17: 34.)*

La activación del receptor requiere la unión del ligando (bien pueden ser ligandos solubles o en algunos casos por fibras de colágeno de la matriz extracelular) y la consiguiente dimerización u oligomerización del primero en un estado activo, esta dimerización a su vez puede darse de tres formas según sea el receptor, la primera sería que el dímero se forme completamente por el ligando o las moléculas receptoras, la segunda incluyen la participación tanto del ligando como del receptor para la formación de la interfaz del dímero y en tercer caso la participación de una molécula accesoria (Butii, 2018).

#### *EGFR.*

La familia de los EGFR esta conformada por EGFR1 (EGFR, HER1, c-erbB1), HER2 (EGFR2, c-erbB2/neu), EGFR3 (c-erbB3, HER3) y EGFR4 (c-erbB4, HER4) (Macdonald-Obermann, 2014; Butii, 2018). Poseen siete ligandos afines diferentes que incluyen EGF, TGF $\alpha$ , betacelulina (BTC), EGF de unión a heparina, anfirregulina (AREG), epirregulina y epigen.

Al llevarse a cabo la unión con el ligando, EGFR activa varias moléculas de señalización corriente abajo, incluidas RAS, PI3K, fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) y JAK, lo que conlleva al aumento de la supervivencia celular, el crecimiento celular y la progresión tumoral (Wise, 2017). El EGFR se encuentra sobre-expresado en los tejidos tumorales del cáncer de mama y se asocia con una mayor agresividad y mal pronóstico clínico (Lee, 2015).

La expresión de ER se correlaciona inversamente con EGFR, según lo reportado existe una mayor expresión de EGFR y presencia de células madre en TNBC que carecen de expresión de ER. La activación de EGFR dependiente de metaloproteinasas enriquece las células madre CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> en TNBC a través de la vía MAPK/ ERK (Wise, 2017). Como es el caso del cáncer de mama inflamatorio (IBC) el cual se caracteriza por ser más agresivo y mortal, y presenta un enriquecimiento de células madre cancerosas quimio- y radio-resistentes. Por lo tanto, la señalización de EGFR es importante para la patogénesis y progresión del IBC (Wang, 2017).

## HER2

El descubrimiento del papel de HER2 en la proliferación celular del cáncer de mama, transformó la clasificación de los subtipos de esta enfermedad (Slamon, 1987). El oncogén *ERBB2/HER2*, ubicado en 17q21, se amplifica en, aproximadamente, el 20% de los carcinomas de mama invasivos, lo que conduce a la sobreexpresión de la proteína HER2 que, como se ha indicado, es un receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa, aunque sin ligando conocido (Wolff *et al.*, 2013).

La sobreexpresión de HER2 medida por inmunohistoquímica (Wolff *et al.*, 2014), es un predictor independiente de supervivencia (Slamon *et al.*, 1987) y se asocia con tumores agresivos, de mal pronóstico y con respuesta positiva a la quimioterapia (Wolf, 2014). La detección de HER2 está clínicamente validada para predecir la respuesta a las terapias anti-HER2 en entornos neoadyuvantes y adyuvantes (Harris, 2016). En esas terapias, HER2 es reconocido y bloqueado por el anticuerpo monoclonal humanizado anti-HER2, trastuzumab, que se usa contra este tipo de cáncer (Cobleigh *et al.*, 1999), en combinación con la quimioterapia, tanto en el contexto de cáncer de mama HER2 positivo metastásico como en el tratamiento adyuvante (Slamon *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2011).

## VEGFR

Los VEGFR se expresan en células cancerosas, endoteliales y otras células estromales. Los VEGF son potentes factores pro-angiogénicos que se unen a tres tipos diferentes de VEGFR, VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (KDR u homólogo murino, Flk1) (Butii, 2018) la unión de estos a su receptor induce en las células del estroma así como en las células endoteliales vasculares y linfáticas, la angiogénesis y/o la linfangiogénesis en diferentes tipos de cáncer (Shibuya, 2011). Como es el caso de la osteopontina (OPN) la cual estimula el aumento de la expresión de VEGF-A en células de cáncer de mama promoviendo el crecimiento tumoral y la angiogénesis mediante la regulación de la señalización autocrina, paracrina y yuxtacrina de VEGF / VEGFR en células cancerosas y endoteliales (Chakraborty, 2008). Por otra parte, la activación de VEGFR1 induce la transición epitelio mesénquima (EMT) de las células cancerosas promoviendo así la invasión y la metástasis en modelos de cáncer de mama.

## PDGFR

La familia PDGFR consta de PDGFR- $\alpha$  y  $\beta$ , que son estructuralmente similares. Los PDGF se unen principalmente a los dominios 2 y 3 e inducen la homo o heterodimerización de los receptores. Adicionalmente, estos receptores se estabilizan aún más mediante interacciones directas receptor-receptor a través del dominio 4 después de la dimerización (Heldin, 2013).

La expresión de PDGFR se asocia con un mal pronóstico de los pacientes con cáncer de mama y tiene un potencial pronóstico y predictivo. Debido a la actividad aberrante de los PDGFR en la mama que impulsa la tumorigénesis, se ha reportado que una mayor expresión de PDGFR se asocia con una reducción de ER y PR y una mayor expresión de HER2, así como una mayor tasa de proliferación y tamaño del tumor (Paulsson, 2009).

## FGFR

La familia FGFR está compuesta por FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4 (Butii, 2018). La unión de FGF a FGFR conduce a la dimerización y la activación del dominio quinasa intracelular, dando como resultado la fosforilación cruzada de residuos de tirosina presentes en la cola citoplasmática del receptor (Plotnikov, 1999), lo que conlleva a la activación de las vías RAS/MAPK y PI3K/AKT, las cuales se encuentran activas de forma aberrante en el cáncer de mama, jugando un papel importante en los procesos de proliferación, apoptosis, supervivencia y metástasis (Babina, 2017). En el carcinoma de mama lobulillar metastásico en el cual se evidencia una mala respuesta a la quimioterapia presenta una amplificación del gen FGFR1. Así mismo se ha reportado que el cáncer de mama ER+ muestra amplificación de FGFR1 (Formisano, 2018; Butii, 2018) relacionado con la remodelación del estroma y la recidiva tumoral (Tomiguchi, 2016).

### 1.2.3.4 Proliferación

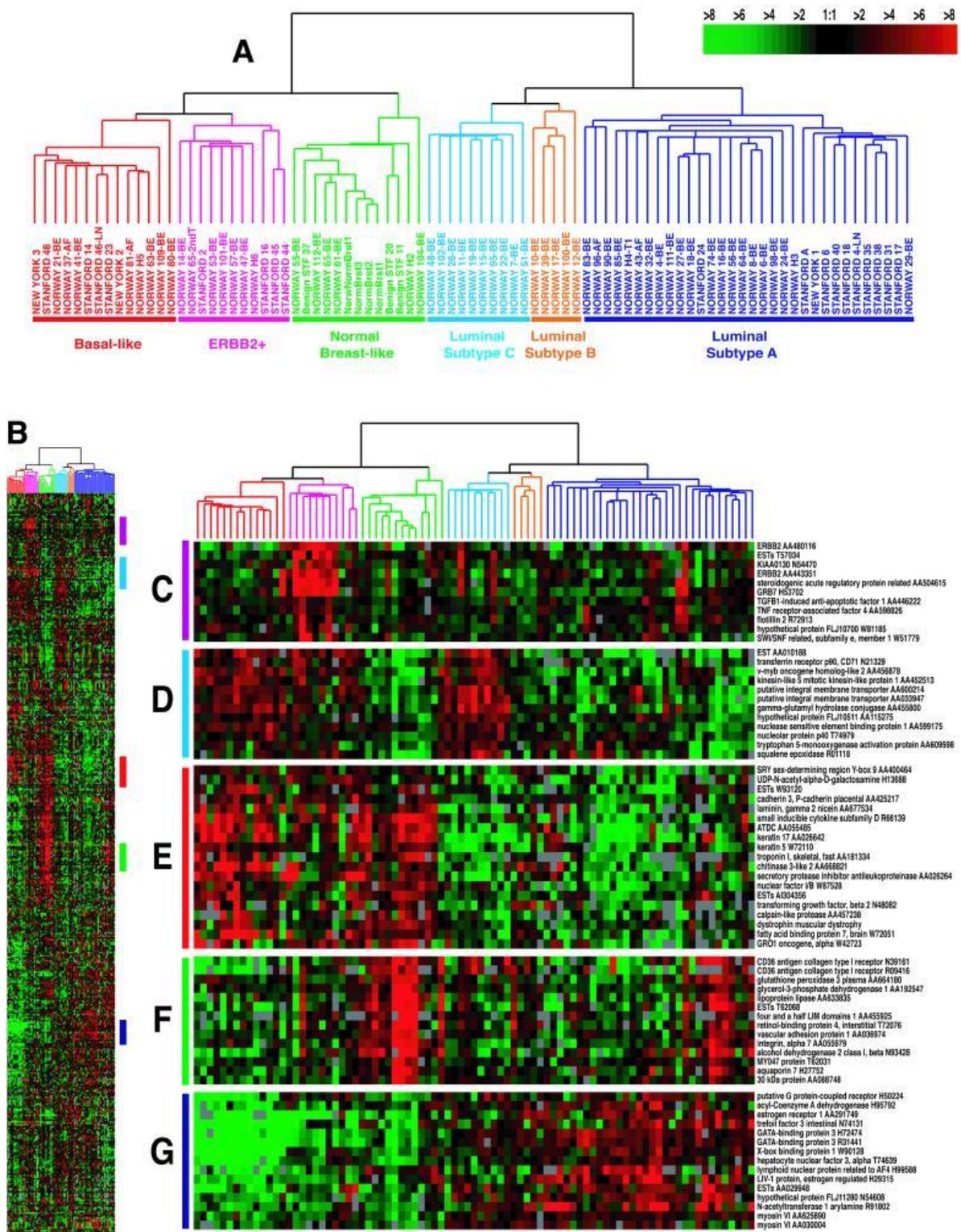
Se han investigado en profundidad varios marcadores de proliferación por su valor pronóstico en el cáncer de mama (Stuart-Harris *et al.*, 2008), incluidos el recuento mitótico, la medición de la fracción celular en fase S del ciclo celular por citometría de flujo y la inmunohistoquímica con anticuerpos contra Ki-67, que se expresa fuertemente en las células en proliferación (Cheang *et al.*, 2009; Yerushalmi *et al.*, 2010; Dowsett *et al.*,

2011). Sin embargo, el uso generalizado de tales cambios moleculares se ha visto limitado por la falta de estandarización metodológica, la falta de consenso sobre los puntos de corte apropiados para el uso clínico y la variabilidad inter-observador en la evaluación.

La expresión de Ki-67 se correlaciona inversamente con la respuesta al tratamiento. Así, el alto índice de proliferación, medido como una elevada expresión de Ki-67, se correlaciona con una mala respuesta a la terapia. El uso clínico de Ki-67 es controvertido debido a la poca reproducibilidad entre laboratorios en los ensayos de IHC frente a Ki-67, las diferencias en los umbrales para los índices de proliferación baja y alta y las diferencias en los métodos de ensayo (Duffy, 2017). A pesar de estas limitaciones, la expresión de Ki-67 ha demostrado un valor pronóstico clínico en los umbrales bajo y alto.

#### ***1.2.3.5 Expresión de genes implicados en la clasificación, evolución y pronóstico***

Hace cerca de 20 años, el perfil transcripcional de los tumores de mama reveló un conjunto de genes cuya expresión varió significativamente entre los tumores y esta variación no se debió al sesgo de muestreo de tejido, debido a que los patrones de expresión génica en dos muestras tumorales del mismo individuo eran casi siempre más similares entre sí que en cualquier otra muestra. El análisis de agrupamiento jerárquico mediante el grado de expresión de un patrón de 500 genes reveló la existencia de cinco perfiles de expresión génica (**Figura 2**). Ello permitió clasificar los tumores de mama como luminal A, luminal B, basal-like, HER2 + y “normal-like” (Perou, 2000; Sorlie, 2001). Los subtipos luminales, basal, y normal pueden asociarse a la histomorfología mamaria. Así, el patrón de expresión del subtipo luminal estaría relacionados con el patrón de expresión de las células epiteliales que rodean la luz del conducto. El patrón de expresión del subtipo basal estaría asociado con el perfil de expresión de las células mioepiteliales que recubren por fuera a las células luminales y que están junto a la membrana basal (Perou, 2000). El aspecto denominado como “normal-like” sería parecido al tejido mamario normal, probablemente debido a la abundancia de tejido mamario normal adyacente en muestras de tumor heterogéneas (Mueller, 2018) sin embargo se destaca por la alta expresión de genes característicos de las células epiteliales basales y las células adiposas, y la baja expresión de genes característicos de las células epiteliales luminales (Perou, 2000). El subtipo HER2+ representa la amplificación del gen HER2/neu y la sobreexpresión del receptor HER2 correspondiente (Mueller, 2018).



**Figura 2. Patrones de expresión génica de 85 muestras experimentales de tumor y tejido normal de glándula mamaria. A. El dendrograma de racimo que muestra los cinco (seis) subtipos de tumores está coloreado como: subtipo luminal A, azul oscuro; subtipo luminal B, amarillo; subtipo luminal C, azul claro; normal como el pecho, verde; como basal, rojo; y ERBB2 +, rosa. B. El diagrama de conglomerado. Las barras de color de la derecha representan los insertos que se presentan en C - G (C) Grupo de amplicones ERBB2. (D)**

**Nuevo cúmulo desconocido. (E) Cúmulo enriquecido con células epiteliales basales. (F) Cúmulo similar a un pecho normal. (G) Grupo de genes del epitelio luminal que contiene ER. (Tomado de Sorlie, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2001)**

Los tumores luminales ER positivos podría subdividirse aún más (Sotiriou y Pusztai, 2009), aunque la caracterización de estos subgrupos sigue siendo controvertida (Ades, 2014). El subtipo basal incluye una alta proporción de tumores triple negativos, es decir, ER-, PR- y HER2 negativos (Andre y Pusztai, 2006). Sin embargo, el perfil de expresión génica tiene algunas limitaciones (Norum, 2014) así como ausencia de relevancia clínica establecida.

Han surgido varios ensayos comerciales que amplifican una serie limitada de genes para definir el subtipo de cáncer de mama y su pronóstico, en lugar de los 500 genes iniciales. Algunos de ellos se han empezado a utilizar en la clínica con ese fin (Sinn *et al.*, 2013); el más ampliamente adoptado hasta la fecha es Oncotype Dx, que consiste en un test de 21 genes, dentro de los que incluye algunos relacionados con: la proliferación (Ki67, STK15, Survivin, CCNB1, MYBL2), los estrógenos (ER, PGR, BCL2, SCUBE2), relacionados con HER2 (HER2, GRB7), genes relacionados con la invasión (MMP11, CTSL2) y 3 más (GSTM1, CD68, BAG1) junto con cinco genes de referencia (ACTB, GAPDH, RPLPO, GUS, TFRC). Los niveles de expresión se combinan en un algoritmo mediante una puntuación entre 0 y 100 que es predictiva de la supervivencia general. Oncotype Dx se utiliza como factor pronóstico de recurrencia en pacientes con cáncer de mama ER positivo tratado con terapia hormonal, (Paik, 2004; Mosly, 2018). Si la puntuación es alta (> 31) indica que hay riesgo de recurrencia por lo que la quimioterapia será beneficiosa. Si el valor es bajo (<10), es pronóstico de una tasa muy baja de recurrencia (<2%) y es probable que la terapia endocrina sola sea suficiente. Hasta hace poco, no estaba claro si la terapia endocrina sola era adecuada para pacientes portadores de cánceres con puntuaciones intermedias (10-25). El problema es que éstos son muy numerosos, pues abarcan dos tercios, de los casos.

El ensayo TAILORx (*Trial Assigning Individualized Options for Treatment*) (Simon, 2009) ha demostrado que la terapia endocrina adyuvante y la terapia quimioendocrina tiene una eficacia similar en mujeres con cáncer de mama con receptor hormonal positivo, HER2 negativo, ganglio axilar negativo que tengan una puntuación de recurrencia de 21 genes de rango medio, lo anterior indica que la quimioterapia no añade ventajas y sugiere que la terapia endocrina sola sería suficiente para este grupo de pacientes. Sin embargo, se encontró beneficio de la quimioterapia en algunas mujeres de 50 años o

menores que tenían una puntuación de recurrencia de 16 a 25 (un rango de puntuaciones que se encontró en el 46% de las mujeres en este grupo de edad). Se ha observado un mayor efecto del tratamiento de la quimioterapia adyuvante en mujeres más jóvenes (EBCTCG, 2012), que puede explicarse, al menos en parte, por un efecto antiestrogénico asociado con la menopausia prematura inducida por la quimioterapia (Swain, 2010; Sparano, 2018).

Hay otras pruebas comerciales como son Prosigna (basado en PAM50), MammaPrint y Endopredict que evalúan la expresión de otros grupos de genes con el fin de establecer un pronóstico dentro del grupo de pacientes con tumor ER-positivo y HER2-negativo (Mosly, 2018).

La prueba Prosigna utiliza un conjunto de 50 genes, PAM 50 (Prediction Analysis of Microarrays) con un conjunto de 8 genes de referencia para identificar el subtipo de expresión génica intrínseca (es decir, luminal A, luminal B, HER2 o basal) (Parker, 2009). Esta prueba identifica el subtipo de cáncer basándose en la comparación del perfil de expresión génica del tumor en estudio con los perfiles característicos de cada subgrupo y genera una puntuación que indica un riesgo de recurrencia. Se ha observado su valor pronóstico en múltiples cohortes de pacientes con cáncer de mama, tratadas con tamoxifeno o anastrozol en monoterapia (Chia, 2012) y tamoxifeno más anastrozol en combinación (Gnant, 2014). Pratt y cols., reportan el desarrollo de un sistema de puntuación quimio-endocrina (*chemoendocrine score -CES*) teniendo en cuenta la subtipificación de PAM50 de acuerdo con la investigación y la expresión de genes adicionales en 63 pacientes con cáncer de mama receptor hormonal positivo HR+/HER2, asignados aleatoriamente a quimioterapia multifarmacológica neoadyuvante versus terapia endocrina en un ensayo de fase II. Se obtuvo como resultado que la mayoría de los genes asociados con la sensibilidad endocrina también se encontraron asociados con la resistencia a la quimioterapia, observándose una relación inversa de la sensibilidad endocrina y quimioterápica en cáncer de mama ER +. De acuerdo con esto se reporta que CES es una firma genómica capaz de medir la sensibilidad quimio-endocrina en cáncer de mama HR+/HER2-. La CES podría tener un valor clínico particular en pacientes con enfermedad de riesgo intermedio HR+/HER2- donde el beneficio de la quimioterapia adyuvante con múltiples fármacos no está claro. (Pratt, 2017).

En cuanto a la prueba MammaPrint esta conformada por 70 genes y fue desarrollado para ayudar a identificar pacientes con cáncer de mama en estadio temprano que tienen más probabilidades de desarrollar metástasis a distancia y, por lo tanto, de beneficiarse de la quimioterapia adyuvante (van 't Veer, 2002; Mook, 2007). Su valor se ha demostrado en múltiples ensayos clínicos, el más grande ha sido el estudio MINDACT con

6693 pacientes. En este ensayo, se demostró que había un grupo de pacientes identificados como de alto riesgo de recurrencia de acuerdo con factores clínicos y patológicos, pero sin embargo la prueba MammaPrint los clasificó como de bajo riesgo de recurrencia y que, probablemente, no se beneficiarían de la quimioterapia (Cardoso, 2016).

La prueba Endopredict mide ocho genes de los cuales tres están asociados con la proliferación (BIRC5, UBE2C, DHCR7) y cinco con la vía de los estrógenos (RBBP8, IL6ST, AZGP1, MGP, STC2). Esta prueba genera una puntuación entre 0 y 15 (donde menos de 5 indica bajo riesgo y más de 5 alto riesgo). De manera adicional, estos datos de puntuación molecular se combinaron con información clínico-patológica como el grado de infiltración ganglionar y la información del tamaño del tumor para de esta forma proporcionar una puntuación combinada molecular/clínico-patológica EPclin, que superó a los factores de riesgo convencionales por sí solos. EPclin podría ser útil en la toma de decisiones terapéuticas cuando el uso de la terapia además de la terapia endocrina es incierto después de considerar los marcadores convencionales (Filipits, 2011). La prueba se basa en ensayos de RT-PCR a partir de tejido fijado y ha sido validada en varios ensayos (Buus, 2016).

Los estudios genómicos y transcriptómicos combinados han permitido la identificación de una gama más amplia de subtipos moleculares de cáncer de mama (Curtis et al., 2012). Además, las técnicas de secuenciación de última generación están mejorando nuestra comprensión de la genética y la biología molecular del cáncer de mama (*Cancer Genome Atlas Network*, 2012; Stephens et al., 2012). Aunque en la actualidad, la traducción de este conocimiento al entorno clínico es limitada, existe evidencia considerable de que los patrones de expresión moleculares del cáncer de mama desempeñarán un papel cada vez más importante en su manejo clínico (Balko *et al.*, 2013).

Por último, hay que señalar que la Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica y el Colegio de Patólogos de Estados Unidos, continúan mejorando los protocolos de evaluación diagnóstica del tejido tumoral de las pruebas basadas en la IHC de ER, PR y HER2 (Wolff, 2014). Los métodos para sortear problemas con el procesamiento de las muestras y el análisis están bien documentados (Vassilakopoulou, 2015), con pautas generales que incluyen un tiempo de isquemia por frío inferior a 60 minutos, una fijación de 72 horas en formalina tamponada neutra al 10% y almacenamiento de portaobjetos con cortes de tejido tumoral cortado antes de 6 semanas (Wolff, 2014). En las nuevas pautas referente a los umbrales de positividad, el límite de actual para HER2 es un marcaje fuerte de la membrana que afecta al menos al 10% para los tumores a los que se

les adjudican tres cruces; ello contrasta con el umbral anterior que era del 30% (Varga, 2015). Es necesario considerar que las diferencias en los umbrales de positividad entre trabajos pueden dificultar los estudios de metaanálisis a la hora de comparar estudios prospectivos con los datos publicados anteriormente (retrospectivos).

### 1.3 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en mujeres en España y en el resto del mundo. Ciertamente, es el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia en las mujeres en 140 de los 184 países principales incluidos en la base de datos GLOBOCAN (el 76%) (Ferlay *et al.*, 2018). En la mayoría de los países restantes, el cáncer de mama fue el segundo cáncer diagnosticado con mayor frecuencia, después del cáncer de cérvix uterino. Sin embargo, hay sustanciales variaciones regionales en las tasas de incidencia de cáncer de mama en todo el mundo. En 2012, se registró una variación de más del triple en las tasas de incidencia de cáncer de mama estandarizadas por edad entre América del Norte y Europa occidental (tasas superiores al 90 por 100 000) y África Central y Asia Oriental, Sur y Central (con tasas superiores al 30 por 100 000). Se estima que antes de los 75 años, 1 de cada 22 mujeres será diagnosticada con cáncer de mama y 1 de cada 73 mujeres morirá de cáncer de mama en todo el mundo de forma global. Pero en el mundo Occidental afecta a una de cada ocho mujeres (IARC, *Breast Cancer Screening*, 2014).

Según GLOBOCAN en 2018 la cantidad de casos de cáncer aumentó a 18.1 millones de nuevos casos y 9.6 millones de muertes por cáncer, de los cuales 2.088.849 (11.6%) corresponden a cáncer de mama; de estos, Asia y Europa contribuyeron con el 43.6% y 25%, respectivamente. En cuanto a la mortalidad, se registraron 626.679 casos, de estos, Asia representa el 49.6% y Europa el 22% de las muertes. En España para ese año 2018, el cáncer de mama ocupó el primer lugar en incidencia de cáncer en mujeres, seguido del colorrectal, con 32.285 y 14.428 casos nuevos, respectivamente; en cuanto a la mortalidad, el cáncer de mama ocupó el segundo lugar, con 6.241 casos (14,4%); precedido del cáncer de colorrectal con 6.645 casos (14.9%) (GLOBOCAN, 2018).

A continuación, describimos la incidencia y mortalidad estimadas por cáncer de mama que se hizo en 2012 para el año 2025, en general y por categoría de Índice de Desarrollo Humano (IDH). En general, para el año 2025, se estima un aumento del 30% en el número de casos nuevos (de 1,68 millones a 2,19 millones) y un aumento del 33%

en el número de muertes (de 0,52 millones a 0,69 millones). Debido a las diferencias de crecimiento de la población entre las categorías de IDH, se proyecta que el número de casos y muertes aumentará más rápidamente en países con IDH bajo. También se estima que el número de muertes aumentará más rápidamente en países con IDH medio. Ello se atribuye a la adquisición de un modo de vida cada vez más occidentalizado. En el caso del cáncer de mama se atribuye a un cambio progresivo en los hábitos de la natalidad y en un aumento de la esperanza de vida (IARC, *Breast cancer screening*, 2014).

### 1.3.1 Factores de riesgo

Aunque sería ideal identificar un subconjunto de la población de la que surgirían la mayoría de los casos de cáncer de mama sobre la base de los factores de riesgo de cáncer, las simulaciones de la detección basada en el riesgo no han confirmado la validez de este enfoque.

De acuerdo con lo publicado por Shah y cols., en 2017, la estratificación del riesgo para el desarrollo de cáncer de seno entre las mujeres sería:

(i) mujeres con un aumento de **riesgo alto**, serían aquellas con un riesgo cuatro veces mayor que la población normal de desarrollar cáncer de mama. Estas mujeres suelen presentar cáncer de mama premenopáusico y bilateral, tener antecedentes familiares de cáncer de mama en la madre, una hermana, hija o en una pariente cerca. Se suele asociar a mutaciones genéticas de los genes *BRCA 1* o *BRCA 2*. Suelen presentar lesiones premalignas histopatológicas del tipo carcinoma lobular *in situ*, hiperplasia celular atípica; y radiológica con más de un 75% de densidad en la mamografía (Shah, 2017).

(ii) Las mujeres con un aumento de **riesgo intermedio** serían aquellas que tienen un riesgo de dos a cuatro veces mayor que la población normal de desarrollar un cáncer de mama. Suelen ser residentes en el Norte de Europa o en América del Norte, de edad avanzada, con antecedentes personales de cáncer de mama, sobre todo de cáncer de mama premenopáusico en la familia, con antecedentes histopatológicos de hiperplasia celular sin atipias y más de un 50 % de densidad mamográfica (Elmore, 2016).

(iii) Las mujeres con un aumento de **riesgo bajo** son aquellas que tienen menos de dos veces el riesgo que la población normal de desarrollar cáncer de mama. Se caracterizarían por: ser nulíparas, por una edad de la menarquia antes de los 11 años, el nacimiento del primer hijo después de los 30 años, edad de la menopausia después de

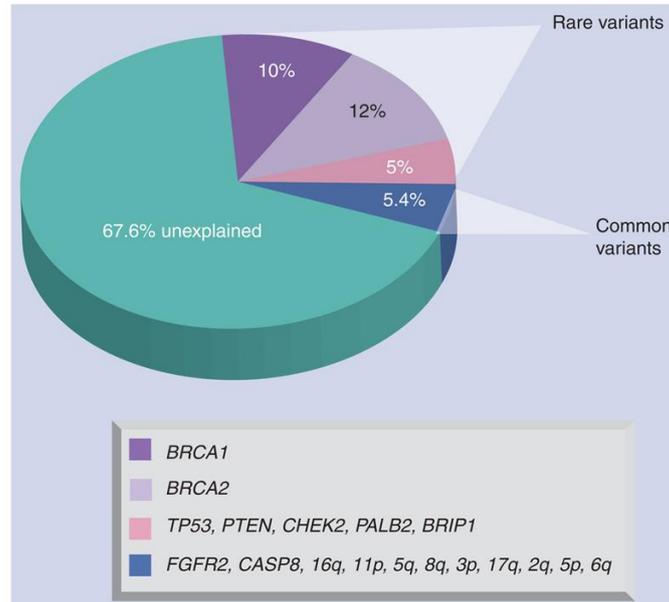
los 55 años, antecedentes familiares de cáncer de mama posmenopáusico, alto nivel socioeconómico, obesidad posmenopáusica y consumo diario de alcohol (Elmore, 2016).

A continuación, se describen los factores de riesgo implicados en el desarrollo del cáncer de mama, y que son identificables en menos del 70% de los pacientes, según la *American Cancer Society*.

### 1.3.1.1 Factores genéticos

#### *Penetrancia de genes de susceptibilidad.*

La penetrancia cuantifica la modificación de la expresión génica mediante la variación del entorno y los antecedentes genéticos, por lo cual mide el porcentaje de casos en los que se expresa el gen (Griffiths, 2000; Miko 2008). Los genes de susceptibilidad al cáncer de mama se clasifican como de alta, moderada y baja penetrancia- ello refleja el riesgo relativo de desarrollar cáncer de mama en las portadoras de mutaciones en estos genes (**Figura 3**).



**Figura 3. Cáncer familiar de acuerdo a los genes de susceptibilidad, la mayor parte de los casos familiares no tiene explicación. La variación genética residual probablemente se deba a una gran cantidad de variantes, cada una de las cuales confiere un efecto moderado sobre el riesgo de cáncer de mama. (Tomado de Ghousaini M, Future Oncol. 2009).**

Describimos los tres grupos a continuación:

a) Las mutaciones en los **genes de alta penetrancia** (como *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*, *PTEN*, *STK11* y *CDH1*), aumentan el riesgo de cáncer de mama más de cinco veces (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer*, 2001). Dentro de este grupo, los principales genes de susceptibilidad al cáncer de seno, *BRCA1* y *BRCA2*, representan, aproximadamente, el 3-5% de todos los casos de cáncer de seno y el 20-50% de todos los casos de cáncer de mama hereditario (Rahman, 2014b).

### ***BRCA1* y *BRCA2***

Como hemos indicado ya, dos de los principales genes de alta penetrancia de susceptibilidad al cáncer de mama son *BRCA1* y *BRCA2* (*BRCA* viene de **BR**east **CA**ncer) que en condiciones fisiológicas son genes supresores de tumores. Se expresan en la mama, y otros tejidos. Codifican proteínas cuya función es reparar el DNA dañado. La presencia de mutaciones en los genes *BRCA*, altera en sus proteínas la capacidad de reparar del DNA dañado y aumentan el riesgo de cáncer de mama en las mujeres portadoras. Se estima que hay un aumento del 80% de riesgo de padecer cáncer de mama a los 90 años de edad entre las mujeres con los genes *BRCA1* o *BRCA2* mutado. Aunque el riesgo varía con las diferentes poblaciones (Marissa, 2014).

Tanto las células deficientes en la función de *BRCA1* como de *BRCA2* muestran inestabilidad genómica, debido a la reparación deteriorada del DNA. Pero los cánceres que surgen en las portadoras de mutaciones *BRCA1/2* difieren en sus características. Además, dentro de las pacientes de edad similar, los tumores relacionados con la mutación *BRCA1* son significativamente diferentes de los tumores de mama esporádicos en su aspecto histopatológico y características moleculares (Lakhani *et al.*, 1998, 2002; Honrado *et al.*, 2006; Palacios *et al.*, 2008; van der Groep *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2011). Es frecuente que presenten un patrón de expresión del tipo *basal-like*. A nivel histopatológico, el carcinoma ductal invasivo, es el tipo histológico más común tanto en los cánceres de mama hereditarios como en los esporádicos. Si bien ciertos subtipos ocurren con mayor frecuencia en los tumores de mama hereditarios que en los esporádicos. Así, los tumores relacionados con la mutación *BRCA1* son, frecuentemente, de

grado histológico 3 y de tipo medular, caracterizados por una arquitectura sincitial, ausencia de estructuras tubulares o glandulares, alto grado nuclear y un marcado infiltrado del estroma de tipo linfoplasmocítico. Los cánceres de mama relacionados con *BRCA1* son típicamente triple negativo y de fenotipo basal (Lakhani *et al.*, 1998, 2002; Vargas *et al.*, 2011; Mavaddat *et al.*, 2012). En pacientes premenopáusicas que desarrollen tumores de histopatología medular y triple negativa, es preciso hacer el análisis de mutaciones en el gen *BRCA1*, independientemente de los antecedentes familiares de cáncer de mama y/u ovario.

El origen biológico específico de los tumores mamarios debidos a la mutación en *BRCA1* se demuestra por los análisis de expresión de RNA mensajero (mRNA) y de secuenciación de próxima generación del tejido tumoral (Sørliie, 2004; Stephens, 2012).

No se ha descrito un fenotipo definido de manera evidente para pacientes con cáncer de mama familiar por mutaciones en el gen *BRCA2*, aunque algunos estudios indican una aparición más frecuente de carcinomas lobulares tubulares, lobulares y pleomórficos (Lakhani *et al.*, 1998, 2002; Honrado *et al.*, 2006; Palacios *et al.*, 2008; van der Groep *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2011). Los tumores relacionados con mutaciones en *BRCA2* muestran una alta frecuencia de positividad para el ER, similar a los casos esporádicos y, generalmente, son negativos para HER2. Sin embargo los *BRCA2* suelen ser de mayor grado (grados 2 y 3) que los tumores esporádicos (sin mutación en *BRCA2*) y pueden mostrar infiltración linfocítica más prominente, y más focos de necrosis. Sin embargo, estas características que se exhiben en los tumores relacionados con *BRCA2*, lo hacen de manera menos consistente que las características medulares de los tumores relacionados con *BRCA1*.

En Estados Unidos, a diferencia de España y otros países, las pruebas genéticas para la evaluación de los genes *BRCA1* y *BRCA2* no se consideran parte de la evaluación estándar para el tamizaje del cáncer de mama (Shen, 2015), a pesar de que el *Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos* declaró que las mujeres con un gen *BRCA1* o *BRCA2* anormal tienen un riesgo de más de un

60% de ser diagnosticadas con cáncer de mama durante su vida, en comparación con el 12-13% de riesgo que tienen las mujeres en general (Diez, 2011).

La detección de las mutaciones en los genes *BRCA* indica que hay mayores posibilidades de que se desarrolle un segundo cáncer de mama entre aquellas pacientes que previamente han tenido la enfermedad. También aumenta el riesgo de padecerlo si se acompaña de antecedentes familiares con cáncer de mama y de ovario. Sin embargo, la detección de mutaciones en genes *BRCA* no es diagnóstico de cáncer de mama en pacientes sanas a quienes se les ha detectado mutaciones positivas o que tienen antecedentes familiares de cáncer de seno (Shah, 2017).

El sobrediagnóstico y el sobretratamiento del cáncer de mama entre mujeres normales y el impacto psicosocial en las portadoras, limitan el uso generalizado de la evaluación de mutaciones en *BRCA* dentro de los programas de detección de cáncer de mama en todo el mundo (Brodersen, 2013). Las recomendaciones para las portadoras de mutaciones en genes *BRCA* serían: el autoexamen de las mamas cada mes, examen clínico de las mamas dos veces al año, mamografía anual y resonancia magnética (MRI) a partir de los 25-30 años (Shah, 2017).

Los cánceres de mama causados por mutaciones de otros genes de susceptibilidad de alta penetrancia no parecen diferir significativamente en sus características de los tumores de mama esporádicos. Estas mutaciones parece que confieren un riesgo elevado de desarrollar cáncer de mama (IARC, 2016), pero los números estudiados hasta ahora son pequeños (van der Groep, 2011). Las mutaciones somáticas en estos genes son mutaciones *driver*, que son frecuentes en el cáncer de mama esporádico (Stephens, 2012).

A continuación, describimos algunos de esos genes:

### TP53

El cáncer de mama es el más común diagnosticado en mujeres afectadas por el síndrome de Li-Fraumeni (LFS) (Li, 1969). Se presenta, principalmente, como carcinoma ductal o como DCIS con positividad para la expresión de ER y PR y/o de HER2/NEU (Masciari, 2012). El LFS es un síndrome de predisposición al cáncer hereditario causado por una mutación en el gen *TP53* (González, 2009), que confiere un riesgo acumulativo del 49% de desarrollar cáncer de mama a la edad de 60 años.

La probabilidad de portar una mutación en *TP53* aumenta en pacientes con cáncer de mama menores de 30 años con un familiar de primer o segundo grado con cánceres típicos asociados al LFS a cualquier edad, y es casi nula en pacientes diagnosticadas con cáncer de mama a los 30-49 años y sin antecedentes familiares de cánceres asociados con LFS (González, 2009).

### Cadherina 1 (CDH1)

Las portadoras de mutaciones en el gen *CDH1* (que codifica la cadherina epitelial humana) tienen un riesgo acumulativo de cáncer de mama del 52% a la edad de 75 años (Kaurah, 2007), y el cáncer de mama desarrollado es con frecuencia de tipo lobular en pacientes mayores de 45 años (Schrader, 2011).

### PTEN

Las mutaciones heterocigotas hereditarias en el gen *PTEN* (homólogo de fosfatasa y tensina), que codifica una fosfatasa dirigida al fosfatidilinositol (3,4,5) – trifosfato, es característico en individuos con síndrome de Cowden (Browning, 2015). El síndrome de Cowden es una enfermedad rara y multisistémica, con un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama del 25 al 50% (Pilarski, 2013); y el desarrollo de otros tipos raros de cáncer (como por ejemplo, el gangliocitoma cerebeloso displásico) (Nieuwenhuis, 2014).

### STK11

Las mutaciones en el gen *STK11* (serina / treonina-proteína quinasa 11) se han asociado con el síndrome de Peutz-Jeghers (Peutz, 1921), un trastorno raro, caracterizado por un mayor riesgo de varias neoplasias, incluido un mayor riesgo

(del 45%) de cáncer de seno de tipo ductal en desarrollo a la edad de 70 años (Hearle, 2006).

b) Las mutaciones en los **genes de penetrancia moderada o intermedia** (como *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1*, *NBS1*, *RAD51C* y *XRCC2*) aumentan el riesgo de cáncer de mama de dos a cinco veces. La identificación de mutaciones en genes que predisponen al desarrollo del cáncer de mama es de gran importancia clínica, tanto para las pacientes como para parientes no afectados que portan una variante alélica patógena. El análisis de estos genes de penetrancia moderada se ha recomendado en mujeres con un alto riesgo familiar, en las que no se ha demostrado la presencia de mutaciones en los principales genes de susceptibilidad al cáncer de mama. Los signos que sugieren la presencia de una mutación en la línea germinal (heredada) en un gen de susceptibilidad al cáncer de seno son: (i) signos de apariencia inusual de cáncer de seno como son: el inicio temprano de la enfermedad; la recurrencia tumoral; un desarrollo tumoral bilateral; el desarrollo de cáncer de seno masculino; la presencia de diagnósticos histopatológicos raros o menos frecuentes como tumor triple negativo, tipo medular o atípico; así como tumores ER negativos, en general. (ii) El agrupamiento de casos de cáncer de mama en las familias afectadas; y (iii) multiplicidad de varios tipos de cáncer en la misma familia y/o individuos (desarrollo de cáncer de seno y de otros tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de ovario, el colorrectal y el melanoma).

### ***CHEK2***

Uno de los más estudiados es el gen *CHEK2* (checkpoint kinase 2), es un gen supresor de tumores ubicado en el cromosoma 22 (Bell, 1999), que codifica una serina/treonina quinasa reguladora que fosforila varios sustratos proteicos (incluidos p53 y BRCA1) en respuesta al daño del DNA. En relación con las mutaciones en las variantes alélicas de *CHEK2*, la más común es c.1100delC, la cual es responsable de un aumento del riesgo de desarrollar cáncer de mama, con una *odds ratio* de 2.7 para el cáncer de seno de forma global, de 2.6 para el cáncer de mama de inicio temprano, de 4.8 para el cáncer de mama familiar (Weischer, 2008) y una razón de riesgo de 3.5 y peor supervivencia para el cáncer de mama contralateral (Weischer, 2012), en mujeres con características de alto riesgo que no portan mutaciones en los genes *BRCA1/2* (Meijers-Heijboer, 2002). El riesgo acumulado para pacientes con cáncer de mama familiar y que

son portadores heterocigotos se estimó en un 37% (Weischer, 2008). Los tumores de mama que surgen en portadoras de la mutación c.1100delC, son con frecuencia de tipo luminal y expresan el ER y/o PR (Nagel, 2012; Kriege, 2014).

Las variantes de CHEK2 son altamente específicas del tipo de población. Se encontró que otras cuatro variantes alélicas de este gen están asociadas con un mayor riesgo de cáncer múltiple, incluidos los de mama, colorrectal, próstata y tiroides (Cybulski, 2004). La variante p.I157T se ha asociado con un riesgo significativamente mayor de cáncer de mama (OR, 4.2 para cáncer de seno lobular) (Liu, 2012a, b).

### ***RAD51C***

El gen *RAD51C* es esencial para la frecuencia cardíaca y la reparación del DNA mediante recombinación homóloga (Somyajit, 2010). Ha sido reportado como un gen de susceptibilidad para desarrollar cáncer hereditario de mama y ovario (HBOC) (Meindl, 2010; Cohen- Haguenaer, 2019). Desde esta afirmación han surgido varias investigaciones que han afirmado una predisposición hereditaria al cáncer de ovario para mujeres portadoras de mutaciones que afectan a *RAD51C* (Song, 2015) y *RAD51D* (Loveday, 2011). Un estudio de múltiples etapas de asociación del genoma completo (GWAS) ha reportado dos nuevos alelos de riesgo en *RAD51B* un SNP pericentromérico en el cromosoma 1p11.2, rs11249433, y un segundo SNP en el cromosoma 14q24.1, rs999737, que pueden conducir al riesgo de cáncer de mama (Thomas, 2009).

### ***ATM***

El gen *ATM* (ATM serina / treonina quinasa) se encuentra en el cromosoma 11. Desempeña un papel fundamental en la reparación del DNA y la progresión del ciclo celular (Cavaciuti, 2005). El síndrome de ataxia-telangiectasia se produce por la mutación bialélica en la línea germinal de este gen, la cual se manifiesta en la infancia y se caracteriza por ataxia cerebral, telangiectasias, inmunodeficiencia y un mayor riesgo de tumores malignos, especialmente tumores de mama y gástrico (Cohen-Haguenaer, 2019).

### ***BRIP1***

El gen *BRIP1* (proteína C-terminal helicasa 1 que interactúa con BRCA1) se encuentra en el cromosoma 17. Codifica la proteína BRIP1, un socio de unión de BRCA1 involucrado en la reparación de roturas de doble hebra en el DNA (De Nicolo, 2008).

c) Las mutaciones en los **genes de baja penetrancia** aumentan el riesgo de cáncer de mama menos de dos veces y no tienen utilidad clínica en la actualidad (Michailidou *et al.*, 2013). Sin embargo, la categorización de la penetrancia no es óptima, debido a una comprensión limitada de las verdaderas características fenotípicas. Incluso los principales genes de susceptibilidad al cáncer de seno exhiben polimorfismos que aumentan el riesgo de cáncer de seno solo levemente (aunque con alta significancia estadística); ejemplos son la mutación sin sentido *BRCA1 R1699Q* y la mutación truncada *BRCA2 c.K3326 \** (Michailidou *et al.*, 2013). Los análisis de secuenciación revelan que, aproximadamente, el 20% de los cánceres triple negativos tienen mutaciones, que incluyen *BRAF V600E*, amplificaciones de *EGFR* y mutaciones en *ERBB2* y *ERBB3* (Shah *et al.*, 2012).

Se han identificado loci que aportan pequeños aumentos en el riesgo relativo de desarrollar cáncer de mama en la población general. En mujeres jóvenes portadoras de mutaciones en el gen *BRCA2* que de manera adicional presentan mutaciones en *FGFR2* (receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos) ó en *TOX3* (*TOX high mobility group box family member 3*) el riesgo acumulado a los 70 años es de 41% y 70% respectivamente (Cohen-Haguenauer, 2019).

El conocimiento incompleto de las características de la enfermedad y de la respuesta al tratamiento en pacientes que portan mutaciones en los genes de susceptibilidad al cáncer de mama, limita el potencial clínico de docenas de variantes recientemente caracterizadas, lo que hace que la evaluación del riesgo de cáncer en esta población de alto riesgo sea incierta (Kean, 2014).

### **1.3.1.2 Factores hormonales**

Antes del siglo XVIII, el cáncer de mama ya era considerado como una enfermedad sistémica causada por algunos problemas en fluidos líquidos, sangre y la linfa del

cuerpo. En 1713, se describió una mayor prevalencia de cáncer de mama entre las monjas en Padua (Haagensen, 1986). Curiosamente, 129 años después de esta observación, Rigoni-Stern encontró que las monjas tenían tres veces más riesgo de cáncer de mama, en comparación con otras mujeres y lo relacionó con la nuliparidad (Rigoni, 1842). En 1889, Schinzinger, declaró que la enfermedad crecía más lentamente en mujeres postmenopáusicas e incluso sugirió la castración ovárica como un medio para acelerar el beneficio de la menopausia. Beatson, también informó de la regresión del tumor en pacientes con cáncer de mama avanzado después de la castración quirúrgica (Beatson, 1986) y, por primera vez se dispuso de un tratamiento hormonal para este tipo de cáncer, se inició con la ooforectomía como un tratamiento sistémico para las pacientes con cáncer de mama (Donegan, 1995).

Desde hace tiempo se considera que los factores de riesgo establecidos para el cáncer de mama, tales como: la menarquía temprana, menopausia tardía, el consumo de alcohol, la obesidad y la terapia de reemplazo hormonal (TRH) postmenopáusica, pueden considerarse como distintas fuentes de la dosis "acumulativa de estrógenos a las que el epitelio está expuesto a lo largo del tiempo " (Henderson, 2000).

Los estrógenos son hormonas esteroideas implicadas en la regulación de la diferenciación y la proliferación de las células epiteliales mamarias normales. Las vías químicas de la biosíntesis de los esteroides, incluyendo las enzimas más importantes y su localización intracelular, son similares en el ovario y en la glándula suprarrenal.

La enzima aromatasa forma parte de la superfamilia de la citocromo P450. Convierte la testosterona en estradiol (Brueggemeier, 2001) y es codificada por el gen *CYP19* humano (15q21.1) que abarca alrededor de 123kb, con una región codificante de 9 exones (de alrededor de 30kb entre el exón II y el exón X) (Meinhardt, 2002). La aromatasa participa en la producción local de estrógenos. En la etapa inicial de la síntesis, el colesterol se convierte en pregnenolona por la enzima P450. Se ha sugerido que la conversión de andrógenos a estrógenos puede ser un posible mecanismo por el que los andrógenos estimulan la proliferación de las células de la mama (Shufelt, 2008). La pregnenolona se puede convertir ya sea a progesterona o a  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona y estos compuestos en última instancia, son andrógenos. El estradiol, es el estrógeno más activo producido por el ovario, se sintetiza localmente en la mama a partir de andrógenos por la enzima aromatasa.

Los estrógenos son responsables del desarrollo del sistema ductal, mientras que la progesterona es necesaria para el desarrollo lobular de la mama.

El mecanismo clásico de acción de las hormonas esteroideas implica interacciones nucleares de los receptores intracelulares, que son citoplasmáticos o nucleares. En ausencia de ligando, los ER permanecen inactivos, enlazados a proteínas chaperonas del complejo HSP (Heat Shock Proteins, proteínas de choque térmico), conservando así una distribución que mantiene oculto su péptido señal de localización nuclear (SLN). Cuando ocurre la unión del estrógeno al ER se producen unos cambios conformacionales que logran separarlo de las HSP y de esta forma quedan expuestas las señales de localización nuclear; provocando así la traslocación del ER al núcleo y la subsecuente activación de la transcripción de genes diana por la interacción con sus elementos de respuesta, (Sabbah, 1996) denominados ERE (Elemento de Respuesta a Estrógenos). Los ERE son secuencias palindrómicas con la estructura 5'-GGTCAnnnTGACC-3', donde "n" representa un nucleótido cualquiera (Gruber, 2004). Sin embargo, existen genes que, aun sin poseer un ERE, logran transcribirse a través de señalización estrogénica gracias a un mecanismo indirecto. En dicho caso, los ER van a interactuar con otros factores de transcripción como son Jun, Fos, AP-1 y SP-1, de esta manera provocan su activación y posterior traslocación a núcleo, allí se unen con sus propios elementos de respuesta y provocan la expresión génica (Liu, 2002).

La máxima actividad transcripcional requiere la acción concertada del dominio AF1 (*activation function 1*) ligando-independiente y el dominio AF2 (*activation function 2*) ligando-dependiente. La actividad transcripcional también se ve afectada por una serie de cofactores regulatorios que incluyen complejos remodeladores de la cromatina, coactivadores y correpresores. Los coactivadores, en general, no se unen al DNA, sino que son reclutados a los promotores de los genes diana a través de interacciones proteína-proteína con el ER. Los ejemplos de coactivadores del ER incluyen los miembros de la p160/SRC (coactivador del receptor de esteroides), la familia: SRC1/NcoA1 (coactivador del receptor nuclear-1), NcoA2 y NCOA3/AIB1/TRAM1/RAC3.

## Obesidad

El aumento de peso se ha asociado con un incremento del colesterol y de los niveles de triglicéridos en la sangre, y a su vez con un aumento del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y diversos tipos de cáncer, como el de mama. Algunos estudios han detectado más enfermedades cardiovasculares entre pacientes con cáncer de mama (Trichopoulou, 1997). El consumo de grasas se relaciona directamente con la obesidad y el grado de obesidad es un factor determinante de los niveles de colesterol y triglicéridos en la sangre; por otro lado, las grasas y la obesidad pueden desempeñar un papel importante en el metabolismo de las hormonas sexuales esteroideas (Colditz, 2001; Cui, 2010).

En la etapa inicial, el colesterol se convierte en pregnenolona acción de la enzima aromatasa, que es el complejo enzimático del *citocromo P450*, esta reacción o grupo de reacciones es el paso limitante en el proceso de biosíntesis. Como mencionamos en la anterior sección la citocromo P450 es importante en la conversión de andrógenos a estrógenos y de allí su relación con la inducción de la proliferación (Shufelt, 2008).

Por otra parte, la enzima aromatasa está presente en diversos tejidos como el tejido adiposo, piel, ovario, cerebro, hueso, placenta, etc. Además, se ha demostrado que determinados carcinomas de mama tienen la habilidad de producir estrógeno a través de aromatasa intratumoral. Por otra parte, in vitro, la actividad de la aromatasa se ha observado en el tejido mamario, y la expresión de la aromatasa es mayor en o cerca al sitio del tumor de mama (Richards, 2002).

Wu y cols., han sugerido que la reducción de grasa en la dieta disminuye los niveles séricos de estradiol, por tanto, la modificación de la dieta se ofrecería como una estrategia para la prevención del cáncer de mama (Wu, 1999). Se ha observado que un bajo contenido de grasa y/o la dieta alta en fibra en las mujeres premenopáusicas pueden reducir los niveles de estrógenos sin afectar la ovulación, lo que podría proporcionar una base para la prevención del cáncer de mama (Boyd, 1997; Cui, 2010).

Goldin y cols., notaron una disminución significativa en las concentraciones séricas de testosterona y androstenediona en mujeres premenopáusicas cuando la dieta se cambió a otra baja en grasa y alta en fibra (Goldin, 1994). Además, se ha encontrado que las concentraciones plasmáticas de estradiol son significativamente menores en las

mujeres posmenopáusicas vegetarianas que en las no vegetarianas. La modificación de la obesidad y la dieta podrían contribuir a un menor riesgo de cáncer de mama.

Los estudios revelaron que la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) se asocia de manera positiva con lipoproteínas de alta densidad (HDL)-colesterol y negativa con triglicéridos. Por lo tanto, esta relación inversa entre la SHBG sérica y los niveles de triglicéridos en suero, conducen a una elevación del porcentaje de estradiol libre (forma activa) cuando el nivel sérico de triglicéridos es alto. Se ha determinado que el contenido de lípidos totales en el tejido, los triglicéridos y el colesterol son significativamente más altos en casos de cáncer de mama, y también se correlacionaron con los niveles de estradiol. Esto indica que la absorción de los lípidos del plasma por el tejido tumoral se correlaciona con los niveles de estradiol, siendo así, se evidencia que los lípidos son un factor de riesgo en cáncer de mama (Mumford, 2011).

### *Edad avanzada*

El riesgo de desarrollar cáncer de mama es de 1/8 en las mujeres. En la actualidad, más del 40% de las mujeres con cáncer de mama son mayores de 65 años, estas representan casi el 60% de las muertes totales por cáncer de mama (DeSantis, 2011; Siegel, 2014). Antes de los 49 años, el riesgo estimado de desarrollar cáncer de mama es de 1/53; sin embargo, aumenta a 1/43 entre los 50-59 años y continúa ascendiendo a 1/23 entre los 60-69 años. Para las mujeres mayores de 70 años, este riesgo es el más alto, con una probabilidad de 1/15 de desarrollar cáncer de mama (Siegel, 2015).

Según lo publicado, las mutaciones genéticas de alto riesgo, como en el gen *BRCA1*, se dan con diferente frecuencia según la edad de inicio, encontrándose que, en pacientes menores de 40 años, el 5,3% de los casos de cáncer de mama se deben a mutaciones en el gen *BRCA1*. En el grupo de edad de 40 a 49 años, estas mutaciones bajan al 2.2% de los casos; y disminuyen aún más, al 1.1%, para pacientes que desarrollan cáncer de mama en el grupo de edad de los 50 a los 70 años (Ford, 1995).

La supervivencia al cáncer de mama se asocia fuertemente con la edad en el momento del diagnóstico (*United Kingdom Office for National Statistics*, 2013). Las mujeres mayores de 70 años tienen la supervivencia más baja, la cual esta ciertamente

influenciada por su edad y las comorbilidades relacionadas con la edad, tales como diabetes mellitus, enfermedad coronaria, hipertensión, accidente cerebrovascular, asma y gastritis crónica. Estas comorbilidades son factores de riesgo independientes para la supervivencia y se encuentran de manera más frecuente en pacientes mayores (Siegel, 2015).

### *Consumo de alcohol*

El consumo moderado de alcohol se asocia constantemente con un mayor riesgo de cáncer de mama, particularmente, con los subtipos de receptores hormonales positivos. Se ha publicado que el riesgo aumentaría en un 11% por el consumo de una bebida con alcohol al día antes del primer embarazo, que es cuando el tejido mamario estaría en su etapa más vulnerable. Esto se traduce en que el 4% de los casos de cáncer de mama serían atribuibles al alcohol consumido antes del primer embarazo (Liu, 2015).

Se cree que el aumento de las hormonas sexuales inducido por el etanol promueve la proliferación de las células epiteliales mamarias ya iniciadas, pero no causa la transformación neoplásica de las células epiteliales normales (Fanelli, 2011). En relación con los productos cancerígenos del metabolismo del alcohol, en el cuerpo humano, el alcohol se convierte en acetaldehído, principalmente, por la alcohol deshidrogenasa y luego en acetato por la acetaldehído deshidrogenasa y la xantina oxidoreductasa. El acetaldehído se une rápidamente al DNA y las proteínas y produce aductos de DNA, lo que da como resultado mutaciones puntuales, enlaces cruzados de DNA y aberraciones cromosómicas (Lorenti, 2009). Adicionalmente, el acetaldehído inhibe la reparación del daño oxidativo del DNA inducido por los agentes alquilantes.

### *Hormonas exógenas*

Otro factor que puede modificar la susceptibilidad de desarrollar cáncer de mama son los anticonceptivos orales y la terapia de reemplazo hormonal. Con relación al primero, aunque existe controversia sobre el papel que estos puedan tener en el desarrollo de cáncer de mama, se ha indicado que el consumo prolongado de anticonceptivos que contienen estrógenos y progestina, por más de 10 años, puede producir un pequeño aumento en el riesgo de desarrollar esta patología (Samason, 2016).

La terapia de reemplazo hormonal se administra para compensar la disminución de estrógenos y progesterona como resultado de la menopausia. El uso de hormonas en terapia de reemplazamiento aumenta el riesgo de cáncer de mama de manera dependiente de la duración del tratamiento y de las hormonas utilizadas. La administración de estrógenos produce un aumento del riesgo del 2,2% por año de tratamiento (Bernstein, 2002), mientras que cuando se combinan con progestina el aumento del riesgo es aún mayor, y su administración durante 5 años se asocia con un incremento del riesgo del 30% (Rossouw, 2002).

## **1.4 DIAGNÓSTICO**

Las pruebas que se utilizan para la detección de cáncer de mama son el autoexamen, el examen clínico de la mama y la mamografía. Sin embargo, la sensibilidad del autoexamen y del examen clínico no superan el 60%, y la mamografía identifica aproximadamente el 85% de los tumores (Díaz, 2005). Las imágenes diagnósticas tienen el inconveniente de ser operador-dependiente y tienen limitaciones para la detección de lesiones muy pequeñas.

Por lo anterior, se ha planteado el uso de técnicas basadas en herramientas moleculares que sirvan de apoyo a las pruebas de tamizaje tradicionales, que permitan la detección de la enfermedad y faciliten la valoración de personas asintomáticas. Entre estas técnicas moleculares, se han propuesto las que permiten identificar la expresión de biomarcadores específicos relacionados con la presencia de células tumorales, a partir de una muestra de sangre periférica (biopsia líquida).

### **1.4.1 Marcadores Tumorales**

Un marcador tumoral (o también llamado marcador biológico o biomarcador) es una molécula, sustancia o proceso que está alterado cuantitativa o cualitativamente en una condición precancerosa o cancerosa detectable por una prueba. Esta alteración puede ser producida por el tumor mismo o por tejido normal circundante en respuesta a la lesión tumoral (Hayes, 1996).

La naturaleza del marcador tumoral es diversa, puede ser un ácido nucleico (DNA o RNA), un péptido, una proteína, o incluso procesos tales como apoptosis, angiogénesis y proliferación, entre otros. Pueden ser detectables en tejido, plasma sanguíneo, saliva, orina y otros fluidos corporales (Schrohl, 2003).

Los marcadores que pueden ser detectados en sangre periférica de pacientes con cáncer, se conocen como marcadores tumorales séricos y son un recurso ideal para la detección de células tumorales diseminadas debido a la facilidad de acceso al material biológico para el análisis de la muestra. La presencia de células malignas en sangre fue descrita desde los años 60 (Zidman, 1961) y centenares de estudios en la última década han señalado sustancias metabólicas en sangre, productos del proceso de transformación maligna que incluyen aumento en la proliferación, pérdida de características morfológicas propias de un tejido o dediferenciación y pérdida de la adhesión, esta última favorece la metástasis de muchos tipos de cáncer (Xi, 2007).

### ***Características que debe tener un marcador sérico***

Un marcador tumoral sérico, idealmente, debe ser una sustancia producida por la célula neoplásica o cuya regulación esté bajo su control, que refleje el aumento en la actividad proliferativa celular y que, además, permita determinar la presencia, evolución o respuesta terapéutica de un tumor maligno. Adicionalmente, debe reunir varias de las siguientes características (Lozano, 2005):

- Estar presente en los tumores.
- Ser secretado por ellos.
- Ser detectable en sangre.
- Ser cuantificable en forma fácil y reproducible.
- No estar regulado por procesos no tumorales.
- Correlacionarse con el desarrollo de la lesión maligna, tanto en presencia, como en ausencia de esta.

## **1.5 Tratamiento farmacológico del cáncer de mama**

Con relación al tratamiento farmacológico que se ha venido usando para el cáncer de mama, existen tres estrategias: la terapia hormonal, la quimioterapia con agentes citotóxicos y la terapia dirigida.

### **1.5.1 Terapia hormonal**

La terapia hormonal es de amplio uso en tumores con expresión de receptores hormonales, y su acción se basa en reducir el efecto que ejercen las hormonas producidas por

la paciente sobre las células tumorales. Existen tres posibles mecanismos para conseguir este fin:

1. Supresión de la producción de hormonas por el ovario: El ovario es la fuente principal de estrógenos en mujeres premenopáusicas, la supresión temporal o permanente de su función produce un descenso en los niveles de estrógenos. Además de la ooforectomía, hay fármacos con los que se puede conseguir esta supresión. Se utilizan agonistas de la *hormona liberadora de gonadotropina coriónica* (GnRH) que interrumpen el mecanismo de retroalimentación de la glándula pituitaria que estimula la producción de estrógenos en el ovario. La goserelina y el leuprolide, son ejemplos de fármacos con este efecto, usados en terapia adyuvante de mujeres premenopáusicas con cáncer de mama positivo para receptores hormonales (Goel, 2009).

2. Inhibición de la síntesis de estrógenos: Se basa en el uso de *inhibidores de la aromatasas*, la enzima que convierte la testosterona en estradiol. Según su estructura química, estos fármacos se clasifican en inhibidores esteroideos, como el exemestano; e inhibidores no esteroideos, como el letrozol y el anastrozol. Son los fármacos usados en primera línea de cáncer de mama postmenopáusico positivo para receptores hormonales (Johnston, 2003).

3. Bloqueo de la unión del receptor de estrógenos a su ligando: Se emplea en la primera línea de tratamiento de mujeres premenopáusicas con cáncer de mama positivo para receptores hormonales. Consiste en la administración de tamoxifeno, un modulador selectivo del receptor de estrógenos. Para el tratamiento de tumores que no responden a tamoxifeno o a otras terapias hormonales se usa fulvestrant, un antagonista puro del receptor de estrógenos que se une a éste impidiendo su dimerización, y además promueve su rápida degradación (Wakeling, 2000).

### 1.5.2 Quimioterapia con agentes citotóxicos

Los agentes citotóxicos han constituido la herramienta clásica para el tratamiento del cáncer. Son fármacos que interfieren en procesos celulares esenciales para que las células que están proliferando completen su división celular con éxito y, en consecuencia, hacen que la célula sobre la que actúan muera o detenga su ciclo. Su eficacia antitumoral se debe a que los tumores, o al menos la mayoría de las células que los forman y que sostienen su rápido crecimiento, tienen un alto índice proliferativo. Sin embargo, al no actuar de manera específica sobre las células tumorales, causan importantes daños en otros tejidos sanos, especialmente en aquellos con alta proliferación celular como las mucosas de la boca, faringe e intestino, piel, células germinales o la médula ósea.

Por esta razón, estos fármacos producen importantes efectos secundarios. Actualmente, existe una gran variedad de agentes citotóxicos que actúan sobre procesos que tienen lugar durante las distintas fases del ciclo celular. Entre las familias más importantes de estos fármacos podemos encontrar:

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

- Antimetabolitos: son compuestos con estructura similar a la de moléculas que se utilizan en la síntesis de DNA y RNA, de manera que desplazan a los compuestos naturales en las reacciones de síntesis y bloquean el funcionamiento normal de la célula. Pertenecen a este grupo los análogos de purinas y pirimidinas, y los antagonistas del folato.

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

- Inhibidores de la topoisomerasa II: llevan a cabo su acción mediante dos posibles mecanismos. Algunos de estos agentes, llamados *venenos de la topoisomerasa II* estabilizan las uniones covalentes entre la enzima y el DNA, bloqueando la transcripción y la replicación. Otros compuestos son *inhibidores catalíticos* de la actividad de esta enzima, que resulta esencial para las células proliferativas (Nitiss, 2009). A este grupo pertenecen las antraciclinas, las antracenedionas, las bisdioxopiperazinas y las epipodofilotoxinas.

Entre los fármacos más utilizados en terapia adyuvante del cáncer de mama están las antraciclinas y los taxanos, y son una de las opciones preferidas en cáncer de mama metastásico negativo para receptores hormonales y aquellos que progresan tras terapia hormonal y nunca han sido expuestos a estos agentes (Kataja, 2008; Tang, 2016). La combinación de doxorubicina y docetaxel, es uno de los protocolos aprobados y ha sido ampliamente utilizado desde hace 20 años (Dieras, 1997; von Minckwitz, 2007).

### 1.5.3 Terapias dirigidas

Durante el desarrollo tumoral existen moléculas alteradas con mayor frecuencia, y parecen ser las responsables de mantener la señalización aberrante, característica de las

células tumorales, por lo cual se han propuesto como dianas terapéuticas. Debido a esto, las terapias dirigidas son aquellas en las que se usan fármacos que actúan de forma más o menos específica sobre estas moléculas diana e interfieren con su actividad en procesos importantes para las células tumorales. Al ir dirigidas frente a dianas específicamente alteradas en los tumores, estos fármacos no causan tantos daños en los tejidos no tumorales, de modo que, en principio, los efectos secundarios de las terapias dirigidas son menores que los producidos por la quimioterapia con agentes citotóxicos.

Existen diferencias en las alteraciones moleculares y la frecuencia con la que éstas ocurren entre los distintos tipos de cáncer de mama. Por lo anterior, las terapias van dirigidas a una diana específica, y sólo aquellos pacientes en los que la proteína o vía a la que va dirigida esté alterada, van a beneficiarse del fármaco. Dentro de las terapias dirigidas aprobadas para el tratamiento del cáncer de mama se encuentran:

- Terapia dirigida frente a tumores positivos para el receptor de estrógenos (ER). Además de la hormonoterapia que ya hemos descrito, hay dos fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer de mama ER positivo-ERBB2 negativo: el inhibidor de CDK4/6, palbociclib, y el inhibidor de mTOR, everolimus (Gradishar, 2016).

- Terapia dirigida frente a tumores ERBB2 positivos. El primer anticuerpo recombinante aprobado por la FDA dirigido frente a este tipo de tumores fue trastuzumab, al que siguieron otro anticuerpo, pertuzumab, y el inhibidor del tirosin quinasa, lapatinib. Tanto trastuzumab como pertuzumab son anticuerpos monoclonales humanizados, dirigidos frente a diferentes epítomos de la región extracelular del receptor HER2/ERBB2/NEU. Una estrategia más reciente, consiste en el uso de *inmunocombinados*. Éstos son combinaciones de anticuerpos unidos a un agente citotóxico, de modo que el anticuerpo funciona como vehículo para dirigir la acción de estos compuestos citotóxicos a las células que expresan la proteína diana reconocida por el anticuerpo. En el cáncer de mama ERBB2 positivo se ha aprobado T-DM1, que combina trastuzumab con el inhibidor de microtúbulos emtansina (LoRusso, 2011).

- Terapia dirigida frente al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Esta estrategia terapéutica también se conoce como *terapia antiangiogénica*. El primer fármaco diseñado para interferir con la función de VEGF fue el anticuerpo monoclonal humanizado bevacizumab, que se une a VEGF y bloquea su unión a los receptores celulares. Bevacizumab es el único fármaco dirigido que ha sido aprobado para el tratamiento de tumores triple negativos, ya que son tumores muy proliferativos que requieren un alto aporte de nutrientes y oxígeno. Sin embargo, fue retirado para esta indicación

debido al escaso efecto sobre la supervivencia global en combinación con la quimioterapia convencional (Brufsky, 2011). Otros fármacos antiangiogénicos son ramucirumab, un anticuerpo dirigido frente al receptor de VEGF, y los inhibidores de la actividad tirosina quinasa de éste, sunitinib y sorafenib. Sin embargo, los ensayos clínicos en fase III no han mostrado que el tratamiento con ramucirumab ni con estos inhibidores de tirosina quinasa produzcan una mejora significativa en la supervivencia libre de enfermedad ni en la supervivencia global (Mackey, 2015; Baselga, 2013).

- Terapia dirigida frente a la vía de PI3K/AKT/mTOR. Esta vía se encuentra activada en el 70% de los tumores de mama, por lo que algunas de las proteínas más importantes para su activación se han propuesto como posibles dianas terapéuticas. El uso de everolimus, un inhibidor de mTOR, ya ha sido aprobado por la FDA (Yardley, 2013). Además, los resultados de los ensayos clínicos con el inhibidor de PI3K, pictilisib, sugieren su utilidad terapéutica, e igualmente se están desarrollando estudios sobre la eficacia clínica de inhibidores de AKT (Gu, 2016).

- Terapia dirigida frente a mutaciones en *BRCA1/2*. Alrededor del 20% de los tumores de mama triple negativos tienen mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2*, y estos tumores son sensibles a inhibidores de la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP), debido a un efecto de letalidad sintética. La PARP es una enzima esencial en el proceso de reparación de las roturas de cadena sencilla en el DNA, que si no se reparan progresan y generan roturas de doble cadena. Las células que no tienen *BRCA1* o *BRCA2* funcionales no son capaces de reparar estas roturas de doble cadena y mueren. Un ejemplo de estos inhibidores que está siendo evaluado en ensayos clínicos es iniparib (O'Shaughnessy, 2011).

## 1.6 MICRORNAs

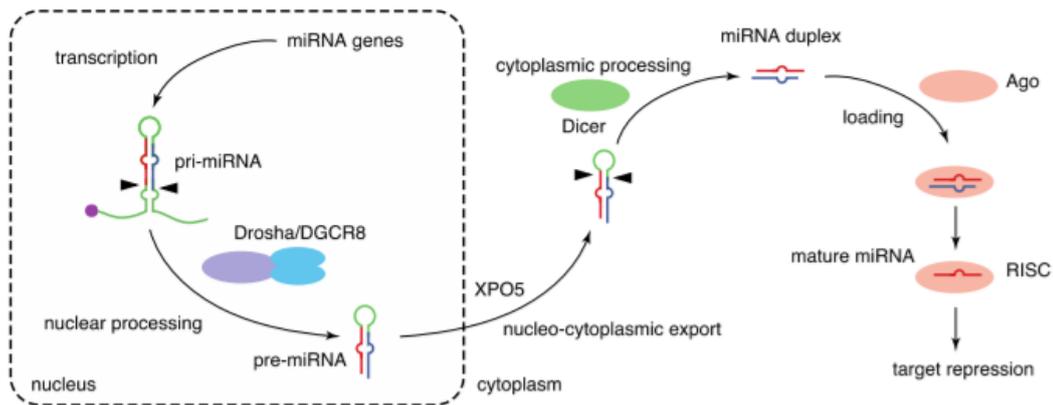
Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNA no codificante, poseen 18-25 nucleótidos de longitud, aproximadamente, están evolutivamente conservados y constituyen la clase dominante de los pequeños RNA en la mayoría de los tejidos somáticos. Se unen, principalmente, a la región no traducida (UTR) de los RNA mensajeros, lo que resulta en una regulación negativa de las proteínas diana a través de la degradación de este mRNA o mediante la inhibición de la traducción (Mulrane, 2013). En animales, se han detectado otros pequeños RNAs que incluyen: siRNAs, piRNAs (piwi-RNA) de células germinales, RNA mitocondrial no codificante (ncRNAs). Aunque muchos aspectos de la vía de la biogénesis de los miRNAs y sus mecanismos de acción

no están totalmente claros, los procesos clave se han caracterizado completamente (Cava, 2014; Bertoli, 2015).

### **1.6.1 Procesamiento de los miRNA**

La transcripción de los miRNAs ocurre a partir de genes individuales no codificantes que contienen su propio promotor; o de forma intragénica, a partir de porciones resultantes del proceso de empalme de genes que codifican proteínas (Czech, 2011). Son transcritos casi exclusivamente por la RNA polimerasa II en un transcrito primario llamada pri-miRNA. Este largo transcrito contiene una caperuza o casquete de 7-metilguanosina en el extremo 5', una cola de poli(A) en el extremo 3' y, a veces, también intrones. Para ser procesados, los pri-miRNA son reconocidos por la ribonucleasa Drosha y su compañera, la proteína de unión a RNA bicatenario, DGCR8, a través de la interacción con una estructura de tallo-bucle dentro del miRNA, en el que las secuencias no son perfectamente complementarias (Lee, 2003; Denli, 2004). El procesamiento de los pri-miRNAs da lugar a los miRNAs precursores (pre-miRNAs), de aproximadamente 70 nucleótidos.

Algunos miRNAs intrónicos, llamados mirtrones, podrían evitar el procesamiento por Drosha y utilizar la maquinaria de empalme para generar pre-miRNAs (Czech, 2011). Los pre-miRNAs generados son luego exportados desde el núcleo al citoplasma por la exportina 5 (XPO5), donde son escindidos por la enzima RNase III Dicer 1, en unión con la proteína de unión a RNA sensible a la transactivación 2 (TARBP2) y la AGO2 (complejo DICER).



**Figura 4. Biogénesis de los miRNAs.** El proceso de formación de los miRNAs consta de múltiples pasos, incluida la transcripción de transcritos primarios de miRNAs, el procesamiento nuclear por Drosha, la exportación del núcleo al citoplasma por XPO5, el procesamiento citoplasmático por Dicer y la formación del RISC con la proteína Ago (Matsuyama, 2020).

El procesamiento genera un doble miRNA-miRNA\* duplex (Diederichs, 2007). Luego se separan las dos cadenas: el miRNA maduro (la cadena guía) se incorpora en el *complejo silenciador inducido por RNA* (RISC), mientras que la cadena de miRNA\* es unida al RISC o puede degradarse (Bartel, 2004). El miRNA maduro guía la proteína AGO del RISC a la secuencia complementaria del mRNA diana para reprimir su expresión (Czech, 2011; Bertoli, 2015) (Figura 4).

### 1.6.2 Mecanismos de acción

El factor determinante para la unión del miRNA a su mRNA diana es una secuencia de 6–8 nucleótidos en el extremo 5' del miRNA, la secuencia "semilla". Cualquier secuencia de complementariedad entre el miRNA y esta región va a generar una disminución en los niveles de expresión de mRNA diana. La complementariedad con la secuencia semilla puede ocurrir en cualquier región del mRNA, pero es más probable que se dé en la región 3' UTR de un mRNA (Qin, 2010).

#### *Degradación del mRNA*

Cuando la complementariedad es perfecta entre la unidad RISC en 3'UTRs en el mRNA y la región semilla del miRNA, esto es suficiente para causar la escisión endonucleolítica

y la degradación de mRNA (Zhang, 2007). El proceso tendría lugar en un compartimento citoplasmático conocido como *cuerpos de procesamiento* (o *cuerpos P*) que contienen las enzimas de degradación, junto con las exonucleasas, para llevar a cabo el proceso de degradación liderado por el RISC, las proteínas argonautas y los miRNAs (Al-Khanbashi, 2015).

### *Represión de la traducción*

Se ha publicado que los miRNAs también pueden unirse a otras regiones en el mRNA diana. Según el grado de homología con la secuencia diana 3'UTR, los miRNAs pueden inducir la represión o la degradación traduccional de los mRNAs. Dado que cada miRNA es capaz de regular la expresión de muchos genes, cada miRNA puede regular simultáneamente múltiples vías de señalización celular (Lytle, 2007).

La represión traduccional se determina por el grado de complementariedad basado en el emparejamiento de bases nitrogenadas entre la secuencia de semillas del miRNA y el mRNA objetivo.

La represión traduccional ocurre cuando el miRNA se empareja imperfectamente con el mRNA diana que dirige el RISC para que se una a la región no traducida 3' (3'UTR). Esto causa un abultamiento en el dúplex por el emparejamiento próximo de miRNA y el mRNA diana, generando un bloqueo en la traducción y protegiendo el mRNA diana de las endonucleasas. Este complejo luego se transporta a los *cuerpos P* que, como se ha indicado, contienen enzimas que están involucradas en la degradación del mRNA. La eficacia de la represión traduccional se ve afectada por el número de sitios de unión entre el miRNA y su mRNA diana.

Además, se han propuesto recientemente otros mecanismos "no canónicos" de acción de los miRNAs. Así, los miRNAs podrían aumentar la traducción de un mRNA diana, reclutando complejos de proteínas en la región rica en AU del mRNA diana o podrían aumentar indirectamente los niveles de este mRNA interactuando y modulando proteínas represoras que bloquean la traducción del mRNA diana (Eiring, 2010). Otra evidencia sugiere que los miRNAs podrían mejorar la biogénesis de los ribosomas, modulando así la síntesis de proteínas, o evadiendo el control del ciclo celular para así activar la represión del gen diana (Vasudevan, 2007).

### **1.6.3 Participación de los miRNA en el cáncer**

Los miRNAs regulan procesos clave de la activación y supresión de genes. Un solo miRNA puede coordinar múltiples vías que involucran la regulación de un gran número de genes, así mismo diferentes miRNA pueden controlar un solo miRNA diana. Este papel múltiple refleja la complejidad de la regulación génica, que constituye una complicada red de interacciones moleculares que median las funciones celulares (Kim, 2006), incluyendo la diferenciación de células hematopoyéticas, apoptosis, proliferación celular, desarrollo de órganos, etc. (Bartel, 2004).

Los miRNAs poseen un importante papel en el control de la expresión de mRNA, actuando como silenciadores o como potenciadores de determinadas respuestas, tanto en organismos procariontes como en eucariotas (Munroe, 2004; Zhang, 2018). Su importancia funcional se refleja por la alta conservación entre especies. Su función biológica abarca desde procesos normales de regulación celular, hasta enfermedades complejas, como las cardiovasculares (Mirzadeh Azad, 2020; Martens, 2019), diabetes (Shou, 2019; Goodarzi, 2019), enfermedades autoinmunes (Pan, 2019; Piket, 2019), infecciosas (Voinnet, 2005; Lv, 2019; Menard, 2019; Sadri, 2019) y el cáncer (Cui, 2019; Bach, 2019), entre otros.

En los últimos años ha aumentado el número de publicaciones que hacen referencia a la función que tienen los miRNAs en varios procesos biológicos asociados al cáncer. Así, se ha descubierto que el 50% de todos los genes que codifican miRNAs humanos, se encuentran en sitios frágiles dentro del genoma asociados con deleciones, amplificaciones o translocaciones; alteraciones genómicas a su vez implicadas en la tumorigénesis. En referencia a esto se ha publicado un estudio de hibridación genómica comparativa (CGH) en tumores epiteliales que mostró que el 73% de los genes que codifican miRNAs en el cáncer de mama residen en regiones genómicas afectadas por variaciones en el número de copias (Zhang, 2006).

#### ***1.6.3.1 Mecanismos que alteran los niveles de expresión de los miRNAs***

##### ***Amplificación o deleción***

Tanto la amplificación como la deleción de las secuencias de DNA que codifican los miRNAs pueden alterar su expresión. Así la amplificación de un miRNA puede aumentar el control sobre el mRNA de su gen diana. Si el gen objetivo es un oncogén, al estar amplificado el miRNA, se va a producir un silenciamiento del gen diana, en este caso un

oncogen, por lo cual habría menos probabilidad de desarrollo tumoral (siendo así al miRNA en cuestión se le denomina *oncosuppressor-miR*); si por el contrario mRNA del gen diana es un supresor tumoral, al haber una amplificación del miRNA, esto conllevará al silenciamiento del gen supresor tumoral y, por ende, se podría generar un desarrollo tumoral (en este caso, el miRNA se denominará *oncomiR*) (Bertoli, 2015).

#### *Mecanismos epigenéticos, metilación*

Una gran proporción de *loci* que contienen genes de miRNA en el genoma están asociados con las islas CpG, lo que proporciona bases sólidas para su regulación por metilación (Weber, 2007).

Se ha publicado que la hipermetilación del promotor del *miR-125b* está relacionada con el desarrollo de cáncer de mama invasivo y se asocia a una menor supervivencia debido a la sobreexpresión de su transcrito procedente del gen diana *ETS1 (FFT)*. Así mismo, la hipermetilación del promotor del *miR-335* en líneas celulares y tumores, interfiere con su papel supresor de la invasión y colonización metastásica, así como con la recidiva (Lehmann, 2014). En relación con el clúster denominado miR-200, se han observado diferentes patrones de metilación en el promotor del clúster de miR-200b en diferentes subtipos de cáncer de mama (Castilla, 2012). Para el caso de Let7e-3p, la hipometilación de la región genómica que lo contiene se ha asociado con pobre pronóstico en cáncer de mama (Aure, 2013).

#### *Polimorfismos presentes en miRNAs*

En general, los miRNAs se encuentran localizados en regiones asociadas a cáncer, sitios frágiles, regiones mínimas de pérdida de heterocigosidad, regiones mínimas de amplificación o regiones de puntos de ruptura comunes. Tal es el caso de Let-7, miR125b, miR100 y miR34a, localizados en sitios frágiles del cromosoma 11 (11q23-q24D). En el caso de miR-196a2, que está relacionado con aumento del riesgo de desarrollar cáncer de mama, la presencia del alelo T (rs11614913) implica una disminución del riesgo de desarrollar cáncer de mama, por el contrario, los homocigotos C se asocian con un mayor riesgo (Calin, 2004).

#### *Polimorfismos en los sitios de unión con la diana del miRNA*

Para el caso del gen *XRCC1 (X-ray repair cross-complementing group 1)*, que tiene un efecto protector sobre varios tipos de cáncer, incluyendo el de mama, se ha visto que el

alelo T (rs1799782) produce una unión fuerte con el miR-138, lo que conlleva a la inhibición de *XRCC1* (Han, 2003).

El polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) (rs743554) en el gen *ITGB4* (integrina- $\beta$ 4) está relacionada con una disminución de la supervivencia en cáncer de mama, independientemente de la presencia de otros factores clínico-patológicos (Brendle, 2008).

#### 1.6.4 Participación de los miRNAs en el desarrollo del cáncer de mama

La desregulación de los miRNAs está implicada en el inicio y progresión del cáncer de mama, y se ha observado que pueden actuar como oncogenes o como genes supresores de tumores (Iorio, 2005). Esta desregulación puede ocurrir tanto a nivel genético como epigenético, mediante la presencia del SNP en la secuencia del miRNA, en el sitio de unión al mRNA objetivo o, a través de la metilación aberrante del DNA y la modificación de histonas (Melo, 2011).

Los miRNAs también tienen un importante papel en el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento del cáncer de mama. Según lo publicado, algunos miRNAs están emergiendo como biomarcadores para el diagnóstico, tal es el caso de miR-9, miR-10b y miR-17-5p (Christodoulatos, 2014); para el pronóstico y la predicción de respuesta terapéutica; y tienen funciones importantes en el control de procesos como son la invasión y metástasis, la proliferación, apoptosis y la inestabilidad genómica (Bertoli, 2015).

La transición epitelio-mesénquimal (EMT) es un conjunto de eventos moleculares que permiten la conversión de células epiteliales en células mesénquimales con propiedades migratorias. Este proceso sucede durante el desarrollo de los vertebrados y se mantiene silente en la etapa adulta; pero se puede reactivar en enfermedades como la fibrosis y la progresión tumoral. Las células epiteliales se encuentran unidas entre sí por uniones adherentes, conformadas por proteínas como E-cadherina, cateninas y anillos de actina. Además, las uniones adherentes están asociadas a complejos de polaridad ápico-basal. Durante la transición epitelio-mesénquima, se reprime la transcripción de los genes que codifican para los componentes de las uniones adherentes intercelulares y se pierde la polaridad ápico-basal de la célula. Además, la célula sufre cambios en el citoesqueleto que promueven una constricción apical en la célula y una desorganización de la membrana basal. Finalmente, las células se delaminan y migran (Hervé, 2009).

Algunos de los principales miRNAs que regulan la vía de WNT/beta-catenina son: Let-7, regulador de la autorrenovación y diferenciación de las *stem cells* en cáncer de mama.

Lin-28, regulador de la actividad de las *stem cells*, se expresa abundantemente en las *stem cells* embrionarias. Funciona como un regulador negativo de Let-7, evitando su procesamiento por Dicer III y Drosha III. Existe, por tanto, una retroalimentación reguladora de Let-7 y Lin-28 (Cai, 2013; Cai, 2013; Ye, 2014).

Otros miRNAs son interesantes como potenciales herramientas nuevas, fácilmente accesibles, asequibles y no invasivas para el tratamiento personalizado de pacientes con cáncer de mama, debido a que al estar circulando en fluidos corporales podremos evaluar determinados miRNAs relacionados con pronóstico clínico y respuesta al tratamiento, como por ejemplo el miR-155 (Sun, 2012) y el miR-210 (Jung, 2012), entre otros.

Los nuevos medicamentos basados en miRNAs también son una terapia prometedora para el cáncer de mama (ej., miR-9, miR-21, miR34a, miR145 y miR150), y otros miRNAs muestran un papel fundamental en la modulación de la respuesta a otros tratamientos, pudiendo aumentar su eficacia (ej., miR-21, miR34a, miR195, miR200c y miR203, en combinación con la quimioterapia).

**Tabla 1. MiRNAs desregulados en cáncer de mama. Se han dividido en 2 grupos, según estén sobrerregulados o subregulados. CM, cáncer de mama.**

	miRNA	Tipo de muestra	Referencia
<b>Sobrerregulados</b>	miR-21	Línea celulares CM	Corcoran, 2011; Zhang, 2012; Ozgun, 2013; Dong, 2014; Tang, 2012
	miR-221/222 cluster	Línea celulares CM	Li, 2013
	miR-221/222 cluster BC cell lines [161] miR-9, miR10b, miR-29a, miR-96, miR-146a, miR-181, miR-373, miR-375, miR-520c, miR589	Línea celulares CM	Christodoulatos, 2014; Tang, 2012; Iorio, 2005; Sandhu, 2014; Ma, 2007; Ma, 2010; Sochor, 2014
	miR-10b	Línea celulares CM	Ma, 2007
	miR-155	Línea celulares CM	Anastasov, 2012; Tang, 2012; Mattiske, 2012
	miR-210	Línea celulares CM	Shimono, 2009
<b>Subregulados</b>	miR-30, miR-31, miR-34, miR-93, miR-126, miR-146a, miR-195, miR-205, miR-206, miR-503	Línea celulares CM; Líneas celulares TNBC	Tang, 2012; Hu, 2015; Zhao, 2014; Kim, 2012; Jang, 2014
	let-7 family	Línea celulares CM	Tang, 2012; Yan, 2014
	miR-92a cluster	Línea celulares CM, Líneas celulares TNBC	Li, 2011; Leung, 2014
	miR-200 family	Línea celulares CM	Tang, 2012; Shimono, 2009
	miR-15/16 cluster, miR-103/107, miR-145, miR-335, miR-128b	Línea celulares CM	Polytarchou, 2012
	miR-10b*	Línea celulares CM, xenografted tumor	Biagion, 2013; Biagion, 2012

\*TNBC= cancer de mama triple negativo.

Adaptada de Bertoli, 2015.

A continuación, describiremos los principales miRNAs reportados por tener un papel crucial en el desarrollo y evolución del cáncer de mama, y que hemos incluido en este trabajo.

### **Familia Let**

El miRNA let-7 fue uno de los primeros miRNAs identificados, controla la salida del ciclo celular y la diferenciación terminal en *Caenorhabditis elegans*. La sobreexpresión de let-7 en líneas celulares de cáncer altera la progresión del ciclo celular y reduce la división celular, de modo que let-7 funciona como un supresor tumoral. Regula la expresión de diversos oncogenes asociados al cáncer de pulmón, y es un regulador maestro de las vías de proliferación celular.

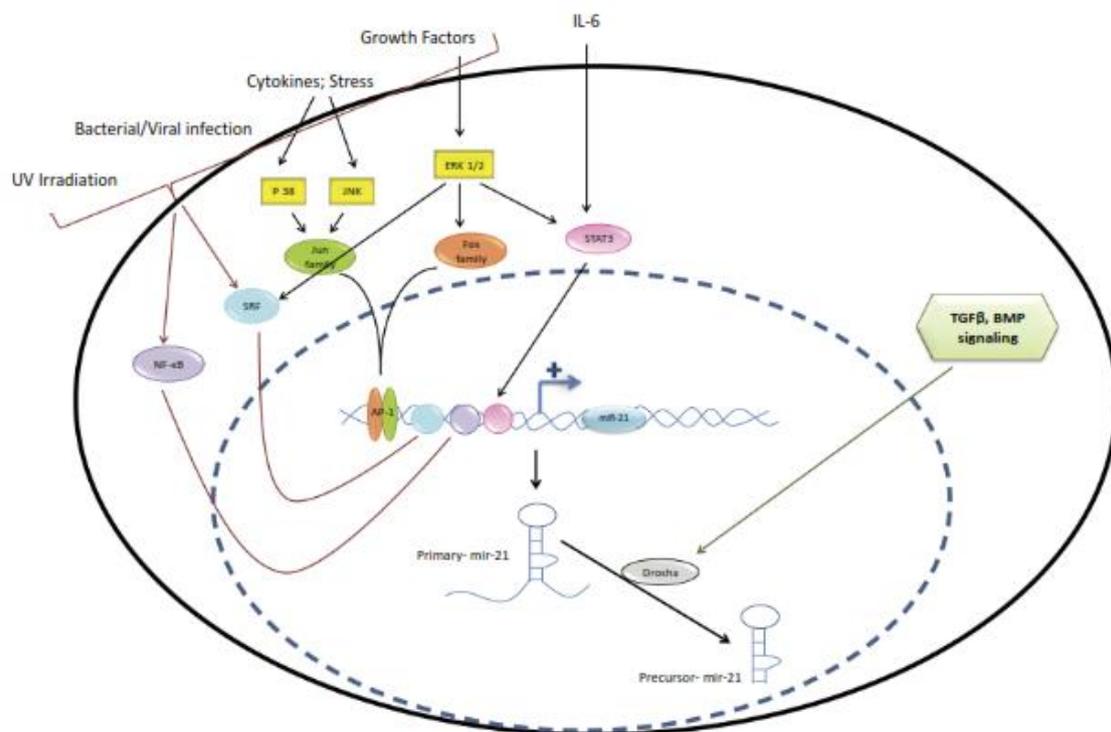
Se ha demostrado que let-7 está regulado negativamente en las células de cáncer de mama. La restauración de let-7 en estas células parece suprimir la tumorigénesis del cáncer de mama in vivo (Yu, 2007).

### **miRNA-21**

Se ha encontrado una mayor expresión de miR-21 in vitro en líneas y tejidos celulares de cáncer de mama comparado con tejido de mama normal (Zhang, 2012; Corcoran, 2011). Según lo reportado por Ozgun y cols. parece estar implicado en el desarrollo y proliferación del cáncer de mama (Ozgun, 2013). La actividad de miR-21 controla la proliferación celular, el punto de control G2/M y la difusión de metástasis (Dong, 2014; Anastasov, 2012; Min, 2014); también parece regular la expresión de muchos anti-oncogenes, incluyendo *TPM1*, *muerte celular programada 4*, *maspin* y *Bcl-2*, lo que favorece la metástasis y el desarrollo de hiperplasias precursoras del cáncer de mama (Li, 2013).

Se ha publicado que el miR-21 actúa como supresor de la expresión de *Wnt-1*, y así inhibe la diferenciación de las células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC). A la vez, la sobreexpresión de miR-21 reduce *PDCD4* y aumenta la expresión de *Bcl-2*, generando una reducción de la apoptosis y acelerando el crecimiento celular. Se ha observado una mayor expresión de miR-21 en tumores de mama, pulmón, colon, páncreas, próstata y gástrico (Ye, 2014).

Existen varias secuencias potenciadoras corriente arriba del promotor miR-21, que son reconocidas por diferentes factores transcripcionales como la proteína de activación 1 (AP-1; compuesta por la familia Jun y Fos), transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), el factor de respuesta sérica (SRF) y factor nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B). La elevada actividad de estos factores a través de vías de señalización aberrantes en cánceres podría inducir una regulación positiva de miR-21. Además, la regulación de miR-21 podría verse afectada por eventos postranscripcionales a través de la señalización del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) / proteína morfogenética ósea (BMP) que promueven la maduración de miR-21 por el complejo DROSHA (Figura 5) (Motamedi, 2019).



**Figura 5. Regulación positiva de miR-21 en cáncer. (Motamedi, et al. Breast Cancer. 2019).**

### **miRNA-200b**

Los miRNAs de la familia miR-200 inducen la proliferación en células progenitoras luminales de mama y aumentan el crecimiento y la capacidad metastásica de las células epiteliales de mama transformadas, incluidas las presentes en variantes histológicas como los carcinomas metaplásicos (Sánchez, 2017). Se ha publicado que formas de miR-200, como miR-200b y miR-200c, regulan negativamente a *c-MYB* en células ER+ y que el TGF- $\beta$  inductor de EMT estabiliza *c-MYB* (Cesi, 2011).

La familia miRNA-200 está implicada en la resistencia contra múltiples terapias en diferentes tipos de cáncer (Ahmad, 2013; San, 2017); por ejemplo, a la terapia dirigida frente al EGFR en cáncer de vejiga (Adam, 2009) y cáncer de pulmón, en la resistencia a sorafenib e imatinib en cáncer renal (Gao, 2014), en la resistencia a oxaliplatino (Tanaka, 2015), al 5-fluouracilo en cáncer de colon, en la resistencia a paclitaxel y carboplatino en cáncer de ovario y en la resistencia a nintedanib (Nishijima, 2006) y paclitaxel en cáncer de pulmón (Zhao, 2018).

### **miRNA-128**

Se ha observado un aumento en la expresión de miR-128 en muchos tipos de cáncer, como el cáncer gástrico (Katada, 2009), gliomas (Pang, 2009) y el cáncer de pulmón (Cai, 2017), pero el patrón de expresión y la función patológica del miR-128 en el cáncer de mama no está clara. Hay estudios que indican que el miR-128 podría actuar como un oncomiR y participar en la patogénesis del cáncer de mama. El miR-128 podría unirse directamente al 3'-UTR de *HIC1*, suprimir su expresión, y así promover la proliferación e invasión e inhibir la apoptosis de las células de cáncer de mama (Li, 2019).

### **miRNA-130**

El miR-130a puede regular la proliferación y la apoptosis de las células tumorales. Rab5a es miembro de la subfamilia Rab de pequeñas GTPasas, y se ha confirmado su asociación con diversas funciones celulares, como crecimiento, diferenciación, expresión génica y transducción de señales (Lanzetti, 2004). La sobreexpresión del miR-130a inhibe la proliferación celular del cáncer de mama y la apoptosis al actuar sobre el mRNA de *Rab5a* (Pan, 2015).

### **miRNA-152**

La participación del miR-152 en el inicio y la progresión del cáncer de mama ha sido estudiada desde que se detectó en tejido tumoral humano y en un panel de líneas celulares de este tumor mediante qRT-PCR. Se ha observado que la expresión del miR-152 se redujo significativamente en muestras de tejido de cáncer de mama en comparación con tejidos adyacentes no cancerosos, así como en líneas celulares de cáncer de mama. La sobreexpresión del miR-152 suprime significativamente la proliferación y la migración e invasión de células de cáncer de mama. En ensayos de luciferasa se demostró que *ROCK1* es un gen objetivo directo y funcional de miR-152 en el cáncer de

mama. Además, la baja expresión de *ROCK1* podría inhibir la proliferación, migración e invasión celular en este tumor. En definitiva, miR-152 inhibió el crecimiento del cáncer de mama y la metástasis a través de la regulación negativa de la expresión de *ROCK1*. Estos datos sugieren que la vía miR-152/*ROCK1* podría ser un objetivo terapéutico útil para el tratamiento del cáncer de mama (Maimaitiming, 2020). También se ha sugerido que miR-152 puede ser un marcador pronóstico prometedor y una diana terapéutica en múltiples cánceres humanos (Cheng, 2014; Zhang, 2015).

### ***miRNA-125b***

En conjunto MiR-125b es considerado un supresor tumoral por su papel en la inhibición de la proliferación y la invasión de las células tumorales de la glándula mamaria (Cheng, 2019), al actuar como un regulador negativo de KIAA1522, el cual funciona como promotor de tumores en múltiples cánceres, incluido el cáncer de mama (Li, 2018; Kassem, 2019). También se ha propuesto a c-Raf como un blanco de miR-125b que conduce a su efecto antiproliferativo (Hofmann, 2009; Tang, 2012).

Sin embargo, se ha reportado el importante efecto de miR-125b sobre la apoptosis inducida por paclitaxel y doxorrubicina en células de cáncer de mama al regular de forma negativa las proteínas que están implicadas en la activación de la apoptosis después de una detención mitótica prolongada inducida por paclitaxel o un daño posterior del DNA si se produce un deslizamiento mitótico. Se cree que los niveles altos de miR-125b pueden no favorecer el tratamiento con paclitaxel, sin embargo, la disminución de los niveles de miR-125b puede aumentar la apoptosis inducida por paclitaxel, posiblemente también la apoptosis inducida por genotóxicos, aunque también pueden ocurrir efectos adversos, incluida la disminución de la apoptosis inducida por doxorrubicina (Matuszyk, 2020). Se estima que ejerce una acción importante en la apoptosis (Le, 2011) y respuesta al tratamiento debido a que regula de forma negativa, a nivel postranscripcional, los mRNA que codifican las proteínas pro-apoptóticas de la familia BCL - 2 (BAK1, PUMA, BMF) y anti-apoptóticas (MCL1) (Luo, 2017).

### ***miRNA-100***

MiR-100 actúa como regulador de múltiples procesos celulares, como el ciclo celular, proliferación, diferenciación, migración, invasión (Jiang, 2016) y apoptosis (Gong, 2015; Li, 2015). Se encuentra subexpresado en el cáncer de mama, regula la proliferación y

el oncogén que promueve la supervivencia factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF2) (Gebeshuber, 2013).

Wang y cols. determinaron la expresión de miR-100 en macrófagos asociados a tumores (TAM) aislados de tejido tumoral de glándula mamaria de ratón, encontrando que podría aumentar la quimiosensibilidad de cisplatino y la inhibición de la metástasis a pulmón, demostraron que miR-100 y la IL-1ra desempeñan un papel crucial en el mantenimiento del fenotipo de TAM y en la inducción de la progresión tumoral, así como la inhibición de miR-100 con un antagomir, el cual es una clase de oligonucleótidos diseñados químicamente que evitan que otras moléculas se unan a un sitio deseado en una molécula de ARNm y se utilizan para silenciar los microARN endógenos, lo cual podría suprimir significativamente la metástasis pulmonar (Wang, 2018).

### ***miRNA-214***

La expresión de miR-214 se ha reportado alterada en diferentes tipos de tumor, en carcinoma de ovario (Liu, 2018) e hígado (Fan, 2016) está subexpresado, mientras que en carcinoma de páncreas (Kuninty, 2016), gástrico (Li, 2018) y de mama (Kalniete, 2015) se ha reportado como sobreexpresado. En cáncer de mama miR-214 está estrechamente asociado con la regulación del desarrollo de células tumorales, incluido el crecimiento celular, la apoptosis y la metástasis (Chen, 2018; Zhang, 2019).

### ***miRNA-34a***

En humanos el gen miR-34a se encuentra localizado en el cromosoma 1p36.23, de acuerdo con lo reportado se ha identificado como un blanco de P53 y actúa como un supresor de tumores (Misso, 2014). Así mismo, miR-34a puede estar involucrado en la regulación del proceso de resistencia a múltiples fármacos (MDR) en el cáncer de mama al influir en la transcripción de BCL-2, CCND1 y NOTCH1. Por lo tanto, es posible que miR-34a puede ser útil como marcador diagnóstico, indicador de pronóstico en pacientes con cáncer de mama, así como de MDR, esto basándose en los resultados de Tang y cols., quienes encontraron que los niveles de expresión de miR-34a eran significativamente más altos en pacientes con cáncer de mama en comparación con mujeres sanas (Tang, 2012), lo que lo convierte en un biomarcador prometedor por la asociación entre miR-34a y el riesgo de cáncer de mama (Kassem, 2019).

### **miRNA-374**

En cáncer de mama la sobreexpresión de miR-374a activa la beta-catenina en la vía de señalización de Wnt/beta-catenina y acelera la EMT y la metástasis distal. Así mismo, afecta a múltiples reguladores negativos de la EMT, incluidos los genes supresores de tumores *WIF1*, *PTEN* y *WNT5A*. En ensayos realizados en ratones al recibir el trasplante en la glándula mamaria de células MCF7/miR-374a y 4T1/miR-374a, estos desarrollaron tumores con metástasis a pulmón. Al transfectar la línea celular MDA-MB-435 con el inhibidor del miR-374a se logró una reducción en la traslocación de la beta-catenina en el núcleo, lo cual se vio reflejado en un tamaño de tumor menor y en la no presencia de metástasis en el pulmón (Cai, 2013). MiR-374 activa constitutivamente la vía de señalización Wnt/beta-catenina y podría convertirse en una diana para el tratamiento del cáncer de mama metastásico temprano (Ye, 2014).

Por el contrario, en melanoma, uno de los tumores cutáneos más malignos con una incidencia en constante aumento en todo el mundo. MiR-374 ha sido reportado por inhibir la proliferación celular y promover la apoptosis de las células en melanoma de ratón al inactivar la vía de señalización Wnt, por su interacción sobre la tirosinasa (Li, 2019).

En un estudio realizado por Luo y cols., en el cual se analizó el nivel de expresión de seis miRNA en el suero de mujeres con cáncer de mama y mujeres sanas no se observaron diferencias en los niveles de expresión del miRNA-374 (Luo, 2014). Se ha descrito a miR-374 como un marcador característico de la célula T-reg humana (Rouas, 2009).

### **miRNA-497**

En la glándula mamaria normal la expresión de miR-497 es mayor que el tejido tumoral y al realizar los ensayos para aumentar la expresión de miR-497 se suprime la proliferación e invasión de células tumorales en cáncer de mama (Li, 2011). Regula el crecimiento celular y la invasión actuando sobre la ciclina E1 en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (Luo, 2013). Además, se ha demostrado que este miRNA podría inducir la apoptosis al actuar sobre Bcl-w en ensayos realizados in vitro en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (Shen, 2012).

Se ha reportado que pacientes con alta expresión de miR-497 presentan una mayor supervivencia. Al analizar en el tejido la expresión de este miRNA y proteínas involucradas en la apoptosis, sugieren que miR-497 podría influir en la supervivencia de cáncer de mama, como un supresor tumoral al regular SMAD7, debido a que este último promueve la proliferación celular (Stolfi, 2014; Liu, 2016).

### ***miRNA-210***

El miRNA-210-3p es el miRNA regulado por hipoxia más destacado, es un objetivo directo del factor alfa inducible por hipoxia 1 (HIF-1 $\alpha$ ) y se ha encontrado sobreexpresado de forma significativa en diferentes cánceres humanos (Quin, 2014). MiR-210-3p parece ser el involucrado funcionalmente en una variedad de procesos biológicos como el ciclo celular, la supervivencia celular, la diferenciación de células madre, angiogénesis, reparación de daños en el DNA, metabolismo mitocondrial y respuesta inmune (Bavelloni, 2017).

También se ha descrito la participación de MiR-210-3p en la respuesta a regímenes terapéuticos que incluyen docetaxel en terapia secuencial con antraciclinas, lo que sugiere que puede representar un biomarcador predictivo en pacientes con cáncer de mama.

En el cáncer de mama, la sobreexpresión de miR-210-3p se correlacionó inicialmente con un mal pronóstico (Wang, 2014), y se asoció con invasividad y menor tiempo para desarrollar metástasis a distancia (Foekens, 2008; Toyama, 2012). En particular, se demostró que miR-210-3p está sobre-expresado en el cáncer de mama triple negativo (TNBC) en comparación con los tumores ER+ (Foekens, 2008). En TNBC se ha encontrado que los altos niveles de miR-210 se correlacionan con un mayor riesgo de recurrencia con el tratamiento con tamoxifeno. MiR-210 tiende a localizarse y expresarse tanto en células epiteliales tumorales como en el microambiente tumoral (TME) de muestras de TNBC, particularmente en células inflamatorias donde es probable que esté regulado por un mecanismo independiente de HIF-1 $\alpha$  (Bar, 2017).

### ***miRNA-29b***

MiR-29 es un importante regulador que desempeña diversas funciones en diferentes tipos de cáncer (Jiang, 2014). Inicialmente se indicó que miR-29 podría desempeñar un papel como supresor tumoral en las células de cáncer de mama mediante la regulación negativa de B-Myb (Wu, 2013), tiempo después se publicaría que miR-29b aceleraba el crecimiento y la metástasis de las células de cáncer de mama (Liu, 2017).

Gao y cols., han referido que el nivel de expresión de miR-29 se regula positivamente en las células tratadas con Sinomenine (Sino), así como la sobreexpresión de miR-29 exhibía una función inhibidora del crecimiento, la migración y la invasión de las células MDA-MB-231 después del manejo con Sino. Por lo cual se ha reportado que miR-29

podría ser un mediador vital para participar en la modulación de la acción antitumoral de Sino en células de cáncer de mama (Gao, 2019).

La reducción de los niveles de miR-30 promueve la autorrenovación e inhibe la apoptosis en las células que inician tumores de mama (Yu, 2010). El extremo 3'UTR de ADAM12-L es un objetivo directo de los miembros de la familia miR-29 y miR-200, estos miRNAs desempeñan un papel importante en la progresión del cáncer de mama y se cree que los diferentes valores pronósticos y quimiopredictivos de ADAM12-L y ADAM12-S en el cáncer de mama puede estar relacionado con el nivel de expresión de miRNA-29 (Duhachek-Muggy, 2015).

### ***miRNA-451***

El miR-451 está ampliamente desregulado en diferentes tipos de cáncer como son gástrico (Pan, 2013), de pulmón (Wang, 2011) y mama y desempeña un papel clave en el inicio y la progresión del tumor (Pan, 2013). Algunos estudios han demostrado que el miR-451 actúa como supresor de tumores y está subexpresado en el cáncer, otros estudios han sugerido el aumento en el nivel de expresión en pacientes con cáncer en comparación a sujetos sanos (Motamedi, 2019).

Se ha reportado que miR-451 está relacionado con la resistencia a múltiples fármacos (MDR) (Gu, 2015; Wang, 2017), debido a que una elevada expresión de miR-451 puede suprimir la expresión del gen MDR-1 e induce resistencia a la doxorubicina en cáncer de mama (Kovalchuk, 2008; Chai, 2011). Gu y cols, sugieren que miR-451 puede tener un significado funcional en la predicción de la resistencia a la quimioterapia neoadyuvante en el tratamiento de cáncer de mama (Gu, 2016).

### **1.6.5. miRNAs extracelulares como marcadores tumorales**

Los miRNAs extracelulares pueden actuar como supresores y como oncomiRs mediante diferentes estímulos. Diferentes estudios proporcionaron la evidencia de que miRNAs pueden liberarse de las células tumorales en respuesta a señales específicas e ingresen en la circulación en forma estable, como moléculas relacionadas con el cáncer, y puedan así servir como biomarcadores para el diagnóstico temprano, el pronóstico y las estrategias terapéuticas individualizadas.

Varios estudios han determinado los posibles miRNAs desregulados en cáncer de mama con el propósito de ser usados en diagnóstico (Nassar, 2014; Zhang, 2014).

### 1.6.5.1 miRNAs circulantes

Los miRNAs son reguladores intracelulares de la expresión génica sin embargo también se han detectado en forma estable en diferentes fluidos corporales, de manera principal en el plasma, transportados en exosomas o microvesículas, asociados a proteínas ó a lipoproteínas e inclusive a cuerpos apoptóticos. En 2008, se publicaron investigaciones que confirmaban la existencia de miRNAs endógenos de 18 a 24 nt en el plasma humano mediante ensayos de clonación, secuenciación y cuantificación (Mitchell, 2008).

El almacenamiento a temperatura ambiente, la congelación-descongelación o variaciones extremas en el pH no producían un descenso de los miRNAs circulantes (Duttgupta, 2011; Kibel, 2009). Sin embargo, los miRNAs obtenidos desde el plasma (Arroyo, 2011) y los miRNAs sintéticos (Tsui *et al.*, 2002; Kibel, 2009) se degradan rápidamente cuando se cultivaron con plasma, lo que sugiere que los miRNA endógenos resiste a las RNasas debido a varias modificaciones.

Hay dos poblaciones principales de miRNAs circulantes, asociadas a vesículas y no asociadas a vesículas, que reflejan los diferentes mecanismos de su liberación. Algunos miRNAs específicos de tejido se pueden liberar a la circulación junto con proteínas y, por lo tanto, se presentan sólo en complejos con proteínas, como el miR-122 específico del hígado (Chang, 2004). Sin embargo, debido a que la liberación de vesículas es esencial en el proceso de maduración y activación de la mayoría de las células sanguíneas, casi todos los miRNAs relacionados con los eritrocitos y las plaquetas, se empaquetan en vesículas y aparecen dentro de estas en la circulación sanguínea (Heijnen, 1999; Hunter, 2010).

Las vesículas unidas a la membrana celular, como los exosomas (de 50-90 nm) y las microvesículas (de 1 µm), contienen miRNAs extracelulares, que pueden detectarse a partir de esas vesículas aisladas y purificadas desde el plasma/suero (Valadi, 2007; Taylor y Gercel-Taylor, 2008; Hunter, 2010). En uno de los estudios realizados se encontraron múltiples RNAs heterogéneos en el bioanálisis de exosomas, que se obtuvieron de una línea de mastocitos. Asimismo, se observó una mayor cantidad de pequeños RNAs, mientras que la cantidad de RNAs ribosómicos fue baja (Valadi, 2007). Aunque está ampliamente descrito el empaquetamiento de miRNAs en vesículas; recientemente se ha observado que los cuerpos apoptóticos también son una forma de transporte vesicular de miRNAs, pero su contenido de miRNAs difiere del de los exosomas (Cui, 2019).

Pero la mayoría de los miRNA circulantes están en una forma no asociada a vesículas y unidos a proteínas, como el complejo con ribonucleoproteínas. Así, los niveles de miRNAs disminuyeron significativamente después de agregar proteinasa K al plasma; además los miRNAs pueden degradarse fácilmente por RNases cuando se disocian de un complejo proteico sensible a proteasas. Entre las proteínas que unen micro-RNAs se describen Argonaute2 (Ago), GW182, nucleofosmina1 (NPM1) y la lipoproteína de alta densidad (HDL) (Cui, 2019, Wang, 2010; Arroyo, 2011; Montani y Bianchi, 2016).

Ago2, la proteína central de la interferencia mediada por miRNAs, junto con GW182, serían las responsables de la protección y el transporte de los miRNA extracelulares (Wang, 2010; Arroyo, 2011; Yao, 2012; Montani y Bianchi, 2016). La degradación de los miRNAs se produce cuando Ago2 se aísla del complejo proteico (Arroyo, 2011) y cuando se bloquea GW182 (Yao, 2012). Otra proteína que participa en la protección de miRNAs es la proteína de unión al RNA nucleolar, nucleofosmina 1 (NPM1), que participa en la exportación de RNA y de ribosomas (Maggi, 2008). En un estudio, el miR-122 sintético se degradó por RNases cuando se incubó con NPM1, y se confirmó que el NPM1 no solo participa en el empaquetado de miRNAs, sino también en el proceso de exportación de los mismos (Wang, 2010).

La apolipoproteína AI (apo AI), que es un componente proteico de la lipoproteína de alta densidad (HDL) la cual dirige el transporte de colesterol desde las células de la pared arterial hasta el hígado y los órganos esteroideogénicos, por esta razón podría emplearse para guiar a ácidos nucleicos u otros fármacos que no son ácidos nucleicos (Rothblat y Phillips, 2010; Vickers, 2014). Aprovechando esta función se ha utilizado la HDL recombinante como vehículo para administrar fármacos antitumorales lipófilos en células de carcinoma hepatocelular humano *in vitro*, pero no *in vivo*, aprovechando las propiedades de carga de éster de colesterol hidrófobo de HDL (Lou, 2005, Kim, 2007).

En conclusión, estos transportadores proteicos protegen a los miRNAs circulantes de la degradación por RNases en varios fluidos corporales. Los micro-RNAs circulantes pueden estar asociados con un tipo celular y ser específicos de tejido. (Arroyo, 2011; Li, 2012).

### 1.6.6 miRNAs y resistencia al tratamiento en cáncer de mama

La resistencia a medicamentos puede deberse a: mecanismos de eliminación o detoxificación de fármacos, facilitación de procesos antiapoptóticos y de supervivencia celular, alteración del transporte de medicamentos (la molécula no entra a la célula diana o es removida inmediatamente).

#### *Resistencia a la quimioterapia*

El miR-34a se asocia con la respuesta a docetaxel a través de la alteración en la modificación de los niveles de de BCL2 (Kast, 2012) Por otro lado, el miR-125b, regula los niveles del antagonista-1 de BCL-2 (BAK1), induciendo resistencia al paclitaxel.

Se ha publicado que miR-328 regula negativamente a *BRCP*, causando una mayor respuesta al agente quimioterapéutico mitoxantrona (Pan, 2009).

Esto llevó a descubrir que muchos otros miRNAs se dirigen y regulan los niveles del transcrito de *MDR1*, incluidos miR-451 (Chen, 2010), miR-7, miR-345 (Pogribny, 2010) y miR-326 (Liang, 2010), lo que aumenta la sensibilidad celular a numerosos agentes quimioterapéuticos.

Además, miR-128 está implicado en la respuesta al tratamiento con docetaxel, tanto *in vitro* como en pacientes. Se observó que en células iniciadoras de tumor de mama (BT-IC) resistentes a la quimioterapia había una reducción en los niveles de expresión de miR-128 y un aumento de la expresión de BMI1 y ABCC5, también conocido como MRP5. Al inducir la expresión ectópica de miR-128 se redujo los niveles de las proteínas Bmi-1 y ABCC5 en BT-IC, junto con una menor viabilidad celular y un aumento de la apoptosis y daño del DNA en presencia de doxorubicina (Zhu, 2011).

#### *Resistencia a la radioterapia*

Las Poli (ADP-ribosa) polimerasas (PARPs) participan en la reparación del DNA por múltiples causas, como la exposición a los rayos ultravioleta (UV), radiaciones ionizantes, ciertos medicamentos contra el cáncer u otras sustancias presentes en el ambiente. En el tratamiento del cáncer, impedir la acción de PARP puede impedir que las células cancerosas reparen el daño a su DNA causándoles la muerte. Los inhibidores de PARP son un tipo de terapia dirigida que se utiliza en el contexto de la deficiencia funcional de BRCA.

El miR-182 afecta la reparación del DNA tras el tratamiento con radiaciones ionizantes, debido a que suprime la expresión de *BRCA1*. Así, se ha observado una correlación inversa entre los niveles de proteína BRCA1 y la expresión de miR-182 (Moskwa, 2011).

Como se indica en las siguientes secciones de este trabajo de tesis doctoral, en este trabajo se pretende entender mejor la participación de los miRNAs en la diferente susceptibilidad, evolución y respuesta al tratamiento del cáncer de mama.

## **HIPÓSTESIS Y OBJETIVOS**

## Hipótesis de trabajo

Uno de los aspectos más importantes dentro de la problemática del cáncer de mama es la alta heterogeneidad de su presentación clínica entre pacientes, considerándose una enfermedad de génesis compleja. Existen grandes diferencias en el grado de susceptibilidad a desarrollarlo y en la evolución de la enfermedad entre pacientes, en cuanto a la agresividad, respuesta al tratamiento y riesgo de recidiva, considerándose estos fenotipos complejos que son determinados por el efecto que ejercen genes encargados de regular diversos procesos en los diferentes niveles de la organización biológica. Una vez diagnosticado el cáncer de mama, hay una serie de criterios clínico-patológicos y moleculares establecidos para definir su pronóstico. Aún así, incluso en pacientes con el mismo subtipo de tumor y estadio de desarrollo tumoral, la respuesta al tratamiento es heterogénea (Dean-Colomb y Esteva, 2008). Ello se traduce en diferencias tanto en la respuesta inmediata al tratamiento como a largo plazo, incluidas la recaída, la resistencia tardía al tratamiento y el efecto sobre la metástasis, causa última de la muerte de las pacientes (Smigal *et al.*, 2006).

Parece que la diferente evolución tumoral y la respuesta al tratamiento están influenciadas por un importante control poligénico y por múltiples determinantes moleculares (Balmain *et al.*, 2003; Winter *et al.*, 2008). Entre estos determinantes moleculares estarían los miRNAs, que son pequeñas moléculas de RNA que participan, fundamentalmente, en la degradación de mRNA específicos. De este modo, participan en la regulación de la expresión génica y tienen una función importante en procesos fisiológicos y patológicos, incluido el cáncer. Así, se describen diferentes miRNAs que participan en el desarrollo, crecimiento y capacidad de diseminación tumoral, así como en la resistencia a la quimioterapia (Graveel *et al.*, 2015).

La desregulación de los niveles de miRNAs, influye en las vías de señalización celulares, debido a sus complejas interacciones a niveles pre- y post-transcripcionales (Mulrane *et al.*, 2013). Se ha descrito la asociación entre señales alteradas de miRNAs y el desarrollo del cáncer en general y del cáncer de mama en particular. Este sería el caso de la pérdida de miRNA supresores tumorales (oncosupresores-miRs) como let-7s, miR-34a, miR-125s y miR-200s, entre otros; así como de la sobreexpresión miRNA oncogénicos (onco-miRs), como miR-21, miR-135, miR-155, miR-224, miR-373 y miR-520c, entre otros (Tang *et al.*, 2012) y con la respuesta al tratamiento (Mulrane *et al.*, 2013).

El distinto comportamiento del cáncer de mama entre pacientes que aparentemente tienen la misma enfermedad histopatológica y estadio evolutivo, vendría determinado, en

parte, por la suma de efectos de genes modificadores de baja penetrancia. Nuestra **hipótesis de trabajo** es que los miRNAs serían subfenotipos moleculares que contribuyen a la heterogeneidad de comportamiento tumoral. Por tanto, los genes que codifican los miRNAs podrían formar parte del componente poligénico que regula la diferente susceptibilidad y evolución del cáncer; y, en concreto, del cáncer de mama.

## Objetivo global

El objetivo global de este estudio es determinar si algunos miRNAs contribuyen a explicar la diferente susceptibilidad, evolución y respuesta al tratamiento del cáncer de mama y si los genes que los codifican pueden contribuir a la influencia poligénica de la enfermedad.

Estudiar esta influencia en la población humana es difícil por la heterogeneidad genética de la población y la influencia ambiental compleja. Por ello, los estudios se llevan a cabo en un modelo de variabilidad fenotípica y genética limitadas y controladas. Este se generó mediante un cruce retrógrado o backcross entre dos cepas de ratón genéticamente homogéneas, singénicas, con distinto grado de susceptibilidad al cáncer de mama.

Para responder a este objetivo global, planteamos los siguientes objetivos específicos:

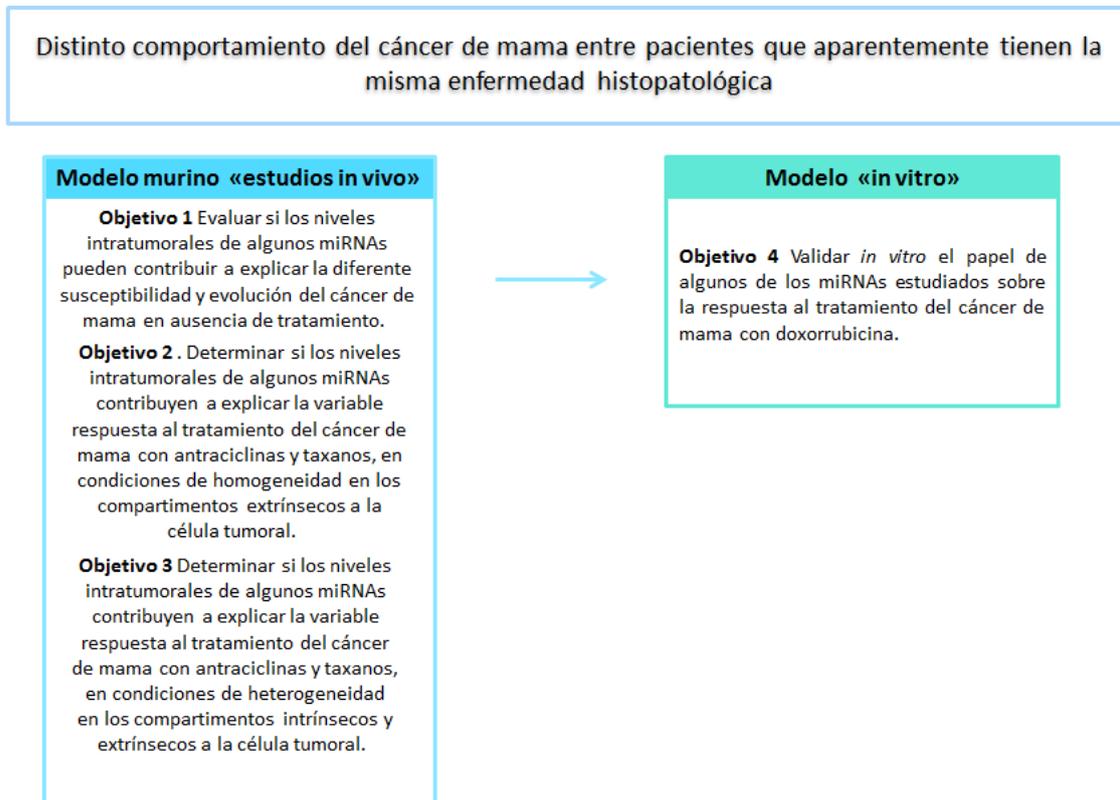
## Objetivos específicos

**Objetivo 1.** Evaluar si los niveles intratumorales de algunos miRNAs pueden contribuir a explicar la diferente susceptibilidad y evolución del cáncer de mama en ausencia de tratamiento.

**Objetivo 2.** Determinar si los niveles intratumorales de algunos miRNAs contribuyen a explicar la variable respuesta al tratamiento del cáncer de mama con antraciclinas y taxanos, en condiciones de homogeneidad en los factores extrínsecos a la célula tumoral.

**Objetivo 3.** Determinar si los niveles intratumorales de algunos miRNAs contribuyen a explicar la variable respuesta al tratamiento del cáncer de mama con antraciclinas y taxanos, en condiciones de heterogeneidad en los factores intrínsecos y extrínsecos a la célula tumoral.

**Objetivo 4.** Validar *in vitro* el papel de algunos de los miRNAs estudiados sobre la respuesta al tratamiento del cáncer de mama con doxorubicina.



**Figura 6.** Relación entre los objetivos específicos planteados en este trabajo de tesis doctoral.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

# 1. Modelo experimental

## 1.1 Cepas de ratón

En este estudio se utilizaron cepas singénicas o *inbred* de ratón con las siguientes características:

- C57BL/6J: es una cepa resistente a diferentes tumores, incluida la resistencia a desarrollar cáncer de mama (Rowse, 1998). En nuestro caso se obtuvo de los *Laboratorios Charles River España*.

- FVB/NJ: es una cepa susceptible a desarrollar cáncer de mama (Davie, et al., 2007); obtenida de los *Laboratorios Charles River España*.

- FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J: es un ratón transgénico que posee un fondo genético FVB y es portador del proto-oncogén *ErbB2/Neu* bajo el promotor LTR (*Long Terminal Repeat*) del *Mouse Mammary Tumor Virus* (MMTV), procedente de los *Laboratorios Jackson*. Este animal transgénico se produjo en el laboratorio del Dr. Muller (Guy et al., 1992). El transgén consiste en la secuencia de cDNA de la versión silvestre del gen *ErbB2/Neu* de rata, a la cual se le añadió la región promotora del MMTV y secuencias de *splicing* alternativo y poliadenilación procedentes del SV40 que confieren estabilidad al transcrito. Este transgén tiene una baja expresión en el epitelio mamario normal, glándula salival, bazo, timo y pulmón, pero se expresa a niveles elevados en el tejido tumoral (Guy et al., 1992). Los ratones transgénicos macho presentan cambios fenotípicos, por el contrario, en las hembras de fondo genético FVB, la expresión del transgén induce la aparición de adenocarcinomas focales rodeados de epitelio mamario hiperplásico a partir de los cuatro meses de edad, y con una mediana de edad de aparición de tumores de 7 meses. Además, se ha observado que alrededor del 70% de los ratones desarrollan metástasis multifocales en pulmón cuando superan los ocho meses de edad.

Es importante diferenciar este modelo *MMTV-ErbB2/Neu* que hemos empleado en el presente estudio, con la versión silvestre proto-oncogénica de *ErbB2/Neu*, del transgénico desarrollado por el grupo del Dr. Leder, el cual expresa una versión mutada oncogénica de *ErbB2/Neu* (o *NeuT*) bajo el control del mismo promotor del MMTV. Estos ratones *MMTV-NeuT* desarrollan tumores multifocales, afectando a todo el epitelio mamario, y que tienen la característica de aparecer antes; incluso los machos del modelo con la versión oncogénica de *ErbB2/Neu* pueden desarrollar tumores de mama.

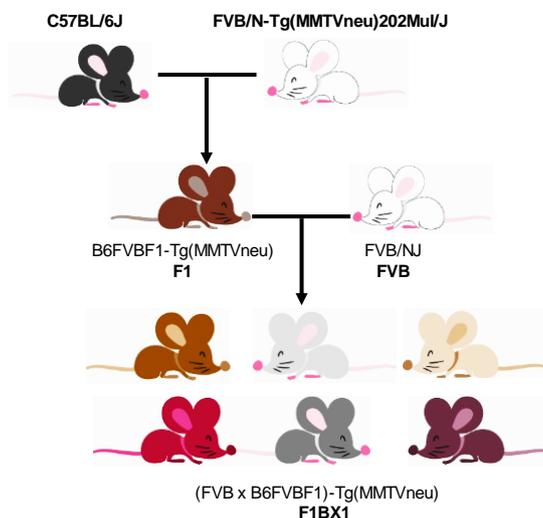
Los animales se mantuvieron en el *Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca* en condiciones libres de patógenos (SPF). Los procedimientos a los que se sometieron fueron conformes con las disposiciones de la Unión Europea, recogidas en el *Real Decreto 1201/2005 del 10 de octubre del Ministerio de Agricultura, Pesca y Ganadería* sobre la “Protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines específicos”. El proyecto fue evaluado positivamente por el *Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca*.

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

Previamente, se generó una primera cohorte proveniente del retrocruce o *backcross* entre dos cepas consanguíneas o singénicas (*inbred*), la cepa resistente C57BL/6J y la cepa susceptible FVB/NJ, portadora del proto-oncogén inductor de cáncer de mama *ErbB2/Neu*, bajo el promotor LTR del MMTV (FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J). Nótese que los fondos genéticos C57BL/6J y FVB/NJ tienen un comportamiento divergente en cuanto a la susceptibilidad al cáncer de mama, fenotipo que se desea estudiar. Los ratones FVB/N Tg(MMTVneu)202Mul/J son portadores del transgén en ambas cromosomas, en homocigosis, por lo tanto lo transmitieron en heterocigosis a toda su progenie. Como producto del cruce entre estas dos cepas se obtuvo la primera generación filial, denominada F1, B6FVBF1 Tg(MMTVneu), estos individuos son genéticamente idénticos entre ellos, siendo heterocigotos en todos los *loci* diferentes entre C57/BL6J y FVB/NJ, por lo cual portan un alelo procedente de cada una de las cepas parenterales.

Seguidamente, se realizó un retrocruce entre los ratones F1 con una cepa parental FVB/NJ, y producto de esto se obtuvieron los ratones (FVB x B6FVBF1)-Tg(MMTVneu), denominada F1BX1 en nuestro estudio (**Figura 3**). En esta generación cada ratón es portador de una combinación única de alelos procedentes de las cepas parentales en diferente proporción. Por lo tanto, pueden ser, en cada locus, homocigotos para el alelo FVB (F/F) o heterocigotos, con un alelo de FVB y otro de C57BL/6 (F/B). Nótese, sin embargo, que el componente genético procedente de la cepa FVB fue mayoritario, un cromosoma completo es siempre FVB y en el otro hay mayor o menor grado de recombinación con material genético de C57BL/6 (F/B), debido a que fue con la cepa que se realizó el retrocruce, por lo tanto, el componente C57BL/6 quedó reducido. El propósito de esta estrategia fue enriquecer la cohorte *backcross* en alelos de suscepti-

bilidad al cáncer de mama. Mediante esta estrategia se generó un modelo de variabilidad genética (y fenotípica) limitada y controlada, a partir de dos genomas homogéneos conocidos.



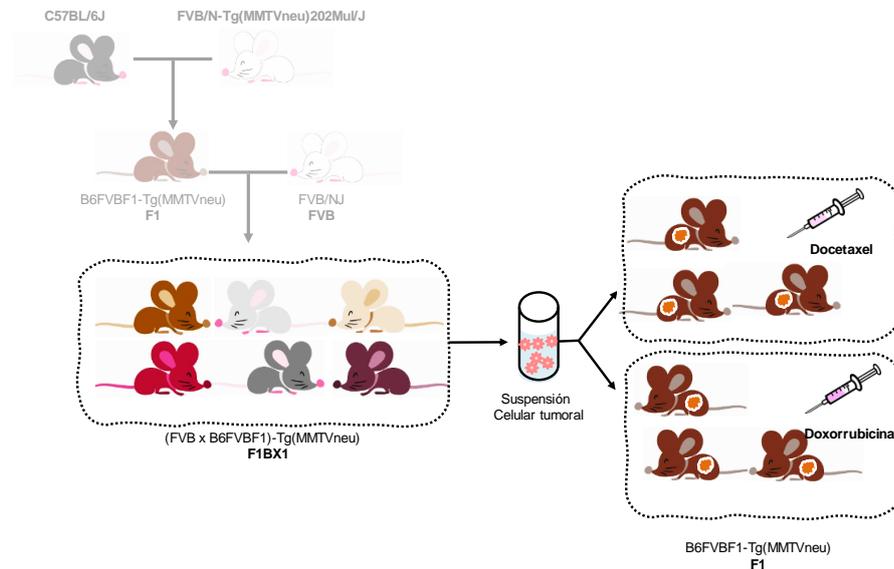
**Figura 3. Esquema de la estrategia seguida para generar los ratones F1BX1. La F1 portaba el transgén en heterocigosis, sólo el 50% de las hembras del backcross fueron portadoras del transgén.**

Debido a que se generó la cohorte F1BX1 mediante cruce entre ratones F1 que portan el transgén *MMTV-ErbB2/Neu* en homocigosis y FVB/NJ no transgénicos, sólo aproximadamente la mitad de ellos heredaron el transgén *MMTV-ErbB2/Neu*. En este trabajo, sólo presentaremos resultados de los estudios realizados con las hembras F1BX1 transgénicas. Identificamos a los ratones transgénicos mediante PCR en DNA genómico extraído de un fragmento de cola obtenido al destetar a los ratones (ver más adelante).

### 1.3 Aloiinjerto de tumores generados en la cohorte F1BX1 en receptores F1

Con el propósito de evaluar la respuesta al tratamiento de los tumores desarrollados en la cohorte F1BX1, se realizó un aloiinjerto de los tumores en ratones F1 como receptores. El proceso consistió en trasplantar células derivadas de los tumores de animales F1BX1 en hembras receptoras F1 transgénicas. Esta estrategia se basa en las leyes de los trasplantes según las cuales los ratones F1 aceptan trasplantes de sus cepas parentales

y de su descendencia generada por un *backcross* o un *intercross* (Auchincloss, 2004). Se utilizaron cepas transgénicas para evitar una presión de selección por parte del sistema inmune sobre el receptor ERBB2/NEU de rata presente en el transgén (Coussens, 2002).

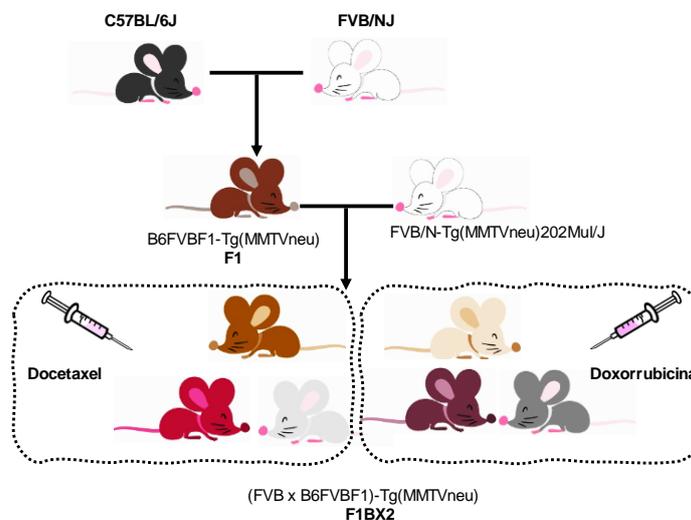


**Figura 7. Esquema de la realización de aloinjerto de tumores generados en la cohorte F1BX1 en receptores F1.**

Previamente, las células que habían sido conservadas en nitrógeno líquido en suero bovino fetal con un 6% de dimetil sulfóxido (DMSO), se descongelaron rápidamente en baño a 37°C, seguidamente se transfirió a un tubo de 15mL (Falcon) con 5mL de DMEM/F12, heparina (2µg/ml) y DNAsa (1 µg/ml) para evitar la agregación celular. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 revoluciones por minuto (rpm). A continuación, se realizaron 2 ciclos de lavado con PBS y se centrifugación durante 5 minutos a 1200 rpm, y se resuspendieron en PBS para obtener la suspensión celular que se inyectó. Se inyectaron 100 µl de esta suspensión, que contenían entre 2 y 5 millones de células, en cada flanco del receptor, en dos receptores F1. El número de células inyectadas no se cuantificó de manera precisa, ya que el número real de células viables capaces de reproducir el tumor en el ratón receptor es, en cualquier caso, desconocido. Esta variabilidad se compensó iniciando el tratamiento de los ratones con tumores cuando éstos alcanzaron, aproximadamente, el mismo volumen en todos los animales, evaluado a partir de las medias de sus diámetros (ver más adelante) y, con ello, cuando se estimó que tenían una masa tumoral similar.

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

A fin de estudiar la respuesta a la quimioterapia en ratones genéticamente heterogéneos, se generó una cohorte de ratones bajo una estrategia similar a la empleada para generar los ratones F1BX1, con la diferencia de que no se usaron como parentales ratones transgénicos FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J, sino que se usaron FVB/NJ no transgénicos. De este modo, los ratones de la primera generación filial, F1, no fueron transgénicos. Después, los ratones F1 se cruzaron con ratones FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J para generar la segunda cohorte (FVB x B6FVBF1)-Tg(MMTVneu) a la que se denominó F1BX2. A diferencia de la F1BX1, todos los animales de la F1BX2 heredaron el transgén MMTV-ErbB2/Neu en heterocigosis. Se confirmó la presencia del transgén por PCR (ver más adelante).



**Figura 8. Esquema de la estrategia seguida para generar los ratones F1BX1. Todas las hembras del backcross fueron portadoras del transgén**

## 2. Evaluación de los patofenotipos relacionados con el comportamiento clínico el cáncer de mama

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

Se consideraron distintos patofenotipos (fenotipos patológicos o clínicos que definen la enfermedad) para caracterizar la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama en la cohorte F1BX1. Distinguimos entre dos tipos de patofenotipos:

*Patofenotipos temporales* (relacionados con la evolución temporal de la enfermedad):

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

*Patofenotipos de progresión tumoral* (local y a distancia):

- *Incidencia tumoral*: es el porcentaje de ratones que desarrollaron tumor con respecto al total de ese grupo.
- *Multiplicidad tumoral*: definida como el porcentaje de ratones que desarrollaron más de un tumor con respecto al total de ratones que presentaron tumor.
- *Tasa de crecimiento*: es la pendiente de la recta que se ajusta a la curva de crecimiento tumoral, resultante de representar el logaritmo del volumen tumoral en el eje de ordenadas y el tiempo en el eje de abscisas.
- *Velocidad media de crecimiento*: se calculó mediante la siguiente fórmula:

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

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

Los ratones de la cohorte F1BX1 se revisaron semanalmente para detectar, mediante palpación, la aparición de tumores de mama a partir de los 3 meses de edad, que es cuando aparecen los primeros tumores en el fondo genético FVB (Guy *et al.*,

1992). De esta manera, se determinaron la latencia, la incidencia y la multiplicidad tumorales. Se siguió el crecimiento de los tumores mediante la medida semanal de su tamaño con un calibrador digital. El volumen tumoral se calculó con la fórmula clásica (Parson *et al.*, 2004):

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

## 2.2 Caracterización de la respuesta al tratamiento

### 2.2.1 Administración de quimioterapia

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

#### 2.2.1.1 Grupos de tratamiento

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

- En el estudio de la respuesta a la quimioterapia en los aloinjertos se incluyeron 250 ratones F1 que se dividieron en dos grupos de tratamiento con monoterapia con docetaxel o con doxorubicina. Se trasplantaron células de un mismo tumor procedente de la F1BX1 en un animal F1 asignado a cada grupo de tratamiento. Se administraron hasta 5 ciclos de quimioterapia.
- En el estudio de respuesta al tratamiento de los tumores en el mismo animal en el que se generaron se incluyeron 462 ratones de la cohorte F1BX2, 37 ratones FVB y 54 ratones F1. Estos ratones fueron divididos en tres grupos, dos de ellos tratados con monoterapia con docetaxel o doxorubicina, y el tercero al que se le administró la combinación de ambos fármacos. Se administraron hasta 6 ciclos de quimioterapia y entraron en el estudio los animales que toleraron al menos 4 ciclos.

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

### 2.2.1.2 Protocolo de tratamiento

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

Protocolo	Administración
1. Monoterapia con docetaxel (Taxotere®, Sanofi Aventis)	La dosis administrada en cada ciclo fue de 25 mg/kg, en ciclos separados por 8 días (Rottenberg, 2007)
2. Monoterapia con doxorubicina (Farmiblastina®, Pfizer)	Se administró una dosis de 5 mg/kg en cada ciclo, con un tiempo de recuperación entre ciclos de 10 días (Rottenberg, 2007).
3. Tratamiento combinado	Cada dosis consistió en 25 mg/kg de docetaxel y 5 mg/kg de doxorubicina. El tiempo de recuperación entre ciclos fue el del fármaco que requería más tiempo: 10 días.

\* Los fármacos se obtuvieron mediante receta veterinaria oficial.

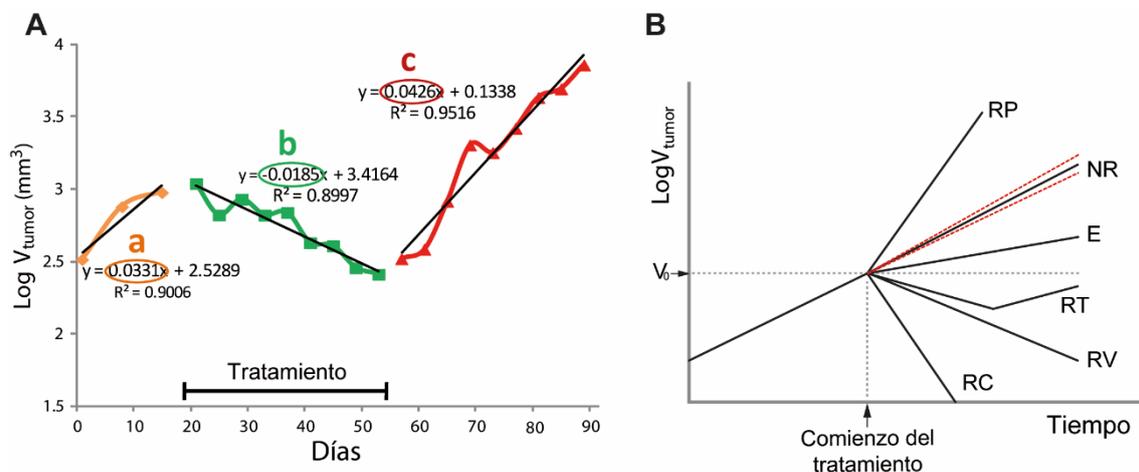
### 2.2.2 Determinación de los fenotipos de respuesta al tratamiento

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

- Efecto del tratamiento sobre la dinámica de crecimiento tumoral

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

las dimensiones del tumor con la misma periodicidad, hasta el sacrificio de los ratones. El sacrificio se realizó dos meses después de finalizar el tratamiento, o cuando el tumor superó los 25 mm de diámetro mayor o el ratón presentó signos de enfermedad, definidos como adelgazamiento con hundimiento de costados, pelo erizado, taquipnea, pérdida del 25% del peso, etc. Se calculó la velocidad de crecimiento tumoral en tres fases diferentes: antes del tratamiento, durante el tratamiento y después del tratamiento. La velocidad de crecimiento en cada una de las fases se calculó de la misma manera que en los tumores de la F1BX1, como la pendiente de la recta que mejor se ajustó a la evolución del volumen tumoral con respecto al tiempo en escala semilogarítmica (**Figura 4**).



**Figura 9. Cálculo de la velocidad de crecimiento tumoral en las 3 etapas de los tumores tratados y definición de los tipos de respuesta.** (A) Representación del logaritmo decimal del volumen tumoral en mm<sup>3</sup> en función del tiempo en días. Usamos la pendiente de la recta que se ajusta a la curva de evolución tumoral (a) antes, (b) durante y (c) después del tratamiento, como medidas de la velocidad de crecimiento en cada una de estas fases. (B) Definición esquemática de los tipos de respuesta considerados. RC: respuesta completa; RV: reducción del volumen tumoral; E: estabilización; RT: resistencia temprana; NR: no respuesta; RP: respuesta paradójica.

Además de las velocidades de crecimiento antes, durante y después del tratamiento, definimos tres fenotipos de respuesta al mismo para cuantificar el cambio observado en la velocidad de crecimiento de cada tumor entre estas fases:

- Respuesta Durante el Tratamiento (RDT): es el resultado de la resta entre la velocidad de crecimiento antes del tratamiento menos velocidad de crecimiento

- durante el tratamiento ( $RDT=a-b$  en la **Figura 9 A**). Cuantifica el cambio experimentado en la velocidad de crecimiento del tumor durante el tratamiento con respecto a la velocidad que tenía antes de empezarlo. Está definida de tal manera que un valor más alto de RDT significa una mejor respuesta al tratamiento.
- Respuesta a la Retirada del Tratamiento (RRT): es el resultado de restar la velocidad de crecimiento durante el tratamiento menos velocidad de crecimiento después del tratamiento ( $RRT=b-c$  en la **Figura 9 A**). Cuantifica el cambio experimentado en la velocidad de crecimiento del tumor al finalizar el tratamiento con respecto a la que tenía durante el mismo. Está definida de tal manera que un valor mayor de RRT significa un mejor comportamiento del tumor al retirar el tratamiento.
  - Cambio Observado Respecto a la Velocidad Inicial (CORVI): es el resultado de restar la velocidad de crecimiento antes del tratamiento menos la velocidad de crecimiento después del mismo ( $CORVI=a-c$  en la **Figura 9 A**). Cuantifica el cambio en la velocidad de crecimiento entre las dos fases sin tratamiento: la anterior y la posterior a éste. Está definida de tal manera que un valor mayor de CORVI implica un mejor comportamiento en la fase posterior al tratamiento con respecto al que el tumor tenía antes de éste.

Considerando los cambios inducidos por el tratamiento en el volumen tumoral y en la velocidad de crecimiento, clasificamos la respuesta de cada tumor en uno de los siguientes grupos (**Figura 9 B**):

- a. Respuesta completa: la de aquellos tumores que desaparecieron por completo a la palpación durante la administración de la quimioterapia.
- b. Reducción del volumen tumoral: pertenecen a este grupo los tumores que redujeron su volumen durante el tratamiento sin llegar a desaparecer. Se definieron numéricamente por tener una velocidad de crecimiento negativa.
- c. Estabilización: los tumores que continuaron creciendo durante el tratamiento, pero a menor velocidad que antes de empezar el tratamiento. Son los tumores con una velocidad de crecimiento durante el tratamiento positiva y RDT mayor que 0,01.
- d. Resistencia temprana: en aquellos casos en los que durante la fase de tratamiento se observó un comportamiento bifásico. Estos tumores respondieron inicialmente, de modo que experimentaron una reducción en su tamaño, o redujeron notablemente su velocidad de progresión local, pero, sin llegar a terminar el tratamiento, dejaron de responder y reiniciaron su crecimiento.

- e. Ausencia de respuesta: el tumor siguió creciendo, aproximadamente, a la misma velocidad que antes de iniciar el tratamiento. Consideramos este tipo de respuesta cuando el valor absoluto de RDT fue menor de 0,01.
- f. Respuesta paradójica: la de los tumores que crecieron a mayor velocidad durante el tratamiento que antes de iniciarlo. El valor de RDT de estos tumores es negativo y menor que -0.01.

- Otros patofenotipos de respuesta al tratamiento:

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

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

### **3. Obtención y procesamiento de muestras tumorales**

#### **3.1 Cirugía y obtención de biopsia tumoral**

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

## 3.2 Necropsia

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

La eutanasia se realizó mediante inhalación de CO<sub>2</sub>; se accedió a la cavidad torácica y se recogieron los pulmones, se fijaron durante 24 horas en paraformaldehído al 3.7%, tamponado con metanol; tras la fijación, se conservaron en etanol al 70% y a 4°C. Se realizó un recuento de metástasis macroscópicas en los pulmones utilizando una lupa de mesa (Zeiss) con un objetivo de 10x.

## 3.3 Procesamiento de los tumores de mama

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

1. Congelación rápida en nitrógeno líquido y conservación a -80°C. Estas muestras fueron usadas para la extracción de DNA, RNA y proteínas.
2. Fijación e inclusión en parafina. Un fragmento tumoral se mantuvo en una solución de paraformaldehído al 3.7%, tamponado con metanol, durante 24 horas. Pasado este tiempo, se pasó la muestra a etanol al 70%, donde se conservó a 4°C hasta el momento de su inclusión en parafina.
3. Suspensiones de células individualizadas. Las células tumorales se conservaron así en condiciones de alta viabilidad para su análisis por citometría de flujo y para su trasplante en ratones receptores. Las muestras se disgregaron mecánicamente con bisturís en medio DMEM/F12, suplementado con un 5% de suero bovino fetal. Se procesaron de esta manera dos fragmentos de tumor que, tras la disgregación mecánica, se sometieron, respectivamente, a digestión enzimática a 37°C durante 2 horas y durante 6 horas, en un volumen de 10 ml en tubos Falcon de 50 ml con 300 U/ml de colagenasa (#098K8616, Sigma) y 100 U/ml de hialuronidasa (#017K7003, Sigma). Las células digeridas durante 6 horas son muestras enriquecidas en células epiteliales individualiza-

das y se utilizaron para el aloinjerto de tumores en receptores F1 y para cuantificar subpoblaciones celulares epiteliales y estromales mediante citometría de flujo. Las células digeridas durante 2 horas son muestras con la digestión suficiente para liberar leucocitos infiltrantes con buena viabilidad, por lo que se usaron para analizar la infiltración por células inmunitarias también mediante citometría de flujo. Tras la digestión enzimática, las muestras se centrifugaron 5 minutos a 1200 rpm y se aspiró el sobrenadante. A continuación, se añadieron 1 o 2 ml, en función de la cantidad aparente de eritrocitos en el botón celular (lo que se estimó por el color más o menos rojo del mismo) de solución de lisis de células rojas (ACK Lysing Buffer #10-548E, Lonza), a base de cloruro amónico. El pellet se disolvió y se agitó suavemente y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones y se aspiró el sobrenadante.

Para conseguir la suspensión de células individualizadas se añadieron 5 ml de PBS suplementado con un 2% de suero bovino fetal y 0,1 mg/ml de DNasa (#DN25, Sigma) y se pipeteó 25 veces con una pipeta de 10 ml. Tras incubar 5 minutos a temperatura ambiente, la suspensión se filtró a través de filtros de 70  $\mu\text{m}$  (#352350, BD Falcon), que se lavaron con 5 ml de PBS para obtener tantas células como fuera posible. Tras otro paso de centrifugación, en las mismas condiciones, se resuspendió el pellet en suero bovino fetal con un 6% de DMSO y se procedió a la congelación lenta para conservar la viabilidad celular. Las células se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  o en nitrógeno líquido (fase gaseosa) por tiempo indefinido hasta su uso.

## 4. Protocolos generales

### 4.1 Extracción de DNA de tejidos

Se extrajo DNA de tejido de cola y tumores congelados en nitrógeno líquido y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se incubaron en 500  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis (Tris 100 mM pH 8, ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 5 mM, SDS 0.2%, NaCl 2 mM) y 1  $\mu\text{l}$  de Proteinasa K a 100 mg/ $\mu\text{l}$  (#3115801001, Roche) durante toda la noche a  $55^{\circ}\text{C}$ . Tras la incubación, se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) (#A2493, AppliChem), se pasó la mezcla a tubos de Phase Lock Gel (#2302820, 5 PRIME) y se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm para separar la fase acuosa y la fase orgánica. El gel facilitó la separación de las fases y la recogida del sobrenadante con el DNA. Se

precipitó el DNA con isopropanol (#W992DM, Fisher Bioreagents) y se centrifugó durante otros 5 minutos a 12000 rpm. Se lavó el pellet con etanol al 70% para eliminar las sales y se volvió a centrifugar 5 minutos a 12000 rpm. Tras eliminar el sobrenadante y dejar que se evaporase todo el etanol residual, se resuspendió el DNA en 100 µl de buffer TE (Tris 100 mM pH 8; EDTA 1 mM) y se homogeneizó en agitación a temperatura ambiente durante, al menos, 1 hora.

## 4.2 Extracción de RNA de tumores

Para la extracción de RNA de fragmentos de tumores congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C se usó el kit Qiagen miRNeasy Mini Kit (#217004, Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. De forma resumida, se descontaminó la zona de trabajo de posibles RNasas con RNase Exitus Plus (AppliChem, #A7153) y se homogeneizó el fragmento de tumor congelado en 700 µl de trizol (Qiagen 5.346.994) en tubos con esferas de cerámica (Precellys Lysing Kit, tissue homogenizing CK mix #KT03961-1-009.2, Precellys), dando dos pulsos de 10 segundos a una intensidad 5.5 (m/s) en un homogeneizador (FastPrep Homogenizer, Thermo Savant) a 4°C (localizado en una cámara fría). El homogeneizado se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 140 µl de cloroformo, se agitó la mezcla vigorosamente durante 15 segundos y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se centrifugó la mezcla a 12000 rpm y 4°C durante 15 minutos, para separar la fase acuosa y la fase orgánica. La fase acuosa se pasó a un tubo de 1.5 ml libre de RNasa (Eppendorf) con 525 µl de etanol absoluto, se mezcló mediante pipeteo, se introdujo la mezcla en una de las columnas del kit de extracción y se centrifugó durante 15 segundos a 12000 rpm. Tras la centrifugación se añadieron 350 µl de buffer RWT a la columna y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. A continuación, se realizó una incubación con DNasa para eliminar los restos de DNA de la muestra. Para ello, se añadieron 10 µl de DNasa (2.7 U/µl) (Quiagen #79254) y 70 µl de buffer RDD y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación se añadieron otros 350 µl de buffer RWT y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 segundos. A continuación, se realizaron dos lavados mediante la adición de 500 µl de Buffer RPE y centrifugación a 12000 rpm, durante 15 segundos en el primer lavado y 2 minutos en el segundo. Finalmente, para eluir el RNA, se puso la columna sobre un nuevo tubo colector, se añadieron 40 µl de agua libre de RNasa y se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto.

### 4.3 Cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos

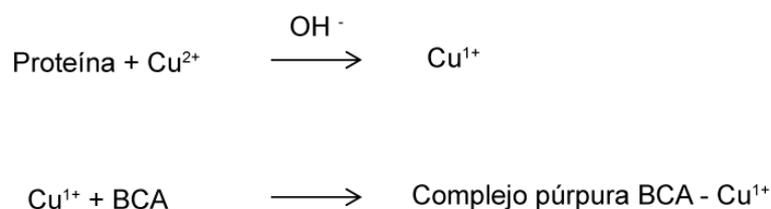
Se cuantificó la concentración de DNA o RNA en los extractos mediante la medición de su absorbancia a 260 nm con un microespectrofotómetro Nanodrop ND-1000. Se usaron los ratios entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm, y entre 260 nm y 230 nm como medida de la pureza de los ácidos nucleicos extraídos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

### 4.4 Extracción de proteínas de los tumores

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

### 4.5 Cuantificación de la concentración de proteínas

Para cuantificar la concentración de proteínas de los extractos se utilizó el método de BCA (BCA protein assay reagent A, 500ml, #23228 y BCA protein assay reagent B, 25 ml, #23224, Thermo Fisher). Este método se basa en la reacción de Biuret entre las proteínas y el ión  $\text{Cu}^{2+}$ , que se reduce a  $\text{Cu}^{1+}$ , el cual forma un complejo de color púrpura con el ácido bicinconínico (BCA), que absorbe la luz a 570 nm (Figura 5).



**Figura 10. Fundamento del método de BCA que se ha utilizado para la cuantificación de proteínas.**

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

#### **4.6 Cuantificación de la expresión de microRNAs mediante PCR cuantitativa**

Se extrajo y cuantificó RNA total, que incluyó los miRNAs (o miRs), a partir de fragmentos de tumores congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C, siguiendo los protocolos previamente descritos. En este RNA, se midieron los niveles de miRNAs mediante Q-PCR.

La elección de los miRNAs a analizar se basó en dos criterios: 1) según la literatura, miRNAs identificados en la bibliografía como importantes en la susceptibilidad al cáncer de mama, así como en su evolución y la respuesta a la quimioterapia; 2) un criterio genético, se eligieron miRNAs que se expresaron diferencialmente en tumores de ratones F1 y FVB (cepas parentales). Basándose en estos criterios, se eligieron 28 miRNAs para el estudio (27 miRNAs blanco y 1 miRNA housekeeping).

### 4.6.1 Síntesis de cDNA

En primer lugar, se sintetizó el cDNA específico usando el TaqMan® Advanced miR cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific), el proceso consta de cuatro pasos: poliadenilación, ligación, transcripción inversa y preamplificación. A continuación, describimos de forma detallada los pasos:

Antes de iniciar el proceso, se retiró el tubo de 50% de PEG 8000 del kit de síntesis de cDNA del miRNA TaqMan® Advanced para permitir que alcanzara la temperatura ambiente en preparación para la reacción de ligación.

#### 4.6.1.1 Reacción de poliadenilación

Consiste en agregar una cola Poly-A en el extremo 3' del RNA usando la enzima Poly-A polimerasa. La cola poli-A se usa como un adaptador para llevar a cabo la transcripción inversa universal. Las muestras de RNA y los reactivos se descongelaron en hielo. La mezcla de PCR se preparó de acuerdo con los valores mostrados en la Tabla 1. En cada tubo de PCR, se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de RNA a una concentración de 2,5  $\text{ng}/\mu\text{L}$  y 3  $\mu\text{L}$  de la mezcla (mix) de reacción de poliadenilación.

Se selló la placa o tubos de PCR (según donde se hiciera la reacción) y se dio un spin para bajar el contenido y eliminar las burbujas. Seguidamente, se colocaron los tubos o placa en el termociclador y las reacciones se llevaron a cabo con el programa indicado en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Reacción de poliadenilación. (A) Mix de poliadenilación; (B) Programa de reacción de poliadenilación.**

<b>A</b>	<b>Poliadenilación</b>	<b>1 reacción</b>
	10x PolyA Buffer	0,5 $\mu\text{L}$
	ATP [10 mM]	0,5 $\mu\text{L}$
	Poly A enzima [5 U/ $\mu\text{L}$ ]	0,3 $\mu\text{L}$
	Agua	1,7 $\mu\text{L}$
	<b>Vol.</b>	<b>3 <math>\mu\text{L}</math></b>

**B**

<b>Programa</b>		
<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Duración</b>
Poliadenilación	37°C	45 min
Detención de reacción	65°C	10 min
Conservación	4°C	Constante

Se procedió inmediatamente con el paso de ligación, en cuanto la reacción de poliadenilación estuvo completa.

#### 4.6.1.2 Reacción de ligación

Su propósito es agregar un adaptador en el extremo 5' mediante una reacción de ligación. Ese adaptador actuaría como el sitio de unión del cebador o primer para la preamplificación de los miRNAs. La mezcla maestra se preparó de acuerdo con el número de muestras (**Tabla 3A**).

**Tabla 3. Reacción de ligación. (A) Mix de ligación; (B) Componentes de la reacción de ligación.**

**A**

. Ligación	1 reacción
5X DNA ligasa buffer	3 $\mu$ L
50% PEG 8000	4,5 $\mu$ L
25X adaptador	0,6 $\mu$ L
RNA ligasa [10 U/ $\mu$ L]	1,5 $\mu$ L
Agua	0,4 $\mu$ L
<b>Vol.</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>

**B**

Programa		
Paso	Temperatura	Duración
Ligación	16°C	60 min
Conservación	4°C	Constante

El polietilenglicol (PEG) 8000 es muy viscoso, para asegurar el pipeteo exacto del 50% de PEG 8000: se utilizó el 50% de PEG 8000 a temperatura ambiente, se aspiró y dispensó la solución lentamente, manteniendo la punta de la pipeta en la solución durante aproximadamente 10 segundos después de liberar el émbolo durante la aspiración para permitir que el 50% de PEG 8000 se arrastre por completo a la punta de la pipeta. Se mantuvo el émbolo presionado durante aproximadamente 10 segundos para permitir que el 50% de PEG 8000 se distribuyera por completo en el cóctel de la reacción de ligación.

Se añadieron 5  $\mu$ l de la mezcla a los tubos de PCR del paso anterior, y se puso en el programa de ligación específico en el termociclador (**Tabla 4B**).

#### 4.6.1.3 Reacción de transcripción inversa o reversa (RT)

Su objetivo es sintetizar cDNA total a partir del RNA y, para ello, se utilizó un cebador universal de retrotranscripción. Este se une a la cola de Poly-A del extremo 3'. La mezcla de RT se preparó de acuerdo con el número de muestras (**Tabla 4A**). Se añadieron 15 µl de la mezcla a cada tubo de PCR. El programa de RT se hizo en el termociclador (**Tabla 4B**).

**Tabla 4. Transcripción reversa (A) Mix de RT (B) Programa RT.**

**A**

RT	1 reacción
5X RT buffer	6 µL
DNTPs [100Mm]	1,2 µL
20X primers universales	1,5 µL
10X RT enzima	3 µL
Agua	3,3 µL
<b>VOL.</b>	<b>15 µL</b>

**B**

Programa		
Paso	Temperatura	Duración
Transcripción Reversa	42°C	15 min
Detención de la reacción	85°C	5 min
Conservación	4°C	Constante

#### 4.6.2 Reacción de pre-amplificación

Su finalidad es aumentar el número de moléculas de cDNA. Para eso, se usaron cebadores universales hacia adelante y hacia atrás que se unen los extremos 3' y 5', respectivamente. La mezcla maestra se preparó de acuerdo con el número de muestras (**Tabla 5A**). Después de eso, se añadieron 5 µL del cDNA y 45 µL de la mezcla maestra en un nuevo tubo de PCR. Se muestra el programa de pre-amplificación que se llevó a cabo en el termociclador (**Tabla 5B**).

**Tabla 5. Reacción de Pre-amplificación (A) Mix de Pre-amplificación (B) Programa Pre-amplification.**

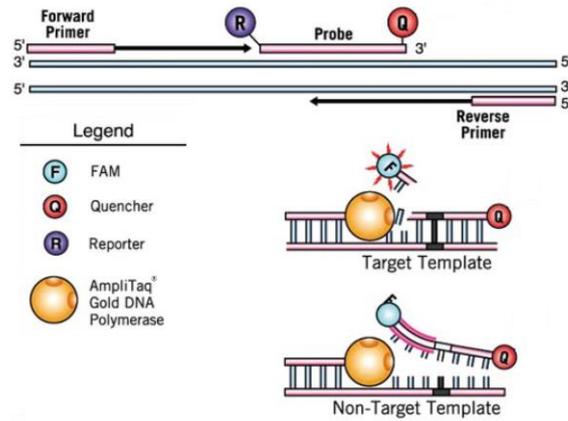
**A**

pre-amplificación	1 reacción
2X miR-Amp master mix	25 µL
20X miR-Amp primer mix	2,5 µL
Agua	17,5 µL
VOL. TOTAL	45 µL
cDNA	5 µL

Programa			
Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
Activación enzima	95°C	5 min	1
Denaturación	95°C	3 seg	14
Anillamiento/extensión	60°C	30 seg	
Detención de reacción	99°C	10 min	
Conservación	4°C	Constante	1

#### 4.6.3 Reacción de Q-PCR

Para medir los niveles de expresión de miR, se usó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR). Para cuantificar los niveles de los 28 miRNAs, se obtuvieron sondas TaqMan específicas (TaqMan Advanced miR Assay 20X, Fisher). La sonda hibrida específicamente con algunos nucleótidos del miRNA después de hacerlo los cebadores. Para evitar la posibilidad de que la sonda pueda actuar como un sitio de unión para la polimerasa, el extremo 3' de la misma no está hidroxilado. La sonda contiene dos nucleótidos modificados: uno que tiene un fluorocromo unido y otro que tienen un interruptor desactivado (un elemento que funciona como efecto pantalla y evita la emisión fluorescente). Cuando la polimerasa llega a la región de la sonda TaqMan, activa la actividad exonucleasa 5'-3' y escinde el inhibidor, separándolo del fluorocromo. En ese momento, el fluorocromo comienza a emitir luz, y el equipo Q-PCR puede detectarlo. Dependiendo de la cantidad de luz emitida, se cuantifica la cantidad inicial de moléculas de cDNA procedentes del miRNA concreto que estaban en la muestra inicial (Figura 11).



**Figura 11. TaqMan® Advanced miRNA Assays (ThermoFisher) (Tomada de <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TaqManAdvanced-miRNA-Assays->**

Se hizo una dilución 1:10 del cDNA en tampón TE y se añadieron 15 µl de la mezcla de Q-PCR (Tabla 5) a una placa de 96 pocillos. La Q-PCR se realizó por triplicado para cada muestra. La lista de sondas empleadas se describe también en la Tabla 6.

**Tabla 6. Lista de sondas TaqMan Advanced empleadas para la cuantificación de los niveles de expresión de los miRNAs de interés.**

mi-RNA	Name TaqMan Advanced	Assay ID
miR-21	hsa-miR-21a-5p	477975_mir
Familia Let-7	hsa-let-7a-5p	478575_mir
	hsa-let-7f-5p	478578_mir
	hsa-let-7d-5p	478439_mir
	hsa-let-7d-3p	477848_mir
	hsa-let-7i-5p	478375_mir
	hsa-let-7c-5p	478577_mir
	hsa-let-7e-5p	478579_mir
	hsa-let-7e-3p	479281_mir
	hsa-let-7b-5p	478576_mir
hsa-let-7g-5p	478580_mir	
miR-374	hsa-miR-374b-5p	478389_mir
miR-497	hsa-miR-497-5p	478138_mir
miR-210	hsa-miR-210-3p	477970_mir
miR-100	hsa-miR-100-5p	478224_mir

miR-130a	hsa-miR-130a-3p	477851_mir
miR-152	hsa-miR-152-3p	477921_mir
miR-214	hsa-miR-214-3p	477974_mir
	hsa-miR-214-5p	478768_mir
miR-29b	hsa-miR-29b-3p	478369_mir
miR-34a	hsa-miR-34a-5p	478048_mir
miR-125b	hsa-miR-125b-5p	477885_mir
	hsa-miR-125b-1-3p	478665_mir
miR-128	hsa-miR-128-3p	477892_mir
miR-200b	hsa-miR-200b-5p	478753_mir
	hsa-miR-200b-3p	477963_mir
miR-451	hsa-miR-451a	478107_mir
miR-361	hsa-miR-361-5p	478056_mir

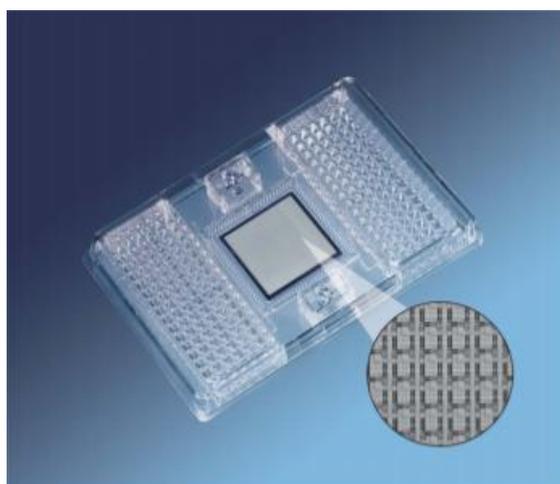
#### 4.6.3.1 Sistema Fluidigm de Q-PCR

El sistema Biomark <sup>™</sup> HD proporciona un rendimiento mayor de órdenes de magnitud en la PCR en tiempo real, en comparación con las plataformas convencionales debido a sus circuitos de fluidos integrados (IFC). Estos son circuitos de fluidos integrados de microvolúmenes (circuitos nanofluidicos) que contienen redes de microcanales que combinan automáticamente conjuntos de muestras con conjuntos de ensayos (Figura 12). Esta solución proporciona densidades de experimento mucho más allá de lo que es posible con plataformas de microplacas, y reduce significativamente el número de etapas de manejo de líquidos y volúmenes por reacción (Fluidigm).



**Figura 12. Sistema BioMark <sup>™</sup>HD (Fluidigm). Incluye los componentes ópticos, de ciclo térmico y software necesarios para realizar la expresión génica de PCR en tiempo real (Fluidigm).(imagen obtenida de <https://www.fluidigm.com/products/biomark-hd-system>)**

A fin de realizar la cuantificación del mayor número de muestras en forma simultánea se empleó la versión *Fluidigm 96.96 Dynamic Array*™ el cual permite un alto rendimiento. En un lado del marco hay 96 micropocillos, para incluir las muestras y, en el otro, otros 96 micropocillos para contener los reactivos con los pares de sonda y cebador. Una vez en los micropocillos, los componentes se presurizan en los circuitos de fluidos integrados mediante un controlador. Los componentes se combinan, sistemáticamente, en 9.216 reacciones paralelas y simultáneas (Figura 13).



**Figura 13.** Placa de 96 x 96 micropocillos de *Fluidigm 96.96 Dynamic Array*™, que permite realizar 9216 reacciones de forma simultánea. (imagen obtenida de <https://www.fluidigm.com/products/biomark-hd-system>)

#### **4.6.3.2 Análisis de la QCR**

Para analizar los resultados, se recurrió a la técnica del *Cycle threshold* (Ct) (Bustin, 2009). Ct es el número de ciclo en el que la fluorescencia emitida por la sonda se vuelve exponencial. Para cuantificar los miRNAs, utilizamos el método del  $\Delta\Delta Ct$ . Primero, obtuvimos el  $\Delta Ct$ , que es el resultado de restar el valor de Ct de nuestro control (la expresión del miRNA Let-7a), al valor de Ct en la muestra de interés. Seguidamente calculamos el  $\Delta\Delta Ct$  restando al  $\Delta Ct$ , del miRNA diana el  $\Delta Ct$  del miRNA control (housekeeping). Después se calculó el RQ como el  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . RQ en la expresión en comparación con la muestra de control, e indica cuántas veces se ha sobreexpresado o sub-expresado nuestro miRNA respecto de la expresión en la muestra de control (Peltier, 2008).

## 4.7 Array microRNAs

Se evaluó a través del array *GeneChip miRNA 4.0* de *Affymetrix* la expresión diferencial de miRNAs en tumores de mama provenientes de las dos cohortes empleadas para generar el F1BX1, la FVB y la F1 las cuales son cepas homogéneas. Este array detecta todas las secuencias maduras de miRNA registradas en miRBase Release 20 (emplea 30.424 sets de sondas), cuenta con una reproducibilidad >0.95, requiere 130-500ng de RNA total. Permite el análisis de 203 especies dentro de las que se encuentra ratón (*Mus musculus*), del cual se detectan 1.908 miRNAs.

## 4.8 Material y métodos utilizados para la determinación del papel de let-7b-5p en la respuesta al tratamiento con Doxorrubicina

### 4.8.1 Cultivo celular

Utilizamos tres líneas celulares de cáncer de mama de origen humano: MDA-MB-435, Skbr3 y HCC1954. Todas ellas fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD). Las características de las células se encuentran recogidas en la **Tabla 7**. MDA-MB-435 y SKBR3 se cultivaron en el medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco®). La línea celular HCC1954 se cultiva en el medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, a partir de ahora) (Gibco®). Ambos medios de cultivo se complementaron con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina / estreptomycin y 1% de L-glutamina. Las células se mantuvieron en un incubador a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad.

**Tabla 7. Características de las líneas celulares humanas de cáncer de mama utilizadas.**

Línea celular	No. Catálogo	Receptores	Descripción
HCC1954	ATCC®, CRL-2338™	ER-, PR-, HER2 ++.	Deriva de un carcinoma ductal invasivo .
Skbr3	ATCC®, HTB-30™	ER-, PR-, HER2 ++.	Procede de un adenocarcinoma metastásico.
MDA-MB-435	ATCC®, HTB-129™	ER-, PR-, HER2-.	Deriva de un carcinoma ductal invasivo. Aunque recientemente se han descrito como posibles células de melanoma (Prasad,2015).

Las células MDA-MB-435 y Skbr3 se pasaron tres veces por semana; mientras que las células HCC1954 se pasaron dos veces por semana, debido a que esta línea celular tiene una tasa de crecimiento más baja que las otras. Las células se mantuvieron en placas de cultivo de 100 x 20 cm (Falcon) específicas para cultivos celulares. Para pasar las células, se aspiró el medio y éstas se lavaron con 5 ml de solución salina PBS 1 M con Na<sup>+</sup> (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 85 mM / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,88 mM / NaCl 130 mM) (PBS 1x, en adelante). Luego, se añadieron 2,5 ml de TripLE<sup>TM</sup> Express (Gibco®) se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 minutos para disociar las células. Después de eso, las células se observaron en el microscopio invertido para verificar la disociación celular. Para detener la actividad del TripLE, se añadieron rápidamente 7,5 ml de medio con FBS; y para romper los grupos, las células se resuspendieron con una pipeta de 10 ml y el dispositivo Pipetus. Más tarde, las células se pasaron a una nueva placa a las concentraciones indicadas en la Tabla 10.

#### 4.8.2 Transfección

Las líneas celulares se transfectaron utilizando placas de cultivo de 24 pocillos y se emplearon los siguientes reactivos:

**Mimético:** el *mimic hsa-let-7b* (MISSION®) es un miRNA exógeno y mimético del let7b-5p endógeno.

**Inhibidor:** simultáneamente, en otro pocillo, la expresión endógena de Let7b-5p se inhibió por la transfección de un miR sintético, llamado inhibidor (MISSION®). Este es un inhibidor exógeno específico del miR endógeno let7b-5p.

**Controles negativos:** se usaron oligo-RNAs no codificantes. El propósito de estos era: en primer lugar, observar la muerte basal generada durante el protocolo de transfección y, en segundo lugar, determinar la eficacia de transfección del ensayo con fluorescencia.

En el estudio utilizamos tres controles negativos:

- (i) El control negativo sin fluorescencia.
- (ii) El control de siRNA negativo universal fluorescente, conjugado con cianina 5 (MISSION®),
- (iii) El control negativo universal fluorescente siRNA, siRNA conjugado con 6-FAM (MISSION®). Ambos controles fluorescentes se utilizaron para evaluar la eficacia de la transfección. Utilizamos el control conjugado de cianina-5 cuando realizamos el ensayo

de anexina V-FITC; mientras que utilizamos el control conjugado 6-FAM cuando no utilizamos la anexina V. Utilizamos el control no conjugado para los ensayos que no iban a ser analizados por citometría de flujo.

El **protocolo de transfección** fue el siguiente: 24 horas antes de la transfección, las células se sembraron en cada pocillo 0,5ml de suspensión celular en un rango de concentraciones, entre  $2 \times 10^5$  y  $3 \times 10^5$  células por mililitro, dependiendo de la línea celular. Utilizamos placas de 24 o 96 pocillos de acuerdo con el experimento (**Tabla 8**).

**Tabla 8. Concentraciones celulares usadas para los ensayos de transfección.**

Tipo celular	Concentración
HCC1954	$3 \times 10^5$ céls. por mililitro
Skbr3	$2.5 \times 10^5$ céls. por mililitro
MDA-MB-435	$2 \times 10^5$ céls. por mililitro

Para llevar a cabo las transfecciones, se utilizó el sistema *TransIT-X2®* (*Mirus Bio*) como vehículo. *TransIT-X2®* es un reactivo polimérico no liposómico, posee una alta eficiencia de transfección para miRNAs (*Mirus*).

Se usó el medio Opti-MEM I (Gibco®). Este es una modificación del *Eagle's Minimum Essential Medium*, reducido en suero, amortiguado con HEPES, bicarbonato de sodio y complementado con hipoxantina, timidina, piruvato de sodio, L-glutamina, oligoelementos y factores de crecimiento.

**Tabla 9. Condiciones de transfección y tipos de placa.**

Componente	Placa 24 pocillos	Placa 96 pocillos
Oligo-RNA (mimic, inhibidor o control)	4,2 $\mu$ l (75 nM)	0,77 $\mu$ l (75 nM)
TransIT-X2®	1,5 $\mu$ l	0,28 $\mu$ l
OPTIMEM	50 $\mu$ l	9,2 $\mu$ l
Vol.	55,7 $\mu$ l	10,25 $\mu$ l

Para el mix de transfección para cada oligo-RNA (mimic, inhibidor y controles), se preparó usando las concentraciones que se muestran en la **Tabla 9** y se dejó 15 minutos de incubación a temperatura ambiente. Los reactivos se añadieron despacio por goteo en cada pocillo.

#### 4.8.3 Concentración inhibitoria (IC50) para el tratamiento con doxorrubicina

Veinticuatro horas después de la transfección, se añadió doxorrubicina a las células. La dosis utilizada para cada tipo de célula se estableció después de calcular la concentración inhibitoria del 50% de las células en cultivo o IC50, de acuerdo con el ensayo MTT. Para hacerlo, las células se cultivaron con diferentes concentraciones de doxorrubicina (en placas de 96 pocillos) y a las 24 horas se cuantificó la absorbancia a 570 nm y se estimó la IC50. Las IC50, dosis finales de fármaco utilizadas se muestran en la **Tabla 10**. La doxorrubicina se diluyó en el medio apropiado para cada línea celular.

**Tabla 10. Concentración de doxorrubicina usada para el tratamiento de cada línea celular.**

Línea celular	Concentración de Doxorrubicina (IC50)
HCC1954	1,96 $\mu$ M
Skbr3	1,04 $\mu$ M
MDA-MB-435	2,1 $\mu$ M

Antes del tratamiento con doxorrubicina, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y las células se lavaron una vez con PBS 1x. Después, se añadió doxorrubicina en la mitad de los pocillos, a la concentración específica, en 500  $\mu$ l de medio de cultivo por pocillo en placas de 24 pocillos; y en 92  $\mu$ l de medio por pocillo, en placas de 96 pocillos. En los demás pocillos, se añadió el mismo volumen de medio sin doxorrubicina.

#### 4.8.4 Ensayo de MTT

El MTT es un compuesto perteneciente a las sales de tetrazolio. Se utiliza en un ensayo colorimétrico que mide cambios en la viabilidad celular. Este ensayo se usó para determinar la IC50 de la Doxorrubicina y evaluar si hubo cambios en la viabilidad celular en las tres líneas celulares en las diferentes condiciones estudiadas.

Esta técnica se basa en el cambio de color que sufre la sal amarilla de tetrazolio (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazolil-2) -2,5-difeniltetrazolio) al transformarse en cristal púrpura de formazán. El cambio de color lo induce la enzima succinato deshidrogenasa ubicada en las mitocondrias. La intensidad del color se lee en un lector de microplacas, midiendo la densidad óptica a 570 nm y a 630 nm para evaluar el fondo de la señal.

Para realizar el estudio, las células se sembraron en placas de 96 pocillos. Veinticuatro horas después, las células se transfectaron, y al día siguiente se trataron con doxorubicina a la concentración específica. Después de 24 horas, se retiró el medio de cultivo y se añadieron a cada pocillo 100 µl de medio fresco y 10 µl de reactivo MTT (*Biotum® MTT*).

La mezcla se incubó durante 4 horas a 37 ° C y 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, se añadieron 200 µL de DMSO para disolver los cristales de formazán. El cambio de color se leyó en el lector de microplacas a las longitudes de onda indicadas.

Los datos fueron analizados por el *índice de estimulación* (IE) que es la relación entre la viabilidad en cada condición y la viabilidad basal.

$$IE = \frac{\text{D.O de las células transfectadas y tratadas}}{\text{D.O células condiciones basales}}$$

#### 4.8.5 Ensayo de senescencia

La evaluación de senescencia se realizó utilizando el kit *Senescence cells Histochemical Staining kit* (Sigma®). realizarla técnica se fundamenta en una tinción histoquímica en función de la actividad de la enzima β-galactosidasa a pH = 6. Las células senescentes se ven en color azul con este método porque en ellas aumenta la expresión de la enzima β-galactosidasa (Dimri, 1995).

El procedimiento experimental fue el siguiente: se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS1x. Se añadieron 300 µl de la solución de fijación y la placa se incubó durante 6 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces con PBS1x y, se añadieron 200 µL de la solución de tinción, que contiene el X-gal, este es el sustrato de la β-galactosidasa, que después de ser procesado, genera un precipitado de color azul). La placa se incubó a 37 ° C, sin CO<sub>2</sub> (para

mantener el pH = 6), durante toda la noche. Después, se tomaron fotos en un microscopio óptico invertido y las imágenes se analizaron con el software libre *ImageJ Java image processing software*.

#### **4.8.6 Análisis del ciclo celular**

Este ensayo se basa en la unión del yoduro de propidio al DNA y su detección por citometría de flujo. Para evitar reacciones cruzadas con el RNA, se realiza un tratamiento con RNAasa antes de analizar las células mediante el citómetro. El yoduro de propidio es un agente intercalante; por tanto, cuanto mayor sea el contenido en DNA, mayor será la emisión de yoduro de propidio. Así, en la fase G1, hay la mitad de la señal de emisión que en la fase G2/M porque hay la mitad de DNA.

El procedimiento experimental fue el siguiente: se aspiró el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS 1x. Luego, las células se despegaron con 250  $\mu$ L de TripLE<sup>TM</sup> Express, utilizando el protocolo ya descrito anteriormente. Las células se colocaron en un tubo de 14 mL (Falcon) y se centrifugaron a 1200 rpm, durante 5 minutos a 4 ° C. A continuación, se aspiró el medio de cultivo y se añadió 1 mL de etanol frío al 70%, gota a gota, para fijar las células. Para hacer una suspensión de células individuales, las células se pasaron a través de un filtro de células que cubre los tubos del citómetro de flujo (*Corning<sup>TM</sup>, Falcon<sup>TM</sup>*). Las células fijadas se incubaron durante al menos 1 hora, a 4 ° C. Más tarde, se resuspendieron en una solución con 10  $\mu$ g/mL de yoduro de propidio y 10  $\mu$ g/mL de RNasa en una dilución 1:20. Las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se analizaron por el citómetro de flujo, *Acuri<sup>TM</sup> C6*. Las células se analizaron enfrentando el grado de la dispersión lateral (*side-scatter*) frente al canal FL-2 (para detectar el color rojo emitido por el yoduro de propidio, cuya longitud de onda de excitación/emisión fluorescente es de 535/619 nm, respectivamente). Los resultados se analizaron con el programa de análisis de citometría *FlowJo*.

#### **4.8.7 Detección de la apoptosis**

Las células apoptóticas se caracterizan por el cambio de exposición de la fosfatidilserina (PS) de la superficie interna a la externa de la membrana celular. Ese evento ocurre en

la fase apoptótica temprana y puede detectarse debido al tropismo de la proteína anti-coagulante vascular humana, anexina V, por la PS. La anexina V tiene una alta afinidad solo por el PS y no por otros esfingolípidos de membrana plasmática.

Para el ensayo apoptótico, se usó anexina V conjugada, con la molécula fluorescente FITC (*Immunostep*) (anexina V-FITC, de aquí en adelante). El procedimiento fue el siguiente: las células se transfectaron como se describió anteriormente (ver apartado **4.8.2 Transfección**), se trataron con o sin doxorubicina a las dosis específicas (Tabla 10) en placas de 24 pocillos. Después, las células se despegaron con TriPLE y se volvieron a suspender con 100  $\mu$ l del tampón de unión específico del kit de ensayo de anexina V. Luego, las células se pasaron a través de un tapón con filtro celular que cubre el tubo para el análisis de citometría de flujo. Después, se añadieron 5  $\mu$ l de anexina V-FITC en cada tubo. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadieron otros 100  $\mu$ l de tampón de unión de anexina V, y las células se analizaron por citometría de flujo.

## 5. Análisis de resultados

### 5.1 Análisis de las variables

Las variables estudiadas no siguieron una distribución normal. Por lo tanto, para comparar el valor promedio de diferentes condiciones, utilizamos la prueba U de Mann-Whitney para comparar dos muestras, y la prueba de Kruskal-Wallis para comparar más de dos muestras. Realizamos la prueba de Wilcoxon por pares como prueba *post hoc* para identificar los grupos con diferencias estadísticamente significativas. Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron significativos, y los valores de  $P$  entre  $\leq 0.09$  y  $\geq 0.05$  se consideraron como tendencia estadística. Para comparar proporciones, llevamos a cabo el análisis de contingencia y utilizamos la prueba de chi-cuadrado. Ambos, el software GraphPad Prism5 y JMP12 se utilizaron en este estudio.

### 5.2 Análisis de Ligamiento genético

Durante la meiosis I los cromosomas se condensan y forman pares. En etapa del proceso se produce el entrecruzamiento y la recombinación genética, que permite el inter-

cambio de partes del ADN dando lugar a un nuevo material genético. El ligamiento genético está relacionado con la cosegregación de fragmentos genómicos, en un mismo cromosoma. que ocurre durante la generación de los gametos en la meiosis.

La frecuencia de recombinación, o tasa de recombinación,  $r$ , entre dos loci es la probabilidad de que ocurra un evento de recombinación durante la meiosis y mide qué tan cerca están vinculados dos loci.  $r = 0$  si dos loci están completamente unidos y no se observarían recombinantes durante la meiosis; mientras que  $r = \frac{1}{2}$  si los loci están desvinculados y se observaría aproximadamente el mismo número de recombinantes y no recombinantes durante la meiosis (Zou, 2009).

Para enfermedades y rasgos cuantitativos con determinaciones genéticas y ambientales complejas, con el uso de herramientas analíticas, análisis de ligamiento fructíferos y mapeo de locus de rasgos cuantitativos (QTL) en humanos generalmente se puede localizar un locus de susceptibilidad a enfermedades o un QTL a una región genómica de  $\sim 30$  cM. Entre todos los métodos disponibles para el mapeo de QTL único, el análisis de marcador único es el más simple, transmite la idea clave de cómo la diferencia fenotípica en un QTL está relacionada con los marcadores genéticos, la base del mapeo de QTL (Den, 2000).

En nuestro estudio para el análisis de ligamiento genético e identificar regiones genómicas de rasgo cuantitativo (QTL) asociadas con la variabilidad en el fenotipo de interés, y que podrían estar participando en la determinación de éste se utilizó la información de los marcadores de genotipado de los ratones de las cohortes *backcross*.

Se establece que la distancia genética entre marcadores ( $d$ ) está dada de acuerdo con el número de eventos de recombinación que suceden entre éstos, y su expresión es en centimorgans (cM). Por lo tanto, en el presente documento, se realizó la revisión de los datos genéticos según la distancia genética estimada en base a las frecuencias de recombinación entre marcadores observadas en las cohortes *backcross* con la distancia genética correspondiente a las posiciones anotadas para los marcadores en las bases de datos de referencia (*Mouse Genome Informatics*) (Cox, 2009).

Con el propósito de dar un valor o puntaje a la significancia estadística del ligamiento de los QTL detectados se utilizó el *LOD score*, que se define como el logaritmo en base 10 de la *Odd Ratio* (o razón de riesgo); la cual es el cociente entre las probabilidades de que los datos observados se hubieran generado bajo la hipótesis de que un *locus* esté ligado a un rasgo fenotípico, y bajo la hipótesis de que no lo esté. Un *LOD score* igual a 3 significa que el dato observado es 1000 veces más probable bajo la hipótesis de ligamiento que bajo la hipótesis de independencia. Se utilizaron los criterios establecidos

por Lander y Kruglyak para considerar el nivel de significación de la asociación observada entre un QTL y el fenotipo de interés. Para conocer el nivel de significancia de la asociación observada entre un QTL y el fenotipo de interés se tuvieron en cuenta que los que valores de *LOD score* superiores a 1.5 indicando la *presencia sugestiva de ligamiento*, mientras que valores superiores a 3.3 indicaron que el ligamiento detectado fue estadísticamente significativo. (Lander y Kruglyak, 1995).



# CONCLUSIONES

# Conclusiones

## Primera

Los niveles de expresión de algunos miRNAs mostraron relación con la susceptibilidad, los patofenotipos, así como proteínas de señalización y composición celular del tumor en la cohorte de ratones que desarrollaron cáncer de mama y que estuvieron en ausencia de tratamiento.

## Segunda

En la cohorte de ratones que recibió el alotransplante se identificaron miRNAs intratumorales, que mostraron estar relacionados en la evolución y respuesta al tratamiento con docetaxel y doxorubicina.

## Tercera

Se determinó que en la respuesta al tratamiento con docetaxel y doxorubicina influye el fondo genético. En la cohorte analizada caracterizada por alta heterogeneidad genética se establecieron redes de interacción entre proteínas, células y miRNAs que influyen en la evolución de la enfermedad y por ende en la respuesta al tratamiento.

## Cuarta

Se identificaron los efectos del aumento y la disminución de la expresión de un miRNA en la viabilidad celular, apoptosis y alteraciones del ciclo celular, así como de la respuesta a antraciclinas en líneas celulares de cáncer de mama.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Adam, L. et al. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 5060–5072, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-2245> (2009).

Ahmad, A. et al. Inhibition of Hedgehog signaling sensitizes NSCLC cells to standard therapies through modulation of EMTregulating miRNAs. *Journal of hematology & oncology* 6, 77, <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-77> (2013).

Al-Khanbashi M, Al-Moundhri M. *Oncol Rev.* 2015 Oct 2;9(1):279. doi: 10.4081/oncol.2015.279. eCollection 2015 Feb 10. Review.

Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(8):2697–706.

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Breast Cancer Facts & Figures 2009-2010*. Atlanta: American Cancer Society, Inc.

Anastasov N, Hofig I, Vasconcellos IG et al. Radiation resistance due to high expression of miR-21 and G2/M checkpoint arrest in breast cancer cells. *Radiat Oncol* 2012; 7: 206.

Armstrong L, Hughes O, Yung S, Hyslop L, Stewart R, Wappler I, Peters H, Walter T, Stojkovic P, Evans J, Stojkovic M, Lako M. The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFkappabeta signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Hum Mol Genet.* 2006 Jun 1;15(11):1894-913. doi: 10.1093/hmg/ddl112. Epub 2006 Apr 27. PMID: 16644866.

Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK, et al. Crosstalk between the Estrogen Receptor and the HER Tyrosine Kinase Receptor Family. *Endocrine Reviews.* 2008;29:217–33.

arrest: Implications for breast cancer therapy. *J Cell Physiol.* 2020;1–10.

Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Prichard, C. C., Gibson, D. F., et al. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (12), 5003–5008. doi: 10.1073/pnas.1019055108

Asaga S, Kuo C, Nguyen T, et al (2011). Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. *Clin Chem*, 57, 84-91.

Auchincloss, H., Jr. & Winn, H.J. Clarence Cook Little (1888-1971): the genetic basis of transplant immunology. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4, 155-9 (2004).

Auchincloss, H., Jr. & Winn, H.J. Clarence Cook Little (1888-1971): the genetic basis of transplant immunology. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4, 155-9 (2004).

Aure MR, Leivonen SK, Fleischer T et al. Individual and combined effects of DNA methylation and copy number alterations on miRNA expression in breast tumors. *Genome Biol* 2013; 14: R126.

Babina IS, Turner NC. Advances and challenges in targeting FGFR signalling in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(5):318–332. doi: 10.1038/nrc.2017.8.

Bach DH, Lee SK, Sood AK. Circular RNAs in Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019 Jun 7;16:118-129. doi: 10.1016/j.omtn.2019.02.005. Epub 2019 Feb 16. Review.

Bandini E, Fanini F. MicroRNAs and Androgen Receptor: Emerging Players in Breast Cancer. *Front Genet.* 2019;10:203. Published 2019 Mar 19. doi:10.3389/fgene.2019.00203

Bar I, et al. The microRNA miR-210 is expressed by cancer cells but also by the tumor microenvironment in triple-negative breast cancer. *J Histochem. Cytochem.* 2017;65:335–346. doi: 10.1369/0022155417702849.

Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol.* 2003;21:1973–1979.

Bar-On, O., Shapira, M. & Hershko, D.D. Differential effects of doxorubicin treatment on cell cycle arrest and Skp2 expression in breast cancer cells. *Anticancer Drugs* 18, 1113-21 (2007).

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116:281-97; PMID:14744438; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5).

Baselga, J. et al. A phase 3 tRial comparing capecitabinE in combination with Sorafenlb or pLacebo for treatment of locally advanced or metastatic HER2-Negative breast CancEr (the RESILIENCE study): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 14, 228 (2013).

Bavelloni A, et al. MiRNA-210: a current overview. *Anticancer Res.* 2017;37:6511–6652. doi: 10.21873/anticancer.12107.

Beatson, G.T. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: Suggestions for a new treatment with illustrative cases. *Lancet* 2: 104, 1896.

Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, et al. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 1999 ; 286 : 2528–2531.

Bernstein, L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 7, 3-15 (2002).

Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics.* 2015 Jul 13;5(10):1122-43. doi: 10.7150/thno.11543. eCollection 2015. DOI: 10.7150/thno.11543

Biagioni F, Bossel Ben-Moshe N, Fontemaggi G et al. The locus of microRNA-10b: a critical target for breast cancer insurgence and dissemination. *Cell Cycle* 2013; 12: 2371-2375.

Biamonte F, Santamaria G, Sacco A, Perrone FM, Di Cello A, Battaglia AM, Salatino A, Di Vito A, Aversa I, Venturella R, Zullo F, Costanzo F. MicroRNA let-7g acts as tumor suppressor and predictive biomarker for chemoresistance in human epithelial ovarian cancer. *Sci Rep.* 2019 Apr 5;9(1):5668. doi: 10.1038/s41598-019-42221-x. PMID: 30952937; PMCID: PMC6450929.

Biomark HD Data Collection. User Guide. PN 100-2451 K1. © 2018 Fluidigm Corporation. All rights reserved. 07/2018. Disponible en <https://www.fluidigm.com/binaries/content/documents/fluidigm/resources/biomark-hd-data-collection-ug-100-2451/biomark-hd-data-collection-ug-100-2451/fluidigm%3Afile>

Bonetti P, Climent M, Panebianco F, et al. Dual role for miR-34a in the control of early progenitor proliferation and commitment in the mammary gland and in breast cancer [published correction appears in *Oncogene.* 2020 Mar;39(10):2228]. *Oncogene.* 2019;38(3):360-374. doi:10.1038/s41388-018-0445-3

Bonetti P. et al. Dual role for miR-34a in the control of early progenitor proliferation and commitment in the mammary gland and in breast cancer. *Oncogene* (2019) 38:360–374.

Bourguignon LY, Spevak CC, Wong G, Xia W, Gilad E. Hyaluronan CD44 interaction with protein kinase C(epsilon) promotes oncogenic signaling by the stem cell marker Nanog and the Production of microRNA-21, leading to down-regulation of the tumor suppressor protein PDCD4, anti-apoptosis, and chemotherapy resistance in breast tumor cells. *J Biol Chem* 2009;284:26533–46.

Boyd, N.F., Lockwood, G.A., Greenberg, C.V., Martin, L.J. and Tritchler, D.L. Effects of a low-fat high-carbohydrate diet on plasma sex hormones in premenopausal women: results from a randomized controlled trial. *Br J Cancer* 76: 127, 1997

Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2018, 68, 394–424

Breast cancer screening / IARC Working Group on the Evaluation of Cancer-Preventive Interventions, 2015. – 2nd edition. (IARC Handbooks of Cancer Prevention ; Volume 15) . International Agency for Research on Cancer II. Series ISBN 978-92-832-3017-5, ISSN 1027-5622.

Brendle A, Lei H, Brandt A, Johansson R, Enquist K, Henriksson R, et al. Polymorphisms in predicted microRNA-binding sites in integrin genes and breast cancer: ITGB4 as prognostic marker. *Carcinogenesis* 2008;29:1394–9

Brodersen J, Siersma VD. Long-term psychosocial consequences of false-positive screening mammography. *Ann Fam Med.* 2013;11:106–15.

Browning, M. J., Chandra, A., Carbonaro, V., Okkenhaug, K., Barwell, J. Cowden's syndrome with immunodeficiency. *J. Med. Genet.* 52: 856-859, 2015. PubMed: 26246517

Brueggemeier, R.W., Richards, J.A., Joomprabutra, S., Bhat, A S. and Whetstone, J.L. Molecular pharmacology of aromatase and its regulation by endogenous and exogenous agents. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79: 75, 2001.

Brufsky, A.M. et al. RIBBON-2: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating the efficacy and safety of bevacizumab in combination with chemotherapy for second-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 29, 4286-93 (2011).

Bustin SA, Benes V, Garson JA et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611–622.

Buus R, Sestak I, Kronenwett R, Denkert C, Dubsy P, Krappmann K, Scheer M, Petry C, Cuzick J, Dowsett M. Comparison of EndoPredict and EPclin With Oncotype DX Recurrence Score for Prediction of Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2016:108.

Cabrita MA, Vanzyl EJ, Hamill JD, Pan E, Marcellus KA, Tolls VJ, et al. (2016) A Temperature Sensitive Variant of p53 Drives p53-Dependent MicroRNA Expression without Evidence of Widespread Post-Transcriptional Gene Silencing. *PLoS ONE* 11(2): e0148529. doi:10.1371/journal.pone.0148529

Cai J, Guan H, Fang L, et al. MicroRNA-374a activates Wnt/β-catenin signaling to promote breast cancer metastasis. *J Clin Invest.* 2013;123(2):566-579. doi:10.1172/JCI65871

Cai WY, Wei TZ, Luo QC, et al. The Wnt-β-catenin pathway represses let-7 microRNA expression through transactivation of Lin28 to augment breast cancer stem cell expansion. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 13):2877-2889. doi:10.1242/jcs.123810

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2999-3004.

- Cancer Genome Atlas Network Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490:61–70.
- Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delaloge S, Pierga JY, Brain E, Causeret S, DeLorenzi M, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375:717–729.
- Castellano, I., Allia, E., Accortanzo, V., Vandone, A. M., Chiusa, L., Arisio, R., et al. (2010). Androgen receptor expression is a significant prognostic factor in estrogen receptor positive breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.* 124, 607–617. doi: 10.1007/s10549-010-0761-y
- Castellanos-Martin, A. et al. Unraveling heterogeneous susceptibility and the evolution of breast cancer using a systems biology approach. *Genome biology* **16**, 40 (2015).
- Castilla MA, Diaz-Martin J, Sarrio D et al. MicroRNA-200 family modulation in distinct breast cancer phenotypes. *PLoS One* 2012; 7: e47709.
- Cava C, Bertoli G, Ripamonti M et al. Integration of mRNA expression profile, copy number alterations, and microRNA expression levels in breast cancer to improve grade definition. *PLoS One* 2014; 9: e97681.
- Cavaciuti E, Lauge A, Janin N, et al. Cancer risk according to type and location of ATM mutation in ataxia-telangiectasia families. *Genes Chromosomes Cancer* 2005 ; 42 : 1–9.
- Cenciarini ME, Proietti CJ. Molecular mechanisms underlying progesterone receptor action in breast cancer: Insights into cell proliferation and stem cell regulation. *Steroids*. 2019;152:108503. doi:10.1016/j.steroids.2019.108503
- Ceriani R L. Fetal mammary gland differentiation in vitro in response to hormones I. Morphological findings. *Dev Biol*. 1970;21(4):506–529.
- Ceriani R L. Fetal mammary gland differentiation in vitro in response to hormones II. Biochemical findings. *Dev Biol*. 1970;21(4):530–546.
- Cesi, V. et al. TGFbeta-induced c-Myb affects the expression of EMT-associated genes and promotes invasion of ER+ breast cancer cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 10, 4149–4161, <https://doi.org/10.4161/cc.10.23.18346> (2011).
- Chai H., M. Liu, R. Tian, X. Li and H. Tang, miR-20a targets BNIP2 and contributes chemotherapeutic resistance in colorectal adenocarcinoma SW480 and SW620 cell lines, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 43 (2011), 217-25.
- Chakraborty G, Jain S, Kundu GC. Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor-dependent breast tumor growth and angiogenesis via autocrine and paracrine mechanisms. *Cancer Res*. 2008;68(1):152–161. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2126.
- Chang, S., Weng, S., Hsieh, J. et al. MicroRNA-34a modulates genes involved in cellular motility and oxidative phosphorylation in neural precursors derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *BMC Med Genomics* 4, 65 (2011). <https://doi.org/10.1186/1755-8794-4-65>
- Charles D. Johnson, Aurora Esquela-Kerscher, Giovanni Stefani, Mike Byrom, Kevin Kelnar, Dmitriy Ovcharenko, Mike Wilson, Xiaowei Wang, Jeffrey Shelton, Jaclyn Shingara, Lena Chin, David Brown and Frank J. Slack. The *let-7* MicroRNA Represses Cell Proliferation Pathways in Human Cells. *Cancer Res* August 15 2007 (67) (16) 7713-7722; DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1083
- Chen D, Sun Q, Zhang L, Zhou X, Cheng X, Zhou D, Ye F, Lin J, Wang W. The lncRNA HOXA11-AS functions as a competing endogenous RNA to regulate PADI2 expression by sponging miR-125a-5p in liver metastasis of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017 Aug

3;8(41):70642-70652. doi: 10.18632/oncotarget.19956. PMID: 29050308; PMCID: PMC5642583.

Chen GQ, Zhao ZW, Zhou HY, Liu YJ, Yang HJ. Systematic analysis of microRNA involved in resistance of the MCF-7 human breast cancer cell to doxorubicin. *Med Oncol* 2010;27:406–15.

Chen X, Wang YW, Zhu WJ, Li Y, Liu L, Yin G and Gao P: A four-microRNA signature predicts lymph node metastasis and prognosis in breast cancer. *Hum Pathol* 76: 122-132, 2018

Chen, J., Ouyang, H., An, X., & Liu, S. (2019). miR-125a is upregulated in cancer stem-like cells derived from TW01 and is responsible for maintaining stemness by inhibiting p53. *Oncology Letters*, 17,87–94. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9587>

Cheng Z, Ma R, Tan W, Zhang L. MiR-152 suppresses the proliferation and invasion of NSCLC cells by inhibiting FGF2. *Exp Mol Med*. 2014;46(5):122–8.

Chia SK, Bramwell VH, Tu D, Shepherd LE, Jiang S, Vickery T, Mardis E, Leung S, Ung K, Pritchard KI, et al. A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res*. 2012;18:4465–4472.

Christodoulatos GS, Dalamaga M. Micro-RNAs as clinical biomarkers and therapeutic targets in breast cancer: Quo vadis? *World J Clin Oncol* 2014; 5: 71-81

Christopoulos PF, Vlachogiannis NI, Vogkou CT, et al. The role of the androgen receptor signaling in breast malignancies. *Anticancer Res*. 2017;37:6533–6540.

Cohen-Haguenaer O. Prédiposition héréditaire au cancer du sein (1) - Génétique [Hereditary predisposition to breast cancer (1): genetics]. *Med Sci (Paris)*. 2019;35(2):138-151. doi:10.1051/medsci/2019003

Colditz GA, Rosner BA, Chen WY, Holmes MD, Hankinson SE. Risk factors for breast cancer according to estrogen and progesterone receptor status. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:218–28.

Colditz, G.A. Physical activity and body weight. In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (6th Edition). Eds. V.T. DeVita Jr., S. Hellman and S.A. Rosenberg. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p610, 2001.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1997). Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet*, 350(9084):1047–59. doi:10.1016/S0140-6736(97)08233-0 PMID:10213546

Corcoran C, Friel AM, Duffy MJ et al. Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer. *Clin Chem* 2011; 57: 18-32.

Coussens, L.M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-7 (2002).

Cox, A. et al. A new standard genetic map for the laboratory mouse. *Genetics* 182, 1335-44 (2009).

Cui M, Wang H, Yao X, Zhang D, Xie Y, Cui R, Zhang X. Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge. *Front Genet*. 2019 Jul 18;10:626. doi: 10.3389/fgene.2019.00626. eCollection 2019. Review.

Cui X, Rosner B, Willett WC, Hankinson SE. Dietary fat, fiber, and carbohydrate intake and endogenous hormone levels in premenopausal women. *Horm Cancer*. 2010;1(5):265-276. doi:10.1007/s12672-010-0050-6

Curtis C, Shah SP, Chin SF, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;486(7403):346–52.

- Cybulski C, Górski B, Huzarski T, Masojć B, Mierzejewski M, Debniak T et al. (2004). CHEK2 is a multi-organ cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet*, 75(6):1131–5. doi:10.1086/426403 PMID:15492928
- Czech B, Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 19-31.
- Dai, X. et al. Combined Delivery of Let-7b MicroRNA and Paclitaxel via Biodegradable Nanoassemblies for the Treatment of KRAS Mutant Cancer. *Mol Pharm* 13, 520-33 (2016).
- De Nicolo A, Tancredi M, Lombardi G, et al. A novel breast cancer-associated BRIP1 (FANCF/BACH1) germ-line mutation impairs protein stability and function. *Clin Cancer Res* 2008 ; 14 : 4672–4680.
- Deng HW, Chen WM, Recker RR. QTL fine mapping by measuring and testing for Hardy-Weinberg and linkage disequilibrium at a series of linked marker loci in extreme samples of populations. *Am J Hum Genet*. 2000 Mar;66(3):1027-45. doi: 10.1086/302804. PMID: 10712216; PMCID: PMC1288140.
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004; 432: 231-235.
- DeSantis C., Siegel R., Bandi P., Jemal A. Breast cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 2011;61:409–418. doi: 10.3322/caac.20134.
- Dieci MV, Orvieto E, Dominici M, et al. Rare breast cancer subtypes. *The Oncologist*. 2014;19:805–13.
- Dieras, V. Review of docetaxel/doxorubicin combination in metastatic breast cancer. *Oncology* 11, 31-3 (1997).
- Diez O, Rubio IT, Cardose F. BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*. 2011;22:31–4.
- Dimri, G.P. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363-7 (1995)
- Donegan, W.L. Introduction to the history of breast cancer. In: *Cancer of the Breast* (4th Edition). Eds. W.L. Donegan and J.S. Spratt, WB Saunders, Philadelphia, p1, 1995.
- Dong G, Liang X, Wang D et al. High expression of miR-21 in triple-negative breast cancers was correlated with a poor prognosis and promoted tumor cell in vitro proliferation. *Med Oncol* 2014; 31: 57.
- Dong Y, Wang G. Knockdown of lncRNA SNHG12 suppresses cell proliferation, migration and invasion in breast cancer by sponging miR-451a. *Int J Clin Exp Pathol*. 2020 Mar 1;13(3):393-402. PMID: 32269676; PMCID: PMC7137024.
- Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur J Cancer*. 2017;75:284– 98
- Duhachek-Muggy S, Zolkiewska A. ADAM12-L is a direct target of the miR-29 and miR-200 families in breast cancer. *BMC Cancer*. 2015;15:93. Published 2015 Mar 4. doi:10.1186/s12885-015-1108-1
- Duttagupta, R., Jiang, R., Gollub, J., Getts, R. C., and Jones, K. W. (2011). Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One* 6 (6), e20769. doi: 10.1371/journal.pone.0020769
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-

term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet* 2012; 379: 432–44.

Eiring AM, Harb JG, Neviani P et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell* 2010; 140: 652-665.

Elmore JG. Screening for breast cancer: Strategies and recommendations. Retrieved from the Up to Date website: <http://www.uptodate.com/contents/screening-for-breast-cancer> . March 9, 2016.

Eyholzer, M., Schmid, S., Wilkens, L., Mueller, B. U. & Pabst, T. The tumour-suppressive miR-29a/b1 cluster is regulated by CEBPA and blocked in human AML. *British journal of cancer* 103, 275–284, doi:10.1038/sj.bjc.6605751 (2010).

Fan Y, Qian X and Zhang C: U/G SNP rs111904020 in 3'UTR of STAT3 regulated by miR-214 promotes hepatocellular carcinoma development in Chinese population. *Tumour Biol* 37:14629-14635,2016.

Fanelli SL, Maciel ME, Diaz Gomez MI, et al. Further studies on the potential contribution of acetaldehyde accumulation and oxidative stress in rat mammary tissue in the alcohol drinking promotion of breast cancer. *J. Appl. Toxicol.* 2011;31(1):11–19.

Feng B, Wang R, Song HZ, Chen LB. MicroRNA-200b reverses chemoresistance of docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cells by targeting E2F3. *Cancer*. 2012 Jul 1;118(13):3365-76. doi: 10.1002/cncr.26560. Epub 2011 Dec 2. PMID: 22139708.

Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsky P, Fitzal F, Singer CF, Dietze O, Greil R, Jelen A, Sevelde P, et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin Cancer Res*. 2011;17:6012–6020.

Foekens JA, et al. Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105:13021–13026. doi: 10.1073/pnas.0803304105

Ford D., Easton D.F., Peto J. Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *Am. J. Hum. Genet.* 1995;57:1457–1462.

Formisano L, Stauffer KM, Young CD, Bhola NE, Guerrero-Zotano AL, Jansen VM, et al. Association of FGFR1 with ER $\alpha$  maintains ligand-independent ER transcription and mediates resistance to estrogen deprivation in ER+ breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(20):6138–6150. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1232.

Fu W, Hong Z, You X, Din J, Chen B, Zhao B, Yuan G, Li Q. Enhancement of anticancer activity of docetaxel by combination with Fuzheng Yiliu decoction in a mouse model of castration-resistant prostate cancer. *Biomed Pharmacother.* 2019 Oct;118:109374. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109374. Epub 2019 Sep 3. PMID: 31545228.

Galvan, A., Ioannidis, J.P. & Dragani, T.A. Beyond genome-wide association studies: genetic heterogeneity and individual predisposition to cancer. *Trends in genetics* : TIG 26, 132-41 (2010).

Gao G, Liang X, Ma W. Sinomenine restrains breast cancer cells proliferation, migration and invasion via modulation of miR-29/PDCD-4 axis. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019;47(1):3839-3846. doi:10.1080/21691401.2019.1666861

Gao L, Wang X, Wang X, Zhang L, Qiang C, Chang S, Ren W, Li S, Yang Y, Tong D, Chen C, Li Z, Song T, Zhi K, Huang C. IGF-1R, a target of let-7b, mediates crosstalk between IRS-2/Akt and MAPK pathways to promote proliferation of oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2014 May 15;5(9):2562-74. doi: 10.18632/oncotarget.1812. PMID: 24810113; PMCID: PMC4058027.

Gao, C., Peng, F. H. & Peng, L. K. MiR-200c sensitizes clear-cell renal cell carcinoma cells to sorafenib and imatinib by targeting heme oxygenase-1. *Neoplasma* 61, 680–689, [https://doi.org/10.4149/neo\\_2014\\_083](https://doi.org/10.4149/neo_2014_083) (2014).

Garg, H., Suri, P., Gupta, J.C. *et al.* Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell Int* 16, 49 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12935-016-0326-1>

Ge X, Sathiakumar D, Lua BJ, Kukreti H, Lee M, McFarlane C. Myostatin signals through miR-34a to regulate Fndc5 expression and browning of white adipocytes. *Int J Obes (Lond)*. 2017;41(1):137-148. doi:10.1038/ijo.2016.110

Gebeshuber, C. A. & Martinez, J. miR-100 suppresses IGF2 and inhibits breast tumorigenesis by interfering with proliferation and survival signaling. *Oncogene* 32,3306–3310 (2013).

Geretto M, Pulliero A, Rosano C, Zhabayeva D, Bersimbaev R, Izzotti A. Resistance to cancer chemotherapeutic drugs is determined by pivotal microRNA regulators. *Am J Cancer Res*. 2017 Jun 1;7(6):1350-1371. PMID: 28670496; PMCID: PMC5489783.

Ghoussaini M, Pharoah PD. Polygenic susceptibility to breast cancer: current state-of-the-art. *Future Oncol*. 2009;5(5):689-701. doi:10.2217/fon.09.29

Gnant M, Filipits M, Greil R, Stoeger H, Rudas M, Bago-Horvath Z, Mlineritsch B, Kwasny W, Knauer M, Singer C, *et al.* Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Ann Oncol*. 2014;25:339–345.

Goel, S., Sharma, R., Hamilton, A. & Beith, J. LHRH agonists for adjuvant therapy of early breast cancer in premenopausal women. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD004562 (2009).

Goldin, B.R., Woods, M.N., Spiegelman, D.L., Longcope, C., Morrill-LaBrode, A., Dwyer, J.T., Gualtieri, L.J., Hertzmark, E. and Gorbach, S.L. The effect of dietary fat and fiber on serum estrogen concentrations in premenopausal women under controlled dietary conditions. *Cancer* 74 (Suppl. 3): 1125, 1994.

Gong Y, He T, Yang L, Yang G, Chen Y, Zhang X. The role of miR-100 in regulating apoptosis of breast cancer cells. *Sci Rep*. 2015;5:11650. Published 2015 Jul 1. doi:10.1038/srep11650

Gong, J. *et al.* The relationship between miR-17-5p, miR-92a, and let-7b expression with non-small cell lung cancer targeted drug resistance. *J BUON* 22, 454-461 (2017).

Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, Gu D, Wen-Fong CY, Nguyen VQ *et al.* (2009). Beyond Li Fraumeni syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol*, 27(8):1250–6. doi:10.1200/JCO.2008.16.6959 PMID:19204208

Gonzalez TL, Rae JM, Colacino JA. Implication of environmental estrogens on breast cancer treatment and progression. *Toxicology*. 2019;421:41-48. doi:10.1016/j.tox.2019.03.014

Goodarzi G, Maniati M, Qujeq D. The role of microRNAs in the healing of diabetic ulcers. *Int Wound J*. 2019 Jun;16(3):621-633. doi: 10.1111/iwj.13070. Epub 2019 Feb 28. Review.

Gradishar, W.J. *et al.* Invasive Breast Cancer Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* : JNCCN 14, 324-54 (2016).

Grellety T. Cancer du sein triple négatif exprimant le récepteur aux androgènes : de la biologie à la thérapeutique [Androgen receptor-positive triple negative breast cancer:

From biology to therapy]. *Bull Cancer*. 2020;107(4):506-516. doi:10.1016/j.bulcan.2019.12.012

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT y col. Introducción al análisis genético. 7ª edición. Nueva York: WH Freeman; 2000. Penetrancia y expresividad. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22090/>. Consultado el 15 de agosto de 2020

Gruber CJ, Gruber DM, Gruber IM, Wieser F, Huber JC. Anatomy of the estrogen response element. *Trends Endocrinol Metab* 2004 15: 73-8.

Gu X, Li JY, Guo J, Li PS, Zhang WH. Influence of MiR-451 on Drug Resistances of Paclitaxel-Resistant Breast Cancer Cell Line. *Med Sci Monit*. 2015;21:3291-3297. Published 2015 Oct 30. doi:10.12659/msm.894475

Gu X, Xue JQ, Han SJ, Qian SY, Zhang WH. Circulating microRNA-451 as a predictor of resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer Biomark*. 2016;16(3):395-403. doi:10.3233/CBM-160578

Gu, G., Dustin, D. & Fuqua, S.A. Targeted therapy for breast cancer and molecular mechanisms of resistance to treatment. *Curr Opin Pharmacol* 31, 97-103 (2016).

Guy, C.T. et al. Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10578-82 (1992).

Guy, C.T. et al. Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10578-82 (1992).

Guy, C.T. et al. Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10578-82 (1992).

Haagensen, C.D. *Diseases of the Breast* (3rd Edition). WB Saunders, Philadelphia, p42, 1986.

Häger M, Pedersen CC, Larsen MT, Andersen MK, Hother C, Grønbaek K, Jarmer H, Borregaard N, Cowland JB. MicroRNA-130a-mediated down-regulation of Smad4 contributes to reduced sensitivity to TGF- $\beta$ 1 stimulation in granulocytic precursors. *Blood*. 2011 Dec 15;118(25):6649-59. doi: 10.1182/blood-2011-03-339978. Epub 2011 Oct 25. PMID: 22028478.

Han J, Hankinson SE, De Vivo I, Spiegelman D, Tamimi RM, Mhorenweiser HW, et al. A prospective study of XRCC1 haplotypes and their interaction with plasma carotenoids on breast cancer risk. *Cancer Res* 2003;63:8536-41.

Han LC, Wang H, Niu FL, Yan JY, Cai HF. Effect miR-214-3p on proliferation and apoptosis of breast cancer cells by targeting survivin protein. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(17):7469-7474. doi:10.26355/eurrev\_201909\_18856

Harney AS, Arwert EN, Entenberg D, Wang Y, Guo P, Qian BZ, Oktay MH, Pollard JW, Jones JG, Condeelis JS. Real-Time Imaging Reveals Local, Transient Vascular Permeability, and Tumor Cell Intravasation Stimulated by TIE2hi Macrophage-Derived VEGFA. *Cancer Discov*. 2015 Sep;5(9):932-43. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0012. Epub 2015 Aug 12. PMID: 26269515; PMCID: PMC4560669.

Harris LN, Ismaila N, McShane LM, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2016;34(10):1134-50.

- Hatse S., Brouwers B., Dalmaso B., Laenen A., Kenis C., Schoffski P., Wildiers H. Circulating MicroRNAs as easy-to-measure aging biomarkers in older breast cancer patients: Correlation with chronological age but not with fitness/frailty status. *PLoS ONE*. 2014;9:e110644. doi: 10.1371/journal.pone.0110644.
- Hearle N, Schumacher V, Menko FH, Olschwang S, Boardman LA, Gille JJ et al. (2006). Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin Cancer Res*, 12(10):3209–15. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0083 PMID:16707622
- Heldin CH. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun Signal*. 2013;11(1):97. doi: 10.1186/1478-811X-11-97.
- Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000;21:427–33.
- Hervé Acloque, Meghan S. Adams, Katherine Fishwick, Marianne Bronner-Fraser and M. Angela Nieto. Review series Epithelial-mesenchymal transitions : the importance of changing cell state in development and disease. (2009) *Cell* 119, no. 6
- Hickey TE, Robinson JL, Carroll JS, et al. Minireview: the androgen receptor in breast tissues: growth inhibitor, tumor suppressor, oncogene? *Mol Endocrinol*. 2012;26:1252–1267.
- Hill DA, Barry M, Wiggins C, et al. Estrogen receptor quantitative measures and breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat*. 2017.
- Hofmann M.H., Heinrich J., Radziwill G., Moelling K. A short hairpin DNA analogous to miR-125b inhibits C-Raf expression, proliferation, and survival of breast cancer cells. *Mol. Cancer Res*. 2009;7:1635–1644.
- Honrado E., Benitez J., Palacios J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: Genetic testing and therapeutic implications. *Mod. Pathol*. 2005; 18:1305–1320. doi: 10.1038/modpathol.3800453.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.29610>
- Hu G, Zhao X, Wang J, Lv L, Wang C, Feng L, Shen L, Ren W. miR-125b regulates the drug-resistance of breast cancer cells to doxorubicin by targeting HAX-1. *Oncol Lett*. 2018 Feb;15(2):1621-1629. doi: 10.3892/ol.2017.7476. Epub 2017 Nov 23. PMID: 29434858; PMCID: PMC5774474.
- Hu J, Xu J, Wu Y et al. Identification of microRNA-93 as a functional dysregulated miRNA in triple-negative breast cancer. *Tumour Biol* 2015; 36: 251-258
- Huang Z, Gan J, Long Z, Guo G, Shi X, Wang C, Zang Y, Ding Z, Chen J, Zhang J, Dong L. Targeted delivery of let-7b to reprogramme tumor-associated macrophages and tumor infiltrating dendritic cells for tumor rejection. *Biomaterials*. 2016 Jun;90:72-84. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.03.009. Epub 2016 Mar 9. PMID: 26994345.
- Hwang, H. W., Wentzel, E. A. & Mendell, J. T. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* (New York, N.Y.) 315, 97–100, doi:10.1126/science.1136235 (2007).
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 7065-7070.
- Jiang H, Zhang G, Wu JH, et al. Diverse roles of miR-29 in cancer (review). *Oncol Rep*. 2014;31(4):1509–1516
- Jiang Q, He M, Guan S, et al. MicroRNA-100 suppresses the migration and invasion of breast cancer cells by targeting FZD-8 and inhibiting Wnt/β-catenin signaling pathway. *Tumour Biol*. 2016;37(4):5001-5011. doi:10.1007/s13277-015-4342-x

Johnston, S.R. & Dowsett, M. Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nature reviews. Cancer* 3, 821-31 (2003).

Jones JE, Causey CP, Knuckley B, Slack-Noyes JL, Thompson PR. Protein arginine deiminase 4 (PAD4): Current understanding and future therapeutic potential. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2009 Sep;12(5):616-27. PMID: 19736621; PMCID: PMC3771078.

Jung EJ, Santarpia L, Kim J et al. Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. *Cancer* 2012; 118: 2603-2614.

Kalniete D, Nakazawa-Miklasevica M, Strumfa I, Abolins A, Irmejs A, Gardovskis J and Miklasevics E: High expression of miR-214 is associated with a worse disease-specific survival of the triple-negative breast cancer patients. *Hered Cancer Clin Pract* 13: 7, 2015

Kang, W. et al. let-7b/g silencing activates AKT signaling to promote gastric carcinogenesis. *J Transl Med* 12, 281 (2014).

Kastl L, Brown I, Schofield AC. miRNA-34a is associated with docetaxel resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2012;131:445–54.

Kataja, V. & Castiglione, M. Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 19 Suppl 2, ii11-3 (2008).

KIAA1522, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.172>

Kibel, A. S. editor. (2009). Commentary on Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Urol. Oncol.-Semin. Ori.* 27 (4), 461. doi: 10.1016/j.urolonc.2009.04.001

Kim do Y, Park EY, Chang E, Kang HG, Koo Y, Lee EJ, Ko JY, Kong HK, Chun KH, Park JH. A novel miR-34a target, protein kinase D1, stimulates cancer stemness and drug resistance through GSK3/β-catenin signaling in breast cancer. *Oncotarget.* 2016 Mar 22;7(12):14791-802. doi: 10.18632/oncotarget.7443. PMID: 26895471; PMCID: PMC4924752.

Kim SJ, Shin JY, Lee KD et al. MicroRNA let-7a suppresses breast cancer cell migration and invasion through downregulation of C-C chemokine receptor type 7. *Breast Cancer Res* 2012; 14: R14.

Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 2006; 22:165-73; PMID:16446010; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2006.01.003>.

Kim, S. I., Shin, D., Choi, T. H., Lee, J. C., Cheon, G. J., Kim, K. Y., et al. (2007). Systemic and specific delivery of small interfering RNAs to the liver mediated by apolipoprotein A-I. *Mol. Ther.* 15 (6), 1145–1152. doi: 10.1038/sj.mt.6300168

Kitamura T, Qian BZ, Soong D, Cassetta L, Noy R, Sugano G, Kato Y, Li J, Pollard JW. CCL2-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages. *J Exp Med.* 2015 Jun 29;212(7):1043-59. doi: 10.1084/jem.20141836. Epub 2015 Jun 8. PMID: 26056232; PMCID: PMC4493415.

Korabecna M, Koutova L, Tesarova P. The potential roles of vesicle-enclosed miRNAs in communication between macrophages and cancer cells in tumor microenvironment. *Neoplasma.* 2017;64(3):406-411. doi: 10.4149/neo\_2017\_311. PMID: 28253720.

Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, Ilnytsky Y, Tryndyak VP, Chekhun VF, Pogribny IP. Involvement of miRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin, *Mol Cancer Ther*, 2008, vol. 7 (pg. 2152-2159)10.1158/1535-7163.MCT-08-0021

- Kriege M, Hollestelle A, Jager A, Huijts PE, Berns EM, Sieuwerts AM et al. (2014). Survival and contralateral breast cancer in CHEK2 1100delC breast cancer patients: impact of adjuvant chemotherapy. *Br J Cancer*, 111(5):1004–13. doi:10.1038/bjc.2014.306 PMID:24918820
- Kriegel, A. J., Liu, Y., Fang, Y., Ding, X. & Liang, M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics* 44, 237–244, doi:10.1152/physiolgenomics.00141.2011 (2012).
- Kumar, P., Nagarajan, A. & Uchil, P.D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. Cold Spring Harb Protoc 2018, pdb prot095505 (2018).
- Kuninty PR, Bojmar L, Tjomsland V, Larsson M, Storm G, Ostman A, Sandstrom P and Prakash J: MicroRNA-199a and -214 as potential therapeutic targets in pancreatic stellate cells in pancreatic tumor. *Oncotarget* 7: 16396-16408, 2016.
- Lamb CA, Fabris VT, Lanari C. Progesterone and breast [published online ahead of print, 2020 Apr 10]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2020;S1521-6934(20)30056-0. doi:10.1016/j.bpobgyn.2020.04.001
- Lan FF, Wang H, Chen YC, Chan CY, Ng SS, Li K, Xie D, He ML, Lin MC, Kung HF. Hsa-let-7g inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by downregulation of c-Myc and upregulation of p16(INK4A). *Int J Cancer.* 2011 Jan 15;128(2):319-31. doi: 10.1002/ijc.25336. Epub 2010 Mar 22. PMID: 20309945.
- Lander, E. & Kruglyak, L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature genetics* 11, 241-7 (1995).
- Lanzetti L, Palamidessi A, Areces L, Areces L, Scita G, Di Fiore PP. Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases. *Nature.* 2004;429:309–14.
- Larsen MT, Häger M, Glenthøj A, Asmar F, Clemmensen SN, Mora-Jensen H, Borregaard N, Cowland JB. miRNA-130a regulates C/EBP- $\epsilon$  expression during granulopoiesis. *Blood.* 2014 Feb 13;123(7):1079-89. doi: 10.1182/blood-2013-08-523233. Epub 2014 Jan 7. PMID: 24398327.
- Lauby-Secretan B, Dossus L, Marant-Micallef C, His M. [Obesity and Cancer]. *Bull Cancer.* Jul-Aug 2019;106(7-8):635-646. doi: 10.1016/j.bulcan.2019.04.008.
- Le,M.T.,Shyh-Chang, N., Khaw, S. L., Chin, L., Teh, C., Tay, J., ... Lim, B. (2011). Conserved regulation of p53 network dosage by microRNA-125b occurs through evolving miRNA-target gene pairs. *PLoS Genetics*, 7,e1002242. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002242>
- Lee HJ, Seo AN, Kim EJ, Jang MH, Kim YJ, Kim JH, et al. Prognostic and predictive values of EGFR overexpression and EGFR copy number alteration in HER2-positive breast cancer. *Br J Cancer.* 2015;112(1):103–111. doi: 10.1038/bjc.2014.556.
- Lee Y, Ahn C, Han J et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-419.
- Lehmann U. Aberrant DNA methylation of microRNA genes in human breast cancer - a critical appraisal. *Cell Tissue Res* 2014; 356: 657-664.
- Leung CM, Chen TW, Li SC et al. MicroRNA expression profiles in human breast cancer cells after multifraction and single-dose radiation treatment. *Oncol Rep* 2014; 31: 2147-2156
- Li D, Jia H, Zhang H, Lv M, Liu J, Zhang Y, Huang T, Huang B. TLR4 signaling induces the release of microparticles by tumor cells that regulate inflammatory cytokine IL-6 of macrophages via microRNA let-7b. *Oncoimmunology.* 2012 Aug 1;1(5):687-693. doi: 10.4161/onci.19854. PMID: 22934260; PMCID: PMC3429572.

- Li F, Miao L, Xue T, Qin H, Mondal S, Thompson PR, Coonrod SA, Liu X, Zhang X. Inhibiting PAD2 enhances the anti-tumor effect of docetaxel in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019 Oct 10;38(1):414. doi: 10.1186/s13046-019-1404-8. PMID: 31601253; PMCID: PMC6785896.
- Li H, Bian C, Liao L et al. miR-17-5p promotes human breast cancer cell migration and invasion through suppression of HBP1. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 126: 565-575.
- Li HL, Liang S, Cui JH and Han GY: Targeting of GSK-3 $\beta$  by miR-214 to facilitate gastric cancer cell proliferation and decrease of cell apoptosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22: 127-134, 2018.
- Li J, Zhang Y, Zhang W et al. Genetic heterogeneity of breast cancer metastasis may be related to miR-21 regulation of TIMP-3 in translation. *Int J Surg Oncol* 2013; 2013: 875078.
- Li QL, Ito K, Sakakura C, Ki Inoue, Chi XZ, Lee KY, et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell*. 2002;109:113–24
- Li XJ, Li ZF, Xu YY, Han Z, Liu ZJ. microRNA-374 inhibits proliferation and promotes apoptosis of mouse melanoma cells by inactivating the Wnt signalling pathway through its effect on tyrosinase. *J Cell Mol Med*. 2019;23(8):4991-5005. doi:10.1111/jcmm.14348
- Li Y, Wang Y, Fan H, Zhang Z, Li N. miR-125b-5p inhibits breast cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting KIAA1522. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Sep 26;504(1):277-282. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.08.172. Epub 2018 Aug 31. PMID: 30177391.
- Li Y, Wang Y, Shen X and Han X (2019) miR-128 Functions as an OncomiR for the Downregulation of HIC1 in Breast Cancer. *Front. Pharmacol*. 10:1202. doi: 10.3389/fphar.2019.01202
- Li, C. et al. Multiple roles of microRNA-100 in human cancer and its therapeutic potential. *Cell Physiol. Biochem*. 37, 2143–2159 (2015).
- Li, F. P., Fraumeni, J. F., Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms: a familial syndrome? *Ann. Intern. Med*. 71: 747-752, 1969.
- Li, D., Zhao, Y., Liu, C., Chen, X., Qi, Y., Jiang, Y., et al. (2011). Analysis of MiR-195 and MiR-497 expression, regulation and role in breast cancer. *Clin Cancer Res* 17, 1722–1730.
- Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*. 2003 Jul-Aug;2(4):339-45. PMID: 12851486.
- Liang Z, Li Y, Huang K, Wagar N, Shim H. Regulation of miR-19 to breast cancer chemo-resistance through targeting PTEN. *Pharm Res*. 2011 Dec;28(12):3091-100. doi: 10.1007/s11095-011-0570-y. Epub 2011 Aug 19.
- Liang Z, WuH, Xia J, Li Y, Zhang Y, Huang K, et al. Involvement of miR326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1. *Biochem Pharmacol* 2010;79:817–24.
- Linde N, Casanova-Acebes M, Sosa MS, Mortha A, Rahman A, Farias E, Harper K, Tardio E, Reyes Torres I, Jones J, Condeelis J, Merad M, Aguirre-Ghiso JA. Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis. *Nat Commun*. 2018 Jan 2;9(1):21. doi: 10.1038/s41467-017-02481-5. PMID: 29295986; PMCID: PMC5750231.
- Liu B, Tian Y, Li F, et al. Tumor-suppressing roles of miR-214 and miR-218 in breast cancer. *Oncol Rep*. 2016;35(6):3178-3184. doi:10.3892/or.2016.4749

- Liu C, Wang QS, Wang YJ (2012a). The CHEK2 I157T variant and colorectal cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13(5):2051–5. doi:10.7314/APJCP.2012.13.5.2051 PMID:22901170
- Liu C, Wang Y, Wang QS, Wang YJ (2012b). The CHEK2 I157T variant and breast cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13(4):1355–60. doi:10.7314/APJCP.2012.13.4.1355 PMID:22799331
- Liu J, Zhou Y, Shi Z, et al. microRNA-497 Modulates Breast Cancer Cell Proliferation, Invasion, and Survival by Targeting SMAD7. *DNA Cell Biol*. 2016;35(9):521-529. doi:10.1089/dna.2016.3282
- Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH, Jr., Pestell RG, Kushner PJ. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem* 2002 277: 24353-60.
- Liu Y, Lin J, Zhai S, Sun C, Xu C, Zhou H and Liu H: MicroRNA-214 suppresses ovarian cancer by targeting  $\beta$ -Catenin. *Cell Physiol Biochem* 45: 1654-1662, 2018.
- Liu Y, Zhang J, Sun X, et al. Down-regulation of miR-29b in carcinoma associated fibroblasts promotes cell growth and metastasis of breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(24):39559–39570.
- Liu ZR, Song Y, Wan LH, Zhang YY, Zhou LM. Over-expression of miR-451a can enhance the sensitivity of breast cancer cells to tamoxifen by regulating 14-3-3 $\zeta$ , estrogen receptor  $\alpha$ , and autophagy. *Life Sci*. 2016 Mar 15;149:104-13. doi: 10.1016/j.lfs.2016.02.059. Epub 2016 Feb 17. PMID: 26896688.
- Liu, C. Y. et al. M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial–mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. *Lab. Invest.* **93**, 844–854 (2013).
- Liu, Y., Nguyen, N. & Colditz, G.A. Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. *Women's health* 11, 65-77 (2015).
- Lo, P.K. et al. CD49f and CD61 identify Her2/neu-induced mammary tumor-initiating cells that are potentially derived from luminal progenitors and maintained by the integrin-TGFbeta signaling. *Oncogene* **31**, 2614-26 (2012).
- Lorenti Garcia C, Mechilli M, Proietti De Santis L, Schinoppi A, Kobos K, Palitti F. Relationship between DNA lesions, DNA repair and chromosomal damage induced by acet-aldehyde. *Mutat. Res.* 2009;662(1–2):3–9.
- LoRusso, P.M., Weiss, D., Guardino, E., Girish, S. & Sliwkowski, M.X. Trastuzumab emtansine: a unique antibody-drug conjugate in development for human epidermal growth factor receptor 2-positive cancer. *Clin Cancer Res* 17, 6437-47 (2011).
- Lou B, Liao XL, Wu MP, Cheng PF, Yin CY, Fei Z. Lipoproteína de alta densidad como portador potencial para la administración de un fármaco antitumoral lipófilo en las células del hepatoma. *Mundial J Gastroenterol*. 2005; 11 : 954-959
- Loveday C, Turnbull C, Ramsay E, et al. Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet* 2011 ; 43 : 879–882.
- Lu W, Katzenellenbogen BS. Estrogen Receptor- $\beta$  Modulation of the ER $\alpha$ -p53 Loop Regulating Gene Expression, Proliferation, and Apoptosis in Breast Cancer. *Horm Cancer*. 2017;8(4):230-242. doi:10.1007/s12672-017-0298-1
- Luo J, Zhao Q, Zhang W, et al. A novel panel of microRNAs provides a sensitive and specific tool for the diagnosis of breast cancer. *Mol Med Rep*. 2014;10(2):785-791. doi:10.3892/mmr.2014.2274

Luo Y, Wang X, Niu W, et al (2017). Elevated microRNA 125b levels predict a worse prognosis in HER2 positive breast cancer patients. *Oncol Lett*, 2017, 867-74.

Luo, M., Shen, D., Zhou, X., Chen, X., and Wang, W. (2013a) MicroRNA-497 is a potential prognostic marker in human cervical cancer and functions as a tumor suppressor by targeting the insulin-like growth factor 1 receptor. *Surgery* 153, 836–847.

Lv J, Zhang Z, Pan L, Zhang Y. MicroRNA-34/449 family and viral infections. *Virus Res*. 2019 Jan 15;260:1-6. doi: 10.1016/j.virusres.2018.11.001. Epub 2018 Nov 6. Review.

Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 9667-9672.

Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007; 449: 682-688.

Ma L, Young J, Prabhala H et al. miR-9, a MYC/MYCIN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 247-256.

Macdonald-Obermann JL, Pike LJ. Different epidermal growth factor (EGF) receptor ligands show distinct kinetics and biased or partial agonism for homodimer and heterodimer formation. *J Biol Chem*. 2014;289(38):26178–26188. doi: 10.1074/jbc.M114.586826.

Mackey, J.R. et al. Primary results of ROSE/TRIO-12, a randomized placebo-controlled phase III trial evaluating the addition of ramucirumab to first-line docetaxel chemotherapy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 33, 141-8 (2015).

Maggi, L. B., Kuchenruether, M., Dadey, D. Y. A., Schwoppe, R. M., Grisendi, S., Townsend, R. R., et al. (2008). Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the mammalian ribosome. *Mol. Cell. Biol.* 28 (23), 7050–7065. doi: 10.1128/MCB.01548-07

Maimaitiming A, Wusiman A, Aimudula A, Kuerban X, Su P. MicroRNA-152 Inhibits Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Breast Cancer. *Oncol Res*. 2020 Feb 7;28(1):13-19. doi: 10.3727/096504019X15519249902838.

Malhotra GK, Zhao X, Band H, et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(10):955–60.

Mammoli F, Parenti S, Lomiento M, Gemelli C, Atene CG, Grande A, Corradini R, Manicardi A, Fantini S, Zanocco-Marani T, Ferrari S. Physiological expression of miR-130a during differentiation of CD34<sup>+</sup> human hematopoietic stem cells results in the inhibition of monocyte differentiation. *Exp Cell Res*. 2019 Sep 1;382(1):111445. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.05.026. Epub 2019 May 29. PMID: 31152707.

Marisa Weiss. BRCA1 and BRCA2 Testing, Your Guide to the Breast Cancer Pathology Report - Breastcancer.org. [www.breastcancer.org/cms./BreastcancerorgPathologyReportGuide2014.pdf](http://www.breastcancer.org/cms./BreastcancerorgPathologyReportGuide2014.pdf). page 25.

Martens CR, Bansal SS, Accornero F. Cardiovascular inflammation: RNA takes the lead. *J Mol Cell Cardiol*. 2019 Apr;129:247-256. doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.03.012. Epub 2019 Mar 14. Review.

Matsuyama H, Suzuki HI. Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 24;21(1). pii: E132. doi: 10.3390/ijms21010132. Review.

Mattiske S, Suetani RJ, Neilsen PM, Callen DF. The oncogenic role of miR-155 in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21: 1236-1243.

Matuszyk J, Klopowska D. miR-125b lowers sensitivity to apoptosis following mitotic

- McClellan, J. & King, M.C. Genetic heterogeneity in human disease. *Cell* **141**, 210-7 (2010).
- McGuire A, Brown JA, Malone C, Mclaughlin R, Kerin MJ. Effects of age on the detection and management of breast cancer. *Cancers*. 2015;7:908–929. doi: 10.3390/cancers7020815
- McKillop G. Text book of radiology and imaging. D. Sutton. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2003. ISBN: 0443071098. Clinical Radiology. 2003 Sep 30;58:746.
- Mehmeti-Ajradini M, Bergenfelz C, Larsson AM, Carlsson R, Riesbeck K, Ahl J, Janols H, Wullt M, Bredberg A, Källberg E, Björk Gunnarsdottir F, Rydberg Millrud C, Rydén L, Paul G, Loman N, Adolfsson J, Carneiro A, Jirström K, Killander F, Bexell D, Leandersson K. Human G-MDSCs are neutrophils at distinct maturation stages promoting tumor growth in breast cancer. *Life Sci Alliance*. 2020 Sep 21;3(11):e202000893. doi: 10.26508/lsa.202000893. PMID: 32958605.
- Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R et al.; CHEK2-Breast Cancer Consortium (2002). Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(\*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet*, 31(1):55–9. doi:10.1038/ng879 PMID:11967536
- Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 2010 ; 42 : 410–414.
- Meinhardt, U. and Mullis, P.E. The essential role of the aromatase/p450 arom. *Semin Reprod Med* 20: 277, 2002.
- Melo SA, Esteller M. Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. *FEBS Lett* 2011;585:2087–99
- Menard KL, Haskins BE, Denkers EY. Impact of *Toxoplasma gondii* Infection on Host Non-coding RNA Responses. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 May 14;9:132. doi: 10.3389/fcimb.2019.00132. eCollection 2019. Review.
- Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007;133(2):647–58.
- Mi Y, Liu F, Liang X, et al. Tumor suppressor let-7a inhibits breast cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting MAGE-A1. *Neoplasma*. 2019;66(1):54-62. doi:10.4149/neo\_2018\_180302N146
- Michailidou K, Hall P, Gonzalez-Neira A, Ghoussaini M, Dennis J, Milne RL et al.; Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Collaboration; Hereditary Breast and Ovarian Cancer Research Group Netherlands (HEBON); kConFab Investigators; Australian Ovarian Cancer Study Group; GENICA (Gene Environment Interaction and Breast Cancer in Germany) Network (2013). Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat Genet*, 45(4):353– 61, e1–2. doi:10.1038/ng.2563 PMID:23535729
- Micro-Ribonucleic Acid and Carcinogenesis: Breast Cancer as an Example.
- Miko, I. (2008) Variabilidad fenotípica: penetrancia y expresividad. *Educación de la naturaleza* 1 ( 1 ) : 137 Disponible en <https://www.nature.com/scitable/topicpage/phenotype-variability-penetrance-and-expressivity-573/> Consultado el 15/08/2020
- Miles, C. & Wayne, M. (2008) Quantitative trait locus (QTL) analysis. *Nature Education* 1(1):208.

Milioli HH, Vimieiro R, Riveros C, et al. The Discovery of Novel Biomarkers Improves Breast Cancer Intrinsic Subtype Prediction and Reconciles the Labels in the METABRIC Data Set. *PLoS One*. 2015;10:e0129711.

Min L, Liu C, Kuang J, Wu X, Zhu L. miR-214 inhibits epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells via downregulation of RNF8. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2019;51(8):791-798. doi:10.1093/abbs/gmz067

Min W, Wang B, Li J et al. The expression and significance of five types of miRNAs in breast cancer. *Med Sci Monit Basic Res* 2014; 20: 97-104.

Mirus, TransIT-X2, Primary Protocol <https://www.mirusbio.com/assets/protocols/ml061-transit-x2-dynamic-delivery-system-user-protocol.pdf>

Mirzadeh Azad F, Arabian M, Maleki M, Malakootian M. Small Molecules with Big Impacts on Cardiovascular Diseases. *Biochem Genet*. 2020 Jan 29. doi: 10.1007/s10528-020-09948-z. [Epub ahead of print] Review.

Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosovaagadjanyan, E. L., et al. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (30), 10513–10518. doi: 10.1073/pnas.0804549105

Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469–87

Mook S, Van't Veer LJ, Rutgers EJ, Piccart-Gebhart MJ, Cardoso F. Individualization of therapy using Mammprint: from development to the MINDACT Trial. *Cancer Genomics Proteomics*. 2007;4:147–155.

Moskwa P, Buffa FM, Pan Y, Panchakshari R, Gottipati P, Muschel RJ, Beech J, Kulshrestha R, Abdelmohsen K, Weinstock DM, Gorospe M, Harris AL, Helleday T, Chowdhury D. miR-182-mediated downregulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors. *Mol Cell*. 2011 Jan 21;41(2):210-20. doi: 10.1016/j.molcel.2010.12.005. Epub 2010 Dec 30. Erratum in: *Mol Cell*. 2014 Jan 9;53(1):162-3.

Mosly D., Turnbull A., Sims A., Ward C., Langdon S. Predictive markers of endocrine response in breast cancer. *World J. Exp. Med*. 2018;8:1. doi: 10.5493/wjem.v8.i1.1

Motamedi M, Hashemzadeh Chaleshtori M, Ghasemi S, Mokarian F. Plasma Level Of miR-21 And miR-451 In Primary And Recurrent Breast Cancer Patients. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2019;11:293-301. Published 2019 Oct 25. doi:10.2147/BCTT.S224333

Mott, J. L. et al. Transcriptional Suppression of mir-29b-1/mir-29a Promoter by c-Myc, Hedgehog, and NF-kappaB. *Journal of cellular biochemistry* 110, 1155–1164, doi:10.1002/jcb.22630 (2010).

Mueller C, Haymond A, Davis JB, Williams A, Espina V. Protein biomarkers for subtyping breast cancer and implications for future research. *Expert Rev Proteomics*. 2018;15(2):131–152. PMID: 29271260. DOI: 10.1080/14789450.2018.1421071

Mulrane L, McGee SF, Gallagher WM, O'Connor DP. miRNA dysregulation in breast cancer. *Cancer Res*. 2013 Nov 15;73(22):6554-62. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1841. Epub 2013 Nov 7. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-13-1841](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1841)

Mumford SL, Schisterman EF, Siega-Riz AM, Gaskins AJ, Wactawski-Wende J, VanderWeele TJ. Effect of dietary fiber intake on lipoprotein cholesterol levels independent of estradiol in healthy premenopausal women. *Am J Epidemiol*. 2011;173(2):145-156. doi:10.1093/aje/kwq388

Munroe SH. Diversity of antisense regulation in eukaryotes: multiple mechanisms, emerging patterns. *J Cell Biochem*. 2004 Nov 1;93(4):664-71. Review.

Nagel JH, Peeters JK, Smid M, Sieuwerts AM, Wasielewski M, de Weerd V et al. (2012). Gene expression profiling assigns CHEK2 1100delC breast cancers to the luminal intrinsic subtypes. *Breast Cancer Res Treat*, 132(2):439–449. doi:10.1007/s10549-011-1588-x PMID:21614566

Nagle RB, Bocker W, Davis JR, et al. Characterization of breast carcinomas by two monoclonal antibodies distinguishing myoepithelial from luminal epithelial cells. *J Histochem Cytochem*. 1986;34(7):869–81.

Nassar FJ, El Sabban M, Zgheib NK et al. miRNA as potential biomarkers of breast cancer in the Lebanese population and in young women: a pilot study. *PLoS One* 2014; 9: e107566.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Cancer Stat Facts: Female Breast Cancer . <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>

Neault, M., Couteau, F., Bonneau, E., De Guire, V. & Mallette, F.A. Molecular Regulation of Cellular Senescence by MicroRNAs: Implications in Cancer and Age-Related Diseases. *Int Rev Cell Mol Biol* 334, 27-98 (2017).

Nelson AW, Groen AJ, Miller JL, et al. Comprehensive assessment of estrogen receptor beta antibodies in cancer cell line models and tissue reveals critical limitations in reagent specificity. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;440:138–50.

Nematian SE, Mamillapalli R, Kadakia TS, Majidi Zolbin M, Moustafa S, Taylor HS. Systemic Inflammation Induced by microRNAs: Endometriosis-Derived Alterations in Circulating microRNA 125b-5p and Let-7b-5p Regulate Macrophage Cytokine Production. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018 Jan 1;103(1):64-74. doi: 10.1210/jc.2017-01199. PMID: 29040578.

NEVILLE MC. Physiology of lactation. *Clin Perinatol* 1999, 26:253.

Nieuwenhuis MH, Kets CM, Murphy-Ryan M, Yntema HG, Evans DG, Colas C et al. (2014). Cancer risk and genotype-phenotype correlations in PTEN hamartoma tumor syndrome. *Fam Cancer*, 13(1):57–63. doi:10.1007/s10689-013-9674-3 PMID:23934601

Nishijima, N. et al. miR-200/ZEB axis regulates sensitivity to nintedanib in non-small cell lung cancer cells. *International journal of oncology* 48, 937–944, <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3331> (2016).

Nitiss, J.L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature reviews. Cancer* 9, 338-50 (2009).

Norum JH, Andersen K, Sorlie T. Lessons learned from the intrinsic subtypes of breast cancer in the quest for precision therapy. *Br J Surg*. 2014;101(8):925–38.

O'Shaughnessy, J. et al. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 364, 205-14 (2011).

Ozgun A, Karagoz B, Bilgi O et al. MicroRNA-21 as an indicator of aggressive phenotype in breast cancer. *Onkologie* 2013; 36: 115-118.

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:2817–2826

Pan Q, Liu Z, Liao S, Ye L, Lu X, Chen X, Li Z, Li X, Xu YZ, Liu H. Current mechanistic insights into the role of infection in systemic lupus erythematosus. *Biomed Pharmacother*. 2019 Sep;117:109122. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109122. Epub 2019 Jun 18. Review.

Pan X, R. Wang and Z.X. Wang, The potential role of miR451 in cancer diagnosis, prognosis, and therapy, *Mol Cancer Ther* 12 (2013), 1153-62.

Pan X, Wang R, Wang ZX. The potential role of miR-451 in cancer diagnosis, prognosis, and therapy. *Mol Cancer Ther.* 2013;12 (7):1153–1162. doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0802

Pan Y, Wang R, Zhang F, Chen Y, Lv Q, Long G, et al. MicroRNA-130a inhibits cell proliferation, invasion and migration in human breast cancer by targeting the RAB5A. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:384–93.

Pan YZ, Morris ME, Yu AM. MicroRNA-328 negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells. *Mol Pharmacol* 2009;75:1374–9

Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009;27:1160–1167.

Parsons, S.J. & Parsons, J.T. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23, 7906-9 (2004).

Pasculli B, Barbano R, Rendina M, et al. Hsa-miR-210-3p expression in breast cancer and its putative association with worse outcome in patients treated with Docetaxel. *Sci Rep.* 2019;9(1):14913. Published 2019 Oct 17. doi:10.1038/s41598-019-51581-3

Paulsson J, Sjöblom T, Micke P, Pontén F, Landberg G, Heldin CH, et al. Prognostic significance of stromal platelet-derived growth factor  $\beta$ -receptor expression in human breast cancer. *Am J Pathol.* 2009;175(1):334–341. doi: 10.2353/ajpath.2009.081030.

Peltier HJ and Latham GJ (2008) Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 14(5):844–852.

Perou CM, Scrlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406:747–52.

Peters, A. A., Buchanan, G., Ricciardelli, C., Bianco-Miotto, T., Centenera, M. M., Harris, J. M., et al. (2009). Androgen receptor inhibits estrogen receptor- activity and is prognostic in breast cancer. *Cancer Res.* 69, 6131–6140. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0452

Peutz, J. L. A. Very remarkable case of familial polyposis of mucous membrane of intestinal tract and nasopharynx accompanied by peculiar pigmentations of skin and mucous membrane. (Dutch). *Nederl. Maandschr. Geneesk.* 10: 134-146, 1921.

Phillips T, Murray G, Wakamiya K, et al. Development of standard estrogen and progesterone receptor immunohistochemical assays for selection of patients for antihormonal therapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007;15(3):325–31.

Piket E, Zheleznyakova GY, Kular L, Jagodic M. Small non-coding RNAs as important players, biomarkers and therapeutic targets in multiple sclerosis: A comprehensive overview. *J Autoimmun.* 2019 Jul;101:17-25. doi: 10.1016/j.jaut.2019.04.002. Epub 2019 Apr 20. Review.

Pilarski R, Burt R, Kohlman W, Pho L, Shannon KM, Swisher E (2013). Cowden syndrome and the PTEN hamartoma tumor syndrome: systematic review and revised diagnostic criteria. *J Natl Cancer Inst,* 105(21):1607–16. doi:10.1093/jnci/djt277 PMID:24136893

PIÑEROS, M. HERNÁNDEZ, F. Increasing mortality rates of common malignancies in Colombia: an emerging problem. *Cancer.* 101. 2004; 228592.

Plotnikov AN, Schlessinger J, Hubbard SR, Mohammadi M. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell.* 1999;98(5):641–650. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80051-3.

- Pogribny IP, Filkowski JN, Tryndyak VP, Golubov A, Shpyleva SI, Kovalchuk O. Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. *Int J Cancer* 2010;127:1785–94.
- Polytarchou C, Iliopoulos D, Struhl K. An integrated transcriptional regulatory circuit that reinforces the breast cancer stem cell state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 14470-14475.
- Powell E, Shanle E, Brinkman A, et al. Identification of estrogen receptor dimer selective ligands reveals growth-inhibitory effects on cells that co-express ERalpha and ERbeta. *PLoS One*. 2012;7(2):e30993.
- Prasad, V., Gopalan, R. Continued use of MDA-MB-435, a melanoma cell line, as a model for human breast cancer, even in year, 2014. *npj Breast Cancer* 1, 15002 (2015). <https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2015.2>
- Prat A, Lluch A, Turnbull AK, et al. A PAM50-Based Chemoendocrine Score for Hormone Receptor-Positive Breast Cancer with an Intermediate Risk of Relapse. *Clin Cancer Res*. 2017;23(12):3035-3044. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2092
- Proietti CJ, Cenciarini ME, Elizalde PV. Revisiting progesterone receptor (PR) actions in breast cancer: Insights into PR repressive functions. *Steroids*. 2018;133:75-81. doi:10.1016/j.steroids.2017.12.015
- Qi L, Bart J, Tan L, Platteel I, Sluis T, Huitema S, et al. Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma. *BMC Cancer*. 2009;9(1):163.
- Qin Q, et al. Multiple functions of hypoxia-regulated m
- Qin W, Shi Y, Zhao B et al. miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells. *PLoS One* 2010; 5: e9429.
- Rahman N (2014b). Mainstreaming genetic testing of cancer predisposition genes. *Clin Med*, 14(4):436–9. doi:10.7861/clinmedicine.14-4-436 PMID:25099850
- Rat A, Lluch A, Turnbull AK, Dunbier AK, Calvo L, Albanell J, de la Haba-Rodríguez J, Arcusa A, Chacón JI, Sánchez-Rovira P, et al. A PAM50-Based Chemoendocrine Score for Hormone Receptor-Positive Breast Cancer with an Intermediate Risk of Relapse. *Clin Cancer Res*. 2017;23:3035–3044.
- Richards, J.A., Petrel, T.A. and Brueggemeier, R.W. Signaling pathways regulating aromatase and cyclooxygenases in normal and malignant breast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80: 203, 2002.
- Rigoni-Stern, D. Fatti statistici relativi alle malattie cancerose che servono de base alle poche cose dette dal dott. *Gior Servire Progr Pat Terap* 2: 507, 1842.
- Rossouw, J.E. et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 288, 321-33 (2002).
- Rothblat, G. H., and Phillips, M. C. (2010). High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr. Opin. Lipidol.* 21 (3), 229–238. doi: 10.1097/MOL.0b013e328338472d
- Rottenberg, S. et al. Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 12117-22 (2007).
- Rouas R, Fayyad-Kazan H, El Zein N, Lewalle P, Rothé F, Simion A, Akl H, Mourtada M, El Rifai M, Burny A, et al: Human natural Treg microRNA signature: role of microRNA-31 and microRNA-21 in FOXP3 expression. *Eur J Immunol*. 39:1608–1618. 2009.

Rowse, G.J., Ritland, S.R. & Gendler, S.J. Genetic modulation of neu proto-oncogene-induced mammary tumorigenesis. *Cancer research* **58**, 2675-9 (1998).

RUSSO J, HU YF, YANG X, RUSSO IH. Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000;27:17–38.

RUSSO J, RUSSO IH. Development of the human breast. *Maturitas* 49 (2004) 2–15

RUSSO J, RUSSO IH. IN: NEVILLE MC, DANIEL CW, editors. *The mammary gland*. New York, NY: Plenum Publishing Corporation; 1987. p. 67–93.

Sabbah M, Radanyi C, Redeuilh G, Baulieu EE. The 90 kDa heat-shock protein (hsp90) modulates the binding of the oestrogen receptor to its cognate DNA. *Biochem J* 1996 314:1 205-13.

Sadri Nahand J, Moghoofei M, Salmaninejad A, Bahmanpour Z, Karimzadeh M, Nasiri M, Mirzaei HR, Pourhanifeh MH, Bokharaei-Salim F, Mirzaei H, Hamblin MR. Pathogenic role of exosomes and microRNAs in HPV-mediated inflammation and cervical cancer: A review. *Int J Cancer*. 2020 Jan 15;146(2):305-320. doi: 10.1002/ijc.32688. Epub 2019 Oct 31. Review.

Samson, M. et al. Progestin and breast cancer risk: a systematic review. *Breast cancer research and treatment* 155, 3-12 (2016).

San, K., Horita, M., Ganapathy, A., Chinnadurai, G. & Ezekiel, U. R. Deregulated expression of microRNA-200b/c and SUZ12, a Polycomb repressive complex 2 subunit, in chemoresistant colorectal cancer cells. *Genes & cancer* 8, 673–681, <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.152> (2017).

Sánchez-Cid L, et al. MicroRNA-200, associated with metastatic breast cancer, promotes traits of mammary luminal progenitor cells *Oncotarget*. 2017; 8:83384–406. 10.18632/oncotarget.20698

Sánchez-Cid L, Pons M, Lozano JJ, Rubio N, Guerra-Rebollo M, Soriano A, Paris-Coderch L, Segura MF, Fueyo R, Arguimbau J, Zodda E, Bermudo R, Alonso I, Caparrós X, Cascante M, Rafii A, Kang Y, Martínez-Balbás M, Weiss SJ, Blanco J, Muñoz M, Fernández PL, Thomson TM. MicroRNA-200, associated with metastatic breast cancer, promotes traits of mammary luminal progenitor cells. *Oncotarget*. 2017 Sep 7;8(48):83384-83406. doi: 10.18632/oncotarget.20698. PMID: 29137351; PMCID: PMC5663523.

Sánchez-Cid. et al. MicroRNA-200, associated with metastatic breast cancer, promotes traits of mammary luminal progenitor cells. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 48).

Sandhu R, Rein J, D'Arcy M et al. Overexpression of miR-146a in basal-like breast cancer cells confers enhanced tumorigenic potential in association with altered p53 status. *Carcinogenesis* 2014; 35: 2567-2575.

Schrader KA, Masciari S, Boyd N, Salamanca C, Senz J, Saunders DN et al.; kConFab (2011). Germline mutations in CDH1 are infrequent in women with early-onset or familial lobular breast cancers. *J Med Genet*, 48(1):64–8. doi:[10.1136/jmg.2010.079814](https://doi.org/10.1136/jmg.2010.079814) PMID:[20921021](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20921021/)

Sellitto A, D'Agostino Y, Alexandrova E, et al. Insights into the Role of Estrogen Receptor  $\beta$  in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1477. Published 2020 Jun 5. doi:10.3390/cancers12061477

Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y et al. (2012). The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*, 486(7403):395–9. PMID:22495314

- Shah T.A., Guraya S.S. Breast cancer screening programs: Review of merits, demerits, and recent recommendations practiced across the world. *J. Microsc. Ultrastruct.* 2017;5:59–69. doi: 10.1016/j.jmau.2016.10.002.
- Shen S, Zhou Y, Xu Y, Zhang B, Duan X, Huang R, et al. A multicentre randomised trial comparing ultrasound vs mammography for screening breast cancer in high-risk Chinese women. *Br J Cancer.* 2015;112:998–1004.
- Shen, L., Li, J., Xu, L., Ma, J., Li, H., Xiao, X., et al. (2012). miR-497 induces apoptosis of breast cancer cells by targeting Bcl-w. *Exp Ther Med* 3, 475–480.
- Shibuya M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti-and pro-angiogenic therapies. *Genes Cancer.* 2011;2(12):1097–1105. doi: 10.1177/1947601911423031.
- Shimono Y, Zabala M, Cho RW et al. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell* 2009; 138: 592-603.
- Shou Y, Ma YH, Hu L, Xu P, Zhang WB, Gao Y, Zhang BM. [Exosomes and their roles in diabetes mellitus and its complications: from pathogenic, diagnostic and therapeutical perspectives]. *Sheng Li Xue Bao.* 2019 Dec 25;71(6):917-934. Review. Chinese.
- Shufelt CL, Braunstein GD. Testosterone and the breast. *Menopause Int* 2008;14:117–22.
- Shufelt CL, Braunstein GD. Testosterone and the breast. *Menopause Int* 2008;14:117–22.
- Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 2014;64:9–29. doi: 10.3322/caac.21208.
- Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Nov 4;101(21):1446-52. doi: 10.1093/jnci/djp335. Epub 2009 Oct 8. PMID: 19815849; PMCID: PMC2782246.
- Sochor M, Basova P, Pesta M et al. Oncogenic microRNAs: miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum. *BMC Cancer* 2014; 14: 448.
- SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ONCOLOGÍA MÉDICA (SEOM). Información sobre el cáncer: Cáncer de mama, estadificación. 08 de marzo de 2017 Disponible en <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-mama?start=9>
- Somyajit K, Subramanya S, Nagaraju G. RAD51C: a novel cancer susceptibility gene is linked to Fanconi anemia and breast cancer. *Carcinogenesis.* 2010;31(12):2031-2038. doi:10.1093/carcin/bgq210
- Song B, Wang C, Liu J, Wang X, Lv L, Wei L, et al. MicroRNA-21 regulates breast cancer invasion partly by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;29(1):29.
- Song H, Dicks E, Ramus SJ, et al. Contribution of germline mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D genes to ovarian cancer in the population. *J Clin Oncol* 2015 ; 33 : 2901–2907.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869–74.
- Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, Geyer CE Jr, Dees EC, Goetz MP, Olson JA Jr, Lively T, Badve SS, Saphner TJ, Wagner LI, Whelan TJ, Ellis MJ, Paik S, Wood WC, Ravdin PM, Keane MM, Gomez Moreno HL, Reddy PS, Goggins TF, Mayer IA, Brufsky AM, Toppmeyer DL, Kaklamani VG, Berenberg JL,

Abrams J, Sledge GW Jr. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379:111–121.

Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC et al.; Oslo Breast Cancer Consortium (OSBREAC) (2012). The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*, 486(7403):400–4. PMID:[22722201](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22722201/)

Stolfi, C., De Simone, V., Colantoni, A., Franze, E., Ribichini, E., Fantini, M.C., et al. (2014). A functional role for Smad7 in sustaining colon cancer cell growth and survival. *Cell Death Dis* 5, e1073.

Sun F, Fu H, Liu Q, Tie Y, Zhu J, Xing R, Sun Z, Zheng X (2008) Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. *FEBS Lett* 582:1564–1568

Sun H, Ding C, Zhang H, Gao J. Let-7 miRNAs sensitize breast cancer stem cells to radiation-induced repression through inhibition of the cyclin D1/Akt1/Wnt1 signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2016 Oct;14(4):3285-92. doi: 10.3892/mmr.2016.5656. Epub 2016 Aug 19. PMID: 27574028.

Sun Y, Wang M, Lin G et al. Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. *PLoS One* 2012; 7: e47003

Swain SM, Jeong J-H, Geyer CE Jr, et al. Longer therapy, iatrogenic amenorrhea, and survival in early breast cancer. *N Engl J Med* 2010;362:2053–65. [

Tacar, O., Sriamornsak, P. & Dass, C.R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol* 65, 157-70 (2013).

Tanaka, S. et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition and down-regulation of miR-200c and miR-141 in oxaliplatinresistant colorectal cancer cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 38, 435–440, <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00695> (2015).

Tang J, Ahmad A, Sarkar FH. The role of microRNAs in breast cancer migration, invasion and metastasis. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 13414-13437

Tang, Y., Wang, Y., Kiani, M.F. & Wang, B. Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. *Clinical breast cancer* 16, 335-343 (2016).

TaqMan® Advanced miRNA Assays, User Guide. ThermoFisher Scientific [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/100027897\\_TaqManAdv\\_miRNA\\_Assays\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/100027897_TaqManAdv_miRNA_Assays_UG.pdf)

Thammaiah, C.K. & Jayaram, S. Role of let-7 family microRNA in breast cancer. *Noncoding RNA Res* 1, 77-82 (2016).

Thomas G, et al. A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1) *Nat. Genet.* 2009;41:579–584.

Tomiguchi M, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Goto-Yamaguchi L, Fujiki Y, Fujiwara S, et al. La expresión de la proteína del receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos se asocia con el pronóstico en el cáncer de mama primario negativo para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano / receptor de estrógeno positivo. *Cancer Sci*. 2016; 107 (4): 491–498. doi: 10.1111 / cas.12897.

Toyama T, et al. High expression of microRNA-210 is an independent factor indicating a poor prognosis in Japanese triple-negative breast cancer patients. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2012;42:256–263. doi: 10.1093/jjco/hys001.

Trichopoulou, A., and Lagiou, P. Worldwide patterns of dietary lipids intake and health implications. *Am J Clin Nutr* 66 (Suppl. 4): S961, 1997.

Tsui, N. B., Ng, E. K., and Lo, Y. M. (2002). Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin. Chem.* 48 (10), 1647–1653.

- Uhr K, Prager-van der Smissen WJC, Heine AAJ, Ozturk B, van Jaarsveld MTM, Borsma AWM, Jager A, Wiemer EAC, Smid M, Foekens JA, Martens JWM. MicroRNAs as possible indicators of drug sensitivity in breast cancer cell lines. *PLoS One*. 2019 May 7;14(5):e0216400. doi: 10.1371/journal.pone.0216400. PMID: 31063487; PMCID: PMC6504094.
- United Kingdom Office for National Statistics . Cancer Survival in England: Patients Diagnosed 2007–2011 and Followed Up to 2012. United Kingdom Office for National Statistics; Newport, UK: 2013.
- Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, et al. Genetic and environmental effects on complex traits in mice. *Genetics*. 2006;174(2):959-984. doi:10.1534/genetics.106.060004
- VALDÉS V, PÉREZ A, LABBOK M: Fisiología de la glándula mamaria. En: Lactancia para la Madre y el Niño, Santiago Mediterraneo, (ed) 1994, p 21.
- van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415:530–536.
- Van Nguyen A, Pollard JW. Colony stimulating factor-1 is required to recruit macrophages into the mammary gland to facilitate mammary ductal outgrowth. *Dev Biol*. 2002 Jul 1;247(1):11-25. doi: 10.1006/dbio.2002.0669. PMID: 12074549.
- Varga Z, Noske A. Impact of Modified 2013 ASCO/CAP Guidelines on HER2 Testing in Breast Cancer. One Year Experience. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140652.
- Vasiliou SK, Diamandis EP. Androgen receptor: A promising therapeutic target in breast cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2019;56(3):200-223. doi:10.1080/10408363.2019.1575643
- Vassilakopoulou M, Parisi F, Siddiqui S, et al. Preanalytical variables and phosphoepitope expression in FFPE tissue: quantitative epitope assessment after variable cold ischemic time. *Lab Invest*. 2015;95(3):334–41.
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007; 318: 1931-1934.
- Vera-Badillo, F. E., Templeton, A. J., de Gouveia, P., Diaz-Padilla, I., Bedard, P. L., Al-Mubarak, M., et al. (2014). Androgen receptor expression and outcomes in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *JNCI J. Natl. Cancer Inst*. 106, djt319–djt319. doi: 10.1093/jnci/djt319
- Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., and Remaley, A. T. (2014). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol*. 17 (1), 423–433. doi: 10.1038/ncb3074
- Voinnet O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet*. 2005 Mar;6(3):206-20. Review.
- von Minckwitz, G. Docetaxel/anthracycline combinations for breast cancer treatment. *Expert opinion on pharmacotherapy* 8, 485-95 (2007).
- Wakeling, A.E. Similarities and distinctions in the mode of action of different classes of antioestrogens. *Endocrine-related cancer* 7, 17-28 (2000).
- Wang H, Tan Z, Hu H, et al. microRNA-21 promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting LZTFL1. *BMC Cancer*. 2019;19(1):738. Published 2019 Jul 27. doi:10.1186/s12885-019-5951-3

Wang J, et al. Elevated expression of miR-210 predicts poor survival of cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9:e89223. doi: 10.1371/journal.pone.0089223. miR-210 in cancer. *J Exp. Clin. Cancer Res*. 2014;33:50. doi: 10.1186/1756-9966-33-50,.

Wang N, Zhang CQ, He JH, Duan XF, Wang YY, Ji X, et al. miR21 down-regulation suppresses cell growth, invasion and induces cell apoptosis by targeting FASL, TIMP3, and RECK genes in esophageal carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2013;58(7):1863–70.

Wang T, Huang B, Guo R, Ma J, Peng C, Zu X, Tang H, Lei X. A let-7b binding site SNP in the 3'-UTR of the Bcl-xL gene enhances resistance to 5-fluorouracil and doxorubicin in breast cancer cells. *Oncol Lett*. 2015 Apr;9(4):1907-1911. doi: 10.3892/ol.2015.2938. Epub 2015 Feb 6. PMID: 25789066; PMCID: PMC4356428.

Wang W, Liu Y, Guo J, et al. miR-100 maintains phenotype of tumor-associated macrophages by targeting mTOR to promote tumor metastasis via Stat5a/IL-1ra pathway in mouse breast cancer. *Oncogenesis*. 2018;7(12):97. Published 2018 Dec 19. doi:10.1038/s41389-018-0106-y

Wang W, Zhang L, Wang Y, et al. Involvement of miR-451 in resistance to paclitaxel by regulating YWHAZ in breast cancer. *Cell Death Dis*. 2017;8(10):e3071. Published 2017 Oct 5. doi:10.1038/cddis.2017.460

Wang X, Reyes ME, Zhang D, Funakoshi Y, Trape AP, Gong Y, et al. EGFR signaling promotes inflammation and cancer stem-like activity in inflammatory breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(40):67904–67917.

Wang X.C., L.L. Tian, X.Y. Jiang, Y.Y. Wang, D.G. Li, Y. She, J.H. Chang and A.M. Meng, The expression and function of miRNA-451 in non-small cell lung cancer, *Cancer Lett* 311 (2011), 203-9.

Wang Z, Xu L, Hu Y, Huang Y, Zhang Y, Zheng X, Wang S, Wang Y, Yu Y, Zhang M, Yuan K, Min W. miRNA let-7b modulates macrophage polarization and enhances tumor-associated macrophages to promote angiogenesis and mobility in prostate cancer. *Sci Rep*. 2016 May 9;6:25602. doi: 10.1038/srep25602. PMID: 27157642; PMCID: PMC4860600.

Wang ZX, Lu BB, Wang H, Cheng ZX, Yin YM. MicroRNA-21 modulates chemosensitivity of breast cancer cells to doxorubicin by targeting PTEN. *Arch Med Res*. 2011;42(4):281–90.

Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D., and Galas, D. J. (2010). Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 38 (20), 7248–7259. doi: 10.1093/nar/gkq601

WangZX, Lu BB, WangH, Cheng ZX, Yin YM. MicroRNA-21 modulates chemosensitivity of breast cancer cells to doxorubicin by targeting PTEN. *Arch Med Res* 2011;42:281–90.

Weber B, Stresemann C, Brueckner B, Lyko F. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle* 2007; 6: 1001-1005

Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer. *Molecular Oncology*. 2010;4:192–208.

Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer. *Molecular Oncology*. 2010;4:192–208.

Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG (2008). CHEK2\*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analysis of 26,000 patient cases and 27,000 controls. *J Clin Oncol*, 26(4):542–8. doi:10.1200/JCO.2007.12.5922 PMID:18172190

- Weischer M, Nordestgaard BG, Pharoah P, Bolla MK, Nevanlinna H, Van't Veer LJ et al. (2012). CHEK2\*1100delC heterozygosity in women with breast cancer associated with early death, breast cancer-specific death, and increased risk of a second breast cancer. *J Clin Oncol*, 30(35):4308–16. doi:10.1200/JCO.2012.42.7336 PMID:23109706
- Wickramasinghe NS, Manavalan TT, Dougherty SM, Riggs KA, Li Y, Klinge CM. Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(8):2584–95.
- Wise R, Zolkiewska A. Metalloprotease-dependent activation of EGFR modulates CD44+/CD24- populations in triple negative breast cancer cells through the MEK/ERK pathway. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;166(2):421–423. doi: 10.1007/s10549-017-4440-0.
- Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(2):241–56.
- Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(2):241–56.
- Wu Z, Huang X, Huang X, et al. The inhibitory role of Mir-29 in growth of breast cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2013;32(1):98.
- Wu Z, Huang X, Huang X, et al. The inhibitory role of Mir-29 in growth of breast cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2013;32(1):98.
- Wu, A.H., Pike, M.C. and Stram, D.O. Meta-analysis: dietary fat intake, serum estrogen levels, and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 91: 529, 1999
- Xie L, Chen X, Wang L, Qian X, Wang T, Wei J, Yu L, Ding Y, Zhang C, Liu B. Cell-free miRNAs may indicate diagnosis and docetaxel sensitivity of tumor cells in malignant effusions. *BMC Cancer*. 2010 Oct 28;10:591. doi: 10.1186/1471-2407-10-591. PMID: 21029414; PMCID: PMC2988750.
- Xie X, Hu Y, Xu L, Fu Y, Tu J, Zhao H, Zhang S, Hong R, Gu X. The role of miR-125b-mitochondria-caspase-3 pathway in doxorubicin resistance and therapy in human breast cancer. *Tumour Biol*. 2015 Sep;36(9):7185-94. doi: 10.1007/s13277-015-3438-7. Epub 2015 Apr 17. PMID: 25894378.
- Yang X, Hu Q, Hu LX, Lin XR, Liu JQ, Lin X, Dinglin XX, Zeng JY, Hu H, Luo ML, Yao HR. miR-200b regulates epithelial-mesenchymal transition of chemo-resistant breast cancer cells by targeting FN1. *Discov Med*. 2017 Sep;24(131):75-85. PMID: 28972876.
- Yang Y, Chaerkady R, Beer MA, Mendell JT, Pandey A. Identification of miR-21 targets in breast cancer cells using a quantitative proteomic approach. *Proteomics*. 2009;9(5):1374–84.
- Yang, X. et al. Inhibition of c-Myc by let-7b mimic reverses multidrug resistance in gastric cancer cells. *Oncol Rep* 33, 1723-30 (2015).
- Yao, B., Lan, B. L., Chen, Y. C., Chang, L. J., and Chan, E. K. L. (2012). Defining a new role of GW182 in maintaining miRNA stability. *Embo Rep*. 13 (12), 1102–1108. doi: 10.1038/embor.2012.160
- Yardley, D.A. et al. Everolimus plus exemestane in postmenopausal patients with HR(+) breast cancer: BOLERO-2 final progression-free survival analysis. *Adv Ther* 30, 870-84 (2013).

Ye N, Wang B, Quan ZF, Pan HB, Zhang ML, Yan QG. The research progress of the interactions between miRNA and Wnt/beta-catenin signaling pathway in breast cancer of human and mice. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(3):1075-9. Review.

Yu F, Deng H, Yao H, Liu Q, Su F, Song E. Mir-30 reduction maintains selfrenewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells. *Oncogene*. 2010;29:4194–204.

YU F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 2007; 131: 1109–1123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.054>

Yu J, Lu Y, Cui D, Li E, Zhu Y, Zhao Y, Zhao F, Xia S. miR-200b suppresses cell proliferation, migration and enhances chemosensitivity in prostate cancer by regulating Bmi-1. *Oncol Rep*. 2014 Feb;31(2):910-8. doi: 10.3892/or.2013.2897. Epub 2013 Dec 5. PMID: 24317363.

Yu X, Luo A, Liu Y, Wang S, Li Y, Shi W, Liu Z, Qu X. MiR-214 increases the sensitivity of breast cancer cells to tamoxifen and fulvestrant through inhibition of autophagy. *Mol Cancer*. 2015 Dec 15;14:208. doi: 10.1186/s12943-015-0480-4. PMID: 26666173; PMCID: PMC4678692.

Zhang HD, Jiang LH, Sun DW, Li J, Ji ZL. The role of miR-130a in cancer. *Breast Cancer*. 2017;24:521–527.

Zhang J, Su B, Gong C, Xi Q, Chao T. miR-214 promotes apoptosis and sensitizes breast cancer cells to doxorubicin by targeting the RFWD2-p53 cascade. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Sep 9;478(1):337-342. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.054. Epub 2016 Jul 12. PMID: 27422604.

Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9136–41.

Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol* 2007;171:728-38.

Zhang W, Liu J, Wang G. The role of microRNAs in human breast cancer progression. *Tumour Biol* 2014; 35: 6235-6244.

Zhang Y, Yun Z, Gong L, Qu H, Duan X, Jiang Y, Zhu H. Comparison of miRNA Evolution and Function in Plants and Animals. *Microna*. 2018;7(1):4-10. doi: 10.2174/2211536607666180126163031.

Zhang Y, Zhao Z, Li S, et al. Inhibition of miR-214 attenuates the migration and invasion of triple-negative breast cancer cells. *Mol Med Rep*. 2019;19(5):4035-4042. doi:10.3892/mmr.2019.10112

Zhang YJ, Liu XC, Du J, Zhang YJ. MiR-152 regulates metastases of non-small cell lung cancer cells by targeting neuropilin-1. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(11):14235–40.

Zhang ZJ, Ma SL. miRNAs in breast cancer tumorigenesis (Review). *Oncol Rep*. 2012 Apr;27(4):903-10. doi: 10.3892/or.2011.1611. Epub 2011 Dec 23. PMID: 22200848; PMCID: PMC3583555.

Zhao FL, Dou YC, Wang XF et al. Serum microRNA-195 is down-regulated in breast cancer: a potential marker for the diagnosis of breast cancer. *Mol Biol Rep* 2014; 41: 5913-5922.

Zhao G, Guo J, Li D, Jia C, Yin W, Sun R, Lv Z, Cong X. MicroRNA-34a suppresses cell proliferation by targeting LMTK3 in human breast cancer mcf-7 cell line. *DNA Cell Biol*. 2013 Dec;32(12):699-707. doi: 10.1089/dna.2013.2130. Epub 2013 Sep 19. PMID: 24050776; PMCID: PMC3864372.

Zhao, Y. F. et al. A miRNA-200c/cathepsin L feedback loop determines paclitaxel resistance in human lung cancer A549 cells in vitro through regulating epithelial-mesenchymal transition. *Acta pharmacologica Sinica* 39, 1034–1047, <https://doi.org/10.1038/aps.2017.164> (2018).

Zheng SZ, Sun P, Wang JP, Liu Y, Gong W, Liu J. MiR-34a overexpression enhances the inhibitory effect of doxorubicin on HepG2 cells. *World J Gastroenterol*. 2019 Jun 14;25(22):2752-2762. doi: 10.3748/wjg.v25.i22.2752. PMID: 31235998; PMCID: PMC6580351.

Zhou J, Wulfschlegel J, Zhang H, Gu P, Yang Y, Deng J, Margolick JB, Liotta LA, Petricoin E 3rd, Zhang Y. Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 9;104(41):16158-63. doi: 10.1073/pnas.0702596104. Epub 2007 Oct 2. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 4;104(49):19655. PMID: 17911267; PMCID: PMC2042178.

Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*. 2007;282(19):14328–36.

Zhu Y, Yu F, Jiao Y, Feng J, Tang W, Yao H, et al. Reduced miR-128 in breast tumor-initiating cells induces chemotherapeutic resistance via Bmi-1 and ABCC5. *Clin Cancer Res* 2011;17:7105–15.

Zou F. QTL mapping in intercross and backcross populations. *Methods Mol Biol*. 2009;573:157-73. doi: 10.1007/978-1-60761-247-6\_9. PMID: 19763927.

## **APENDICE**

# 1. ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura de un receptor tirosin-quinasa (RTK). .....	20
Figura 2. Patrones de expresión génica de 85 muestras experimentales de tumor y tejido normal de glándula mamaria.....	25
Figura 3. Cáncer familiar de acuerdo a los genes de susceptibilidad, la mayor parte de los casos familiares no tiene explicación.....	31
Figura 4. Biogénesis de los miRNAs.....	51
Figura 5. Regulación positiva de miR-21 en cáncer. (Motamedi, et al. Breast Cancer. 2019). .....	58
Figura 6. Relación entre los objetivos específicos planteados en este trabajo de tesis doctoral.....	72
Figura 7. Esquema de la realización de aloinjerto de tumores generados en la cohorte F1BX1 en receptores F1.....	77
Figura 8. Esquema de la estrategia seguida para generar los ratones F1BX1. Todas las hembras del backcross fueron portadoras del transgén.....	78
Figura 9. Cálculo de la velocidad de crecimiento tumoral en las 3 etapas de los tumores tratados y definición de los tipos de respuesta.....	82
Figura 10. Fundamento del método de BCA que se ha utilizado para la cuantificación de proteínas.....	89
Figura 11. TaqMan® Advanced miRNA Assays (ThermoFisher) .....	94
Figura 12. Sistema BioMark™HD (Fluidigm).....	95
Figura 13. Placa de 96 x 96 micropocillos de Fluidigm 96.96 Dynamic Array™ .....	96

## 2. ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. MiRNAs desregulados en cáncer de mama. Se han dividido en 2 grupos, según estén sobrerregulados o subregulados. CM, cáncer de mama. ....	56
Tabla 2. Reacción de poliadenilación. (A) Mix de poliadenilación; (B) Programa de reacción de poliadenilación.....	90
Tabla 3. Reacción de ligación. (A) Mix de ligación; (B) Componentes de la reacción de ligación. ....	91
Tabla 4. Transcripción reversa (A) Mix de RT (B) Programa RT. ....	92
Tabla 5. Reacción de Pre-amplificación (A) Mix de Pre-amplificación (B) Programa Pre-amplification.....	92
Tabla 6. Lista de sondas TaqMan Advanced empleadas para la cuantificación de los niveles de expresión de los miRNAs de interés. ....	94
Tabla 7. Características de las líneas celulares humanas de cáncer de mama utilizadas. ....	97
Tabla 8. Concentraciones celulares usadas para los ensayos de trasfección. ....	99
Tabla 9. Condiciones de transfección y tipos de placa.....	99
Tabla 10. Concentración de doxorrubicina usada para el tratamiento de cada línea celular.....	100

### 3. ABREVIATURAS

7AAD	7-amino actinomicina D
ABC	Dominio de unión a ATP (ATP binding cassette)
ATP	Adenosín trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
cDNA	DNA copia
cM	Centimorgans
CORVI	Cambio observado respecto a la velocidad de crecimiento inicial
Cr.	Cromosoma
CR2	Dominio rico en cisteínas 2 de la proteína ERBB2/NEU
Ct	Ciclo límite (threshold cycle)
CYP	Citocromo P450
Cys	Cisteína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EMT	Transición epitelio-mesénquima
ER	Receptor de estrógenos
F1	Primera generación filial. En este caso nos referimos a la obtenida del cruce entre C57BL/6 y FVB
F1BX1	Primera cohorte de ratones generada mediante retrocruce
F1BX2	Segunda cohorte de ratones generada mediante retrocruce
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GWAS	Estudio de asociación de genoma completo
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IGF	Factor de crecimiento de tipo insulina
IL	Interleucina
InResQTL	QTL intrínseco de respuesta a la quimioterapia
InTumQTL	QTL asociado a un fenotipo intermedio tumoral
KC	Quimiocina derivada de queratinocitos

LTR	Repetición terminal larga (Long Terminal Repeat)
MDR	Resistencia a múltiples fármacos (Multidrug Resistance)
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno (mitogen-activated protein kinase)
MCP	Proteína quimiotáctica de monocitos
MET	Transición mesénquima-epitelio
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
miR-QTL	QTL asociado a la miRNA
MMTV	Virus de tumor mamario de ratón
mRNA	RNA mensajero
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
P-gp	Glicoproteína P
PIP3	Fosfatidil-inositol 3,4,5 trifosfato
PLGF	Factor de crecimiento placentario
PR	Receptor de progesterona
QPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
QTL	Locus de rasgo de herencia cuantitativa
RDT	Respuesta durante el tratamiento
ResQTL	QTL de respuesta a la quimioterapia
RI	Rango intercuartílico
RNA	Ácido ribonucleico
RQ	Cantidad relativa (Relative Quantity)
RRT	Respuesta al retirar el tratamiento
sALK	forma soluble de la quinasa similar al recetor de activina
Sca	Antígeno de células madre (Stem cell antigen)
SDF	Factor derivado del estroma
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNP	Polimorfismo de un único nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism)
SPF	Libre de patógenos específicos (Specific Pathogen Free)
TAM	Macrófago asociado a tumor
TGF	Factor de crecimiento transformante
TM	Transmembrana
TNF	Factor de necrosis tumoral

tQTL	QTL asociado a un patofenotipo tumoral
tsQTL	QTL asociado a la señalización tumoral
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular



