



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA – CSIC**

**Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL AGONISTA DOPAMINÉRGICO  
CABERGOLINA EN LA QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER DE  
MAMA**

**NATALIA GARCÍA SANCHA**

**Salamanca, 2023**



D. JESÚS PÉREZ LOSADA, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca y D. ADRIÁN BLANCO GÓMEZ, Investigador Postdoctoral en el CRUK Manchester Institute,

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo titulado: **ESTUDIO DEL EFECTO DEL AGONISTA DOPAMINÉRGICO CABERGOLINA EN LA QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER DE MAMA**, que presenta la doctoranda **Dña. Natalia García Sancha**, ha sido realizado bajo sus direcciones en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca, y reúne, a sus juicios, las condiciones de originalidad y rigor científico necesarias para ser presentado ante el correspondiente Tribunal y optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a 28 de abril de 2023.



Fdo.: Dr. D. Jesús Pérez Losada



Fdo.: Dr. D. Adrián Blanco Gómez



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

Durante el transcurso de esta tesis doctoral, he sido beneficiaria de una ayuda para la Formación de Profesorado Universitario (FPU), financiada por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU17/00192).



Artículos científicos publicados en el transcurso de esta Tesis Doctoral:

- Cañueto J, Corchete-Sánchez LA, Schmults CD, **García-Sancha N**, Corchado-Cobos R, Mendiburu-Eliçabe M, Santos-Briz Á, Cardeñoso-Álvarez E, Pérez-Losada J, Román-Curto C, Ruiz ES. TMeB score may improve risk stratification of high-risk cutaneous squamous cell carcinoma and guide management of patients: A pilot study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2023 Apr;37(4):e474-e478. doi: 10.1111/jdv.18775. Epub 2022 Dec 3. PMID: 36424906.
- **García-Sancha N**, Corchado-Cobos R, Gómez-Vecino A, Jiménez-Navas A, Pérez-Baena MJ, Blanco-Gómez A, Holgado-Madruga M, Mao JH, Cañueto J, Castillo-Lluva S, Mendiburu-Eliçabe M, Pérez-Losada J. Evolutionary Origins of Metabolic Reprogramming in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 11;23(20):12063. doi: 10.3390/ijms232012063. PMID: 36292921; PMCID: PMC9603151.
- Chang H, Yang X, Moore J, Liu XP, Jen KY, Snijders AM, Ma L, Chou W, Corchado-Cobos R, **García-Sancha N**, Mendiburu-Eliçabe M, Pérez-Losada J, Barcellos-Hoff MH, Mao JH. From Mouse to Human: Cellular Morphometric Subtype Learned From Mouse Mammary Tumors Provides Prognostic Value in Human Breast Cancer. *Front Oncol*. 2022 Feb 11;11:819565. doi: 10.3389/fonc.2021.819565. PMID: 35242697; PMCID: PMC8886672.
- Corchado-Cobos R, **García-Sancha N**, Mendiburu-Eliçabe M, Gómez-Vecino A, Jiménez-Navas A, Pérez-Baena MJ, Holgado-Madruga M, Mao JH, Cañueto J, Castillo-Lluva S, Pérez-Losada J. Pathophysiological Integration of Metabolic Reprogramming in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Jan 10;14(2):322. doi: 10.3390/cancers14020322. PMID: 35053485; PMCID: PMC8773662.
- Conde-Ferreirós A, Corchete LA, Puebla-Tornero L, Corchado-Cobos R, **García-Sancha N**, Román-Curto C, Cañueto J. Definition of prognostic subgroups in the T3 stage of the eighth edition of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous squamous cell carcinoma: Tentative T3 stage subclassification. *J Am Acad Dermatol*. 2021 Nov;85(5):1168-1177. doi: 10.1016/j.jaad.2020.03.088. Epub 2020 Apr 9. PMID: 32278798.
- **García-Sancha N**, Corchado-Cobos R, Bellido-Hernández L, Román-Curto C, Cardeñoso-Álvarez E, Pérez-Losada J, Orfao A, Cañueto J. Overcoming Resistance to Immunotherapy in Advanced Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 13;13(20):5134. doi: 10.3390/cancers13205134. PMID: 34680282; PMCID: PMC8533861.
- Becerril S, Corchado-Cobos R, **García-Sancha N**, Revelles L, Revilla D, Ugalde T, Román-Curto C, Pérez-Losada J, Cañueto J. Viruses and Skin Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 May 20;22(10):5399. doi: 10.3390/ijms22105399. PMID: 34065594; PMCID: PMC8161099.
- Puebla-Tornero L, Corchete-Sánchez LA, Conde-Ferreirós A, **García-Sancha N**, Corchado-Cobos R, Román-Curto C, Cañueto J. Performance of Salamanca refinement of the T3-AJCC8 versus the Brigham and Women's Hospital and Tübingen

alternative staging systems for high-risk cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2021 Apr;84(4):938-945. doi: 10.1016/j.jaad.2020.12.020. Epub 2021 Jan 9. PMID: 33333151.

- Blanco-Gómez A, Hontecillas-Prieto L, Corchado-Cobos R, **García-Sancha N**, Salvador N, Castellanos-Martín A, Sáez-Freire MDM, Mendiburu-Eliçabe M, Alonso-López D, De Las Rivas J, Lorente M, García-Casas A, Del Carmen S, Abad-Hernández MDM, Cruz-Hernández JJ, Rodríguez-Sánchez CA, Claros-Ampuero J, García-Cenador B, García-Criado J, Orimo A, Gridley T, Pérez-Losada J, Castillo-Lluva S. Stromal SNAI2 Is Required for ERBB2 Breast Cancer Progression. *Cancer Res.* 2020 Dec 1;80(23):5216-5230. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0278. Epub 2020 Oct 6. PMID: 33023950; PMCID: PMC7718390.
- Corchado-Cobos R, **García-Sancha N**, González-Sarmiento R, Pérez-Losada J, Cañueto J. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: From Biology to Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020 Apr 22;21(8):2956. doi: 10.3390/ijms21082956. PMID: 32331425; PMCID: PMC7216042.
- **García-Sancha N**, Corchado-Cobos R, Pérez-Losada J, Cañueto J. MicroRNA Dysregulation in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2019 May 2;20(9):2181. doi: 10.3390/ijms20092181. PMID: 31052530; PMCID: PMC6540078.

*“What we know is a drop,  
what we do not know is an ocean”*

*Isaac Newton*

*A mi familia*



<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. Epidemiología del cáncer de mama.....	3
2. Factores de riesgo del cáncer de mama .....	4
2.1. Factores genéticos .....	4
2.2. Factores demográficos y ambientales .....	6
2.2.1. Factores demográficos.....	6
2.2.2. Antecedentes familiares y personales.....	8
2.2.3. Factores hormonales.....	10
2.2.4. Historia reproductiva.....	12
2.2.5. Estilo de vida.....	15
3. Clasificación del cáncer de mama.....	18
3.1. Clasificación clínico-patológica.....	19
3.2. Clasificación molecular.....	20
<b>4. Desarrollo y estructura de la glándula mamaria.....</b>	<b>21</b>
4.1. Desarrollo de la glándula mamaria.....	21
4.2. Involución postlactancia de la glándula mamaria .....	24
4.2.1. Fase reversible de la involución postlactancia .....	24
4.2.2. Fase irreversible de la involución postlactancia.....	25
4.3. Estructura celular de la glándula mamaria .....	27
<b>5. Dopamina y agonistas dopaminérgicos .....</b>	<b>29</b>
5.1. Síntesis, mecanismo de acción y funciones de la dopamina .....	29
5.1.1. Síntesis y metabolismo de la dopamina .....	30
5.1.2. Mecanismos de acción de la dopamina .....	30
5.1.3. Funciones de la dopamina.....	32
5.2. Enfermedades relacionadas con la dopamina.....	33
5.3. Desarrollo y función de los agonistas dopaminérgicos .....	34
5.4. Cabergolina .....	35
<b>6. Análogos de la somatostatina .....</b>	<b>36</b>
<b>7. Prevención del cáncer de mama.....</b>	<b>37</b>
7.1. Quimioprevención actual del cáncer de mama.....	37
7.2. Herramientas para la estimación del riesgo de cáncer de mama .....	39
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....(suprimido)</b>	
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
<b>1. Modelos experimentales <i>in vivo</i>.....</b>	<b>51</b>

## Índice

1.1. Modelos de ratón de cáncer de mama .....	51
1.1.1. Modelo K14-Cre; <i>Brca1<sup>fl/fl</sup></i> ; <i>P53<sup>fl/fl</sup></i> .....	51
1.1.2. Modelo RFP; K14-Cre; <i>Brca1<sup>fl/fl</sup></i> ; <i>P53<sup>fl/fl</sup></i> .....	51
1.2. Grupos de estudio .....	52
1.3. Administración del fármaco .....	55
<b>2. Evaluación de la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama .....</b>	<b>56</b>
<b>3. Obtención y procesamiento de las muestras .....</b>	<b>58</b>
3.1. Necropsia y extracción de los tejidos .....	58
3.2. Procesamiento de los tejidos .....	58
3.3. Obtención de organoides derivados de mama de ratón .....	59
<b>4. Protocolos generales de los estudios <i>in vivo</i> .....</b>	<b>60</b>
4.1. Extracción de DNA de los tejidos .....	60
4.2. Extracción de RNA de los tejidos .....	61
4.3. Extracción de proteínas de los tejidos .....	62
4.4. Cuantificación de la concentración, pureza e integridad de los ácidos nucleicos .....	62
4.5. Cuantificación de la concentración de proteínas .....	63
<b>5. Protocolos específicos de los estudios <i>in vivo</i> .....</b>	<b>63</b>
5.1. Genotipado de los ratones .....	63
5.2. Protocolos para la detección de cambios histopatológicos .....	65
5.2.1. Tinción hematoxilina-eosina .....	65
5.2.2. Cuantificación del área de pared ductal y del área de tejido adiposo .....	66
5.2.3. Inmunohistoquímica frente a la caspasa-3 .....	68
5.2.4. Inmunohistoquímica frente al Ki-67 .....	68
5.2.5. Cuantificación de las células positivas para caspasa-3 y Ki-67 .....	69
5.3. Cuantificación del alelo <i>P53</i> recombinado mediante PCR cuantitativa .....	70
5.4. Disociación de las mamas y evaluación de las subpoblaciones epiteliales de la glándula mamaria mediante citometría de flujo .....	72
5.5. Determinación de los niveles de proteínas mediante <i>multiplex bead array</i> (Luminex®) .....	74
5.6. Cuantificación de la expresión de los receptores de la dopamina mediante PCR cuantitativa .....	77
5.7. Construcción de librerías y secuenciación masiva del RNA .....	78
<b>6. Modelo experimental <i>in vitro</i> .....</b>	<b>79</b>
6.1. Línea celular .....	79
6.2. Condiciones de cultivo, mantenimiento y preservación de las células .....	80
6.3. Administración del fármaco .....	81
<b>7. Protocolos generales utilizados en los estudios <i>in vitro</i> .....</b>	<b>81</b>
7.1. Cuantificación de células en la cámara de Neubauer .....	81

7.2. Extracción y cuantificación de RNA de líneas celulares .....	82
<b>8. Protocolos específicos de los estudios <i>in vitro</i> .....</b>	<b>82</b>
8.1. Análisis de la viabilidad celular mediante ensayo MTT .....	82
8.2. Análisis de la muerte celular mediante ensayo con Anexina V/yoduro de propidio.....	83
8.3. Análisis de la proliferación mediante ensayo con BrdU .....	84
8.4. Cuantificación de la expresión de los receptores de la dopamina mediante PCR cuantitativa. ....	86
<b>9. Fuente de datos y diseño del estudio epidemiológico en humanos.....</b>	<b>86</b>
<b>10. Análisis estadístico de los datos.....</b>	<b>88</b>
10.1. Análisis de la distribución de las variables.....	88
10.2. Análisis univariantes y bivariantes de las asociaciones entre las variables.....	89
10.3. Análisis estadístico de los datos de secuenciación del RNA-Seq .....	89
10.4. Análisis de los datos epidemiológicos.....	90
<b>RESULTADOS.....(suprimido)</b>	
<b>DISCUSIÓN.....(suprimido)</b>	
<b>CONCLUSIONES.....(suprimido)</b>	
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>203</b>
<b>ANEXOS.....(suprimido)</b>	



# **INTRODUCCIÓN**



## 1. Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es en la actualidad el tumor más diagnosticado en el mundo y la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres. Según datos de la *Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC)*, en 2020 se diagnosticaron más de 2.2 millones de nuevos casos de cáncer de mama en el mundo (un 11.7% de todos los casos de cáncer), superando por primera vez al cáncer de pulmón como el tumor más diagnosticado. Produjo más de 680.000 muertes, siendo el quinto tumor con mayor mortalidad, por detrás de los cánceres de pulmón, colorrectal, hepático y gástrico. Entre las mujeres, el cáncer de mama representa 1 de cada 4 casos de cáncer diagnosticados y 1 de cada 6 muertes por esta enfermedad <sup>1</sup>. En España, este tumor tiene la mayor tasa de incidencia, mortalidad y prevalencia de todos los tipos de cáncer en la población femenina. En 2020 se diagnosticaron 34.088 nuevos casos, suponiendo aproximadamente el 30% de los cánceres detectados en mujeres, y provocó más de 6.600 muertes <sup>2</sup>.

Las tasas de incidencia del cáncer de mama son un 88% más altas en los países desarrollados que en los países en vías de desarrollo, posiblemente debido a una mayor prevalencia de factores de riesgo asociados al desarrollo de este tumor (edad temprana de la menarquia, edad tardía de la menopausia, primer embarazo tardío, menor número de hijos, menor tiempo de lactancia materna, mayor consumo de la terapia hormonal de reemplazo y de anticonceptivos orales, mayor ingesta de alcohol, sobrepeso y sedentarismo), y al mayor envejecimiento de la población. Sin embargo, las mujeres que viven en países en vías de desarrollo, tienen tasas de mortalidad debidas a este tumor un 17% más altas en comparación con las mujeres de países desarrollados, posiblemente debido a un retraso en el diagnóstico y a la falta de oportunidades terapéuticas. Con todo ello, se espera que para el año 2040 se detecten más de 3 millones de nuevos casos de cáncer de mama y más de un millón de mujeres fallezcan debido a esta enfermedad <sup>3</sup>.

La detección precoz, los avances farmacológicos y el mayor acceso a los servicios de salud han aumentado la supervivencia al cáncer de mama en las últimas décadas. Según datos del *Programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (SEER)* de Estados Unidos, la tasa de supervivencia a los 5 años para las mujeres con cáncer de mama invasivo, no metastásico, es del 90% y a los 10 años, del 84%. Si el cáncer de mama invasivo se localiza únicamente en la mama, la tasa de supervivencia a los 5 años

es del 99%; si se ha propagado a los ganglios linfáticos regionales, es del 86%; y si ha metastatizado a otros órganos, desciende hasta el 30% <sup>4</sup>.

A pesar de que este tipo de cáncer tiene altas tasas de supervivencia, se trata de una enfermedad que provoca un gran estrés físico y psicológico para las pacientes, así como un alto impacto económico y social. Debido al envejecimiento de la población y a los cambios sociodemográficos, se espera un rápido incremento de pacientes con cáncer de mama <sup>5</sup>. De hecho, se ha descrito un incremento de la incidencia de este tumor del 0.5% anual desde 2005 en Estados Unidos, e incluso algo mayor en otros países de Europa y Oceanía <sup>6-8</sup>. Por ello, es necesario encontrar nuevas estrategias de prevención del cáncer de mama que mejoren las actuales y eviten el desarrollo de esta enfermedad.

## **2. Factores de riesgo del cáncer de mama**

### **2.1. Factores genéticos**

Alrededor del 90-95% de los casos de cáncer de mama diagnosticados son de origen esporádico y solo entre un 5% y un 10% son hereditarios. Aproximadamente, el 25% de los casos de cáncer de mama hereditarios son debidos a la herencia autosómica dominante de mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2* <sup>9</sup>. La alta incidencia de cáncer de mama en ciertas familias se documentó por primera vez en 1866 <sup>10</sup>; sin embargo, estos dos genes responsables de una alta susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama no fueron descritos hasta los años 90 <sup>11,12</sup>. En mujeres, las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* confieren un riesgo del 40% al 87% y del 18% al 88% de desarrollar cáncer de mama a los 70 años, y un riesgo de por vida del 39% al 44% y del 11% al 18% de desarrollar cáncer de ovario, respectivamente <sup>13-15</sup>. En hombres, el riesgo de cáncer de mama a lo largo de su vida es del 1.2% para los portadores de mutaciones *BRCA1* y del 6.8% para los portadores de mutaciones en *BRCA2* <sup>16</sup>. Las mutaciones en estos genes también aumentan el riesgo de desarrollar otros tumores, como próstata y páncreas <sup>17,18</sup>.

Ambos genes son supresores de tumores, tienen un papel importante en la reparación del daño en el DNA y en el mantenimiento de la estabilidad genómica. En la clínica, se testan de manera rutinaria en mujeres con historia familiar de cáncer de mama o de ovario, con el fin de identificar mutaciones patogénicas que puedan explicar el incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama en esas pacientes. Se han descrito hasta 1790 mutaciones

en *BRCA1* y alrededor de 2000 en *BRCA2* <sup>19</sup>; sin embargo, de muchas de ellas se desconoce si son patogénicas y, por tanto, si tienen implicación clínica. Conocer el espectro de las mutaciones patogénicas y su distribución puede hacer más efectiva la estrategia de detección y prevención del cáncer de mama y ovario. Se sabe que existen diferencias en la distribución de las mutaciones en los genes *BRCA1/2* entre países y comunidades étnicas. Por ejemplo, un 2% de las mujeres de etnia judía askenazi son portadoras de las mutaciones *BRCA1* 185delAG, *BRCA1* 5382insC y *BRCA2* 6174delT <sup>20</sup>. En España, las mutaciones 187\_188delAG, 330A>G, 5236G>A, 5242C>A y 589\_590del representan el 46.6% de las mutaciones en *BRCA1*, mientras que las mutaciones 3036\_3039del, 6857\_6858del, 9254\_9258del y 9538\_9539del suponen el 56.6% de las mutaciones en *BRCA2* <sup>21</sup>.

Otros genes con mutaciones de alta penetrancia son *TP53*, *PTEN*, *STK11* y *CDH1*, relacionados con síndromes poco frecuentes como el síndrome de Li-Fraumeni, el síndrome de Cowden, el síndrome de Peutz-Jeghers y el síndrome del cáncer gástrico difuso hereditario, respectivamente. Así mismo, se relacionan con un incremento en el riesgo de desarrollar de cáncer de mama <sup>22-25</sup>, además de otros tipos de cáncer. Por ejemplo, *TP53* es un gen supresor de tumores que presenta mutaciones que aumentan la predisposición genética a un amplio espectro de tumores, incluyendo sarcomas, carcinomas adrenocorticales, de páncreas, hepatocelulares y colorrectales. En las mujeres portadoras de una mutación en este gen, el cáncer de mama es el tumor más frecuente y en el 50% de esos casos es diagnosticado antes de los 30 años <sup>22</sup>. El síndrome de Cowden está asociado con un mayor riesgo de carcinomas de tiroides, renales, de endometrio, melanomas y tumores benignos como hamartomas. Las mujeres con una mutación en *PTEN* tienen un riesgo del 85% de desarrollar cáncer de mama a lo largo de su vida <sup>26</sup>. Por otra parte, las personas con mutaciones en *STK11* tienen un mayor riesgo de desarrollar tumores gastrointestinales, pigmentaciones mucocutáneas <sup>27</sup>, y hasta un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama del 32% a los 60 años <sup>28</sup>.

Además, existen genes de penetrancia moderada como *ATM*, *CHEK2*, *BRIP1*, *PALB2*, *BARD1*, *MRE11A*, *NBN*, *RAD50*, *RAD51C*, *XRCC2*, *RAD51D* y *ABRAXAS*, que participan en el mantenimiento de la integridad genómica y en los mecanismos de reparación del DNA y cuyos productos proteicos, en muchos casos, interactúan con las proteínas *BRCA1/2*. Su defecto aumenta el riesgo a desarrollar cáncer de mama <sup>29</sup>. También se han identificado varios alelos comunes de baja penetrancia que aumentan la

## Introducción

susceptibilidad al cáncer de mama, mediante estudios de asociación del genoma completo (GWAS, del inglés *Genome Wide Association Studies*), incluidos en los *loci* 10q26, 16q12, 2q35, 8q24, 5p12, 11p15, 5q11 y 2q33<sup>30-32</sup>.

Sin embargo, los genes/*loci* de penetrancia baja y moderada solo pueden explicar una fracción menor de las familias sin mutación en *BRCA1/2* que tienen una alta incidencia de cáncer de mama. A pesar de los análisis de ligamiento genético, los GWAS y, más recientemente, los estudios de secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés *Next-Generation Sequencing*) no se han logrado identificar otros genes de alta penetrancia y más del 70% de la predisposición genética a este tumor permanece sin explicación. Es posible que la predisposición genética al cáncer de mama sea una mezcla de variantes poco frecuentes de penetrancia moderada y mecanismos poligénicos que involucran alelos más comunes de baja penetrancia, que actúan en conjunto para conferir un alto riesgo de desarrollar esta enfermedad<sup>33</sup>.

Sin embargo, alrededor del 90% de los cánceres de mama ocurren en mujeres que no tienen antecedentes familiares y son de origen esporádico. Estos se deben a mutaciones genéticas que se van adquiriendo a lo largo del proceso de envejecimiento, en lugar de por mutaciones heredadas. En los cánceres de mama esporádicos, la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad se encuentra fundamentalmente influida por factores ambientales.

## 2.2. Factores demográficos y ambientales

### 2.2.1. Factores demográficos

#### *Sexo*

El cáncer de mama es prácticamente una enfermedad exclusiva de las mujeres y un tumor raro en los hombres. El cáncer de mama masculino representa menos del 1% de todos los casos de cáncer de mama y está frecuentemente asociado a mutaciones en el gen *BRCA2*

<sup>34</sup>.

### *Edad*

Después del sexo, la edad es el factor más importante en la susceptibilidad al cáncer de mama. Actualmente, alrededor del 80% de las pacientes con cáncer de mama son mayores de 50 años y la mediana de edad en el momento del diagnóstico es de 62 años<sup>35</sup>. La tasa de incidencia y el riesgo de desarrollar cáncer de mama aumenta significativamente con la edad; y la probabilidad a 10 años de desarrollar cáncer de mama invasivo aumenta de un 2% a los 40 años, a alrededor del 3% de los 50 a los 60 años y hasta el 7% a partir de los 70 años<sup>36-38</sup>.

Además, una vez desarrollada la enfermedad, la edad joven es un factor independiente asociado a un mayor riesgo de recaída y mortalidad por cáncer de mama<sup>39</sup>. Las principales causas de una mayor agresividad del cáncer de mama en mujeres jóvenes son la detección de la enfermedad en estadios más avanzados, características histopatológicas más agresivas, una mayor tasa de tumores *triple negativos* y con sobreexpresión del gen *HER2* y una mayor invasión linfovascular<sup>40</sup>.

### *Raza y origen étnico*

La tasa de incidencia y mortalidad de cáncer de mama difiere entre diferentes grupos étnicos<sup>41</sup>. Estudios recientes en Estados Unidos han mostrado que el número de nuevos casos de cáncer de mama es prácticamente igual en mujeres afroamericanas que en mujeres blancas caucásicas. Sin embargo, la tasa de incidencia de cáncer de mama antes de los 45 años es más alta entre mujeres negras que entre mujeres blancas; mientras que, entre las edades de 60 y 84 años, es más alta en mujeres blancas que en mujeres negras. Por otra parte, las mujeres negras tienen más probabilidad de morir por cáncer de mama a cualquier edad, posiblemente debido al diagnóstico en una etapa más tardía de la enfermedad y a barreras en el acceso tanto a la atención médica como a las mejoras en el tratamiento del cáncer<sup>35,38,42-44</sup>. También se ha descrito que las mujeres asiáticas de las islas del Pacífico tienen tasas de incidencia y mortalidad más bajas, así como las hispanas y las indio-americanas/nativas de Alaska<sup>35,45</sup>. Sin embargo, las tasas de cáncer de mama en las mujeres asiáticas que emigran a países occidentales se aproximan a las de las mujeres blancas caucásicas después de varias generaciones, poniendo de manifiesto la importancia de los factores ambientales<sup>46,47</sup>.

Se han descrito diferencias biológicas que podrían justificar la diferente susceptibilidad y evolución del cáncer de mama entre las diferentes etnias. Así, la incidencia de tumores basales, de alto grado y más agresivos, es el doble en mujeres jóvenes negras que en mujeres blancas <sup>48</sup>. También se han identificado mayores niveles plasmáticos de factores de crecimiento y de estrógenos, implicados en el desarrollo del cáncer de mama, en mujeres negras que en caucásicas <sup>49</sup>, y diferencias en *loci* genéticos de susceptibilidad <sup>50,51</sup>. En el tumor primario las mujeres negras tienen mayor expresión de las proteínas del ciclo celular Ciclina E y P16 y mayor índice mitótico <sup>52</sup>, así como una mayor prevalencia de mutaciones en *P53* <sup>53</sup>, en comparación con las mujeres blancas. Asimismo, las mujeres asiáticas de las islas del Pacífico son más propensas a amamantar a sus hijos durante al menos 12 meses, tienen menor tendencia a consumir alcohol y tienen tasas de obesidad más bajas, que generalmente se asocian con un menor riesgo de cáncer de mama <sup>54</sup>. Sin embargo, su tasa de incidencia se está incrementando un 1.7% al año, debido a la occidentalización de su estilo de vida <sup>55</sup>.

## **2.2.2. Antecedentes familiares y personales**

### *Antecedentes familiares*

El riesgo de cáncer de mama de una mujer se incrementa con el número de familiares de primer grado (madre, hermana o hija) afectados por la enfermedad. Así, en un estudio que combinó datos de 52 estudios epidemiológicos y que incluyó a más de 58.000 mujeres con cáncer de mama y más de 100.000 controles, se ha descrito que, en comparación con las mujeres que no tienen ningún familiar afectado, el riesgo de cáncer de mama es de 1.80, 2.93 y 3.90, con uno, dos y tres familiares de primer grado afectados, respectivamente <sup>56,57</sup>. También se ha descrito que mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama (dos o más casos de cáncer de mama en familiares de primer grado menores de 50 años, o tres o más casos a cualquier edad) y que no portan mutaciones patogénicas en los genes *BRCA1/2*, serían cuatro veces más propensas a desarrollar cáncer de mama <sup>58</sup>.

### *Enfermedades benignas de la mama*

Las enfermedades benignas de la mama incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de mama <sup>59-62</sup>. Estas lesiones abarcan un amplio espectro de entidades histopatológicas, generalmente subdivididas en lesiones no proliferativas (fibrosis o quistes simples, adenosis no esclerosante, tumor filoides benigno, ectasia ductal, fibrosis periductal, metaplasia apocrina y escamosa, calcificaciones, lipomas y hamartomas), lesiones proliferativas sin atipias (fibroadenomas, adenosis esclerosante, cicatriz radial, papilomatosis e hiperplasia ductal típica) e hiperplasias proliferativas atípicas (hiperplasia ductal atípica e hiperplasia lobulillar atípica). Las lesiones no proliferativas confieren un riesgo relativo de desarrollar cáncer de mama de 1.27, en comparación con un riesgo de 1.88 para las lesiones proliferativas sin atipia. Las hiperplasias atípicas incrementan el riesgo hasta 4.24 y éste varía según la edad en la que son diagnosticadas. Así, el riesgo de cáncer de mama es de 6.99 en mujeres que reciben un diagnóstico de lesión con atipias antes de los 45 años, de 5.02 cuando se diagnostica entre los 45 y 55 años, y de 3.37 cuando se diagnostica después de los 55 años <sup>62</sup>.

### *Densidad mamaria*

La densidad mamaria (DM) se define como el porcentaje de tejido epitelial y conectivo que constituye una mama completa. Se estima mediante mamografía ya que al ser tejidos más densos bloquean más los rayos X que el tejido adiposo y, por tanto, aparecen más blancos en la mamografía. La herramienta más utilizada para evaluar la DM en una mamografía es el denominado *Sistema de Datos e Informes de Imágenes Mamarías* (BI-RADS, del inglés *Breast Imaging Reporting and Data System*). El BI-RADS divide la DM en cuatro categorías principales: el nivel 1, define el tejido mamario casi completamente graso, con una densidad del tejido menor del 10%; el nivel 2, define un tejido mamario fibroglandular, formado por áreas dispersas de densidad del 10 al 49%; el nivel 3, indica un tejido heterogéneamente denso con una densidad de tejido del 50 al 90%; y, finalmente, el nivel 4, define a una mama con más del 90% de densidad de tejido, con muy poco tejido adiposo <sup>63</sup>. La DM ha sido descrita en numerosos estudios como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de cáncer de mama <sup>64,65</sup>. Así, en un metaanálisis que englobó a 42 estudios y más de 240.000 mujeres, se observó que el riesgo relativo de cáncer de mama fue del 1.79, 2.11, 2.92 y 4.64 para los niveles de BI-

RADS 1, 2, 3 y 4, respectivamente <sup>66</sup>. Las mujeres con un 75% de tejido denso, tienen un riesgo de cáncer de mama entre cuatro y seis veces mayor que las mujeres con poco o ningún tejido denso <sup>67</sup>. La DM puede estar influenciada por factores genéticos <sup>68</sup> o por la paridad, la dieta, el consumo de hormonas exógenas o la menopausia. Por ejemplo, ser nulípara (no tener hijos) o ser primípara añosa (tener el primer hijo después de los 35 años), el consumo de terapia hormonal sustitutiva y de alcohol aumentan la DM; mientras que la disminución de hormonas durante la menopausia y un mayor número de embarazos, disminuyen la DM <sup>69,70</sup>.

### **2.2.3. Factores hormonales**

#### *Edad de la menarquia y de la menopausia*

Se ha descrito que una menarquia temprana y una menopausia tardía incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de mama <sup>71</sup>. Los estudios epidemiológicos que informan sobre las tendencias en la edad de la menarquia han demostrado que ésta está disminuyendo de 2 a 3 meses por década, pasando de los 16.5 años en 1840 a los, aproximadamente, 12 años actuales <sup>72-74</sup>. Los factores que afectan a la edad de la menarquia incluyen la exposición durante la gestación al humo del tabaco y a disruptores endocrinos (productos químicos que mimetizan la acción hormonal), el índice de masa corporal (IMC) y factores genéticos <sup>75-77</sup>. Igualmente, la edad media de la menopausia ha pasado de, aproximadamente, los 49 años en las mujeres nacidas en 1910, a 51.5 en las mujeres nacidas 20 años después y a 53.7 años en las mujeres nacidas durante los años 60. La menopausia está influenciada por la paridad, el uso de anticonceptivos, el tabaquismo, el nivel socioeconómico y factores genéticos <sup>78</sup>. Una reciente revisión sistemática con metaanálisis, que combinó los resultados de 117 estudios epidemiológicos, observó que el riesgo de cáncer de mama por cada año que se adelanta la menarquia aumenta un 5% (tomando como referencia los 13 años). Por otra parte, por cada año que se retrasa la menopausia a partir de los 51.5 años, el incremento del riesgo es del 2.9% <sup>71</sup>. Esta diferencia en el incremento del riesgo entre el adelanto de la menarquia y el retraso de la menopausia es debida, posiblemente, a la gran influencia que tienen los estrógenos en la mama inmadura para incrementar la susceptibilidad al cáncer de mama <sup>79</sup>.

### *Consumo de hormonas exógenas*

Las principales fuentes de estrógenos exógenos son los anticonceptivos orales (AO) y la terapia hormonal de reemplazo (THR) para combatir los síntomas de la menopausia. En 2005, la IARC clasificó a los AO combinados y a la THR combinada (que contienen estrógenos y progestágenos) como carcinógenos del grupo 1, lo que indica que existen evidencias suficientes de que estos agentes contribuyen al desarrollo de cáncer en humanos. Esta evaluación se basó en el aumento de riesgo de cáncer de mama y de cuello de útero entre las mujeres que consumían estos medicamentos <sup>80,81</sup>.

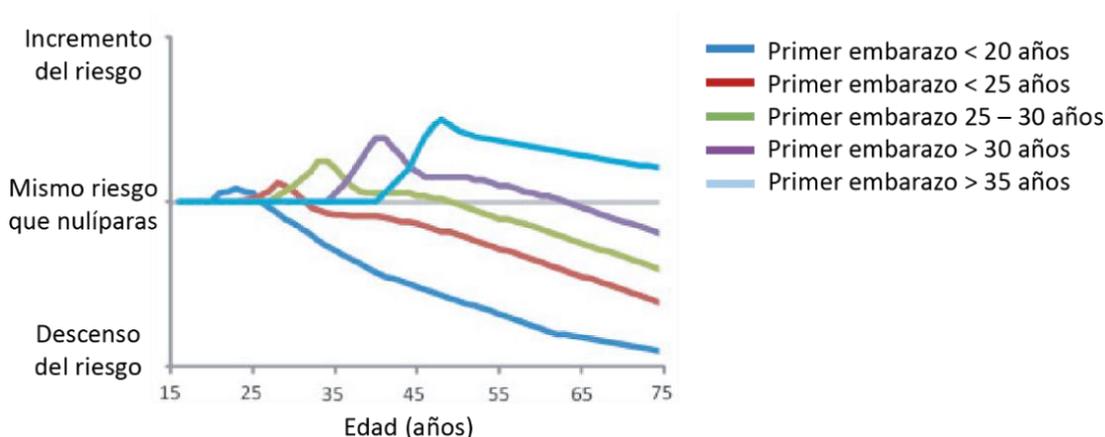
En 1996, el análisis de los datos de 54 estudios publicados sobre el uso de la píldora anticonceptiva combinada, mostró que las mujeres que usaban anticonceptivos en ese momento tenían un riesgo relativo de 1.24 de desarrollar cáncer de mama y el aumento del riesgo se extendía hasta 10 años después de la suspensión del tratamiento <sup>82</sup>. Además, el riesgo fue mayor en mujeres que comenzaron a tomar AO antes de los 20 años y en las que los tomaron antes del nacimiento de su primer hijo; una etapa en la que el tejido mamario es más susceptible a la exposición hormonal <sup>82</sup>. En estudios más recientes, con formulaciones de anticonceptivos hormonales con dosis más bajas de estrógenos y progestágenos, también se ha observado un incremento del riesgo. Este incremento puede ser desde un 9% con menos de un año de consumo de cualquier anticonceptivo hormonal (tanto orales con formulaciones combinadas o sólo de progestágenos y otros métodos no orales), hasta un 48% en mujeres que han tomado AO combinados durante más de 10 años <sup>83</sup>.

En el caso de la THR postmenopáusica, se ha observado un aumento del riesgo de un 2.3% por cada año de uso, un aumento comparable al de cada año de retraso de la menopausia <sup>84</sup>. La exposición a estrógenos más progestágenos durante 5 años se asocia con un aumento aproximado del 26-30% en el riesgo de desarrollar cáncer de mama, las preparaciones que contienen progestágenos son más perjudiciales que las que contienen solo estrógenos y el riesgo de desarrollar cáncer de mama es mayor cuanto mayor es el periodo de uso <sup>85,86</sup>. En términos absolutos, 5 años de consumo de THR, comenzando a los 50 años, aumentaría la incidencia de cáncer de mama entre los 50 y 69 años en, aproximadamente, una de cada 50 mujeres que consumen terapia combinada, una de cada 70 mujeres que toman estrógenos con preparaciones intermitentes de progestágenos y en una de cada 200 usuarias que solo toman formulaciones con estrógenos <sup>87</sup>.

### 2.2.4. Historia reproductiva

En el siglo XVIII, Bernardino Ramazzini, el padre de la medicina ocupacional, observó que la denominada “peste maldita” (como se conocía en aquel momento al cáncer de mama) era más frecuente entre monjas que entre las mujeres casadas, identificando por primera vez la relación entre la historia reproductiva y el cáncer de mama <sup>88</sup>. Ya en 1926, Janet Lane-Clayton, pionera en los estudios de casos y controles, y madre de la epidemiología, identificó que el riesgo de cáncer de mama aumentaba en las mujeres sin hijos, en las mujeres que se casaban más tarde que el promedio y en las mujeres que no amamantaban a sus hijos, mientras que el riesgo disminuía según el número de hijos <sup>89</sup>.

La historia reproductiva, junto con la edad, son los factores epidemiológicos que más modifican el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Se sabe que un embarazo a edad temprana tiene un efecto protector frente al cáncer de mama <sup>90</sup>. Aquellas mujeres que tienen un embarazo antes de los 20 años, desarrollan un 50% menos de cáncer de mama, a lo largo de su vida, en comparación con las mujeres que no han tenido ningún embarazo. El efecto protector a largo plazo disminuye conforme aumenta la edad del primer embarazo, y a partir de los 35 años ese efecto protector es mínimo o inexistente <sup>90</sup>. Además, antes de que el efecto protector se haga patente, existe un aumento transitorio del riesgo de desarrollar cáncer de mama durante los 10 años siguientes al embarazo, con máximo riesgo alrededor de los 5 años. Es lo que se conoce como cáncer de mama postembarazo y su riesgo es pequeño en mujeres que tienen el primer embarazo temprano, va aumentando con la edad del primer embarazo y es máximo en mujeres que tienen su primer hijo después de los 35 años <sup>91-93</sup> (**Figura 1**).



**Figura 1.** Figura ilustrativa del efecto de la edad del primer embarazo sobre el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Tomada y modificada de Meier-Abt <sup>94</sup>.

También se ha observado que cada embarazo aporta una protección extra de entre un 10% y un 13%<sup>95,96</sup>. El efecto protector que produce el embarazo se ha descrito en mujeres de todas las etnias y en mamíferos de experimentación, como ratas y ratones, tanto en modelos de carcinogénesis química como en animales modificados genéticamente<sup>97-100</sup>.

Es el propio proceso de embarazo el que más contribuye a la protección. Así, se ha descrito que 34 semanas de embarazo son suficientes para tener dicho efecto protector, nazca el feto vivo o no<sup>101</sup>. Aunque también se ha observado que la lactancia materna, y en particular la duración total de la lactancia, aumenta la protección frente al cáncer de mama<sup>102,103</sup>. Así, se ha descrito que el riesgo disminuye un 4.3% por cada 12 meses de lactancia<sup>103</sup>. Pero, por otra parte, en un estudio de más de 9 millones de mujeres menores de 55 años donde se evaluó el riesgo de cáncer de mama premenopáusicas, la lactancia no ejerció ninguna protección<sup>93</sup>. Este efecto protector del embarazo y la lactancia se produce tanto para el desarrollo de tumores positivos para el receptor de estrógenos (ER+) como para los tumores receptor de estrógenos negativos (ER-), y en mujeres con mutaciones en *BRCA1/2*<sup>96,104-106</sup>.

Los mecanismos por los que se produce este efecto protector no están bien definidos. Se han postulado cambios en la diferenciación lobulillar, en el destino celular, en la composición del estroma y cambios moleculares y epigenéticos implicados en el efecto protector del embarazo frente al cáncer de mama. Uno de los primeros estudios exhaustivos que investigó la diferenciación de la mama, informó que las mujeres con hijos presentaban una mayor proporción de lóbulos diferenciados en la glándula mamaria, definidos como lóbulos de tipo 3, frente a los lóbulos de tipo 1, más indiferenciados, característicos de mujeres nulíparas<sup>107,108</sup>. Las células aisladas de los lóbulos menos diferenciados fueron las más susceptibles a los carcinógenos y mostraron una mayor capacidad de supervivencia<sup>109</sup>. Sin embargo, un estudio más reciente demostró que las proporciones de los lóbulos diferenciados e indiferenciados no fueron distintas entre mujeres nulíparas y multíparas<sup>110</sup>. Por ello, se ha planteado la hipótesis de que los lóbulos de tipo 1 presentes en mujeres que han tenido un embarazo, aunque pueden parecer histológicamente iguales a los de mujeres nulíparas, podrían proceder de la regresión de lóbulos de tipo 3, debido a la involución lobulillar que se produce con la edad. Estos lóbulos serían funcional y molecularmente diferentes de los lóbulos de tipo 1, inmaduros y más susceptibles a malignizar, característicos de mujeres nulíparas<sup>111</sup>.

También se han documentado cambios en el destino de diferentes subpoblaciones de células madre/progenitoras mamarias tras el embarazo <sup>112</sup>. En particular, en ratones se ha observado que el embarazo a edad temprana reduciría el número de células luminales secretoras de WNT4 y sensibles a hormonas (células ER+ y PR+), lo que conduciría a una disminución de la señalización de la vía de WNT protumorigénica en las células madre/progenitoras mamarias basales y estos cambios permanecerían a lo largo del tiempo <sup>113</sup>. En mujeres portadoras de mutaciones en *BRCA1/2*, que han tenido hijos, el embarazo temprano reduciría el número de células progenitoras CD44-positivas y p27-positivas, sensibles a hormonas, y disminuiría la señalización de la vía proliferativa de WNT, induciendo quiescencia celular a través de la activación de la vía de TGF- $\beta$  <sup>114</sup>.

El estroma mamario y la matriz extracelular (ECM) también se alteran después del embarazo. Así, el tejido mamario de mujeres y ratones hembra que han pasado por un embarazo muestran una expansión de colágeno tipo I en su forma no fibrilar, asociado con una disminución de la rigidez del estroma y que tendría un efecto supresor de tumores <sup>115</sup>. También se ha descrito una disminución de un 12% de la densidad mamográfica tras un embarazo a término, lo que puede estar relacionado con el efecto protector del embarazo <sup>116</sup>.

En cuanto a cambios moleculares, Blakely y colaboradores informaron de los primeros perfiles transcriptómicos diferentes en ratas nulíparas y primíparas. Varias cepas de ratas compartieron un perfil transcripcional común de 70 genes inducidos por la paridad posiblemente relacionado con la resistencia al desarrollo de cáncer de mama tras el embarazo. De esos genes, los regulados negativamente por la paridad tienen funciones clave en la remodelación de la matriz extracelular y el desarrollo de la glándula mamaria, mientras que los genes regulados positivamente se asocian preferentemente con la vía de TGF- $\beta$  y la respuesta inmune <sup>117</sup>. También se ha descrito que las células madre/progenitoras mamarias basales de ratones hembra que han pasado por un embarazo, tendrían una menor expresión de los genes de la vía de *Wnt* (*Lgr5*, *Axin5*, *Vcan* e *Igfbp3*), implicada en proliferación; y, además, mostrarían un aumento de la expresión de genes de la vía de *Notch* (*Gata3*, *Id3* y *Dusp1*), implicada, en este contexto, en diferenciación <sup>113</sup>. En mujeres premenopáusicas que han tenido hijos, se ha observado que los genes implicados en diferenciación celular, como *EGR3*, *DSC3*, *KRT5* y *FZD8* se ven permanentemente sobreexpresados tras el embarazo, y pueden ser los responsables del efecto protector de la paridad frente al cáncer de mama <sup>118</sup>. Estos transcritos

implicados en la diferenciación celular permanecen regulados al alza durante muchos años y también se observan en mujeres postmenopáusicas que han pasado por un embarazo, junto con la sobreexpresión de genes implicados en la regulación de la transcripción, en el ciclo celular o en el *splicing* del RNA <sup>119,120</sup>. Asimismo, se ha observado que el embarazo reduce los niveles del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1, *Insulin Growth Factor-1*), tanto circulante como en la mama, y que hay una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de IGF-1 y el número de embarazos <sup>119,121,122</sup>. Altos niveles plasmáticos de IGF-1 aumentan el riesgo de cáncer de mama <sup>123</sup>, por lo que una disminución temprana de éste podría estar relacionada con el efecto protector del embarazo.

También se han descrito cambios epigenéticos asociados al embarazo que bloquean el desarrollo de lesiones premalignas <sup>124</sup>. Un análisis transcripcional del tejido mamario de mujeres sin cáncer de mama y con hijos, reveló que 232 genes desregulados estaban funcionalmente enriquecidos en la modificación y transcripción de la cromatina <sup>125</sup>. En comparación con mujeres nulíparas, las células epiteliales mamarias de mujeres postmenopáusicas, que tuvieron un embarazo temprano, mostraron heterocromatina rica en histona H3 trimetilada en lisina 27 (H3K27me3), que indica que la cromatina está transcripcionalmente inactiva <sup>126</sup>. También se ha observado hipermetilación y silenciamiento de genes como *FOXA1* <sup>127</sup>, *Igf1r*, *Igf1*, *Irs1* y *Stat5b* <sup>128</sup>, implicados en la proliferación, en mamas de mujeres y de ratones que han tenido un embarazo; e hipometilación y activación de genes como *Elf5*, *Cldn4* y *Ctcf1*, implicados en la diferenciación celular y la supresión tumoral <sup>129</sup>.

### 2.2.5. Estilo de vida

#### *Sobrepeso y obesidad*

El sobrepeso y la obesidad se asocian con un incremento del riesgo de cáncer de mama, pero esta asociación varía según el estado menopáusico. Así, en mujeres postmenopáusicas, un incremento en el índice de masa corporal (IMC) se asocia con un aumento en el riesgo de cáncer de mama; mientras que en mujeres premenopáusicas, IMC altos se asocian con un menor riesgo relativo <sup>130-133</sup>. Un análisis combinado de siete estudios que incluyeron a más de 337.000 mujeres, informó de un riesgo relativo de 0.54 al comparar mujeres premenopáusicas con un IMC > 31 Kg/m<sup>2</sup> frente a aquellas con un

## *Introducción*

IMC < 21 Kg/m<sup>2</sup> <sup>130</sup>. En un metaanálisis con datos de 34 estudios que incluía información de más de 2.5 millones de mujeres, se demostró que el riesgo de cáncer de mama se reduce en, aproximadamente, un 8% por cada 5 Kg/m<sup>2</sup> de aumento del IMC en mujeres premenopáusicas. Por el contrario, el riesgo de cáncer de mama se incrementó un 12% por cada 5 Kg/m<sup>2</sup> de aumento del IMC en mujeres postmenopáusicas <sup>132</sup>.

Es posible que, en mujeres premenopáusicas, la obesidad produzca ciclos anovulatorios, que conllevan una disminución de los niveles circulantes de estrógenos, así como una disminución de la densidad mamográfica y, con todo ello, una disminución del riesgo de cáncer de mama. Sin embargo, en mujeres postmenopáusicas, la obesidad aumentaría los niveles de estradiol y de leptina, así como la resistencia a la insulina <sup>134</sup>. Se ha descrito que niveles altos de leptina aumentan el riesgo de cáncer de mama. Esta hormona tendría un efecto pro-carcinogénico en la mama al aumentar la actividad de vías de señalización implicadas en proliferación, adhesión, invasión, migración, inflamación y angiogénesis, al regular al alza la expresión de Ciclina D1, Survivina, IL-1, E-Cadherina, VEGF y otros factores angiogénicos <sup>135</sup>. Así mismo, regula a la baja la respuesta apoptótica, aumentando la susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama <sup>136</sup>.

## *Actividad física*

La actividad física disminuye el riesgo de desarrollar cáncer de mama, tanto en las mujeres premenopáusicas como en las postmenopáusicas <sup>137,138</sup>. En las mujeres premenopáusicas, la actividad física podría producir un retraso en la menarquia y ciclos anovulatorios, disminuyendo así la concentración de estrógenos circulantes. En las mujeres postmenopáusicas, la actividad física ayudaría a reducir el tejido adiposo, que es la principal fuente de estrógenos tras la menopausia. Asimismo, la actividad física reduciría los niveles de leptina, la resistencia a la insulina y los factores inflamatorios como TNF- $\alpha$  e IL-6 producidos en la grasa, disminuyendo el riesgo de desarrollar cáncer de mama <sup>137,139</sup>.

## *Consumo de alcohol*

El consumo de alcohol se asocia con un aumento del riesgo de cáncer de mama. Un estudio en el que se siguieron a 38.000 mujeres durante 10 años, demostró que el riesgo

relativo de desarrollar cáncer de mama con un consumo mayor o igual a 30 gramos diarios de alcohol frente a ningún consumo fue de 1.32 para el cáncer de mama invasivo e *in situ* y de 1.43 específicamente para el cáncer de mama invasivo <sup>140</sup>. Incluso el consumo de pequeñas cantidades de alcohol (10 gramos/día) se asoció con un aumento del 10% en el riesgo <sup>141,142</sup>. Los mecanismos por los que el consumo de alcohol podría aumentar el riesgo de cáncer de mama incluyen la oxidación del etanol a acetaldehído (un metabolito tóxico y mutagénico), la generación de radicales libres, el aumento en los niveles de estrógenos circulantes producidos por un aumento en la transformación de andrógenos a estrógenos por inducción de las aromatasas, y por un aumento en la actividad transcripcional del receptor de estrógenos <sup>143</sup>.

### *Radiación*

El cáncer de mama es uno de los segundos tumores primarios más comunes en los supervivientes de cáncer infantil, en cuyo tratamiento se incluye la radioterapia torácica. Así, en un estudio de supervivientes de linfoma de Hodgkin infantil, el riesgo de desarrollar cáncer de mama aumentó un 56% en aquellas pacientes que habían recibido radioterapia, con una mediana de latencia de aparición de 18.1 años <sup>144</sup>. Tanto la ventana de edad a la que se recibe la radiación, como la dosis, son factores que influyen en el grado del riesgo. Así, en otro estudio, se documentó que si las niñas fueron tratadas entre los 5 y los 9 años, no tuvieron un mayor riesgo posterior de desarrollar cáncer de mama; sin embargo, las niñas tratadas a partir de los 10 años tuvieron un riesgo relativo de 1.3 <sup>145</sup>. Este riesgo aumentó significativamente con el incremento de la dosis de radiación, llegando a ser 8 veces más alto para el grupo que recibió la dosis más alta (42 Gy), en comparación con el grupo de dosis más bajas (< 4 Gy) <sup>146</sup>.

En la misma línea, los datos epidemiológicos sobre las supervivientes a las bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki, han desvelado que la exposición a la radiación confirió un exceso de riesgo relativo de 1.56 por cada sievert (Sv) recibido <sup>147</sup> y este, a su vez, estaba influido por la edad. Si la exposición sucedió antes de los 20 años, el riesgo varió de 2.65 a 3.94; mientras que entre las mujeres expuestas después de esta edad, el riesgo fue considerablemente menor (0.54 a 1.33) <sup>148</sup>. Estas diferencias en el riesgo se explicarían por una mayor susceptibilidad a la adquisición de mutaciones de las células epiteliales mamarias durante el desarrollo, pues son células indiferenciadas en continua

proliferación; y una menor susceptibilidad a las mismas en edades posteriores, donde la proliferación celular es menor o casi nula después de la menopausia <sup>149</sup>.

### *Exposición al dietilestilbestrol*

El dietilestilbestrol (DES) es un estrógeno sintético que fue ampliamente utilizado durante las décadas de 1940 y 1960 para prevenir el aborto espontáneo, los partos prematuros y otras complicaciones relacionadas con el embarazo. Se ha descrito que el DES produce un aumento del 30% en el riesgo de desarrollo de cáncer de mama en las mujeres a las que se administró el fármaco <sup>150</sup> y, además, sus hijas (que tuvieron exposición intrauterina) tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama ER+ después de los 40 años de edad <sup>151</sup>.

## **3. Clasificación del cáncer de mama**

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que muestra características morfológicas y moleculares variables y diferente comportamiento clínico y respuesta al tratamiento. Debido a esta gran heterogeneidad, es fundamental agrupar la enfermedad en diferentes subtipos que tengan características biológicas y clínicas similares, con el fin de proporcionar un diagnóstico lo más preciso posible de la enfermedad y de su comportamiento, para facilitar la toma de decisiones en la práctica clínica.

En la práctica clínica actual, se realiza una clasificación clínico-patológica basada en características como el tamaño del tumor, el estado ganglionar, la existencia de metástasis a distancia (estadiaje TNM), y en criterios morfológicos y de expresión de algunos marcadores. Entre los anteriores, se incluyen el receptor de estrógenos (ER), el de progesterona (PR), el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y el marcador de proliferación celular Ki67 <sup>152</sup>. Además, las tecnologías de análisis de expresión génica de alto rendimiento, como los *microarrays*, han permitido refinar la clasificación del cáncer de mama en 5 grupos (denominados subtipos intrínsecos), con diferentes características de expresión génica y de marcadores moleculares <sup>153,154</sup>. Con ello, en los últimos años se han desarrollado paneles comerciales, basados en la expresión de un número limitado de genes, para clasificar los tumores, predecir el riesgo de

recurrencia y conocer el pronóstico de la enfermedad, y que ya comienzan a implementarse en la práctica clínica rutinaria <sup>155</sup>.

### 3.1. Clasificación clínico-patológica

La herramienta más frecuentemente utilizada en la clínica para describir el estadio del tumor es el sistema TNM, basado en el tamaño tumoral (T), la diseminación a ganglios loco-regionales (N) y la existencia de metástasis (M). La estadificación combina estos factores y clasifica la enfermedad en nueve estadios evolutivos (0, IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC y IV), con diferente pronóstico y variaciones en el tratamiento <sup>156</sup>.

En términos histopatológicos, el cáncer de mama se puede dividir en carcinomas *in situ*, que se limitan al componente epitelial de la mama, y carcinomas invasivos o infiltrantes, que rompen la membrana basal e invaden el estroma adyacente. Los carcinomas invasivos son un grupo heterogéneo de tumores que se pueden diferenciar en varios subtipos histopatológicos, incluyendo carcinomas ductales infiltrantes, lobulillares invasivos, mucinosos, tubulares, medulares y papilares. De estos, el carcinoma ductal infiltrante (CDI) es el subtipo más común y representa el 70-80% de todas las lesiones invasivas. A su vez, el CDI se subclasifica como bien diferenciado (grado 1), moderadamente diferenciado (grado 2) o pobremente diferenciado (grado 3), según los niveles de pleomorfismo nuclear, el grado de formación de túbulos o glándulas y el índice mitótico <sup>157</sup>. El grado de diferenciación del carcinoma de mama es un factor pronóstico importante, siendo el grado 3 el que peor supervivencia presenta <sup>158</sup>.

En los carcinomas de mama invasivos, además, se determina el estado de expresión de ER, PR, HER2 y Ki67. Así, el panel de consenso de *St. Gallen* propuso cuatro subtipos de cáncer de mama, basados en métodos de tinción inmunohistoquímica e hibridación fluorescente *in situ*. El subtipo luminal A se caracteriza por ser ER y PR positivo, HER2 negativo y con baja expresión de Ki67 (<14%). El subtipo luminal B se puede dividir en luminal HER2 negativo, caracterizado por ser ER positivo, PR positivo o negativo, HER2 negativo y Ki67 alto ( $\geq 14\%$ ); y en luminal B HER2 positivo, que es ER positivo, PR positivo o negativo, HER2 sobreexpresado y con expresión de Ki67. El subtipo HER2 enriquecido es ER y PR negativo y HER2 sobreexpresado o amplificado; y, el triple negativo es ER, PR y HER2 negativos <sup>159,160</sup>.

La octava edición del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC8) recomienda que, además de la clasificación clínico-patológica (estadiaje TNM), se debe considerar el estado de ER, PR, HER, grado tumoral y ensayos multigénicos, resumidos a continuación, para definir el pronóstico de la enfermedad <sup>156,161</sup>.

### 3.2. Clasificación molecular

Los subtipos intrínsecos del cáncer de mama fueron descritos por primera vez en el año 2000 por Charles M. Perou y Therese Sorlie, quienes utilizaron micromatrices (*microarrays*) de cDNA en los que se midió la expresión de aproximadamente 9000 genes <sup>153,154</sup>. Así, definieron 5 subtipos intrínsecos de cáncer de mama: luminal A, luminal B, enriquecido en HER2, basal y *normal-like*. El luminal A es el subtipo más común y representa el 50-60% de todos los cánceres de mama. Son tumores de bajo grado histopatológico (bien diferenciados), bajo grado de pleomorfismo nuclear y baja actividad mitótica. Se caracterizan por la expresión de citoqueratinas epiteliales luminales (CK8 y CK18) y genes asociados con ER como *LIVI*, *FOXA1*, *XBPI*, *GATA3*, *BCL2*, *ERBB3* y *ERBB4*. Por su parte, los tumores luminales B comprenden el 15-20% de los cánceres de mama y tienen un fenotipo más agresivo, mayor grado histopatológico, mayor índice proliferativo y peor pronóstico. Se caracterizan por un aumento en la expresión de genes relacionados con la proliferación como *v-MYB*, *GGH*, *LAPTMB4*, *NSEPI* y *CCNE1*. Los tumores enriquecidos en HER2 representan del 15 al 20% de los tumores de mama y la positividad de HER2 les confiere un comportamiento biológico y clínico más agresivo, siendo altamente proliferativos y con alto grado histológico (peor diferenciados). Se caracterizan por tener mutaciones frecuentes en *TP53* y *PIK3CA* y sobreexpresión de genes de la vía de *HER2* o de su amplicón, como *GRB7* y *PAGP3*. Los tumores que pertenecen al subgrupo de tipo basal expresan altos niveles de marcadores mioepiteliales o de células basales como CK5, CK14, CK17 y laminina, y no expresan ER, PR y HER2, por lo que se denominan *triple negativos*. Además, sobreexpresan P-cadherina, fascina, caveolinas y EGFR, y presentan mutaciones frecuentes en el gen *TP53*, inestabilidad genómica e inactivación de la vía de *Rb*. Es el subtipo más común en mujeres portadoras de mutaciones en *BRCA1*. Además, presentan un alto grado histopatológico, alto índice mitótico y son muy agresivos. Recientemente, se han identificado hasta seis subtipos tumorales dentro de los tumores triple negativos, como los tumores *claudin-low*, con baja expresión de genes implicados en uniones estrechas y adherencias célula-célula, incluidas

las claudinas 3, 4 y 7, la ocludina y la cadherina E. Por último, los tumores del subtipo *normal-like* se caracterizan por ser triple negativos pero no de tipo basal, porque no expresan ni CK5 ni EGFR <sup>162,163</sup>.

Aunque la clasificación molecular del cáncer de mama basada en subtipos intrínsecos ha mejorado la comprensión de la biología del cáncer de mama, su aplicación en la práctica clínica habitual ha tenido menos éxito, por la dificultad de realizar *arrays* de expresión de forma rutinaria. Sin embargo, a pesar de su aplicabilidad limitada, los análisis de expresión génica han llevado a la introducción de ensayos moleculares multigénicos, basados en la identificación de un conjunto limitado de genes (firmas génicas) que se pueden usar para identificar tumores con características biológicas o clínicas específicas. El primer ensayo de pronóstico multigénico desarrollado fue *MammaPrint*, que utiliza un conjunto de 70 genes para determinar la probabilidad de metástasis en los cinco primeros años tras el diagnóstico <sup>164</sup>. Posteriormente, se han desarrollado otros ensayos como *Oncotype DX*, *EndoPredict*, *Prosigna (PAM50)*, *Breast Cancer Index*, *The Rotterdam Signature* y *BluePrint Molecular Signature* <sup>165</sup>, cuyo uso está restringido por su alto coste, pero que ya comienzan a usarse en la práctica clínica, mejorando la predicción del riesgo de recurrencia, el pronóstico de la enfermedad y la elección de los tratamientos <sup>166</sup>.

#### **4. Desarrollo y estructura de la glándula mamaria**

Las glándulas mamarias son órganos secretores complejos, altamente dinámicos, cuya función principal es producir leche durante la lactancia para el sustento de las crías en los mamíferos. Este órgano sufre profundos cambios tisulares, celulares y moleculares a lo largo de la vida de mujer.

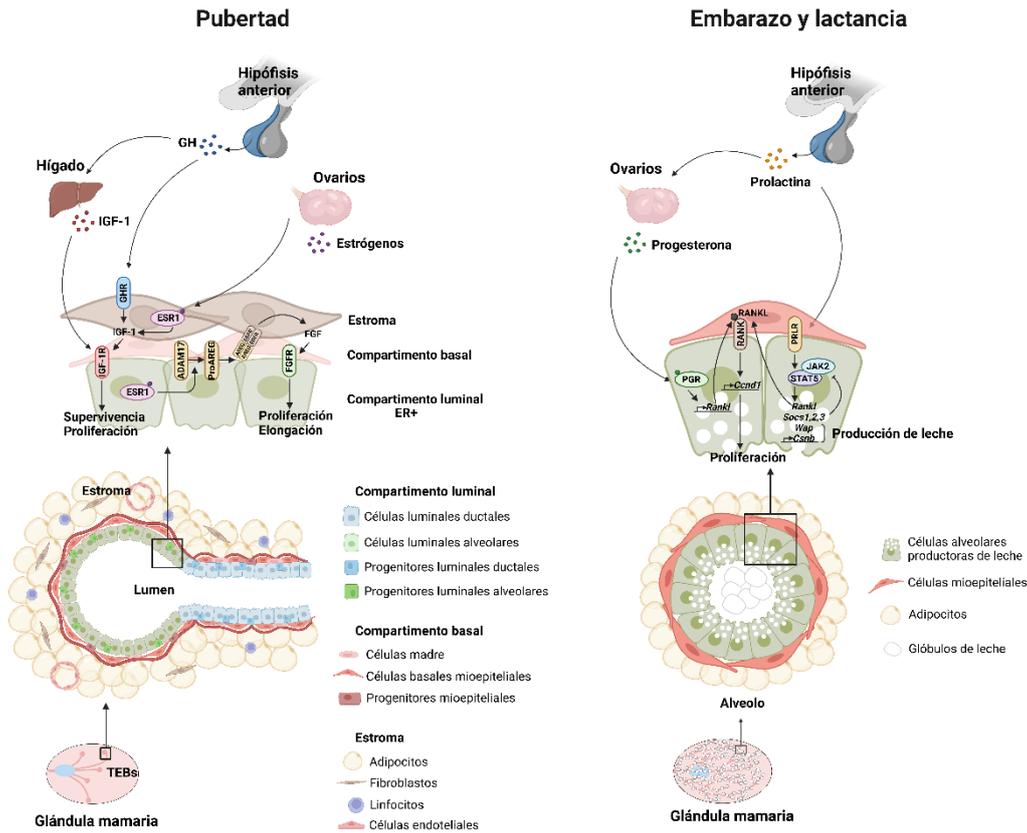
##### **4.1. Desarrollo de la glándula mamaria**

Las glándulas mamarias son apéndices epidérmicos que surgieron en la evolución a partir de glándulas apocrinas sudoríparas <sup>167</sup>. Durante la embriogénesis, se desarrollan como una estructura rudimentaria gracias a las señales del mesénquima cercano; pero durante la pubertad y edad adulta, las hormonas circulantes liberadas por la hipófisis y los ovarios son las impulsoras de los principales cambios morfológicos y funcionales.

## Introducción

En el embrión hay dos compartimentos tisulares en la glándula mamaria: el compartimento epitelial y el compartimento estromal circundante. Estos tejidos derivan del ectodermo y del mesodermo, respectivamente. Una vez que se ha formado la placoda mamaria (engrosamiento del ectodermo), el conjunto de células epiteliales desciende al mesénquima subyacente. Las células ectodérmicas sintetizan y liberan la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTH<sub>LH</sub>); y ésta induce en el mesénquima la expresión del receptor 1A de la proteína morfogénica ósea (BMP<sub>RI</sub>A). A este receptor se une la proteína morfogénica ósea-4 (BMP-4) producida por el mesénquima. Como resultado se activa la expresión del factor de transcripción MSX2 en el mesénquima, que inhibe la formación de folículos pilosos encima del pezón. Este epitelio mamario crece hasta convertirse en una estructura pequeña y simple hasta el nacimiento <sup>168</sup>.

Al nacer, la glándula mamaria es solo un sistema rudimentario que va creciendo conforme al desarrollo general del organismo hasta la pubertad. Con el inicio de ésta, la red de ductos comienza a expandirse a partir de unas estructuras denominadas Brotes Finales Terminales (TEBs, del inglés *Terminal End Buds*). El crecimiento y la expansión de los TEBs están regulados por la hormona de crecimiento (GH, del inglés *Growth Hormone*), que se produce en la hipófisis anterior o adenohipófisis, y que regula la proliferación celular al inducir la expresión del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1, del inglés *Insulin Growth Factor-1*), fundamentalmente en el hígado, aunque en este contexto también tiene importancia el producido en el estroma mamario. El IGF-1 actúa junto con los estrógenos secretados por los ovarios, promoviendo la supervivencia y proliferación de las células epiteliales. La señalización de los estrógenos a través de su receptor ESR1 estimula la liberación del factor de crecimiento AREG, que induce la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, del inglés *Fibroblast Growth Factor*). El FGF, a su vez, estimula la proliferación de las células epiteliales luminales y la ramificación de los conductos (**Figura 2**). Otros factores, como TGF- $\beta$ 1, Reelin, Slit2 y Netrin1 también contribuyen a la formación de la arquitectura mamaria. La glándula mamaria madura y virgen se mantiene más o menos estable hasta el embarazo (con pequeños cambios a lo largo del ciclo menstrual) y está formada por una extensa red de ductos y brotes, conocidos como brotes alveolares en ratones y Unidades Ducto-Lobulillares Terminales (TDLUs, del inglés *Terminal Duct Lobular Units*) en humanos <sup>168</sup>.



**Figura 2. Desarrollo de la glándula mamaria durante la pubertad, el embarazo y la lactancia.** A la izquierda, procesos moleculares implicados en el desarrollo de la mama durante la pubertad bajo el control de las hormonas GH, IGF-1 y los estrógenos. A la derecha, procesos moleculares inducidos en la mama durante el embarazo y la lactancia bajo el control hormonal de la progesterona y la prolactina. GH, Growth Hormone (hormona del crecimiento). GHR, Growth Hormone Receptor (receptor de la hormona del crecimiento). IGF-1, Insulin Growth Factor-1 (factor de crecimiento similar a la insulina-1). IGF-1R, Insulin Growth Factor-1 Receptor (receptor del factor de crecimiento similar a la insulina-1). TEBs, Terminal End Buds (brotes finales terminales). ER+, Estrogen Receptor + (receptor de estrógenos +). PGR, Progesterone Receptor (Receptor de la progesterona). PRLR, Prolactin Receptor (Receptor de la prolactina). Figura modificada de Macías et al. <sup>168</sup>. Creada con BioRender.com.

En cada ciclo de embarazo la mama sufre profundos cambios que consisten en una hiperplasia e hipertrofia de los ductos, con mayor número de arborizaciones y alveolos, hasta formarse una glándula capaz de producir leche. Este proceso está controlado, principalmente, por las hormonas prolactina (PRL), producida en la adenohipófisis, y la progesterona, producida en los ovarios. La progesterona es responsable de la extensa ramificación lateral y la alveologénesis, necesarias para crear una glándula mamaria competente para la lactancia. Esta hormona, en combinación con la prolactina, también promueve la diferenciación de los alveolos, que sintetizan y secretan la leche durante la lactancia. Ambas hormonas regulan los programas transcripcionales que incluyen el control de la expresión de *Rankl*, que, de manera paracrina, estimula la proliferación al

regular al alza la expresión de genes diana como la Ciclina delta 1 (*Ccnd1*) o *Wnt4*. Por otra parte, la vía de señalización JAK2/STAT5 se activa por la acción del receptor de la prolactina (PRLR) y la señalización a través de esta vía culmina en la expresión de los genes de las proteínas de la leche, incluido el gen de la  $\beta$ -caseína (*Csn*) y el de la proteína ácida del suero (*WAP*, del inglés *Whey acidic protein*)<sup>168</sup>. La liberación de oxitocina durante la lactancia controla la captación de calcio, estimula la contractibilidad de las células mioepiteliales e induce la constricción mecánica de las células alveolares lumbinales para expulsar las gotas de leche hacia la luz de los alveolos y conducir las por los ductos hacia el pezón, sobre todo tras la estimulación del mismo con la succión ejercida por las crías<sup>169</sup> (**Figura 2**).

La falta de demanda de leche tras el destete, hace que ésta se estanque en el epitelio mamario y se inicie el proceso conocido como involución postlactancia, en el que la glándula se remodela y vuelve a un estado morfológico similar al previo del embarazo. Se trata de un proceso altamente controlado y dividido en dos etapas<sup>170</sup>.

## **4.2. Involución postlactancia de la glándula mamaria**

En los humanos, la involución postlactancia dura un promedio de 18 meses<sup>110</sup>, mientras que en roedores dura, aproximadamente, 10 días, y abarca dos fases principales, según su posible reversibilidad: la primera es la fase reversible, y la segunda, la irreversible<sup>170</sup>.

### **4.2.1. Fase reversible de la involución postlactancia**

La primera fase de la involución postlactancia es la fase reversible, que en el ratón dura las primeras 48 horas después del destete. Si se recobra el estímulo de succión, reintroduciendo a las crías, la mama puede producir de nuevo leche. Se caracteriza por un aumento en la muerte celular y la vía predominante en esta fase es la vía de muerte celular mediada por lisosomas (LCD), donde el factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) induce la permeabilización de la membrana lisosomal (LMP), lo que produce la liberación del contenido del lisosoma (proteasas, catepsinas) en el citosol y la muerte celular. Además, el aumento de la expresión del gen *Bax* proapoptótico, junto a la fosforilación y activación de factores de transcripción intracelulares como STAT3, y la desfosforilación e inactivación de otros, como STAT5a y STAT5b, aumentan la apoptosis en esta fase.

STAT3 se fosforila y activa gracias al factor inhibidor de la leucemia (LIF) y a la interleucina-6 (IL-6)<sup>171,172</sup>. Por el contrario, las proteínas STAT5 están inactivas en esta fase, porque su sobreexpresión durante la involución temprana activa la transcripción de *Akt1*, cuya proteína inhibe la señalización apoptótica de STAT3 y conduce a la supervivencia de las células mamarias<sup>173</sup>. En esta fase también hay una mayor producción de proteínas como la glicoproteína sulfatada-2 (SGP-2), la enzima convertidora de interleucina-1b (ICE) y el inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1 (TIMP-1), que inducen la apoptosis de las células epiteliales sin degradación de la matriz extracelular. Además, hay una expresión elevada de otras proteínas como el factor de crecimiento transformante  $\beta 3$  (TGF- $\beta 3$ ) y la interleucina-10 (IL-10). Esta última, induce TRAIL (del inglés *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) y DR4 (del inglés *Death receptor 4*) contribuyendo a la apoptosis de la etapa inicial<sup>174</sup>. Por último, durante esta fase, las células epiteliales viables actuarían como fagocitos “no profesionales” y serían, junto con los neutrófilos, las responsables de eliminar las células apoptóticas y los glóbulos de grasa de la leche<sup>175</sup> (**Figura 3**).

La importancia de estas moléculas en la involución se ha demostrado con numerosos modelos de ratón en los que la delección de *Bax*, *Il-6*, *IL-10*, *Stat3* retrasó la involución de la glándula mamaria, mientras que la delección de *Stat5a* o *Akt1* promovió una involución prematura<sup>100</sup>.

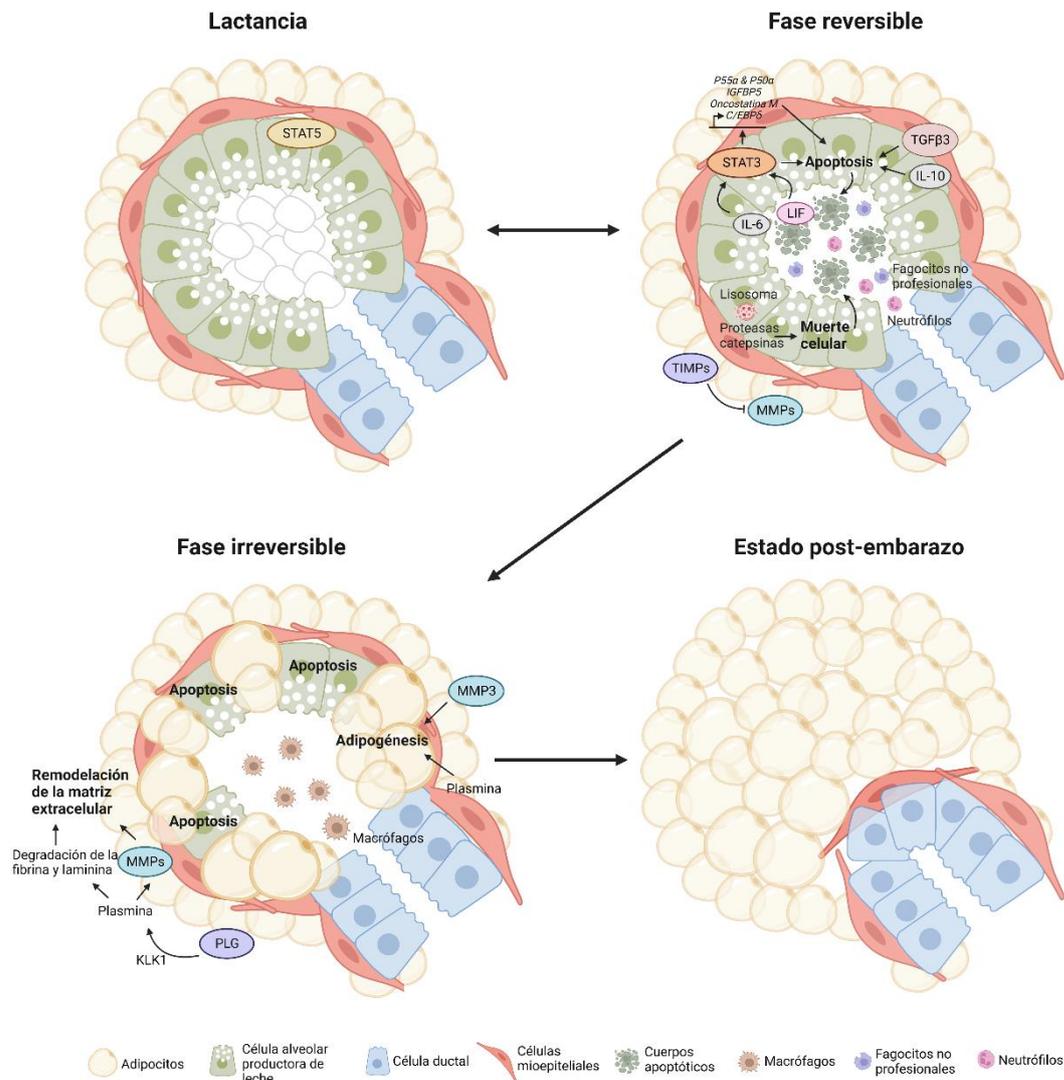
#### 4.2.2. Fase irreversible de la involución postlactancia

La segunda fase de la involución postlactancia es la fase irreversible y se caracteriza por producir cambios drásticos en la arquitectura de la glándula mamaria, incluida la remodelación de la membrana basal, el colapso de los alvéolos y la diferenciación de los adipocitos. Las moléculas más importantes que regulan estos procesos son miembros de las familias de las proteasas de serina y de las metaloproteinasas de matriz (MMP), que son responsables de activar el plasminógeno y descomponer la matriz extracelular, respectivamente, dando como resultados una segunda ola de apoptosis y la remodelación mamaria.

El plasminógeno (PLG), que se sintetiza en el hígado y circula como un zimógeno a través de la sangre, se activa a plasmina localmente en la glándula mamaria, gracias a la acción de la serín-proteasa caliceína (KLK1). La plasmina degrada directamente las proteínas

Introducción

de la matriz, como la fibrina y la laminina, y activa a las MMP, como MMP-3, MMP-9 y MMP-13, que se expresan principalmente en las células del estroma <sup>176</sup> (Figura 3). Las MMP remodelan la membrana basal al descomponer el colágeno existente en el espacio intersticial y, además, inducen una segunda ola de apoptosis de las células que no respondieron a las señales de muerte celular de la primera fase <sup>170</sup>.



**Figura 3. Cambios moleculares y tisulares que se producen durante el proceso de involución postlactancia.** TIMPs, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (inhibidores tisulares de las metaloproteinasas). MMPs, Matrix Metalloproteinases (metaloproteinasas de matriz). PLG, Plasminogen (plasminogeno). KLK1, Kallikrein-1 (calicreína). Modificada de Macias et al. <sup>168</sup> y Jena et al. <sup>174</sup>. Figura creada con BioRender.com.

En consonancia con lo expuesto, se ha demostrado que la expresión inducida de MMP-3 provoca una involución prematura, mientras que la supresión del plasminógeno produce un retraso en la remodelación de la glándula <sup>100</sup>. Durante esta segunda fase, los macrófagos se encargan de eliminar las células apoptóticas y los desechos celulares, y

favorecen el reclutamiento de otras células del sistema inmune <sup>175</sup>. Finalmente, de forma simultánea con la pérdida de epitelio mamario por apoptosis, los adipocitos circundantes se diferencian, en un proceso que requiere de la acción tanto de plasmina como de MMP3 <sup>170</sup>.

Se han descrito en la literatura diversos modelos animales modificados genéticamente, en los que los cambios genéticos inducidos alteran tanto la involución postlactancia como la susceptibilidad al cáncer de mama. De forma general, se ha observado que la susceptibilidad tumoral aumenta cuando la involución está retrasada y disminuye cuando la involución es prematura y más potente <sup>100</sup>.

Por otra parte, durante la involución se produce un estado proinflamatorio que puede crear un microambiente tumoral que promueva la transformación definitiva de células mamarias preneoplásicas, con mutaciones adquiridas. Esto explicaría el aumento del riesgo de cáncer de mama hasta unos 10 años después del embarazo. Además, la involución postlactancia, en presencia de enfermedad subclínica, puede aumentar el potencial metastásico de los tumores de mama que aparecen durante el embarazo <sup>177</sup>.

### **4.3. Estructura celular de la glándula mamaria**

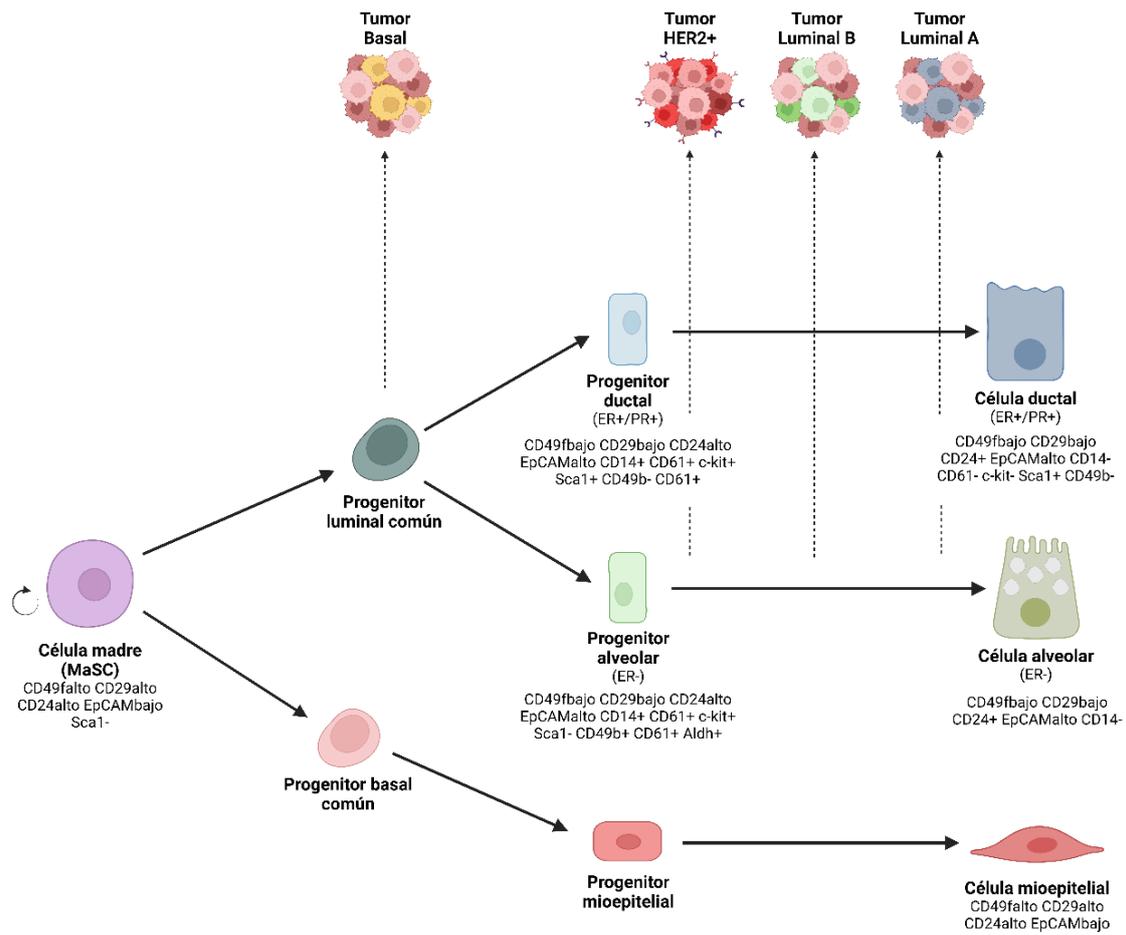
Las glándulas mamarias de la mujer adulta están compuestas por células epiteliales que crecen sobre una almohadilla de grasa, formada por adipocitos, e infiltrada por células endoteliales vasculares, fibroblastos y células del sistema inmune. Las células epiteliales se subdividen en múltiples tipos que, juntas, forman la estructura ramificada de la glándula mamaria y constituyen los alveolos secretores durante la lactancia. Se pueden distinguir dos compartimentos de células epiteliales principales: (i) el compartimento luminal, que es el formado por la capa celular interna, que está localizada hacia la luz o *lumen* de la estructura tubular del ducto, y (ii) el compartimento basal, que es la capa celular externa que rodea a las células luminales y que está en contacto con la membrana basal <sup>178</sup>. El linaje luminal, a su vez, se divide en células alveolares maduras, productoras de leche; células ductales, que recubren la luz de los ductos que van haciendo coalescencia en ductos cada vez más grandes hasta desembocar en el pezón; y, progenitores luminales, tanto alveolares como ductales.

## Introducción

Por otra parte, el compartimento basal está formado por células mioepiteliales, altamente contráctiles, que facilitan el movimiento de la leche a través de los conductos; progenitores mioepiteliales y células madre de la glándula mamaria (MaSC, del inglés *Mammary Stem Cells*). Estas últimas tienen una alta capacidad de autorrenovación, son las responsables de la gran expansión epitelial que sufre la mama en cada ciclo de embarazo y son capaces de generar todos los linajes epiteliales de la glándula mamaria gracias a su capacidad de diferenciación multipotente <sup>179,180</sup>.

Las subpoblaciones epiteliales se pueden diferenciar mediante el uso de la citometría de flujo y el marcaje de cada subpoblación con anticuerpos específicos fluorescentes (FACS, del inglés *Fluorescence-Activated Cell Sorting*). En ratones, las poblaciones luminales y basales se pueden diferenciar según la expresión de la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), la integrina  $\alpha 6$  (CD49f), el antígeno CD24 y la integrina  $\beta 1$  (CD29). Así, las células luminales muestran un fenotipo de expresión de EpCAM alto y CD49f bajo o CD24+ y CD29 bajo; al contrario que las células basales, que son EpCAM bajo y CD49f alto o CD24+ y CD29 alto. Las subpoblaciones de progenitores luminales o luminales maduros se pueden diferenciar según la expresión de la integrina  $\beta 3$  (CD61), cKit, Sca1, CD49b o CD14. Mientras que los progenitores luminales expresan CD61, cKit y CD14, las células luminales maduras son negativas para los tres marcadores. También se ha descrito que los progenitores luminales ductales que expresan ER/PR+ se caracterizan por la expresión de Sca1, así como las células ductales maduras, mientras que las células alveolares ER/PR-, no expresan este marcador <sup>179-182</sup> (**Figura 4**).

En los últimos años, se han hecho grandes esfuerzos para detectar la “célula de origen” de los diferentes subtipos de cáncer de mama. Se cree que los tumores enriquecidos en HER2 y los tumores luminales A y B surgirían de precursores luminales con diferente grado de diferenciación. Los tumores basales, en un primer momento, se creyó que surgirían de las MaCS, sin embargo, diferentes estudios han revelado que también se originarían en progenitores luminal aberrantes, con capacidad de autorrenovación, de donde surgirían este subtipo de tumores y, más concretamente, los asociados a mutaciones en *BRCA1* <sup>183,184</sup>.



**Figura 4. Representación esquemática de las subpoblaciones celulares del epitelio de la glándula mamaria y los marcadores que las identifican.** MaSC, Mammary Stem Cell (células madre de la glándula mamaria). Figura creada con Biorender.com. Adaptada de Cristea, S. et al.<sup>185</sup>, Visvader, J.E. et al.<sup>179</sup> y Fu, N. Y. et al.<sup>180</sup>

## 5. Dopamina y agonistas dopaminérgicos

### 5.1. Síntesis, mecanismo de acción y funciones de la dopamina

La dopamina es un neurotransmisor del grupo de las catecolaminas que se sintetiza principalmente en el sistema nervioso central (SNC), pero también se produce, aunque en menor medida, en los nervios simpáticos del sistema nervioso periférico, en la médula de las glándulas suprarrenales y en el páncreas. Su papel como neurotransmisor fue descrito en 1957 por Arvid Carlsson<sup>186</sup> que fue galardonado con el premio Nobel en Fisiología o Medicina en el año 2000 por sus investigaciones sobre la dopamina. Su función inhibitoria de la síntesis de prolactina la hace importante en el contexto del embarazo y la involución postlactancia.

### 5.1.1. Síntesis y metabolismo de la dopamina

La mayor parte de la síntesis de dopamina se produce directamente a partir del aminoácido tirosina, pero también se puede sintetizar indirectamente a partir de la fenilalanina<sup>187</sup>. En el citosol, la tirosina hidroxilasa (TH) convierte la tirosina en levodopa (L-DOPA o L-Dihidroxifenilalanina)<sup>188</sup>. Luego, la L-DOPA se convierte en dopamina mediante la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (DOPA descarboxilasa o AADC)<sup>189,190</sup>. Además, se ha descrito una ruta de biosíntesis alternativa, en la que la AADC convertiría la L-fenilalanina y la tirosina en feniletilamina y tiramina, respectivamente, y a partir de la tiramina, por acción de Cyp2D, se formaría la dopamina por oxidación<sup>191</sup>. Además de ser un neurotransmisor por sí mismo, la dopamina es el precursor de las catecolaminas adrenalina y noradrenalina en las células adrenérgicas y noradrenérgicas<sup>192,193</sup> (**Figura 5**).

En el SNC, después de la síntesis en las neuronas dopaminérgicas, la dopamina queda secuestrada en el interior de las vesículas presinápticas a través del transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT2)<sup>194</sup>. Debido a cambios en el potencial de membrana, la dopamina se libera a la hendidura sináptica por exocitosis. La dopamina extracelular puede unirse a los receptores postsinápticos ubicados en las dendritas y el soma o a los autorreceptores presinápticos ubicados en la neurona presináptica. Para detener su señalización, la dopamina extracelular puede degradarse o se produce su recaptación por las neuronas dopaminérgicas. La degradación de la dopamina se produce por las enzimas catecol-O metil transferasa (COMT), la monoamina oxidasa (MAO), la alcohol deshidrogenasa (ADH), la aldehído deshidrogenasa (ALDH) y la aldehído reductasa (AR)<sup>187</sup>. La recaptación, proceso por el que el transmisor liberado regresa a las terminaciones nerviosas presinápticas para reciclar las mismas moléculas, está mediada por el transportador de dopamina (DAT) o por los transportadores de monoamina (MAT)<sup>195</sup>.

### 5.1.2. Mecanismos de acción de la dopamina

Para ejercer sus acciones, la dopamina tiene que unirse a sus receptores, ubicados en la membrana plasmática de las respectivas células diana. Los receptores de la dopamina pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G o GPCR (del inglés *G protein coupled receptors*). Hasta el momento, se han descrito cinco subtipos diferentes de receptores de dopamina: D1, D2, D3, D4 y D5. Estos se dividen en dos grupos

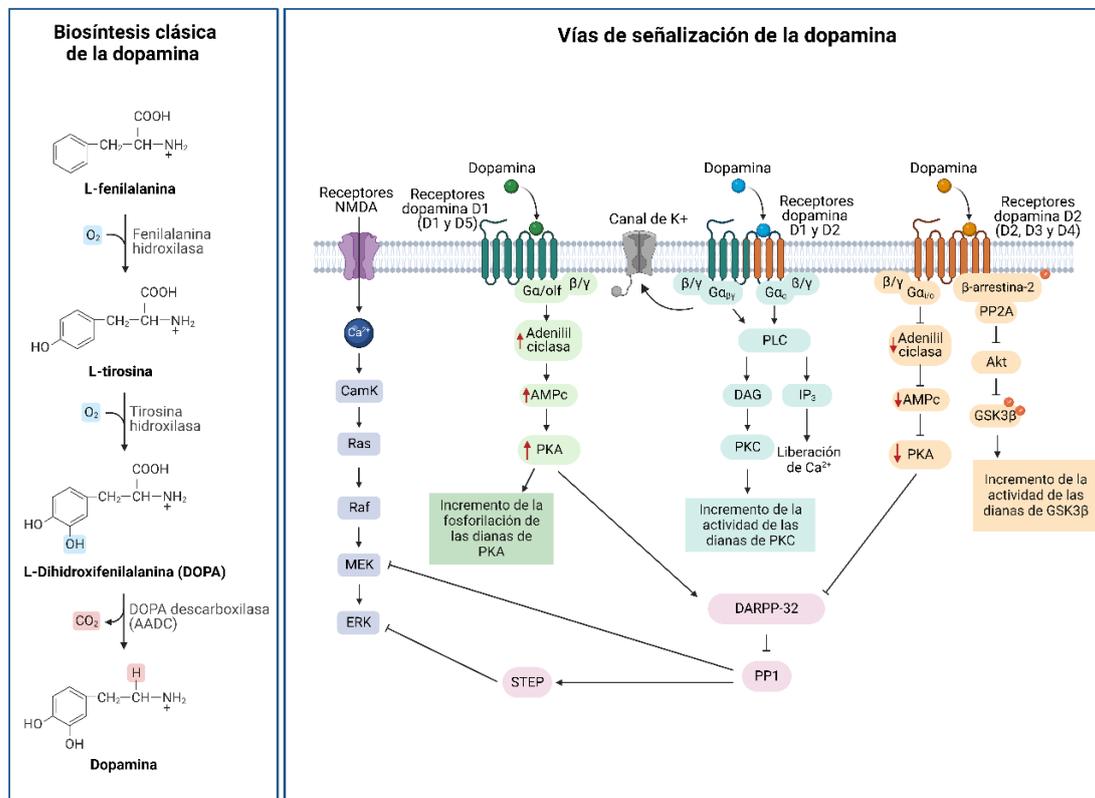
principales: los receptores de tipo D1 (D1 y D5) y los receptores de tipo D2 (D2, D3 y D4) <sup>196-201</sup>. Todos los receptores de la dopamina son metabotrópicos que conducen a la formación de segundos mensajeros, que desencadenan o bloquean la activación de vías de señalización celular específicas.

Al unirse a su receptor, la dopamina provoca respuestas intracelulares que dependen del tipo de receptor de dopamina que se activa. La señalización debajo del receptor de la dopamina implica principalmente a proteínas G; aunque, también pueden participar las vías de señalización independientes de las proteínas G <sup>202</sup>. Las proteínas G se componen principalmente de tres subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Tras la unión de la dopamina al GPCR, la subunidad  $\alpha$  se une al trifosfato de guanosina (GTP) y luego se disocia del complejo  $\beta\gamma$ . Tanto la subunidad  $\alpha$ /GTP como el complejo  $\beta\gamma$  pueden activar varios efectores corriente abajo. Cuando se produce la hidrólisis de GTP, la proteína G trimérica se vuelve a asociar y su actividad cesa temporalmente. Los receptores de tipo D1 se acoplan a la proteína  $G_{\alpha_s/olf}$ , activando la proteína adenilil-ciclase para producir niveles más altos del segundo mensajero AMPc, que estimula la actividad de la proteína quinasa A (PKA). En sentido contrario, los receptores de tipo D2, que se acoplan a la proteína  $G_{\alpha_i/o}$ , inhiben la adenilil-ciclase y reducen la concentración intracelular de AMPc que bloquea la actividad de la PKA. La PKA tiene varias dianas, como la proteína de unión a elementos de respuesta AMPc (CREB), los receptores de glutamato, los receptores de ácido gamma-amino butírico (GABA), los canales iónicos y una proteína denominada fosfoproteína neuronal regulada por AMPc y dopamina de 32KDa (DARPP-32). DARPP-32 inhibe a la proteína fosfatasa 1 (PP1), capaz de regular la vía MAPK/MEK/ERK. Además de regular la actividad de la adenilil-ciclase a través de  $G_{\alpha_s/olf}$  o  $G_{\alpha_i/o}$ , los receptores de dopamina también pueden acoplarse a la proteína  $G_{\alpha_q}$  y modular la fosfolipasa C (PLC). PLC cataliza la producción de trifosfato de inositol (IP3) y diacilglicerol (DAG), que aumentan los niveles intracelulares de calcio y activan la proteína quinasa C (PKC), respectivamente. PLC también puede ser activada por  $G_{\beta\gamma}$ , que, a su vez, activa la salida de potasio de la célula (**Figura 5**).

Además, los receptores D1 son capaces de activar ERK al interactuar con los receptores de glutamato NMDA. Por otra parte, los receptores D2 regulan la vía fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K)-AKT-glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). La unión de la dopamina al receptor D2 desencadena la formación de un complejo que consta de  $\beta$ -arrestina-2, AKT y PP2A. Esto permite que PP2A inactive a AKT a través de la desfosforilación. La AKT

## Introducción

inactivada no puede fosforilar sus sustratos, incluidas las dos isoformas de GSK3, GSK3 $\alpha$  y GSK3 $\beta$ , lo que hace que se activen constitutivamente promoviendo la división celular, la proliferación, la motilidad y la supervivencia<sup>203</sup> (**Figura 5**).



**Figura 5. Biosíntesis y mecanismo de acción de la dopamina.** A la izquierda, biosíntesis clásica de la dopamina. A la derecha, vías de señalización activadas por los diferentes receptores de la dopamina. Modificada de Meiser et al.<sup>187</sup> y Klein et al.<sup>203</sup>. Figura creada con BioRender.com.

### 5.1.3. Funciones de la dopamina

En el cerebro, la señalización de la dopamina está involucrada en funciones como el movimiento voluntario, la memoria, la atención y el aprendizaje. Además está implicada en la modulación del dolor, la recompensa, la motivación y la adicción a drogas<sup>204-206</sup>. También participa en la regulación de la secreción de la prolactina (PRL)<sup>207</sup>, de la hormona estimuladora del tiroides (TSH)<sup>208</sup>, de la hormona liberadora de gonadotropina (GRH)<sup>209</sup> y de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH)<sup>210</sup>.

El subtipo de receptor D2 es el que predomina en las células productoras de prolactina de la adenohipófisis<sup>211</sup>. Después de unirse la dopamina, aumenta rápidamente el potasio intracelular y se reduce la entrada de calcio, lo que inhibe la secreción de prolactina. Además, la reducción en los niveles de AMPc intracelulares suprimen la expresión del

gen *PRL*<sup>211</sup>. Durante la lactancia, es necesario que cese la inhibición de la secreción de prolactina que ejerce la dopamina para que la madre pueda producir la leche necesaria para el amamantamiento de las crías<sup>211</sup>. El estímulo de succión sobre el pezón que se produce durante la lactancia reduce la liberación de dopamina desde la vía tuberoinfundibular, que se origina en el núcleo arcuato del hipotálamo sobre la adenohipófisis, y ésta aumenta la producción y liberación de prolactina. El incremento de los niveles de prolactina circulante estimula la síntesis de leche en la mama<sup>207</sup>. Además, la secreción de prolactina se autorregula mediante un mecanismo de retroalimentación de ciclo corto, en el que los niveles elevados de prolactina aumentan la actividad del sistema tuberoinfundibular<sup>212,213</sup>. La prolactina aumenta progresivamente en la circulación sanguínea de la madre hacia el final del embarazo y su concentración plasmática llega a ser de 7 a 10 veces mayor que la de las mujeres no embarazadas. Estos altos niveles de prolactina son fundamentales para la preparación de la mama para el inicio de la lactancia, que está inhibida durante el embarazo por los altos niveles de progesterona<sup>214</sup>. Puesto que la dopamina es un regulador de PRL, se han desarrollado numerosos agonistas dopaminérgicos para tratar desórdenes hiperprolactinémicos y también para inhibir la lactancia en mujeres que no pueden o no quieren dar de lactar.

A nivel periférico, la dopamina que circula por el torrente sanguíneo, producida principalmente por los nervios simpáticos<sup>215</sup> y, en menor medida, por la glándula suprarrenal, participa en procesos fisiológicos como la regulación hormonal, las funciones cardiovasculares, la regulación del sistema nervioso simpático y del sistema inmunológico. Por ejemplo, en el páncreas, la dopamina inhibe la liberación de insulina<sup>216</sup>. A nivel renal, la dopamina es natriurética al inhibir la reabsorción de sodio en los túbulos renales, lo que influye en el control de la presión arterial<sup>217</sup>. En las glándulas suprarrenales, interviene en la regulación de catecolaminas desde la médula adrenal<sup>199</sup>. También inhibe la secreción del factor de von Willebrand procoagulante en las células endoteliales, relacionado con enfermedades coronarias y con trastornos de la hemostasia secundaria parecidos a la hemofilia<sup>218</sup>.

## **5.2. Enfermedades relacionadas con la dopamina**

El trastorno relacionado con la dopamina más conocido es la enfermedad de Parkinson, que se origina por una pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *sustancia negra pars*

*compacta*<sup>219</sup> y por la presencia de agregados intraneuronales llamados cuerpos de Lewy enriquecidos en  $\alpha$ -sinucleína<sup>220</sup>. La enfermedad de Huntington<sup>221</sup>, la esquizofrenia<sup>222,223</sup>, el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH)<sup>224</sup>, el síndrome de Gilles de la Tourette<sup>225</sup> y las adicciones<sup>226</sup> también se relacionan con problemas en la señalización de la dopamina, debido a una hiperactividad de las neuronas dopaminérgicas.

La hiperprolactinemia, definida como niveles en ayunas por encima de 20 ng/ml en hombres y por encima de 25 ng/ml en mujeres, es uno de los trastornos endocrinológicos más comunes del eje hipotalámico-pituitario. Los trastornos de la hipófisis (prolactinomas, enfermedad de Cushing, acromegalia, síndrome de la silla turca vacía), trastornos del SNC (tumores granulomatosos, trastornos hipotalámicos o metástasis tumorales) o enfermedades sistémicas (hipotiroidismo severo, tumores secretores de estrógenos, insuficiencia renal, cirrosis hepática o infección por virus herpes) son algunas de las causas patológicas del desarrollo de hiperprolactinemia<sup>227,228</sup>. Además, fármacos antidepresivos con actividad serotoninérgica, incluidos los inhibidores de la recaptación de serotonina, los inhibidores de la monoamino oxidasa y muchos tricíclicos pueden causar hiperprolactinemia, así como los antagonistas de los receptores de la dopamina, los opiáceos o los agentes que agotan la dopamina<sup>228</sup>. Por ello, para tratar la hiperprolactinemia se utilizan agonistas dopaminérgicos.

### **5.3. Desarrollo y función de los agonistas dopaminérgicos**

Tras el descubrimiento de que la administración de la levodopa, un precursor de la dopamina que puede atravesar la barrera hematoencefálica, producía una marcada mejoría sintomática en la enfermedad del Parkinson, la levodopa ha sido el tratamiento primario para esta enfermedad<sup>229,230</sup>. Sin embargo, la terapia con levodopa tiene efectos secundarios muy graves, que ocurren después de varios años de tratamiento, e incluyen discinesias y fluctuaciones motoras debido a la acumulación de dopamina periférica<sup>231</sup>. Los agonistas de la dopamina se desarrollaron originalmente como terapia complementaria al tratamiento más potente con levodopa. Además de usarse en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, los agonistas dopaminérgicos también se utilizan en el tratamiento de trastornos hiperprolactinérmicos, el síndrome de las piernas inquietas y en el tratamiento del síndrome de Cushing, por su papel inhibitorio en la síntesis de ACTH.

Los agonistas de la dopamina se clasifican entre ergolínicos (derivados del cornezuelo del centeno o modificaciones de síntesis de éstos) y no ergolínicos. Los ergolínicos incluyen la bromocriptina, cabergolina, pergolida y lisurida. Los agonistas no ergolínicos incluyen el pramipexol, ropinirol, rotigotina, piribedil y apomorfin. La bromocriptina fue el primer agonista dopaminérgico utilizado en la práctica clínica para el manejo de los prolactinomas. A la dosis de 2.5 a 15 mg diarios, normaliza los niveles de prolactina en el 80 al 90% de los pacientes con microprolactinomas y en, aproximadamente, el 70% de los que tienen macroprolactinomas disminuye el tamaño del tumor y mejora los defectos en el campo visual al disminuir la presión sobre el quiasma óptico. Sin embargo, la bromocriptina tiene efectos secundarios adversos que pueden impedir la administración de dosis terapéuticas. Por ello, la cabergolina, un agonista selectivo de los receptores D2 de la dopamina, con acción prolongada, se ha utilizado como un tratamiento muy eficaz de los micro y macroprolactinomas. Los efectos secundarios de la cabergolina son menos frecuentes y menos graves que los de la bromocriptina, por lo que se ha sustituido como tratamiento primario <sup>232,233</sup>.

#### **5.4. Cabergolina**

La cabergolina (N-[3-(Dimetilamino)propil]-N-[(etilamino)carbonil]-6-(2-propenil)-8-ergolin-8-carboxamida) es un alcaloide sintético derivado de la ergotamina. Se trata de un agonista dopaminérgico que actúa a nivel central, originando una supresión dosis-dependiente de los niveles de prolactina, gracias a su actividad agonista sobre los receptores de la dopamina de la hipófisis anterior. Por ello, se usa para tratar trastornos relacionados con el aumento de los niveles de la hormona prolactina en sangre (trastornos hiperprolactinéuticos), incluyendo la ausencia de la menstruación (amenorrea), menstruaciones muy espaciadas en el tiempo (oligomenorrea), ciclos menstruales sin ovulación (anovulación) y secreción de leche no asociada con el periodo de lactancia (galactorrea). Así mismo, la cabergolina está indicada en pacientes con tumores de la hipófisis secretores de prolactina (adenomas hipofisarios –microprolactinomas y macroprolactinomas), aumentos de prolactina sin causa conocida (hiperprolactinemia idiopática) o para tratar el síndrome de la silla turca vacía que cursa con hiperprolactinemia. Además, es un medicamento que se utiliza para inhibir la lactancia en aquellas mujeres que no quieren dar de lactar, o cuando la lactancia está contraindicada por razones médicas de la madre o del recién nacido, o después de dar a luz a un feto

muerto o después de un aborto tardío <sup>234</sup>. También se utiliza como segunda línea de tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en pacientes intolerantes o en los que no fue efectivo un compuesto no ergolínico en monoterapia o como tratamiento adyuvante de la levodopa más un inhibidor de la dopa-decarboxilasa <sup>235</sup>.

Además, se usa en veterinaria para inhibir la secreción de prolactina y acelerar la involución mamaria tras el cese del ordeño, reduciendo el riesgo de mastitis y mejorando el bienestar de las vacas <sup>236</sup>. En éstas se ha observado como la administración de una sola dosis en el denominado “momento del secado” aumenta la concentración de Na<sup>+</sup> y disminuye la concentración de K<sup>+</sup>, e incrementa la infiltración de células inmunes, los niveles de MMP-9 y la concentración de células epiteliales mamarias en las secreciones. Todo ello, sugiere un mayor potencial de proteólisis de los componentes de la matriz extracelular mamaria, una mayor permeabilidad y una mayor remodelación de las glándulas mamarias <sup>236,237</sup>.

A nivel molecular, la cabergolina es siete veces más selectiva por los receptores de tipo D2 (D2, D3 y D4) que la bromocriptina. La cabergolina se une con mayor afinidad al receptor D2, seguido del receptor D3 (con la mitad de afinidad que al receptor D2) y, por último, del receptor D4 (con una afinidad 12 veces menor). También tiene afinidad por los receptores dopaminérgicos D1 (aunque 80 veces menor), y, en menor medida, por los receptores serotoninérgicos 5-HT1 y 5-HT2, y los receptores adrenérgicos  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 <sup>238</sup>.

Es un fármaco bien tolerado como dosis única para inhibir la lactancia y la mayoría de los efectos secundarios informados son transitorios y de gravedad leve a moderada. Los efectos adversos más habituales son náuseas, dolor de cabeza y mareos, pero de corta duración, de resolución automática y dependientes de la dosis. Al contrario que la bromocriptina, cuyo uso para inhibir la lactancia ya no está indicado porque produce efectos secundarios potencialmente graves <sup>239</sup>.

## **6. Análogos de la somatostatina**

La somatostatina es una hormona sintetizada fundamentalmente en el hipotálamo, cuya principal función es regular negativamente la secreción de la hormona del crecimiento (GH) por la adenohipófisis. La GH, junto con el factor de crecimiento de la insulina 1 (IGF1) producido en el hígado, regulan el desarrollo fetal y el crecimiento en la

adolescencia<sup>240</sup>. Además, tienen un papel importante en el desarrollo de la morfogénesis ductal de la glándula mamaria<sup>241-244</sup>, así como en el desarrollo, evolución y pronóstico del cáncer de mama<sup>245-247</sup>. Se ha descrito que polimorfismos en genes del eje GH/IGF-1 y altos niveles circulantes de IGF-1 se asocian a un mayor riesgo de cáncer de mama<sup>248,249</sup>. Por el contrario, la presencia de los receptores de la somatostatina (*SSTR*, *Somatostatin Receptor*) se considera un factor de buena evolución en cáncer de mama, pues se asocia a una baja invasión y proliferación<sup>250-252</sup>.

Los efectos pro-apoptóticos y anti-proliferativos de la somatostatina sugirieron su utilización como droga terapéutica, pero su vida media es muy corta. Los análogos sintéticos de la somatostatina (*SSA*, del inglés *Somatostatin Analogues*) se desarrollaron para prolongar la vida media de la somatostatina y, con ello, su actividad biológica. El octreotide, fue el primer análogo sintético desarrollado, y se usa para el tratamiento de la acromegalia y de la diarrea severa asociada a tumores carcinoides y tumores neuroendocrinos pancreáticos secretores de polipéptidos intestinales vasoactivos (VIP)<sup>253</sup>. El segundo *SSA* sintetizado fue el lanreotide, que se usa para el tratamiento de tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos irresecables, localmente avanzados o metastásicos y para el tratamiento del síndrome carcinoide<sup>254,255</sup>. El pasireotide (*SOM230*) es un análogo de segunda generación, aprobado para el tratamiento de la acromegalia, el síndrome de Cushing y tumores carcinoides metastásicos refractarios o resistentes al octreotide<sup>256</sup>. Se caracteriza por unirse con alta afinidad a cuatro de los cinco receptores de la somatostatina (*SSTR1*, *SSTR2*, *SSTR3* y *SSTR5*)<sup>257</sup>. Se ha descrito que la administración de pasireotide en mujeres con hiperplasia atípica mamaria disminuyó la proliferación y aumentó la apoptosis en lesiones pre-malignas<sup>258</sup>. Así mismo, en ratas hipofisectomizadas y ooforectomizadas a las que se administró GH y estrógenos para inducir hiperplasia en los ductos mamarios, se observó una reducción en el número y el tamaño de los conductos hiperplásicos tras administrar pasireotide<sup>259</sup>.

## **7. Prevención del cáncer de mama**

### **7.1. Quimioprevención actual del cáncer de mama**

Actualmente, la medida más eficaz para reducir el riesgo de cáncer de mama en mujeres portadoras de una mutación en la línea germinal en genes de alta penetrancia, como *BRCA1* y *BRCA2*, es la mastectomía bilateral con doble ooforectomía. La amputación de

ambos pechos se asocia con una reducción del riesgo de hasta el 95%, sin embargo, las implicaciones físicas y psicológicas para la mujer que se somete a dicha operación pueden ser muy grandes <sup>260,261</sup>.

Otras opciones de prevención del cáncer de mama para mujeres con un incremento del riesgo de desarrollar esta enfermedad, es la quimioprevención. Dos medicamentos de la familia de los moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM, por sus siglas en inglés *Selective Estrogen Receptor Modulators*), tamoxifeno y raloxifeno, están aprobados por la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) para prevenir el cáncer de mama en mujeres de alto riesgo. También se han propuesto, con más limitaciones, los inhibidores de la aromatasas (exemestano y anastrozol), pero aún no han recibido la aprobación de la FDA.

La aprobación del tamoxifeno para la quimioprevención se aceleró en base a los resultados del *Estudio Prevención-1 del Proyecto Nacional de Cirugía Adyuvante de Mama e Intestino* (NSABP-P1). En este estudio se asignó aleatoriamente el recibir tamoxifeno (20 mg/día) o placebo durante 5 años, a un total de 13.388 mujeres con un riesgo de cáncer de mama de, al menos, el 1.66 y con antecedentes de carcinoma *in situ*. El tratamiento con tamoxifeno redujo el riesgo de cáncer de mama invasivo en un 49%, en mujeres premenopáusicas y postmenopáusicas, para tumores ER-positivos <sup>262</sup>. El ensayo IBIS-I, posterior, también mostró una reducción estadísticamente significativa en el riesgo de cáncer de mama ER-positivo, que se mantuvo más de diez años tras la finalización del tratamiento, pero no se observó reducción en el riesgo de tumores ER-negativos <sup>263</sup>. Sin embargo, los efectos secundarios del tamoxifeno son frecuentes y muy molestos, incluyendo síntomas menopáusicos (sofocos y sudoración nocturna), por lo que en muchas ocasiones la adherencia al tratamiento por parte de las mujeres no es fácil y el 40% lo abandonan. Además, también produce un aumento del riesgo de eventos tromboembólicos y un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de endometrio <sup>264,265</sup>. En el caso del raloxifeno, inicialmente aprobado para el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica, se observó una reducción del 76% del riesgo de cáncer de mama en aquellas mujeres que tomaron dicho fármaco durante cuatro años, con una reducción de hasta un 66% en la incidencia de cáncer de mama invasivo tras ocho años de tratamiento, pero solo es eficaz en mujeres postmenopáusicas <sup>266-268</sup>. El raloxifeno produce un menor riesgo de desarrollo de eventos tromboembólicos y de cáncer de endometrio que el tamoxifeno <sup>269</sup>; pero los efectos secundarios dependen de la edad, de la etnia o de la

presencia previa de histerectomía. Por ello, se han publicado tablas de riesgo-beneficio para ambos medicamentos que pueden ayudar a identificar el grupo de mujeres postmenopáusicas en el que los beneficios de la terapia superan a los riesgos <sup>270</sup>. La búsqueda de un nuevo fármaco para la quimioprevención con un perfil beneficio-riesgo más favorable condujo al descubrimiento de lasofoxifeno, un SERM de tercera generación con mayor potencia. Tras cinco años de tratamiento, el riesgo de cáncer de mama en total (incluido el carcinoma *in situ*) y de cáncer de mama invasivo se redujo en un 79% y 83%, respectivamente, en comparación con el grupo placebo <sup>271</sup>. Sin embargo, el lasofoxifeno no está aprobado aún por la FDA.

Los inhibidores de la aromatasas también han resultado eficaces para disminuir el riesgo de cáncer de mama ER+ en mujeres postmenopáusicas, aunque no están aprobados por la FDA. El exemestano, en comparación con el placebo, es capaz de reducir hasta un 65% el riesgo anual de cáncer de mama invasivo <sup>272</sup>; mientras que el anastrozol lo hace en un 49% <sup>273,274</sup>. Presentan menos efectos secundarios que los SERM, aunque pueden aumentar el desarrollo de osteoporosis y fracturas óseas y están contraindicados en la quimioprevención en mujeres premenopáusicas <sup>274</sup>.

Actualmente, hay diversos ensayos clínicos con diferentes fármacos (bifosfonatos, retinoides, moduladores del receptor de progesterona, metformina y anti-RANKL) para evaluar su utilidad en la quimioprevención del cáncer de mama <sup>275</sup>.

## **7.2. Herramientas para la estimación del riesgo de cáncer de mama**

Además de los métodos quimiopreventivos actuales, se han desarrollado una amplia variedad de herramientas para evaluar el riesgo de desarrollar cáncer de mama, basadas tanto en el estado de la mutación de los genes *BRCA*, como en factores clínicos e histopatológicos. La herramienta de evaluación de riesgo de cáncer de mama BCRAT (*Breast Cancer Risk Assessment Tool*, por sus siglas en inglés) o *Gail's score* es la herramienta más utilizada para estimar el riesgo de una mujer de desarrollar cáncer de mama durante los próximos 5 años y hasta los 90 años (riesgo de por vida). Utiliza el historial médico y reproductivo de la mujer y el historial de cáncer de mama entre sus parientes de primer grado (madre, hermanas e hijas) para estimar el riesgo absoluto de cáncer de mama <sup>276</sup>. Se utiliza en mujeres mayores de 35 años y se considera que las personas con un riesgo a 5 años mayor de 1.66 tienen un riesgo elevado y, por lo tanto,

serían candidatas a recibir quimioprevención. Aunque dado el riesgo-beneficio, sólo habría certeza para administrar la quimioprevención a mujeres con una puntuación del riesgo superior a 3<sup>277</sup>. Otra herramienta de estimación de riesgos es el método de Tyrer-Cuzick, que calcula la probabilidad de que una mujer desarrolle cáncer de mama dentro de los siguientes 10 años y a lo largo de toda su vida, considerando antecedentes personales y familiares entre parientes de primer y segundo grado<sup>278</sup>. Aquí, las mujeres con un riesgo de por vida de más del 20% se consideran de alto riesgo. Sin embargo, estos métodos para definir el riesgo tienen deficiencias y pueden infra o sobreestimar el riesgo de cáncer de mama. Son muy eficaces para estimar el riesgo a nivel poblacional pero no tanto el individual<sup>279,280</sup>. En los últimos años, los nuevos algoritmos de inteligencia artificial de “*deep learning*” y “*machine learning*” están siendo aplicados sobre técnicas de imagen como la mamografía, la ecografía y la resonancia magnética, para predecir de una forma más ajustada el riesgo de cáncer de mama<sup>281-283</sup>. Con ello, se van a poder identificar mejor a las mujeres susceptibles de desarrollar cáncer de mama y, por tanto, se espera un incremento de las demandas de quimioprevención.

A pesar de las mejoras en las técnicas de evaluación del riesgo del cáncer de mama, actualmente no se encuentran implementadas en la práctica clínica habitual. Además, no hay una estrategia de quimioprevención completamente eficaz y sin efectos adversos potencialmente graves. También hay una serie de barreras que impiden la implementación de la quimioprevención, como son los problemas con la adherencia al tratamiento por parte de las mujeres y la frecuente falta de familiaridad e información inadecuada sobre las principales opciones por parte del profesional clínico<sup>280</sup>. Por ello, apremia la necesidad de encontrar nuevas estrategias de quimioprevención, con menos efectos secundarios y más accesibles a toda la población femenina susceptible de desarrollar cáncer de mama.





## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. Modelos experimentales *in vivo*

### 1.1. Modelos de ratón de cáncer de mama

#### 1.1.1. Modelo K14-Cre; *Brcal*<sup>ff</sup>; *P53*<sup>ff</sup>

El modelo de ratón K14-Cre; *Brcal*<sup>ff</sup>; *P53*<sup>ff</sup> es un doble *knock-out* condicional de tejido. Fue desarrollado por el laboratorio del Dr. Jos Jonkers, del *Netherland Cancer Institute*<sup>286,287</sup>, y fue cedido a nuestro grupo. Se trata de un ratón que pierde la expresión de los genes *Brcal* y *P53* debido a la acción de la recombinasa Cre, cuya expresión está controlada por el promotor del gen de la citoqueratina 14 (CK14 o K14). En este modelo, el gen *Brcal* tiene insertadas dos secuencias de nucleótidos *LoxP* en los intrones 3 y 13. *P53*, por su parte, tiene las secuencias *LoxP* en los intrones 1 y 10. La recombinasa Cre reconoce esas secuencias *LoxP* y deletiona el fragmento de DNA comprendido entre ambas secuencias. Así, aquellas células que expresan K14, y que son principalmente las células epiteliales de la glándula mamaria y de la piel, y sus descendientes, tienen deletionado los genes *Brcal* y *P53* en sus dos alelos. Los productos de estos alelos son proteínas truncadas no funcionales.

La delección de *Brcal* y *P53* ocurre aproximadamente entre el 5 y el 30% de células epiteliales de la mama<sup>286,287</sup>. Estos ratones desarrollan tumores de mama con un 100% de penetrancia, con una mediana de aparición de siete meses. Estos tumores remedan los tumores humanos *triple negativos* con mutación en *BRCA1*, pues no expresan el receptor de estrógenos, expresan marcadores epiteliales basales, tienen un patrón de crecimiento sólido y son de alto grado. Puesto que la K14 también se expresa en las células epiteliales de la piel, estos ratones también desarrollan carcinomas epidermoides cutáneos.

El ratón se generó en un fondo genético FVB/N y, a partir de aquí, se denominará modelo deficiente en *Brcal/P53*.

#### 1.1.2. Modelo RFP; K14-Cre; *Brcal*<sup>ff</sup>; *P53*<sup>ff</sup>

El modelo de ratón RFP; K14-Cre; *Brcal*<sup>ff</sup>; *P53*<sup>ff</sup> se obtuvo del cruce entre el modelo *Brcal/P53*, anteriormente descrito, con el ratón *reporter* C57BL/6-Gt(ROSA)26<sup>tm1Hjf</sup><sup>288</sup>. Este ratón fue generado por el grupo del Dr. Fehling en el Instituto de Inmunología de la Universidad Clínica de Ulm en Alemania, y fue obtenido por nuestro grupo del repositorio INFRAFRONTIER/EMMA. Se trata de un ratón *knock-in* que expresa la

proteína roja fluorescente (RFP, del inglés *Red Fluorescence Protein*) bajo el promotor del locus ROSA26. ROSA26 es un *locus* muy utilizado para la expresión de genes de forma ubicua y constitutiva en ratones. En este modelo, el *locus* tiene en el extremo 5' un codón de *stop* flanqueado por dos secuencias de nucleótidos *LoxP*. Cuando la recombinasa Cre reconoce esas dos secuencias, deleciona el fragmento que contiene el codón de *stop*, lo que permite la síntesis de la proteína RFP. Tras el cruce con el modelo *Brcal/P53*, aquellas células que expresan K14 y que pierden la expresión de *Brcal* y *P53* por la acción de la recombinasa Cre, a su vez, también expresan la proteína RFP. Esta proteína emite fluorescencia, lo que permite detectar específicamente las células que tienen los dos genes de interés delecionados mediante citometría de flujo o inmunohistoquímica.

El ratón *reporter* C57BL/6-Gt(ROSA)26<sup>tm1Hjf</sup> se generó en el fondo genético C57BL/6. El modelo obtenido al cruzar este ratón con el ratón *Brcal/P53* posee un fondo genético FVB y C57BL/6, en grado variable. A partir de ahora, a este modelo se le denominará modelo RFP.

## 1.2. Grupos de estudio

Los ratones se dividieron en diferentes grupos de estudio:

- *Nulíparas*: ratones hembra que no tuvieron ningún embarazo.
- *Nulíparas tratadas con cabergolina en monodosis* (nulíparas cabergolina, de aquí en adelante): ratones hembra que no tuvieron ningún embarazo y a las seis semanas de edad se les administró cabergolina por vía intraperitoneal a una dosis de 0.25 mg/Kg.
- *Nulíparas tratadas con cabergolina en régimen de tratamiento crónico* (nulíparas cabergolina crónico, de aquí en adelante): ratones hembra que no tuvieron ningún embarazo y a las seis semanas de edad se les administró cabergolina por vía intraperitoneal a una dosis de 0.25 mg/Kg. A partir de ese momento, recibieron la misma dosis cada 15 días.
- *Múltiparas sin lactancia*: ratones hembra que tuvieron dos embarazos no seguidos de lactancia. Estos ratones se pusieron en cruce a las seis semanas de edad. Tras el parto, se retiraron las crías para no permitir la lactancia.

- *Múltiparas con lactancia*: ratones hembra que tuvieron dos embarazos seguidos de sus dos respectivos periodos de lactancia. Estos ratones se pusieron en cruce a las seis semanas de edad. Tras cada uno de los dos partos, tuvieron un periodo de lactancia de 21 días.
- *Múltiparas con lactancia tratadas con cabergolina* (múltiparas con lactancia cabergolina o cabergolina, de aquí en adelante): ratones hembra que tuvieron dos embarazos seguidos de sus dos respectivos periodos de lactancia. Tras el segundo periodo de lactancia, se les administró cabergolina por vía intraperitoneal a una dosis de 0.25 mg/Kg.
- *Múltiparas con lactancia tratadas con cabergolina y pasireotide-LAR* (múltiparas con lactancia cabergolina + pasireotide o múltiparas con lactancia con tratamiento combinado, de aquí en adelante): ratones hembra que tuvieron dos embarazos seguidos de sus dos respectivos periodos de lactancia. Tras el segundo periodo de lactancia, se les administró cabergolina de forma intraperitoneal a una dosis de 0.25 mg/Kg y, diez días después, se les administró pasireotide-LAR (forma de liberación lenta o *Long Acting Release*) a una dosis de 40 mg/Kg por vía subcutánea. Tras ello, se continuó con la administración de pasireotide cada 28 días.

Los ratones se dividieron en dos cohortes de estudio con diferente evolución temporal:

- *Cohorte longitudinal*: se generó para evaluar en cada grupo de estudio los patofenotipos de susceptibilidad al cáncer de mama y de evolución tumoral (ver sección 2 de material y métodos), así como variables moleculares y celulares asociadas a la aparición y evolución de la enfermedad, que pudieran estar implicadas en el diferente comportamiento de la misma.

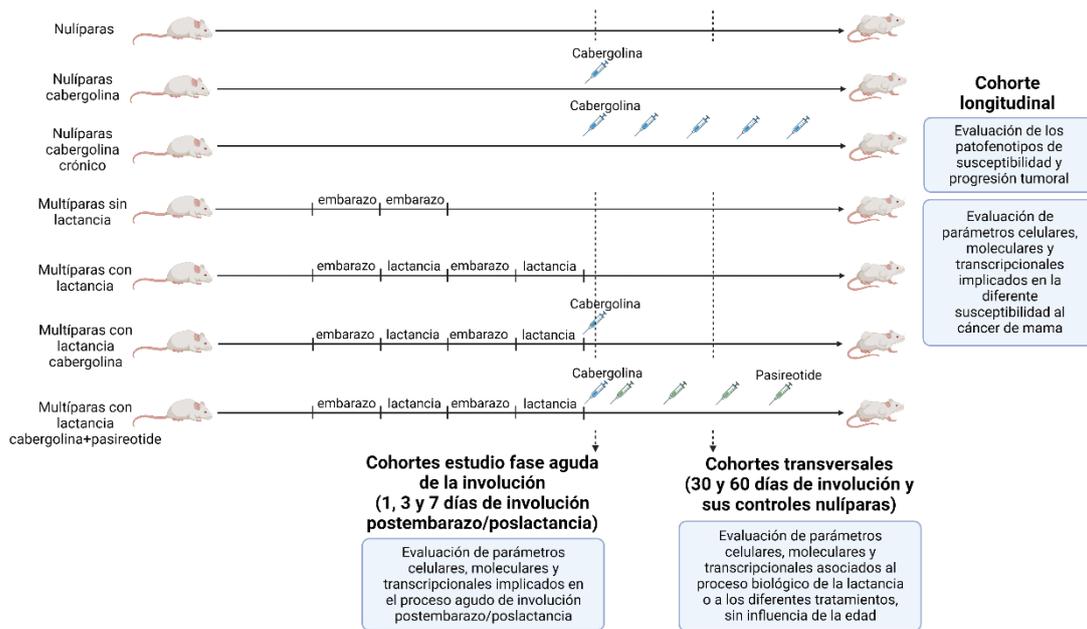
Los ratones de esta cohorte se sacrificaron cuando el tumor de mama alcanzó 25 mm en su diámetro mayor, si un tumor de piel superó 1 cm de diámetro, o cuando el deterioro del ratón fue evidente y obligó a su sacrificio. Los ratones que formaron esta cohorte fueron: (i) nulíparas (N=35); (ii) nulíparas cabergolina (N=37); (iii) nulíparas cabergolina crónico (N=28); (iv) múltiparas sin lactancia (N=33); (v) múltiparas con lactancia (N=32); (vi) múltiparas con lactancia cabergolina (N=37) y (vii) múltiparas con lactancia cabergolina + pasireotide (N=32).

## Material y métodos

- *Cohorte transversal*: se generó para valorar cambios tisulares, celulares y moleculares inducidos a largo plazo por el embarazo, por la lactancia o por el tratamiento, sin estar influenciados por la edad. Para ello, se sacrificaron ratones a 30 y 60 días de involución postlactancia o involución postembarazo de los grupos anteriores: multíparas sin lactancia, con lactancia, tratadas con cabergolina y tratadas con tratamiento combinado; y además se incluyeron ratones nulíparas de la misma edad (se especifica en cada experimento). El número de ratones de cada grupo de estudio fue de 4 a 6 y se detallan en los experimentos correspondientes.
- *Cohorte para el estudio de la fase aguda de la involución postlactancia*: esta cohorte se generó para estudiar diferentes parámetros celulares y moleculares asociados a la fase aguda de la involución postlactancia y postembarazo. Para ello, se sacrificaron ratones de los grupos de multíparas sin lactancia, con lactancia y multíparas con lactancia tratadas con cabergolina a 1, 3 y 7 días de involución. El número de ratones de cada grupo de estudio de la cohorte transversal fue de 5 a 7 y se detallan en los experimentos correspondientes.

Todos los grupos de ratones y cohortes se muestran en la **Figura 6**. Los estudios de la cohorte longitudinal únicamente se realizaron con el modelo de ratón *Brcal/P53*. Los estudios a 1, 3, 7, 30 y 60 días de involución se realizaron con el modelo *Brcal/P53* y los estudios de citometría a 60 días de involución se realizaron con el modelo de ratón RFP. También se realizaron estudios en ratones *wild type* a 1, 3, 7, 30 y 60 días de involución.

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



**Figura 6. Esquema ilustrativo de los diferentes grupos y cohortes de ratones estudiados. Figura creada con BioRender.com.**

### 1.3. Administración del fármaco

Se administró cabergolina por vía intraperitoneal a una dosis de 0.25 mg/Kg de ratón en suero salino (agua + 0.9% de NaCl) al 0.25% de metilcelulosa. Esta dosis es equivalente a la utilizada en humanos para inhibir la lactancia <sup>235,289</sup>. La cabergolina (*Cabergoline*, #C0246, *Sigma Aldrich*) se disolvió en 1 ml de etanol al 100% y se conservó a -20°C a una concentración de 10 mg/ml. Para la preparación de la solución salina al 0.25% de metilcelulosa, se disolvieron 500 mg de metilcelulosa (#M7140, *Sigma Aldrich*) en 100 ml de agua, en agitación y llevando el agua a ebullición en una placa calefactora. A continuación, se diluyeron, en otros 94 ml de agua, 6 ml de NaCl 5M, obteniendo suero salino al 1.8% de NaCl. Se mezclaron los 100 ml de metilcelulosa con los 100 ml de salino y se enrasó hasta 200 ml, consiguiendo una dilución de salino 0.9% de NaCl al 0.25% de metilcelulosa. Este diluyente se conservó a -20°C.

A un ratón de 30 gramos de peso se le inyectaron 50 µl de solución de inyección (7.5 µg de cabergolina en 50 µl de suero salino con metilcelulosa o 0.15 mg/ml). En el momento de la inyección, se pesó al ratón y se realizaron los cálculos para administrar la cantidad correspondiente, para una dosis de 0.25 mg/Kg de ratón. Se mezcló la cabergolina diluida en etanol con el suero salino al 0.25% de metilcelulosa y se inyectó con jeringuillas de insulina de 29G (*Myjector U-100 insulin*, #BS05M2913, *Terumo*) por vía intraperitoneal

## Material y métodos

bajo anestesia con isoflurano (*Vetflurane*, #575837-4, *Virbac*) en campana de flujo laminar.

El fármaco Pasireotide-*Long Acting Release* (Pasireotide-LAR o Signifor-LAR), cedido por Novartis, se administró por vía subcutánea a una dosis de 40 mg/Kg cada 28 días, a una concentración del fármaco de 20 mg/ml<sup>290</sup>. El fármaco se administró diluido en D-manitol, carboximetilcelulosa sódica y poloxámero 188. Para preparar el diluyente, se disolvieron en agua destilada 700 mg de carboximetilcelulosa sódica (#21902, *Sigma Aldrich*), 4.5 gramos de D-manitol (#M4125, *Sigma Aldrich*) y 400 mg de poloxámero 188 (*Kolliphor P188*, #15759, *Sigma Aldrich*). A un ratón de 30 gramos, se le administraron 60 µl de solución de inyección (1.2 mg de pasireotide en 60 µl de diluyente o 20 mg/ml). Previo a la administración del fármaco, se pesó cada ratón para ajustar los cálculos. La administración fue por vía subcutánea con una jeringuilla y aguja estériles (*ICO plus 3 Tuberculina 0.5 x 16*, #N14085, *Peroxfarma*) bajo anestesia con isoflurano (*Vetflurane*, #575837-4, *Virbac*) en campana de flujo laminar.

## 2. Evaluación de la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama

Los ratones de los distintos grupos fueron revisados dos veces por semana por el mismo observador, para detectar la aparición de tumores de mama mediante palpación y para valorar el estado físico de los animales. Una vez apareció el tumor de mama, se evaluó semanalmente el crecimiento del mismo mediante el uso de un calibre digital, con el que se midieron los diámetros mayor y menor. Para evaluar la susceptibilidad y evolución del cáncer de mama, se tuvieron en cuenta diferentes patofenotipos.

Patofenotipos de susceptibilidad tumoral:

- *Latencia tumoral*: se definió como el tiempo transcurrido entre el nacimiento del ratón y la aparición del primer tumor de mama.
- *Incidencia tumoral*: se definió como el porcentaje de ratones de un grupo que desarrollaron tumor de mama con respecto al total de ratones de ese grupo.
- *Multiplicidad tumoral*: es el porcentaje de ratones de un grupo que desarrollaron dos o más tumores de mama con respecto al total de ratones que desarrollaron tumor de mama en ese grupo.

- *Número absoluto de tumores*: es el número total de tumores de mama observados en el momento de la necropsia en cada uno de los ratones de cada grupo.

Patofenotipos de evolución tumoral:

- *Duración de la enfermedad*: se definió como el tiempo transcurrido entre la aparición del primer tumor de mama y la eutanasia del ratón.
- *Supervivencia*: se definió como el tiempo transcurrido entre el nacimiento del ratón y su sacrificio. Corresponde, por tanto, a la suma del tiempo de latencia tumoral más el tiempo de duración de la enfermedad en aquellos ratones que desarrollaron tumor.
- *Tasa de crecimiento tumoral*: se definió como la pendiente de la recta que se ajusta tras representar el volumen tumoral semanal en escala logarítmica respecto del tiempo en escala lineal. El volumen tumoral de cada semana se calculó mediante la siguiente fórmula <sup>291</sup>:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = \frac{\text{Diámetro mayor (mm)} \times \text{Diámetro menor}^2 \text{ (mm}^2\text{)}}{2}$$

- *Incidencia de metástasis pulmonares*: se definió como el porcentaje de ratones con tumor de mama de un grupo que desarrollaron metástasis pulmonares con respecto al total de ratones con tumor de mama pertenecientes a ese grupo. Para evaluar las metástasis pulmonares, se utilizó una lupa de mesa binocular (*Zeiss Stemi 2000*). Primero, se separaron los cinco lóbulos pulmonares (cuatro en el pulmón derecho y uno en el izquierdo) con ayuda de pinzas y bisturí. A continuación, se observaron los diferentes lóbulos bajo el objetivo 10X y se contaron las metástasis por dos observadores diferentes.
- *Multiplicidad de metástasis pulmonares*: se definió como el porcentaje de ratones de un grupo que desarrollaron dos o más metástasis pulmonares con respecto al total de ratones que las desarrollaron.

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

#### **3.1. Necropsia y extracción de los tejidos**

Los ratones se sacrificaron cuando algún tumor de mama alcanzó los 25 mm en su diámetro mayor (cohorte longitudinal), en la fecha convenida según el experimento (cohortes transversales) o cuando el animal mostró signos de deterioro físico o de enfermedad avanzada (como taquipnea, pelo erizado, pérdida del 25% del peso inicial, ulceración del tumor, inflamación cutánea que impedía la toma del alimento o tumor escamoso de piel de 1 cm). La eutanasia de los ratones se realizó mediante el método de dislocación cervical precedida de anestesia con isoflurano (*Vetflurane*®, #575837-4, *Virbac*) en habitaciones alejadas del resto de animales de experimentación en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

La necropsia se llevó a cabo con el material quirúrgico necesario debidamente esterilizado. Del animal se extrajo la cuarta mama inguinal derecha para incluir en parafina y realizar los estudios histológicos. El resto de mamas se destinó a la obtención de organoides (ver apartado 3.3 de esta sección de material y métodos). También se recogieron todos los tumores desarrollados por los ratones (tanto de mama como de piel). Cada tumor se dividió en dos mitades, una mitad se incluyó en parafina para estudios histopatológicos y la otra mitad se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C. También se extrajeron los pulmones, donde se evaluaron las metástasis pulmonares, y después se incluyeron en parafina. Además, se extrajeron el hígado, bazo, páncreas, riñones y corazón, de los que una mitad del órgano se incluyó en parafina y la otra mitad se congeló en nitrógeno líquido.

#### **3.2. Procesamiento de los tejidos**

Antes de la inclusión de los órganos y tumores en parafina, éstos se mantuvieron 24 horas inmersos en paraformaldehído (PFA) al 3.7%, tamponado con metanol (#29121100, *PanReac AppliChem*), a temperatura ambiente. Posteriormente, se cambiaron las muestras a una solución de etanol al 70%, y se mantuvieron a 4°C hasta su tallado. Los órganos se tallaron, es decir, se seccionaron de forma correcta cada uno de ellos, y se introdujeron en un casete histológico (#44141, *DeltaLab*) para su procesamiento.

El procesamiento de los tejidos se realizó en un procesador automático (*Excelsior™ ES Tissue Processor*, #A78400006, *Thermo Scientific™*), que permite ir adicionando diferentes reactivos para sustituir el agua intersticial de la muestra por parafina. De forma resumida, las muestras fueron deshidratadas mediante tres incubaciones de 1 hora en concentraciones crecientes de etanol (70%, 80% y 90%) y una incubación de 3 horas en etanol al 100%. A continuación, se realizaron otras tres incubaciones de 1 hora en xilol, para sustituir al agente deshidratante por una sustancia miscible en parafina, en un proceso conocido como aclaramiento. Finalmente, los alcoholes fueron sustituidos por parafina al incubar la muestra durante 4 horas en parafina líquida, quedando los intersticios de los tejidos fijados y la muestra endurecida en su totalidad.

A continuación, se construyó un bloque de parafina, con los órganos correctamente orientados, mediante un molde adecuado y un dispensador de parafina caliente, en una estación de inclusión en parafina. Cuando se obtuvo un bloque de parafina completamente frío, se realizaron cortes del tejido de 2 µm de grosor, mediante un microtomo manual de rotación (*Leica RM2255*). Los cortes se introdujeron en un baño con agua a 50°C, para estirar el fragmento cortado y facilitar la adherencia de las muestras en el portaobjetos.

Este proceso se llevó a cabo en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca.

### **3.3. Obtención de organoides derivados de mama de ratón**

Los organoides derivados de mama de ratón son una suspensión enriquecida en células epiteliales de la glándula mamaria<sup>292</sup>. Para obtenerlos, una vez extraídas las mamas en la necropsia del ratón, éstas se disgregaron mecánicamente mediante cortes con dos bisturís en medio suplementado (DMEM/F-12 (50%/50%), 5% de suero bovino fetal y 1% de penicilina/estreptomicina). Una vez disgregadas, se incubaron en un tubo de 50 ml (*Falcon®*) con 10 ml de medio suplementado, 1.25 ml de colagenasa (6000 U/ml) (#C2674, *Sigma-Aldrich*) y 1 ml de tripsina al 2.5% (#15090046, *Thermo Fisher Scientific*) durante 30 minutos a 37°C, en agitación orbital a 100 rpm, para degradar el colágeno e hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas. Tras ello, se centrifugó cada muestra durante 5 minutos a 1.200 rpm a temperatura ambiente y se eliminó la fase superior que contenía la grasa, mediante aspiración con una bomba de vacío. El *pellet* sólido, enriquecido en células epiteliales, se disgregó agitándolo cuidadosamente en 4 ml

## Material y métodos

de PBS 1X suplementado con un 2% de suero bovino fetal y 119  $\mu$ l de DNasa (676 U/ml) (#DN25, *Sigma-Aldrich*), y después se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó durante 5 minutos a 1.200 rpm, se aspiró el sobrenadante, y se realizaron tres lavados con 4 ml de PBS 1X frío suplementado con un 2% de suero bovino fetal, dando un pulso de 1.500 rpm durante 5 segundos y eliminando el sobrenadante entre los lavados. Por último, se añadió 1 ml de PBS 1X suplementado frío y se repartió la suspensión enriquecida en células epiteliales en tubos de 1.5 ml libres de RNAsas, que se centrifugaron durante 5 minutos a 2.200 rpm y a una temperatura de 4°C. Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante, se congeló el *pellet* de forma rápida en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C. Esta suspensión enriquecida en células epiteliales se empleó posteriormente para extraer DNA, RNA y proteínas.

## 4. Protocolos generales de los estudios *in vivo*

### 4.1. Extracción de DNA de los tejidos

Se extrajo el DNA de la cola de cada ratón y de organoides previamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C. En primer lugar, las muestras se incubaron toda la noche a 55°C en 500  $\mu$ l de *buffer* de lisis (Tris 100 mM pH 8, ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 5 mM, SDS 0.2%, NaCl 200 mM) y 2  $\mu$ l de proteinasa K (20 mg/ml) (#3115879001, *Roche*), para digerir las proteínas, disolver las membranas celulares y favorecer la liberación del DNA. Tras la incubación, se añadieron 500  $\mu$ l de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) (#136112-00-0, *Sigma-Aldrich*) a cada muestra, se mezcló y se pasó la mezcla a tubos con una matriz de gel. Esta favorece la separación de la fase acuosa, que contiene el DNA, de la fase orgánica con las proteínas y las sustancias insolubles (*Phase Lock Gel*, #2302800, *5 Prime*), tras una centrifugación durante 5 minutos a 12.000 rpm. A continuación, se añadieron 500  $\mu$ l de cloroformo (#1024451000, *Sigma-Aldrich*) y tras centrifugar durante 5 minutos a 12.000 rpm para limpiar los restos de fenol, el DNA se precipitó en 1 ml de isopropanol (#33539, *Honeywell Riedel-de-Haen*). De nuevo, se centrifugó durante 5 minutos a 12.000 rpm y se lavó el “ovillo” de DNA con 500  $\mu$ l de etanol al 70%, para eliminar las sales que precipitan junto al DNA. Por último, se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 12.000 rpm, se eliminó el sobrenadante, se dejó evaporar todo el etanol residual, se resuspendió el DNA en 100  $\mu$ l de *buffer* TE (Tris 100 mM a pH 8, EDTA 1 mM) y se homogeneizó

durante al menos 1 hora en un agitador orbital a temperatura ambiente. Una vez diluido el DNA, se realizaron directamente los experimentos planteados o se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta su utilización.

#### 4.2. Extracción de RNA de los tejidos

Antes de la extracción de RNA, se limpió el área de trabajo de posibles RNAsas que pudiesen degradar el RNA con *RNase Exitus Plus* (#A71530500, PanReac AppliChem). A continuación, se seccionó el tejido almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  en fragmentos de 5 a 30 mg. Para la extracción de RNA, se usó el kit comercial *Qiagen miRNeasy Mini Kit* (#217004, Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante, que permite que, junto con el RNA de tamaño habitual, se extraigan también fragmentos de RNA muy pequeños. De forma resumida, el fragmento de muestra congelado se introdujo en un tubo con esferas de cerámica (*Precellys Lysing Kit*, #P000918-LYSK0-A, Bertin Technologies) y 700  $\mu\text{l}$  de Qiazol (#1023537, Qiagen), para triturar el tejido en un homogeneizador (*FastPrep 24<sup>TM</sup> 5G*, #1160005500, MP Biomedicals). El proceso de homogeneización se realizó dando dos pulsos de 10 segundos cada uno, a una intensidad de 5.5 (m/s). El homogeneizado se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se añadieron 140  $\mu\text{l}$  de cloroformo, se agitó la mezcla enérgicamente durante 15 segundos y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se centrifugó la mezcla a 12.000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , separando de esta forma la fase acuosa, que contiene el RNA, y la fase orgánica. La fase acuosa se pasó a un tubo libre de RNAsas de 1.5 ml (#20170-038, VWR) con 1.5 volúmenes de etanol al 100%. Tras mezclarlo mediante pipeteo, se introdujo la mezcla en una columna, incluida en el kit de extracción, que retiene el RNA en su membrana. Se centrifugó durante 15 segundos a 12.000 rpm y, tras eliminar el líquido recogido por el tubo colector de la columna, se fueron añadiendo secuencialmente a la columna 700  $\mu\text{l}$  de *buffer* RWT y dos veces 500  $\mu\text{l}$  de *buffer* RPE, realizando una centrifugación de 15 segundos a 12.000 rpm entre cada *buffer* y una centrifugación de 2 minutos tras el último lavado con *buffer* RPE. Finalmente, para eluir el RNA, se puso la columna sobre un nuevo tubo de 2 ml libre de RNAsas, se añadieron 40  $\mu\text{l}$  de agua libre de RNasa y se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 minuto. El RNA extraído se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 4.3. Extracción de proteínas de los tejidos

Se extrajeron proteínas de fragmentos de organoides derivados de mama de ratón (ver apartado 3.3. de esta sección de material y métodos) congelados en nitrógeno líquido y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para ello, se homogeneizaron fragmentos de 10-15 mg en 250  $\mu\text{l}$  de *buffer* de extracción. Para preparar el *buffer* de extracción se mezclaron 10 ml de RIPA (NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 5 mM pH 8.0, 1% Triton X-100, 0.1% SDS 10%, 0.5% deoxicolato sódico 10X y agua) con un cóctel de inhibidores de proteasas (*cOmplete Mini*, #11836153001, Roche), una pastilla de inhibidores de fosfatasa (*PhosSTOP EASYpack*, #04906837001, Roche), 100  $\mu\text{l}$  de PMSF a 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*, 10837091001, Roche) y 10  $\mu\text{l}$  de DTT 1M (*Dithiotreitol*, 10699530, Fisher Scientific). La homogeneización se realizó en tubos con esferas de cerámica (*Precellys Lysing Kit, tissue homogenizing CK mix*, #P000918-LYSK0-A, Bertin Technologies), dando dos pulsos de 10 segundos cada uno a una intensidad de 5.5 (m/s) en un homogeneizador (*FastPrep 24<sup>TM</sup> 5G*, #1160005500, MP Biomedicals). A continuación, se incubaron las muestras en hielo durante 20 minutos y se centrifugaron durante 2 minutos a la máxima velocidad y a  $4^{\circ}\text{C}$  en una micrófuga (*Eppendorf*). Tras ello, se recogió el sobrenadante, se pasó a una columna con un filtro de 0.65  $\mu\text{m}$  (*Ultrafree-MC-DV*, #UFC30DV00) y se centrifugó a máxima velocidad a  $4^{\circ}\text{C}$ , para eliminar los restos sólidos en suspensión.

### 4.4. Cuantificación de la concentración, pureza e integridad de los ácidos nucleicos

Se cuantificó la concentración y pureza del DNA o RNA extraídos mediante la medición de la absorbancia a 230, 260 y 280 nanómetros (nm) de longitud de onda con un microespectrofotómetro, *Nanodrop ND-1000*. Los *ratios* entre la absorbancia a 260 y 280 nm, y entre 260 y 230 nm, se usaron como indicadores de pureza de la muestra. Las muestras con *ratio* 260/230 cercano o mayor de 2, tanto para RNA como para DNA; y valores mayores de 2 en el RNA y de 1.8 en el DNA en la *ratio* 260/230, indican que los ácidos nucleicos tienen la pureza adecuada para llevar a cabo los siguientes estudios. En el caso del RNA, además, se verificó la integridad (RIN, del inglés *RNA Integrity Number*) mediante el bioanalizador *Agilent 5400*, para realizar los estudios de secuenciación masiva del RNA mensajero.

#### 4.5. Cuantificación de la concentración de proteínas

Para cuantificar la concentración de las proteínas extraídas, se utilizó un *kit* fundamentado en el ensayo del ácido bicinconínico (BCA). Este método se basa en la reacción de Biuret entre las proteínas y el ion  $\text{Cu}^{2+}$ , que se reduce a  $\text{Cu}^{1+}$  y éste, al entrar en contacto con el ácido bicinconínico, forma un complejo de color púrpura de intensidad proporcional a la cantidad de ion cuproso y, a su vez, de proteínas.

Para realizar la cuantificación de la concentración de proteínas, a cada pocillo de una placa de 96 (#353072, *Thermo Fisher Scientific*), se añadieron 200  $\mu\text{l}$  del mix de BCA. Este mix está formado por 196  $\mu\text{l}$  del reactivo A (*BCA protein assay reagent A*, #23228, *Thermo Fisher Scientific*) y 4  $\mu\text{l}$  del reactivo B (*BCA protein assay reagent B*, #23224, *Thermo Fisher Scientific*). A continuación, se diluyeron las muestras 1:10 en *buffer* de extracción, descrito previamente, y se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de la proteína diluida a cada pocillo. Se homogeneizó el reactivo BCA con la muestra, se incubó en una estufa a 37°C durante 20-30 minutos y se midió la absorbancia de cada pocillo en un lector de placas *Ultra-Evolution TECAN* a 570 nm de longitud de onda. La concentración de proteínas de cada muestra se determinó mediante la comparación con una recta patrón de concentraciones conocidas de albúmina (*Albumin Standard*, #23209, *Thermo Fisher Scientific*). En todas las muestras se realizó la cuantificación por triplicado.

### 5. Protocolos específicos de los estudios *in vivo*

#### 5.1. Genotipado de los ratones

Para realizar el genotipado completo de los ratones del modelo deficiente en *Brcal/P53*, se llevaron a cabo cinco reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) diferentes para detectar el alelo *wild type* (wt) o salvaje de *Brcal*, el alelo wt de *P53*, el alelo delecionado de *Brcal*, el alelo delecionado de *P53* y la presencia del transgén *K14 Cre-recombinasa*. Para ello, se cortó un pequeño trozo de cola de los ratones en el momento del destete, para lo que se utilizó un sistema de calor (*Hot bead sterilizer*, #18000-45, *F.S.T.*) que permite la hemostasia, esterilización y cauterización en el momento de corte. De estos fragmentos de cola se extrajo el DNA necesario para realizar las PCRs, según el protocolo descrito en el apartado 4.1 de esta sección de material y métodos.

## Material y métodos

Para detectar la presencia del transgén *K14 Cre-recombinasa*, se diseñaron dos oligonucleótidos de la secuencia del promotor del gen de la K14 (*K14Cre-fwd* y *K14Cre-rev*) (**Tabla 1**). Para identificar los alelos salvajes o *wild type* de *Brca1* y *P53*, se diseñaron oligonucleótidos específicos de regiones próximas a los sitios *LoxP*. En el caso de *Brca1*, se diseñaron dos oligos localizados en el intrón 3 (*Brca1-int3-fwd* y *Brca1-int3-rev*) y en el caso de *P53*, localizados en el intrón 10 (*P53-int10-fwd* y *P53-int10-rev*). Para identificar el alelo deleciónado de *Brca1*, se utilizó el oligonucleótido *forward* del intrón 3 (*Brca1-int3-fwd*), utilizado para detectar el alelo wt, junto con un nuevo oligonucleótido *reverse* situado en el intrón 13 (*Brca1-int13-rev*). Si no se produce la deleción por la acción de la recombinasa Cre, estos dos oligonucleótidos se encuentran muy alejados, el fragmento a amplificar es demasiado grande y la reacción de amplificación no se puede producir. De la misma forma, para identificar el alelo deleciónado de *P53*, se utilizó el oligonucleótido *reverse* del intrón 10 (*P53-int10-rev*), junto con un nuevo oligonucleótido *forward*, situado en el intrón 1 (*P53-int1-fwd*) (**Tabla 1**).

En el modelo de ratón RFP, además, se detectó la presencia del gen *RFP* con otras dos reacciones, una frente al alelo *wild type* y otra frente al alelo *knock-in*, siguiendo la misma estrategia usada para identificar los alelos deleciónados de *Brca1* y *P53* (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para realizar el genotipado de los ratones**

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
<i>K14Cre-fwd</i>	5'-ACCCGAGCACCTTCTCTTCAC-3'
<i>K14Cre-rev</i>	5'-CATCACTCGTTGCATCGA-3'
<i>Brca1-int3-fwd</i>	5'-TATCACCCTGAATCTCTACCG-3'
<i>Brca1-int3-rev</i>	5'-GACCTCAAACCTGAGATCCAC-3'
<i>Brca1-int13-rev</i>	5'-TCCATAGCATCTCCTTCTAAAC-3'
<i>P53-int10-fwd</i>	5'-AAGGGGTATGAGGGACAAGG-3'
<i>P53-int10-rev</i>	5'-GAAGACAGAAAAGGGGAGGG-3'
<i>P53-int1-fwd</i>	5'-CACAAAACAGGTTAAACCCAG-3'
<i>RFP-HL15-fwd</i>	5'-AAGACCGCGAAGAGTTTGTCC-3'
<i>RFP-HL54-fwd</i>	5'-TAAGCCTGCCCAGAAGACTCC-3'
<i>RFP-HL154-rev</i>	5'-AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA-3'

En las cinco reacciones se mezclaron 1 µl del DNA obtenido de la cola (50 ng), 2 µl de oligonucleótidos específicos *forward* y *reverse* 5 µM, 2 µl de dNTPs 2.5 mM cada uno (#20.031-4179, *Biotoools*), 2 µl de buffer 10X, 0.6 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.12 µl de Taq polimerasa 5 U/µl (*NZYTaq II DNA polymerase*, #MB35401, *Nzytech*) y 10.28 µl de H<sub>2</sub>O.

Para detectar la presencia del transgén *K14 Cre recombinasa*, y los alelos *wild type* y deleciónado de los dos genes de interés (*Brcal* y *P53*), se realizó el siguiente programa de ciclos de temperatura en un termociclador (*Vapo.protect*, *Eppendorf*): 94°C durante 2 minutos; 30 ciclos cada uno de ellos formado por tres pasos de 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 50 segundos; y, por último, una extensión adicional de 72°C durante 5 minutos.

Para detectar los alelos *wild type* y *knock-in* de *RFP*, el programa de PCR fue: 94°C durante 5 minutos; 35 ciclos cada uno de ellos formado por tres pasos de 94°C durante 10 segundos, 62°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos; y, por último, 72°C durante 5 minutos.

Para visualizar el resultado de la PCR, el producto se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se añadió *Midori Green* (#MG13201, *Nzytech*), un intercalante de DNA no mutagénico que emite fluorescencia cuando recibe luz ultravioleta y permite visualizar el DNA amplificado.

## 5.2. Protocolos para la detección de cambios histopatológicos

### 5.2.1. Tinción hematoxilina-eosina

La tinción de hematoxilina-eosina se llevó a cabo, en todos los órganos y tumores, siguiendo el protocolo de tinción manual especificado en la **Tabla 2**. Esta técnica se realizó en el Servicio de Patología Molecular Comparada del Centro de Investigación del Cáncer.

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

Proceso	Reactivo	Tiempo
Desparafinado	Histoclear	5 minutos
	Histoclear	5 minutos
	Histoclear	5 minutos
	Histoclear (50%) + Alcohol 100% (50%)	5 minutos
Rehidratación	Alcohol 100%	5 minutos
	Alcohol 90%	5 minutos
	Alcohol 80%	5 minutos
	Agua destilada	5 minutos
Tinción	Hematoxilina de Harris	10 minutos
	Agua destilada (lavado)	20 minutos
	Eosina 0.5% + ácido acético	30 segundos
Deshidratación	Agua destilada	25 segundos
	Alcohol 80%	25 segundos
	Alcohol 90%	25 segundos
	Alcohol 100%	25 segundos
	Histoclear (50%) + Alcohol 100% (50%)	25 segundos
	Histoclear	25 segundos
	Histoclear	25 segundos
	Histoclear	25 segundos

Una vez finalizado el proceso de tinción, se añadió a la muestra una gota del fijador no acuoso, DPX (#100579, Merck Millipore) y, sobre ella, se colocó un cubreobjetos para visualizar la muestra al microscopio.

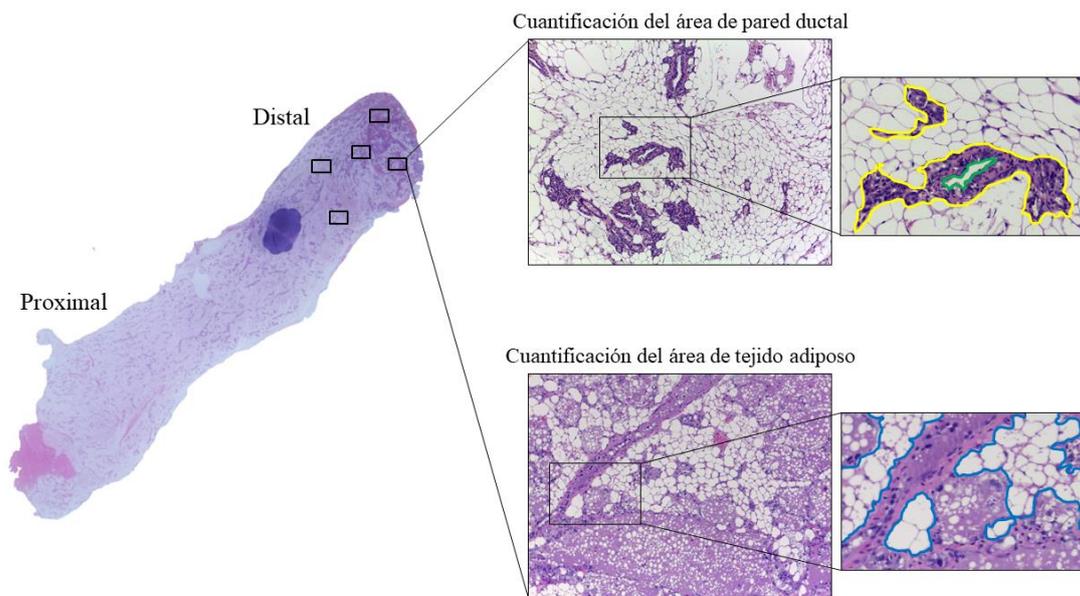
### 5.2.2. Cuantificación del área de pared ductal y del área de tejido adiposo

Para cuantificar el área de pared ductal y el área de tejido adiposo de las mamas, se tomaron 5 fotografías al azar de la zona distal (la zona más cercana al pezón y más alejada del cuerpo del animal una vez que se retira la piel en el momento de la necropsia) de cada una de las mamas teñidas con hematoxilina-eosina. Las imágenes fueron tomadas con una

cámara (*Leica ICC50 HD*) acoplada a un microscopio óptico *Leica DM750* a un aumento de 10X.

Las fotografías fueron analizadas con el *software ImageJ*. El área de la pared ductal se definió como el área ocupada por tejido epitelial, junto con el estroma adyacente periductal, menos el área de la luz y/contenido del ducto (**Figura 7**). Para calcular el porcentaje de área ductal, se dividió la resta de estas dos áreas entre el área total de tejido mamario presente en la fotografía y se multiplicó por 100.

En cuanto al porcentaje de área de tejido adiposo, ésta se definió como el área ocupada por adipocitos entre el total del área de la fotografía multiplicada por 100 (**Figura 7**). Todas las áreas se seleccionaron manualmente con la herramienta de selección del programa y se representaron en micrómetros cuadrados ( $\mu\text{m}^2$ ).



**Figura 7.** Esquema representativo de la cuantificación del área ductal y del área de tejido adiposo mediante el software libre *Image J*. Los cuadrados sobre la mama representan las fotografías tomadas con el microscopio óptico a 10X. En cada imagen se evaluó el área del ducto (área comprendida entre los trazos amarillos) y el área del contenido (área señalada en verde). El área de pared ductal fue la diferencia entre ambas, con respecto del área total de tejido mamario de la foto. También se cuantificó el área formada por tejido adiposo (área señalada en azul) respecto del área total de tejido mamario de la foto, según el experimento.

### 5.2.3. Inmunohistoquímica frente a la caspasa-3

La proteína caspasa-3 activada es un mediador esencial del proceso de la apoptosis. La expresión de esta cisteín-proteasa en el núcleo de las células está implicada en la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA <sup>293</sup>. Su detección por inmunohistoquímica se usa frecuentemente en investigación para determinar el grado de muerte celular programada de un tejido <sup>294</sup>.

Para realizar la inmunodetección de la caspasa-3, se realizaron cortes de 3 µm de grosor de las mamas incluidas en bloques de parafina. Los cortes se pusieron en portaobjetos cargados positivamente para permitir la colocación correcta del tejido y mantener la calidad de la tinción (*Leica BOND Plus Slides, #S21.2113.A, Leica*). El proceso de inmunomarcaje se hizo de forma semiautomática en una estación *Discovery ULTRA* de Roche. De forma resumida, el equipo llevó a cabo el desparafinado de las muestras a 69°C. A continuación, incubó las muestras en *buffer TE* (Tris 100 mM y EDTA 10 mM a pH 8) a 100°C durante 32 minutos, para que se produjera el desenmascaramiento del epítipo. Tras ello, se añadió el anticuerpo primario (*Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody, #9661, Cell Signaling*) producido en conejo, a una dilución 1:200, y se incubaron las muestras a 37°C durante 60 minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados (*Discovery Wash (RUO), #07311079001, Roche Diagnostics*) para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (*OmniMap anti-Rb HRP, #05269679001, Roche*) durante 16 minutos. Para su revelado se utilizó el *kit ChromoMAP DAB (#05266645001, Roche)*, que usa como cromógeno la diaminobencidina (DAB). Por último, se realizó la contratinción con hematoxilina y se montó el cubreobjetos aplicando una gota de resina DPX (*#100579, Merck Millipore*).

### 5.2.4. Inmunohistoquímica frente al Ki-67

La proteína Ki67 es un marcador celular usado habitualmente para evaluar el índice de proliferación de un tejido <sup>295</sup>. En cáncer de mama, se usa en la práctica clínica para la clasificación, evaluación del pronóstico y toma de decisiones en cuanto al tratamiento <sup>296,297</sup>.

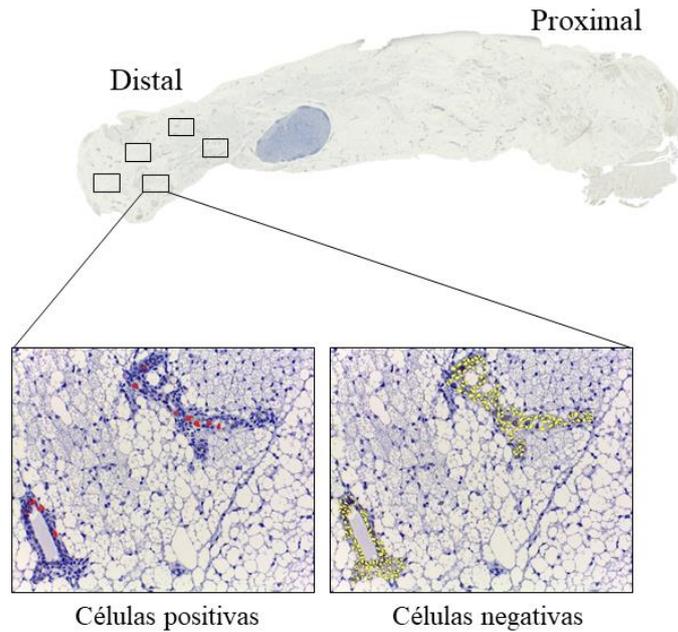
El proceso de inmunodetección de Ki67 también se llevó a cabo de forma semiautomática en una estación *Discovery ULTRA* de Roche. En este caso, el anticuerpo primario usado fue *Anti-Human Ki-67 Monoclonal Antibody (Clone SP6) (#MAD-020310Q, Master Diagnostica)* producido en conejo, y utilizado a una dilución 1:50. Después, se realizaron los mismos pasos de lavado, incubación del anticuerpo secundario, revelado, contratinción y montaje del cubreobjetos que se han detallado en la sección previa.

Los protocolos de inmunohistoquímica se llevaron a cabo en el Servicio de Patología Molecular Comparada del Centro de Investigación del Cáncer.

### **5.2.5. Cuantificación de las células positivas para caspasa-3 y Ki-67**

Para cuantificar el número de células positivas para la caspasa-3 o Ki-67 del componente epitelial ductal, se tomaron 5 fotografías al azar de la zona distal de cada una de las mamas marcadas con inmunohistoquímica, en las que hubiese células epiteliales formando ductos. Las imágenes fueron tomadas con una cámara (*Leica ICC50 HD*) acoplada a un microscopio óptico *Leica DM750* a un aumento de 20X.

La cuantificación de las fotografías se llevó a cabo con el *software Leica Application Suite V3.7*. Este *software* integra la cámara digital que porta el microscopio *Leica DM1000* con una interfaz que permite capturar, procesar y analizar las imágenes. En primer lugar, se asignaron en el programa los parámetros de color y forma de las células positivas y negativas. Una vez entrenado el programa, se delimitó manualmente la región que se debía cuantificar (el área epitelial ductal), y, de forma automática, el *software* generó un informe con el número de células positivas y células negativas. Para obtener el porcentaje de células positivas de cada campo, se dividió el número de células positivas entre el número de células totales (células positivas más células negativas) y se multiplicó por 100 (**Figura 8**).



**Figura 8.** Figura ilustrativa de la cuantificación mediante el software Leica LAS V3.7. de los inmunomarcajes con inmunohistoquímica. Los cuadrados sobre la mama representan las fotografías tomadas con el microscopio óptico a 20X. En rojo se muestran las células positivas y en amarillo las células negativas, de la región ductal previamente delimitada manualmente.

### 5.3. Cuantificación del alelo *P53* recombinado mediante PCR cuantitativa

Para cuantificar el alelo de *P53* recombinado en las mamas de los ratones, se empleó la técnica de PCR cuantitativa (QPCR, del inglés *quantitative polymerase chain reaction*) por el método de *Sybr Green*. El método se basa en la cuantificación de la fluorescencia que emite el fluoróforo *Sybr Green*. Este colorante se une al surco menor de la doble de cadena de DNA y emite fluorescencia. De esta forma, a medida que aumenta el número de moléculas de DNA de doble cadena en cada ciclo de PCR, mayor es la intensidad de fluorescencia.

Para ello, se extrajo y se cuantificó el DNA de los organoides generados a partir de las mamas de ratón (apartados 3.3. y 4.1. de esta sección de material y métodos). Este DNA se diluyó a una concentración de 20 ng/ $\mu$ l para realizar la QPCR. Para llevar a cabo la detección y cuantificación del alelo de *P53* recombinado, se diseñaron dos oligonucleótidos específicos para su reconocimiento. Además, se amplificó un gen de referencia en todas las muestras (*Gapdh*, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) para corregir la señal obtenida en cada muestra. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para detectar P53 recombinado.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
<i>P53del-fwd</i>	5'- GAGACGGAGAAAGGGCGACT -3'
<i>P53del-rev</i>	5'- CTAGA AACTAGTGGATCCCCCG -3'
<i>Gapdh-fwd</i>	5'- CTGCACCACCAACTGCTTAG -3'
<i>Gapdh-rev</i>	5'- GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT -3'

En cada reacción de QPCR se mezclaron 2  $\mu$ l de DNA (40 ng totales); 0.15  $\mu$ l de cada oligonucleótido, *forward* y *reverse* a 25  $\mu$ M; 6  $\mu$ l del buffer de reacción *Perfecta Sybr Green SuperMix ROX* (#95055-500, *QuantaBio*); y 3.7  $\mu$ l de agua, para alcanzar un volumen de reacción de 12  $\mu$ l. Las reacciones para determinar *P53* recombinado y *Gapdh* se realizaron por triplicado, en placas de 96 pocillos (*Twin-Tec real time PCR plates 96, #0030132513, Eppendorf*), cubiertas herméticamente con un adhesivo (*Optically Clear Adhesive Seal Sheets, #AB-1170, Thermo Fisher Scientific*). La QPCR y la lectura de la señal se realizó en un termociclador *Mastercycler ep Realplex2 (Eppendorf)*.

Se utilizó el siguiente programa de ciclos de temperatura: 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos, cada uno de ellos formado por tres pasos de 95°C durante 15 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. La fluorescencia emitida por el fluoróforo se midió en cada ciclo al final de la fase de extensión.

Tras los 40 ciclos, se controló la especificidad de la reacción mediante el análisis de la curva de fusión o *curva de melting*. Este proceso consiste en un aumento progresivo de la temperatura de 50°C a 95°C mientras se monitoriza la señal de fluorescencia. Cuando se alcanza la temperatura de desnaturalización del DNA, la señal de *Sybr Green* cae bruscamente, pues se disocia de la doble cadena de DNA. En reacciones específicas, solamente se debe de producir un único producto de PCR de la secuencia de interés y, por lo tanto, un único pico de desnaturalización.

Para el análisis de los datos se utilizó el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para estimar la cantidad relativa (RQ, *Relative Quantity*)<sup>298</sup> del alelo de *P53* recombinado de cada muestra. En cada reacción se obtuvo el ciclo límite o *Ct (Cycle threshold)*, que es aquel en el que la señal originada por el producto de la reacción se diferencia del fondo. Para las réplicas de cada muestra, se calculó el promedio del *Ct* para el alelo de *P53* recombinado y el promedio del *Ct* para *Gapdh*. El  $\Delta C_t$  se calculó restando al *Ct* de *P53* recombinado, el *Ct* de *Gapdh*

en cada muestra. Se llevó a cabo una normalización calculando el  $\Delta\Delta Ct$ , restando del  $\Delta Ct$  de cada muestra problema, el  $\Delta Ct$  de una muestra de referencia (en este caso un tumor de mama, en el que todas las células tienen el gen *P53* delecionado). Esta muestra se incluyó en todas las placas y permitió comparar muestras analizadas en diferentes estudios. La RQ de cada muestra se calculó aplicando la siguiente fórmula:  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Todas las muestras se analizaron por triplicado, tanto para el gen de interés como para el gen control.

Para corregir la cantidad de alelo de *P53* recombinado por el área ductal, se multiplicó la RQ obtenida para cada ratón en la QPCR por la media del porcentaje de área ductal de ese mismo ratón (la media del porcentaje de área ductal se obtuvo de 5 campos tomados al azar), y se dividió entre 100.

#### **5.4. Disociación de las mamas y evaluación de las subpoblaciones epiteliales de la glándula mamaria mediante citometría de flujo**

Para evaluar las subpoblaciones epiteliales que conforman el epitelio de la glándula mamaria de los ratones mediante citometría de flujo, se realizó una disociación de las mamas para conseguir una suspensión de células individualizadas y, a continuación, se llevó a cabo la tinción mediante anticuerpos.

Para realizar la disociación de las mamas, éstas se extrajeron del animal con unas tijeras estériles y con la precaución de no coger los ganglios que forman parte de las glándulas mamarias. Una vez extraídas las mamas, se incubaron en un tubo de 50 ml (*Falcon*, #352070, *Thermo Fisher Scientific*) con 9 ml de medio DMEM/F-12 (#11554546, *Thermo Fisher Scientific*), 500  $\mu$ l de colagenasa a 6000 U/ml (#C2674, *Sigma Aldrich*) y 500  $\mu$ l de hialuronidasa a 2000 U/ml (#H3506, *Sigma Aldrich*) durante 16 horas a una temperatura de 37°C.

Tras la incubación, se disgregaron las mamas mediante pipeteo durante 30 segundos y se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 350 g y a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, formado principalmente por restos de grasa, y se resuspendió el *pellet* de células en 2 ml de *buffer* ACK (*ACK Lysing Buffer*, #A10492-01, *Thermo Fisher Scientific*) durante 5 minutos, para lisar los hematíes. Posteriormente, se centrifugó de nuevo a 350 g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se añadió 1 ml de tripsina

(*Trypsin-EDTA 0.25% phenol red*, #25200056, *Thermo Fisher Scientific*) precalentada previamente, para individualizar las células. Se pipeteó suavemente durante 1-2 minutos y, a continuación, se añadieron 10 ml de solución salina (*Gibco HBSS*, #14025-092, *Thermo Fisher Scientific*) suplementada con tampón HEPES 10 mM (#15630106, *Thermo Fisher Scientific*) y un 2% de suero bovino fetal para detener la acción de la tripsina. Tras realizar una centrifugación, se descartó el sobrenadante y se añadió 1 ml de la solución salina suplementada descrita anteriormente y 100 µl de DNasa a 676 U/ml (#DN25, *Sigma-Aldrich*), precalentada previamente. Se pipeteó cuidadosamente durante 1 minuto, y se paró la acción de la DNasa con la solución salina suplementada fría. Se filtró la mezcla a través de un filtro de 40 µm (*Cell Strainer*, #352340, *Corning*) para eliminar los posibles agregados celulares. Se centrifugó de nuevo la muestra, en este caso a 4°C de temperatura, y tras eliminar el sobrenadante, la suspensión de células se distribuyó en tubos de citometría con filtro de 35 µm (*5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube with Cell-Strainer Cap*, #352235, *Falcon*).

A continuación, los tubos se centrifugaron, se decantó el sobrenadante y se añadieron 52 µl de la solución de bloqueo, formada por 50 µl de la solución salina suplementada y 2 µl del anticuerpo anti-CD16/CD32 (#MO16PU (V500), *ImmunoStep*) y se incubaron las muestras durante 10 minutos a 4°C. A continuación, se añadieron 50 µl de la solución de inmunomarcaje en los tubos de estudio (especificada en la **Tabla 4**) y 50 µl de la solución salina en los tubos control. En todos los experimentos, se utilizó un tubo teñido con todos los anticuerpos (tubo de estudio) y un tubo sin teñir (tubo control). Además, en el primer experimento, se marcaron diferentes tubos de células cada uno de ellos con un anticuerpo diferente, para poder realizar una matriz de compensación de la señal de fluorescencia de cada fluoróforo. Una vez añadida a las muestras la solución de inmunomarcaje, se incubaron durante 30 minutos en oscuridad y a 4°C y, tras un lavado con 4 ml con la solución salina, se añadieron 100 µl de la misma a cada tubo, junto con 1 µl del marcador de viabilidad celular *Fixable Viability Dye eFluor™ 506*.

**Tabla 4. Lista de anticuerpos de la solución de inmunomarcaje.**

Anticuerpo	Fluorocromo	Dilución	Casa comercial	Referencia
CD45	FITC	1:100	BD Biosciences	#553080
CD140	FITC	1:100	Invitrogen	#11-1401-82

CD31	FITC	1:100	BD Biosciences	#553372
Ter119	FITC	1:100	BD Biosciences	#557915
CD49f	APC	1:100	eBioscience	#17-0495-80
CD29	APC – Cy7	1:100	BioLegend	#102226
CD61	BV421	1:100	BD Biosciences	#566227
Sca1	PerCP – Cy5	1:100	Invitrogen	#45-5981-80
EpCAM	PE – Cy7	1:200	ImmunoStep	#M326PC7
eFluor™ 506		1:100	Invitrogen	#65-0866-14

Las muestras se adquirieron en el citómetro *LSR Fortessa X-20 Cell Analyzer* (BD Biosciences) del Servicio de Citometría de Flujo de la Universidad de Salamanca. El análisis posterior de los datos se realizó con el programa *FlowJo V10* (Treestar, California).

### 5.5. Determinación de los niveles de proteínas mediante *multiplex bead array* (Luminex®)

La cuantificación de proteínas de señalización en lisados proteicos de los organoides derivados de mama de ratón se realizó mediante ensayos de *multiplex bead array* con tecnología Luminex xMAP® de Millipore (Milliplex). Se trata de una tecnología de alto rendimiento que produce resultados comparables a los ensayos de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), pero con mayor eficiencia y velocidad, y menor coste, ya que permite cuantificar múltiples analitos en el mismo pocillo. Estos ensayos se basan en el uso de microesferas magnéticas de 6.45 µm de diámetro, teñidas internamente con una mezcla de dos fluorocromos y, además, tienen un anticuerpo de captura específico para cada analito adherido a ellas. La combinación de los dos fluorocromos en cantidades precisas permite diferenciar, por la fluorescencia resultante de la mezcla, entre las esferas que se unen específicamente a cada analito. Además, se usa un anticuerpo de detección biotinilado que reconoce otro epítipo de la proteína de interés, de modo que se une al complejo formado por la microesfera, el anticuerpo de captura y el analito. Al añadir estreptavidina conjugada con ficoeritrina (PE), ésta se une a la biotina del anticuerpo de detección de manera proporcional a la cantidad de analito capturado inicialmente. Al final del proceso, las microesferas se hacen pasar por un lector, que utiliza los principios de la

citometría de flujo para identificar las microesferas correspondientes a cada analito por la fluorescencia de los fluorocromos internos de éstas, y medir la señal de la ficoeritrina unida a cada microesfera. La intensidad de la señal de ficoeritrina es directamente proporcional a la concentración del analito específico.

Los ensayos que se realizaron fueron *7-plex DNA Damage/Genotoxicity Magnetic Bead Kit* (Milliplex Map Kit, #48-621MAG, Millipore), *Multi-Pathway 9-plex Magnetic Bead Kit* (Milliplex Map Kit, #48-680MAG, Millipore) y *Mouse Angiogenesis/Growth Factor Magnetic Bead Panel* (Milliplex Map Kit, #MAGPMAG-24K, Millipore) en los que se detectaron los analitos mostrados en la siguiente **Tabla 5**.

**Tabla 5. Analitos analizados mediante tecnología Luminex.**

<b>Ensayo</b>	<b>Analitos analizados</b>
<i>7-plex DNA Damage/Genotoxicity Magnetic Bead Kit</i>	ATR, pCHK1 (Ser345), pCHK2 (Thr68), $\gamma$ H2AX, p-P53 (Ser15), MDM2 y P21
<i>Multi-Pathway 9-plex Magnetic Bead Kit</i>	pERK1/2 (Thr185/Tyr187), pAKT (Ser473), pSTAT3 (Ser727), pJNK (Thr183/Tyr185), p-P70S6K (Thr412), pNF- $\kappa$ B (Ser536), pSTAT5A/B (Tyr694/699), pCREB (Ser133), p-P38 (Thr180/Tyr182)
<i>Mouse Angiogenesis/Growth Factor Magnetic Bead Panel</i>	sALK-1, anfirregulina, angiopoyetina-2, betacelulina, sCD31/PECAM-1, EGF, endoglina, endotelina-1, sFASL, FGF-2, folistatina, G-CSF, HGF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A, KC/CXCL1, leptina, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PLGF-1, prolactina, SDF-1, TNF- $\alpha$ , VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D

Las proteínas se extrajeron con un *buffer* de extracción siguiendo el protocolo descrito previamente (apartado 4.3. de esta sección de material y métodos). La cantidad de proteína evaluada se decidió en ensayos preliminares en los que se testaron diferentes cantidades en el rango recomendado por los *kits* (1-25  $\mu$ g), de modo que se eligieron cantidades de proteína que produjeran una señal detectable y en el rango lineal. En los ensayos *7-plex DNA Damage/Genotoxicity Magnetic Bead Kit* y *Multi-Pathway 9-plex*

## Material y métodos

*Magnetic Bead Kit* la cantidad de proteína analizada por muestra fue 18.5 µg, mientras que en el ensayo *Mouse Angiogenesis/Growth Factor Magnetic Bead Panel* fue de 15 µg.

Los ensayos se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante. De manera resumida, en primer lugar, se añadieron 50 µl de *buffer* de ensayo a cada pocillo de la placa de 96. Tras agitar 10 minutos a temperatura ambiente, se decantó el *buffer*. A continuación, se añadieron 25 µl de las microesferas cubiertas de los anticuerpos de captura a cada pocillo. Sin eliminarlas, se añadieron 25 µl de *buffer* de ensayo a los pocillos blanco, 25 µl de lisados celulares controles disponibles en cada *kit* a los pocillos control y 25 µl de cada muestra a los pocillos de estudio. Esta mezcla se incubó durante 18 horas en oscuridad en la cámara fría, en un agitador de placas a 800 rpm. Al día siguiente, se eliminó el sobrenadante por decantación, colocando previamente la placa con las muestras sobre una base magnética (*Magnetic 96-Well Separator, #A14179, Life Technologies*), que hizo que las microesferas magnéticas junto con los analitos, quedasen adheridas al fondo de la placa. A continuación, se hicieron dos lavados con *buffer* de ensayo, se añadió el anticuerpo de detección biotinilado y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de placas a 800 rpm. Tras ello, se eliminó por decantación el anticuerpo de detección y se añadió la estreptavidina conjugada con ficoeritrina. Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente en agitación, se añadió el *buffer* de amplificación y se incubó durante otros 15 minutos en las mismas condiciones. Finalmente, se eliminó el sobrenadante por decantación, se resuspendieron las microesferas en 150 µl de *buffer* de ensayo o *sheat fluid*, dependiendo del *kit* utilizado, y se adquirieron y analizaron las muestras en el lector *Bio-Plex 200 (Bio-Rad)*. La cuantificación realizada con los *kits 7-plex DNA Damage/Genotoxicity* y *Multi-Pathway 9-Plex* fue relativa, ya que éstos no incluyen curvas estándares de concentraciones conocidas de cada una de las proteínas analizadas. En cambio, la cuantificación con el *kit Mouse Angiogenesis/Growth Factor Magnetic Bead Panel* fue absoluta, ya que incluye una curva estándar de concentraciones de los analitos estudiados. De esta manera, la señal de fluorescencia de cada analito se convirtió a concentración expresada en pg/ml. El estudio se hizo en el Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario de Salamanca.

## 5.6. Cuantificación de la expresión de los receptores de la dopamina mediante PCR cuantitativa

Para cuantificar la expresión de los receptores de la dopamina (DR) en las mamas de los ratones, primero, se extrajo RNA de las mismas con el *kit* de extracción *RNeasy Mini Kit* (#74104, *Qiagen*), siguiendo las recomendaciones del fabricante, tal y como se describe en el apartado 4.2 de esta sección de material y métodos. Después, se cuantificó mediante un espectrofotómetro *Nanodrop*<sup>®</sup> y se sintetizó el cDNA mediante el *kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (#04379012001, *Roche*). Para cada reacción de síntesis de cDNA, se mezclaron 400 ng de RNA total, con 2  $\mu$ l de *random hexamer primers* y agua libre de RNasas, hasta alcanzar un volumen final de reacción de 13  $\mu$ l. La mezcla se incubó a 65°C durante 10 minutos, para favorecer la desnaturalización de la estructura secundaria del RNA y permitir la unión de los oligonucleótidos al RNA molde. Seguidamente, se añadieron 4  $\mu$ l de *buffer* de reacción, junto con 2  $\mu$ l de dNTPs (10mM), 0.5  $\mu$ l de inhibidor de RNasas (40 U/ $\mu$ l) y 0.5  $\mu$ l de retrotranscriptasa (20 U/ $\mu$ l). Se sintetizó el cDNA mediante la incubación de la mezcla de forma secuencial, primero, a 25°C durante 10 minutos y, posteriormente, a 55°C durante 30 minutos, para amplificar fragmentos de hasta 4 kb. Finalmente, se realizó una incubación a 85°C durante 5 minutos, para inactivar la retrotranscriptasa. El cDNA obtenido se guardó a -20°C hasta su uso.

Con el cDNA sintetizado, se realizó una qPCR para cuantificar la expresión de los diferentes genes que codifican los receptores de la dopamina, con el método *Sybr*, descrito anteriormente. En cada reacción de QPCR se mezclaron 2  $\mu$ l de cDNA (40 ng totales); 0.15  $\mu$ l de cada oligonucleótido, *forward* y *reverse* a 25  $\mu$ M; 6  $\mu$ l del *buffer* de reacción *Perfecta Sybr Green SuperMix ROX* (#95055-500, *QuantaBio*); y 3.7  $\mu$ l de agua, para alcanzar un volumen de reacción de 12  $\mu$ l. Se realizó el siguiente programa de ciclos de temperatura: 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos, cada uno de ellos formado por dos pasos de 95°C durante 15 segundos y 56°C durante 60 segundos. La fluorescencia emitida por el fluoróforo se midió en cada ciclo al final de la fase de extensión. Tras ello, se realizó una *curva de melting* para ver la especificidad de la reacción y el análisis de los datos se hizo mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , descritos en el apartado 5.3 de esta sección de material y métodos.

Los oligonucleótidos específicos para reconocer los transcritos de cada receptor se especifican en la siguiente **Tabla 6**. Además, como se hizo anteriormente, se incluyeron oligonucleótidos con secuencias específicas para reconocer la expresión de la *Gapdh*.

## Material y métodos

Como muestra de referencia para calcular el  $\Delta\Delta C_t$  (control positivo) se utilizó cDNA sintetizado a partir del RNA extraído de un cerebro de ratón.

Todas las muestras se analizaron por triplicado, tanto para la expresión del gen de interés como para el gen control, en placa de 96 pocillos (*Twin-Tec real time PCR plates 96, #0030132513, Eppendorf*). La QPCR y la lectura de la señal se realizaron en el termociclador *Mastercycler ep Realplex 2 (Eppendorf)*.

**Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para detectar y cuantificar la expresión de los receptores de la dopamina.**

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
<i>mDR1-fwd</i>	5'- AACTGTATGGTGCCCTTCTGTGG -3'
<i>mDR1-rev</i>	5'- CAGCCCCGTTGTTGTTGATG -3'
<i>mDR2-fwd</i>	5'- CACTCCGCCACTTCTTGACATACA -3'
<i>mDR2-rev</i>	5'- GAGCCCCAAGTTACCACCTC -3'
<i>mDR3-fwd</i>	5'- GTCCTGCCCTCTCCTCTTTGGTTT -3'
<i>mDR3-rev</i>	5'- TGAGGGAAGCCAGGTCTGATG -3'
<i>mDR4-fwd</i>	5'- TCATCGGCTTGGTGTTGGC -3'
<i>mDR4-rev</i>	5'- AAGTAGTTGGTGGGTGTCTGC -3'
<i>mDR5-fwd</i>	5'- GGGAGATCGCTGCTGCCTATGTC -3'
<i>mDR5-rev</i>	5'- ACCATCTGGGGTCGTTGGAGA -3'
<i>Gapdh-fwd</i>	5'- CTGCACCACCAACTGCTTAG -3'
<i>Gapdh-rev</i>	5'- GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT -3'

### 5.7. Construcción de librerías y secuenciación masiva del RNA

La construcción de librerías para la secuenciación masiva del RNA fue realizada por la empresa *Novogene*. En primer lugar, una vez extraído el RNA de los organoides (ver apartado 4.2. de esta sección de material y métodos), se realizó un control de calidad de las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% para ver la degradación del RNA, una prueba de pureza y concentración con *Nanodrop*, y cuantificación con el bioanalizador *Agilent 5400* para verificar la integridad del RNA (RIN, *RNA Integrity Number*). Tras ello, se utilizó el kit *Epicenter Ribo-Zero rRNA Depletion (#20040526,*

*Illumina*) para eliminar el RNA ribosómico. El RNA total se seleccionó con poli-A, seguido de una fragmentación del RNA en fragmentos pequeños. Los fragmentos de RNA cortados se transcribieron a DNA complementario y se ligaron con adaptadores utilizando el *kit* de preparación de librerías (*NEBNext Ultra RNA Library Prep, #E7770, Illumina*). Tras la amplificación de los fragmentos mediante PCR, las librerías de RNA se secuenciaron en la plataforma *Illumina NovaSeq 6000 PE150* con una profundidad de lectura de 12G.

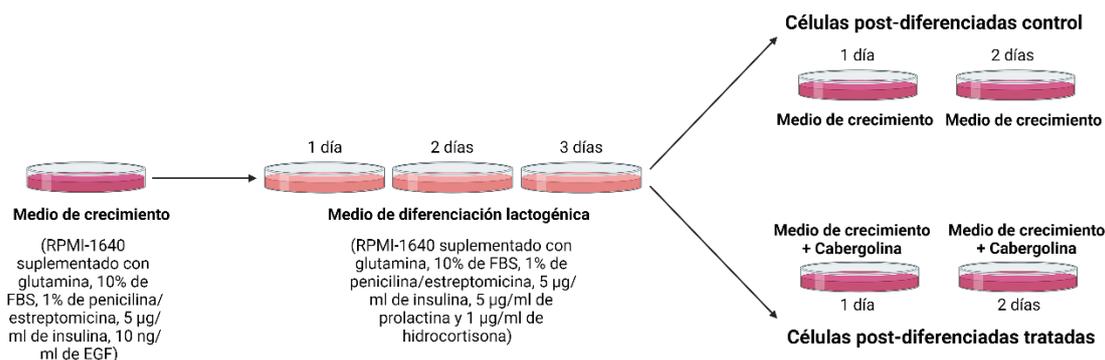
## 6. Modelo experimental *in vitro*

### 6.1. Línea celular

La línea celular HC11 deriva del epitelio mamario normal de ratón. Se trata de un clon sensible a la prolactina, derivado de la línea celular COMMA-1D, originada en un ratón hembra gestante de fondo genético BALB/c. Estas células sufren diferenciación lactogénica cuando se tratan con un cóctel hormonal formado por dexametasona/hidrocortisona y prolactina, y entonces sintetizan la proteína de la leche beta-caseína<sup>299</sup>. Son utilizadas habitualmente como un modelo *in vitro* para estudiar la diferenciación lactogénica y la involución postlactancia<sup>300</sup>.

Estas células crecen en adhesión y monocapa con el medio RPMI-1640 suplementado con glutamina (#21875034, *Thermo Fisher Scientific*), 10% de suero bovino fetal (*Gibco Fetal Bovine Serum, #26140079, Fisher Scientific*), 1% de penicilina/estreptomicina (10.000 U/ml), 5 µg/ml de insulina (#I0516-5ML, *Sigma-Aldrich*) y 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (#RP8661, *Thermo Fisher Scientific*). Para inducir la diferenciación lactogénica, se sustituyó el medio de crecimiento anterior por el medio de diferenciación, formado por RPMI-1640 suplementado con glutamina, 10% de suero bovino fetal, 1% de penicilina/estreptomicina, 5 µg/ml de insulina, 5 µg/ml de prolactina (*Recombinant Murine Prolactin, #315-16, PeproTech*) y 1 µg/ml de hidrocortisona (#H0888, *Sigma-Aldrich*). Las células se mantuvieron tres días en este medio de diferenciación. Después, para conseguir un estado de post-diferenciación, se sustituyó el medio de diferenciación por su medio de crecimiento habitual (**Figura 9**).

## Material y métodos



**Figura 9. Esquema del proceso de diferenciación de las células HC11.** FBS, Fetal Bovine Serum (suero bovino fetal). EGF, Epidermal Growth Factor (factor de crecimiento epidérmico). Figura creada con BioRender.com.

### 6.2. Condiciones de cultivo, mantenimiento y preservación de las células

Todas las células fueron manejadas en campanas de cultivos en condiciones estériles y crecieron en un incubador a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad. Cuando las células se encontraron al 70-80% de confluencia en la placa, fueron sembradas en una nueva placa para su expansión y/o realización del experimento. Para ello, se aspiró el medio de cultivo de la placa, se lavaron las células con PBS 1X Na<sup>+</sup>, se aspiró el medio de lavado y se añadió 1 ml de enzimas de disociación celular (*TrypLE Express*, #12604-013, Gibco). Tras incubarlas durante 5 – 10 minutos para favorecer el efecto de dichas enzimas, se neutralizaron con medio completo fresco y se pasó la suspensión celular a una nueva placa adecuada al experimento.

Para almacenar las células, una vez despegadas de la placa y neutralizadas las enzimas, se centrifugaron durante 5 minutos a 1.200 rpm. Después, se aspiró y se resuspendió el *pellet* en 1 ml de medio de congelación, formado por suero bovino fetal (*Gibco Fetal Bovine Serum*, #26140079, Fisher Scientific) con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, #D4540, Sigma Aldrich). Los crioviales de células se almacenaron durante 2 horas a -20°C, después se mantuvieron a -80°C durante 24 horas y, por último, se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

El proceso de descongelación celular se realizó introduciendo el criovial en un baño termostático a 37°C entre 3 – 5 minutos. Después, las células se añadieron a una placa con medio completo.

Semanalmente, se realizó una PCR para detectar la presencia de micoplasma que pudiese interferir en el crecimiento de las células.

### 6.3. Administración del fármaco

La cabergolina utilizada en los estudios *in vitro* fue la misma que en los estudios *in vivo* (*Cabergoline*, #C0246, *Sigma Aldrich*). Se disolvió en 1 ml de etanol al 100% y se conservó a -20°C a una concentración de 10 mg/ml. En cada experimento, se prepararon diluciones a la concentración deseada.

## 7. Protocolos generales utilizados en los estudios *in vitro*

### 7.1. Cuantificación de células en la cámara de Neubauer

Para contar las células necesarias para cada experimento, se utilizó un hemocitómetro o cámara de Neubauer (*Neubauer Improved*, #1110000, *Optik Labor*), que consiste en un portaobjetos especial en el que hay una retícula grabada y donde se conoce el volumen de líquido depositado entre él y un cubreobjetos.

Para cuantificar las células, primero, se retiró el medio de cultivo de la placa, se realizó un lavado con PBS 1X Na<sup>+</sup> y se despegaron de la placa con *TrypLE*. Cuando las células se encontraban en suspensión, se recogieron en 5 ml de medio de cultivo. Para realizar el recuento, se mezclaron 30 µl de azul de tripán (#15250061, *Thermo Fisher Scientific*), un colorante capaz de penetrar y teñir las células muertas, con 10 µl de la suspensión celular. Se colocaron 10 µl de la mezcla con células en cada una de las dos cámaras del hemocitómetro. A continuación, con un microscopio óptico invertido (*Leica DMI1*), se contabilizaron las células que se encontraban dentro de cada uno de los cuatro cuadrantes de 1 mm<sup>2</sup> en cada una de las dos cámaras. Tras ello, se realizó la media aritmética de las dos cámaras y se obtuvo la concentración celular (células/ml) según la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración celular (células/ml)} = \frac{\text{Media del recuento celular}}{4} \times \text{Factor de dilución} \times 10.000$$

## 7.2. Extracción y cuantificación de RNA de líneas celulares

El RNA de las líneas celulares se extrajo con el *kit RNeasy Mini Kit* (#74104, *Qiagen*), siguiendo las recomendaciones del fabricante. En primer lugar, se suplementó el *buffer* RLT con  $\beta$ -mercaptoetanol (10  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol por cada ml de RLT). En cada placa de células, se añadieron 600  $\mu$ l de esta mezcla y con un rascador (#83.1830, *Sarstedt*) se recogieron todas las células. Se pasaron a un tubo de 1.5 ml libre de RNAsas (*Eppendorf*<sup>®</sup>, #211-0015, *VWR*), donde se mezclaron cuidadosamente mediante pipeteo. Seguidamente, se pasaron los lisados a una columna *QiAshredder* (#79656, *Qiagen*), para romper los ácidos nucleicos y disminuir la viscosidad de la muestra, donde se centrifugaron a la máxima velocidad (>12.000 rpm) en una micrófuga (*Eppendorf*). El contenido que atravesó la columna se mezcló con un volumen de etanol al 70% y se añadió a una columna *RNeasy*. Tras centrifugar durante 15 segundos a 12.000 rpm, el RNA quedó retenido en la membrana de la columna. Ésta se lavó con diferentes *buffers* para purificar el RNA, siguiendo las instrucciones del fabricante, de forma semejante a los pasos realizados en el apartado 4.2 de esta sección de material y métodos. El RNA se diluyó en agua libre de RNAsas y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para realizar la cuantificación del RNA extraído de las células en cultivo, se procedió según el protocolo descrito en el apartado 4.4. de esta sección de material y métodos.

## 8. Protocolos específicos de los estudios *in vitro*

### 8.1. Análisis de la viabilidad celular mediante ensayo MTT

Para medir la viabilidad celular se utilizó el ensayo MTT<sup>301</sup>, que se basa en la reducción metabólica del bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-lio)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. El MTT es de color amarillo y, cuando se reduce por la acción de esta enzima, las sales de tetrazolio se transforman y precipitan en formazán, que es de color azul. El formazán queda retenido en las células y puede ser liberado mediante su solubilización. Esto permite cuantificar por reacción colorimétrica la cantidad de MTT reducido, como medida indirecta de la cantidad de células vivas del cultivo. A mayor absorbancia, mayor número de células vivas.

Para realizar estos estudios, se sembraron 5.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos (*Falcon*, #353072, *Thermo Fisher Scientific*). Tras 24 horas, se lavaron las

células con la solución salina PBS 1X y se añadió medio fresco sin fármaco a los controles, y con fármaco a diferentes concentraciones a los casos de estudio. Se incubaron durante el tiempo deseado, especificado en cada experimento, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Además, se añadieron pocillos sólo con medio (sin células) para ser usados como blanco, y pocillos con células a las que se añadió Triton X-100 (#MKBJ3318V, Sigma Aldrich) como control positivo de nula viabilidad celular. Todas las condiciones de estudio y su control se realizaron por triplicado.

Tras la incubación, se añadieron 10 µl de la solución de MTT (*MTT Cell Viability Assay Kit*, #30006, Biotium) a cada pocillo y se mezcló en un agitador orbital (*Mixmate, Eppendorf*). Se incubó la placa durante 1.5 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, se añadieron 200 µl de DMSO para solubilizar el formazán formado durante el proceso de reducción. Finalmente, se realizó la lectura de la intensidad del color en un lector de microplacas (*Tecan infinite M200 Pro*), midiendo la absorbancia en las longitudes de onda de 570 nm y 630 nm (esta última para evaluar la señal de fondo). La viabilidad celular se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad celular (Abs)} = \frac{(\text{Abs}_{570} - \text{Abs}_{630})_{\text{tratamiento}} - (\text{Abs}_{570} - \text{Abs}_{630})_{\text{blanco}}}{(\text{Abs}_{570} - \text{Abs}_{630})_{\text{control}} - (\text{Abs}_{570} - \text{Abs}_{630})_{\text{blanco}}}$$

## 8.2. Análisis de la muerte celular mediante ensayo con Anexina V/yoduro de propidio

La anexina V es una proteína de unión al calcio que también tiene afinidad por la fosfatidilserina, un fosfolípido que durante la apoptosis celular temprana queda expuesto en la superficie exterior de la membrana plasmática de las células. El yoduro de propidio (PI) es un intercalante del DNA y tiñe aquellas células que han perdido la integridad de la membrana. Este sería el caso de las células que se encuentran en apoptosis tardía, necróticas o muertas por otros procesos que se acompañan con fragmentación de la membrana plasmática. Así, el marcaje simultáneo de Anexina V y PI permite la clasificación entre células vivas (Anexina V negativas y PI negativas), células que se encuentran en apoptosis temprana (Anexina V positivas y PI negativas) y células que se encuentran en apoptosis tardía, necróticas y muertas (Anexina V positivas y PI positivas).

## Material y métodos

Para realizar estos estudios, se sembraron 100.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos (*Falcon 12-well, #353043, Thermo Fisher Scientific*). Tras 24 horas, se lavaron las células con la solución salina PBS 1X y se añadió medio fresco (de crecimiento o de diferenciación, con o sin fármaco, según la condición de estudio). Las células se incubaron durante 48 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad. Todas las condiciones de estudio y control se realizaron por triplicado. Tras 48 horas, se despegaron las células con *TrypLE* y se pasaron a tubos de citometría (*#352008, Thermo Fisher Scientific*), donde se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS 1X Na<sup>+</sup> atemperado y se resuspendieron las células en 100 µl de *buffer* de unión a anexina V 1X (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl y 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>), con 5 µl de anticuerpo anti-anexina V – FITC y 5 µl de yoduro de propidio (*Anexina V FITC – Kit de detección de apoptosis, #ANXVKF-100T, Immunostep*). La mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Trascorrido ese tiempo, se añadieron 100 µl de *buffer* de unión a anexina V y se procedió a la adquisición de los datos con el Citómetro FACS Aria III (*BD biosciences*), en el Servicio de Microscopia y Citometría del Centro de Investigación del Cáncer. En cada experimento, se realizó una matriz de compensación de fluorescencias de cada fluoróforo, para lo que se adquirió un tubo de células sin teñir, un tubo de células teñidas únicamente con anexina V y un tubo de células teñidas únicamente con PI. Se adquirieron 50.000 eventos por tubo, todas las condiciones de estudio se realizaron por triplicado y los datos fueron posteriormente procesados con el *software FlowJo V10*.

### 8.3. Análisis de la proliferación mediante ensayo con BrdU

La bromodesoxiuridina (BrdU o 5-bromo-2-desoxiuridina) es un nucleótido sintético análogo a la timidina. La BrdU se puede incorporar fácilmente al DNA que se está sintetizando durante la fase S del ciclo celular. Por ello, la detección de BrdU incorporado, mediante anticuerpos anti-BrdU específicos, se utiliza comúnmente para detectar células en proliferación, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. El inmunomarcaje con anti-BrdU, junto con la tinción con PI, ayuda a identificar las poblaciones celulares que se encuentran en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular (BrdU negativas, PI positivas en 2n, es decir, células diploides), las células que se encuentran en fase S (BrdU positivas, PI positivas en un continuo entre 2n, diploides, y 4n, tetraploides) y células que se encuentran en la fase G<sub>2</sub>/M (BrdU negativas, PI positivas en 4n) del ciclo celular.

Para llevar a cabo este ensayo, se sembraron 100.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos. A las 24 horas, se lavaron las células con la solución salina PBS 1X y se sustituyó el medio de las células por nuevo medio de cultivo (de crecimiento o de diferenciación, con o sin fármaco, según las condiciones del estudio). Dieciséis horas antes de realizar el ensayo, se añadió BrdU al medio, para que las células pudieran incorporarlo. Tras ello, se despegaron las células de la placa con *TrypLE* y se pasaron a tubos de citometría (#352008, *Thermo Fisher Scientific*), donde se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se lavó el *pellet* dos veces con PBS 1X Na<sup>+</sup> al 1% de albúmina de suero bovino (BSA), centrifugando entre cada lavado 15 minutos a 500 g. Con el fin de fijar las células, el *pellet* obtenido se resuspendió en 200 µl de PBS frío y se añadió a un nuevo tubo de citometría que contenía 4 ml de etanol al 70%, previamente enfriado a -20°, y se incubó durante 30 minutos en hielo. Después, las células se centrifugaron durante 10 minutos a 500 g y 10°C, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de HCl 2N (*Hydrochloric acid fuming 37%*, #100317, *Merck*) con un 0.5% de Triton X-100 (#MKB3318V, *Sigma-Aldrich*) para desnaturalizar el DNA. Tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron de nuevo las células durante 10 minutos a 500 g, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 1 ml de la base 0.1 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> x 10 H<sub>2</sub>O pH 8.5 (#S9640, *Sigma Aldrich*), para neutralizar el ácido. A continuación, se centrifugó de nuevo, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 100 µl de PBS 1% BSA con 0.5% de Tween 20 (#BP337-100, *Fisher Scientific*) con 2 µl de anticuerpo anti-BrdU conjugado con Alexa Fluor 488 (#B35139, *Invitrogen*), y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, se realizó un lavado para eliminar el exceso de anticuerpo con 1 ml de PBS 1% BSA con 0.5% de Tween 20, se centrifugó durante 5 minutos a 500 g, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 200 µl de yoduro de propidio diluido en PBS a 5 µg/ml. Se procedió a la adquisición de las muestras en un Citómetro FACS Aria III (*BD biosciences*), en el Servicio de Microscopia y Citometría del Centro de Investigación del Cáncer. En cada experimento, se realizó una matriz de compensación de fluorescencias de cada fluoróforo, para lo que se adquirió un tubo de células sin teñir, un tubo de células marcadas únicamente con anti-BrdU y un tubo de células teñidas únicamente con PI. Se adquirieron 50.000 eventos por tubo, todas las condiciones de estudio se realizaron por triplicado y los datos fueron posteriormente procesados con el *software FlowJo V10*.

#### **8.4. Cuantificación de la expresión de los receptores de la dopamina mediante PCR cuantitativa**

Para realizar la cuantificación de la expresión de los receptores de la dopamina (DR) mediante PCR cuantitativa en la línea HC11, se extrajo RNA y se cuantificó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.2. de esta sección de material y métodos. A continuación, se sintetizó cDNA, realizando el mismo protocolo que se hizo para sintetizar el cDNA del RNA extraído de las mamas de los ratones (sección 5.6. de material y métodos).

Los oligonucleótidos específicos para reconocer los transcritos de cada receptor se especifican en la **Tabla 6**. Además, se incluyeron oligonucleótidos con secuencias específicas para reconocer la expresión de la *Gapdh*. Como muestra de referencia para calcular el  $\Delta\Delta C_t$  (control positivo) se utilizó cDNA sintetizado a partir del RNA extraído de un cerebro de ratón.

Todas las muestras se analizaron por triplicado, tanto para la expresión del gen de interés como para el gen control, en placa de 96 pocillos (*Twin-Tec real time PCR plates 96, #0030132513, Eppendorf*). La QPCR y la lectura de la señal se realizaron en el termociclador *Mastercycler ep Realplex 2 (Eppendorf)*.

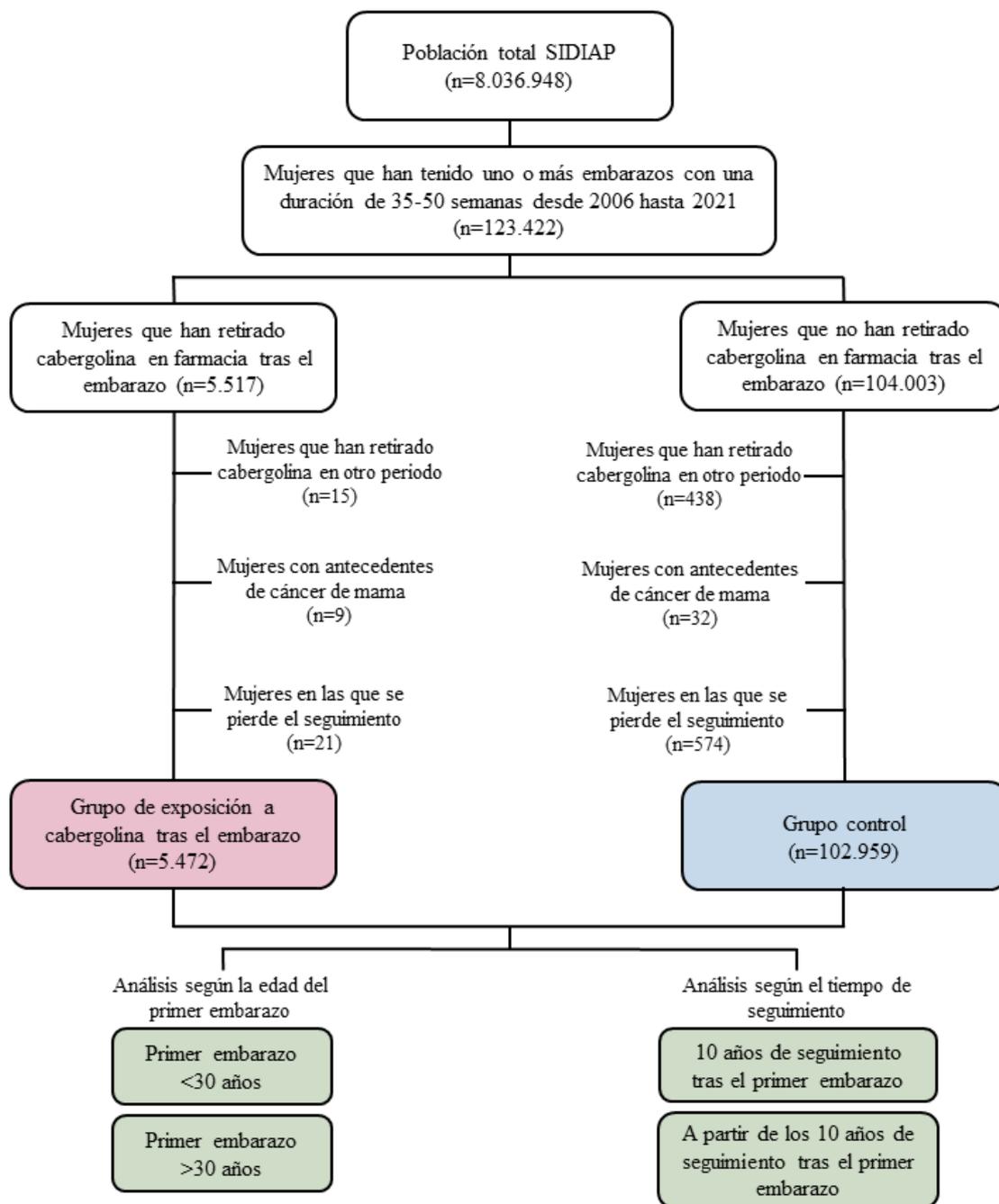
### **9. Fuente de datos y diseño del estudio epidemiológico en humanos**

Para evaluar el efecto de la cabergolina en la protección frente al cáncer de mama en la población humana, se realizó un estudio de cohortes dinámicas retrospectivo que incluyó a todas las mujeres registradas en la base de datos de SIDIAP (Sistema de Información para el Desarrollo de la Investigación en Atención Primaria). SIDIAP es una base de datos que contiene historias clínicas electrónicas de atención primaria de más del 80% de la población de Cataluña (España) y contiene información de salud de más de 8 millones de personas desde 2005 hasta la actualidad. Además, SIDIAP está vinculado a los datos de dispensaciones de las farmacias comunitarias, aportando datos de los usuarios que han recibido el fármaco de interés procedente de farmacias hospitalarias y extrahospitalarias. Este estudio fue aprobado por los Comités Científicos y de Ética del IDIAP. El investigador del IDIAP de colaboración requerida para llevar a cabo el estudio fue la Dra. Mercè Marzo Castillejo, investigadora en Atención Primaria.

En este estudio, se incluyeron mujeres que habían tenido uno o más embarazos con una duración de 35 a 50 semanas, en las que existían las variables de fecha de la última regla (FUR), fecha de terminación del embarazo, circunstancia de la terminación del embarazo y duración del mismo. Se eligió el límite inferior de 35 semanas porque se ha descrito que a partir de 34 semanas de gestación ya hay protección frente al cáncer de mama por efecto del embarazo <sup>101</sup>. El límite superior de 50 semanas se puso como un margen de seguridad para incluir aquellos casos de embarazo que tuvieran algún defecto en la FUR.

Los años de información recogida incluyen desde 2006 hasta 2021. Como casos expuestos al tratamiento, se incluyeron en el estudio aquellas mujeres que recibieron cabergolina durante el mismo mes de finalización del embarazo o el mes siguiente. Así, de las 123.422 mujeres (que habían tenido un total de 176.792 embarazos) con embarazo de duración entre 35 y 50 semanas, 104.003 no habían recibido tratamiento con cabergolina y 5.517 sí lo habían recibido después del embarazo. Se excluyeron del estudio las mujeres que habían recibido cabergolina fuera de la fecha elegida y, por tanto, sin relación con el embarazo (antes del mismo o mucho después), así como aquellas pacientes que habían tenido cáncer de mama antes del embarazo, tanto en casos expuestos como en controles. Finalmente, se estudiaron un total de 5.472 mujeres expuestas a cabergolina frente a 102.959 mujeres del grupo control (**Figura 10**).

Se tuvieron en cuenta variables sociodemográficas (edad, nivel de privación socioeconómica –índice MEDEA, *Mortalidad en áreas pequeñas Españolas y Desigualdades socioeconómicas y Ambientales*-, partos a término, partos prematuros, abortos y duración de embarazo –englobados en el acrónimo TEPAL-), variables clínicas (obesidad, dislipemia, hipertensión arterial, *diabetes mellitus*, menopausia, antecedentes familiares de cáncer de mama, antecedentes familiares de otras neoplasias no de mama, antecedentes personales de otras neoplasias malignas, quimioterapia previa, poliquistosis ovárica, toma de terapia hormonal, consumo de fármacos de prevención de cáncer de mama y mamografía previa) y factores de riesgo de cáncer de mama (hábito tabáquico, altura, peso, índice de masa corporal, consumo de alcohol y actividad física).



**Figura 10.** Esquema de la selección de la muestra para los análisis epidemiológicos. En rojo, el número de mujeres que pertenecen al grupo tratado con cabergolina (n=5.472). En azul, el número de mujeres del grupo control (n=102.959).

## 10. Análisis estadístico de los datos

### 10.1. Análisis de la distribución de las variables

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

## 10.2. Análisis univariantes y bivariantes de las asociaciones entre las variables

Para las comparaciones de variables temporales, se utilizó el estimador no paramétrico de la función de supervivencia *Kaplan-Meier*, cuya significación estadística se determinó mediante el *test de log-rank*.

Para la comparación de variables categóricas entre dos grupos, se utilizó el *test exacto de Fisher* y, entre más de dos grupos, el *test de Chi-cuadrado*.

Para comparar el valor tomado por una variable cuantitativa continua entre dos grupos, se utilizó el *test t de Student* cuando la variable siguió una distribución normal. En cambio, si la variable no se ajustó a una distribución normal, se utilizó el test no paramétrico de la *U de Mann Whitney*. Cuando se comparó una variable normal entre más de dos grupos se utilizó el *test del análisis de la varianza o ANOVA de una vía*; mientras que se utilizó el *test de Kruskal-Wallis* en el caso de las variables que no siguieron una distribución normal. Después de realizar la comparación global entre grupos, en el caso de que se detectasen diferencias estadísticamente significativas, se llevó a cabo un *test post-hoc* para determinar entre qué grupos se dieron las diferencias. Los *tests post-hoc* utilizados fueron el *test de Tukey* en el caso del *ANOVA* y el *test de Dunn* o el *test para cada par de Wilcoxon* en el caso del *test de Kruskal-Wallis*.

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

Se consideró que hubo diferencias estadísticamente significativas entre las variables cuando el *p-valor* fue menor de 0.05. Los programas estadísticos utilizados para realizar los test descritos fueron *Graphpad Prism 8* y *JMP12*.

## 10.3. Análisis estadístico de los datos de secuenciación del RNA-Seq

El análisis de los datos de secuenciación fue llevado a cabo por la empresa Novogene y por el Servicio de Bioinformática del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca. De forma resumida, en primer lugar, se filtró y se descartaron las lecturas de mala calidad (con contaminación de adaptadores, con un 10% o más de nucleótidos indeterminados, o con un 50% de nucleótidos de mala calidad) ya que pueden interferir en los análisis posteriores. El mapeo de las lecturas limpias con el genoma de referencia se realizó

mediante *HISAT2*, V2.0.5. Para estimar el nivel de expresión génica se utilizó el FPKM (Fragmentos por kilobase de la secuencia del transcrito por cada millón de pares de bases secuenciados) que tiene en cuenta los efectos tanto de la profundidad de la secuenciación como de la longitud del gen en el recuento de fragmentos. Los genes expresados significativamente fueron aquellos que superaron el umbral de FPKM de 1. Los análisis de expresión diferencial para muestras que son réplicas biológicas se realizaron con *StringTie-eB*. Los transcritos con un ajuste  $P < 0.05$  se consideraron como expresados diferencialmente entre dos grupos. Se llevaron a cabo análisis de enriquecimiento de los genes expresados diferencialmente para identificar procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares (*Gene Ontology*, *GO*, mediante el paquete de R *GOSemSim*) y vías celulares asociadas a esos genes mediante KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, a través del software *KOBAS v3.0.*)<sup>302,303</sup>.

Los resultados de los análisis de GO y KEGG se representaron mediante diagramas de puntos o *dotplot* y *cnetplot*.

#### 10.4. Análisis de los datos epidemiológicos

El análisis de los datos se llevó a cabo en la muestra global, en las mujeres que habían tenido el primer embarazo con 30 años o menos y con 30 años o más. Así mismo, se realizó el análisis de datos en aquellas mujeres que habían tenido un seguimiento limitado a los 10 años tras el primer embarazo y en aquellas mujeres que habían tenido un seguimiento de más de 10 años (**Figura 9**).

Se realizó un análisis descriptivo de las dos poblaciones de estudio (control y expuestas a cabergolina). Se calculó el *p-valor* mediante el *test exacto de Fisher*, cuando se compararon dos variables categóricas, y mediante *test t de student*, cuando se comparó una cuantitativa entre los dos grupos de estudio.

Se calculó la tasa de incidencia de cáncer de mama (incluido cáncer de mama invasivo y cáncer de mama *in situ*) por cada 1000 habitantes y año. Para la comparación de sucesos temporales, como la latencia de aparición de cáncer de mama, se utilizaron curvas de *Kaplan-Meier*, cuya significación estadística se determinó mediante el *test de log-rank*. Se realizaron análisis bivariantes mediante regresión de Cox en todas las variables de interés. Se ajustaron modelos de regresión multivariante de Cox para calcular los

cocientes de riesgo instantáneos (HR, *Hazard Ratio*) y los intervalos de confianza del 95% (IC del 95%), utilizando las variables clínicas relevantes en el desarrollo de cáncer de mama o que se habían asociado de forma significativa al desarrollo del mismo en los análisis bivariantes. En la construcción de los modelos finales de regresión de Cox se recurrió al *método de Wald*, con extracción progresiva de las variables que no contribuían de forma significativa al modelo final.

Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales con un 5% de nivel de significación. Los análisis se realizaron utilizando R 3.2.1. (*R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria*). Los análisis de los datos epidemiológicos se llevaron a cabo por un equipo de analistas de datos epidemiológicos del SIDIAP



## **BIBLIOGRAFÍA**



- 1 Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians* **71**, 209-249, doi:10.3322/caac.21660 (2021).
- 2 Ferlay, J. *et al.* Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, (accessed July 28, 2022). (2020).
- 3 Ferlay, J. *et al.* Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/tomorrow> (accessed July 28, 2022). (2020).
- 4 SEER\*Explorer. Breast Cancer: U.S. 5-Year Relative Survival, 2012-2018, All Race, Female, All Ages. National Cancer Institute. Accessed July 29, 2022. [https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=55&data\\_type=4&graph\\_type=5&compareBy=sex&chk\\_sex\\_3=3&series=9&race=1&age\\_range=1&stage=101&advopt\\_precision=1&advopt\\_show\\_ci=on&hdn\\_view=0&advopt\\_display=2](https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=55&data_type=4&graph_type=5&compareBy=sex&chk_sex_3=3&series=9&race=1&age_range=1&stage=101&advopt_precision=1&advopt_show_ci=on&hdn_view=0&advopt_display=2).
- 5 Matthews, T. J. & Hamilton, B. E. First births to older women continue to rise. *NCHS data brief*, 1-8 (2014).
- 6 Giaquinto, A. N. *et al.* Breast Cancer Statistics, 2022. *CA: a cancer journal for clinicians* **72**, 524-541, doi:10.3322/caac.21754 (2022).
- 7 Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S. & Jemal, A. Cancer statistics, 2023. *CA: a cancer journal for clinicians* **73**, 17-48, doi:10.3322/caac.21763 (2023).
- 8 Heer, E. *et al.* Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study. *The Lancet. Global health* **8**, e1027-e1037, doi:10.1016/S2214-109X(20)30215-1 (2020).
- 9 Melchor, L. & Benitez, J. The complex genetic landscape of familial breast cancer. *Human genetics* **132**, 845-863, doi:10.1007/s00439-013-1299-y (2013).
- 10 Broca, P. *Traité des tumeurs*. Vol. 13 (Librairie De La Faculte De Medecine) (1866).
- 11 Miki, Y. *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**, 66-71, doi:10.1126/science.7545954 (1994).
- 12 Wooster, R. *et al.* Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* **378**, 789-792, doi:10.1038/378789a0 (1995).
- 13 Mavaddat, N. *et al.* Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *Journal of the National Cancer Institute* **105**, 812-822, doi:10.1093/jnci/djt095 (2013).
- 14 Fackenthal, J. D. & Olopade, O. I. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nature reviews. Cancer* **7**, 937-948, doi:10.1038/nrc2054 (2007).
- 15 Antoniou, A. *et al.* Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *American journal of human genetics* **72**, 1117-1130, doi:10.1086/375033 (2003).
- 16 Tai, Y. C., Domchek, S., Parmigiani, G. & Chen, S. Breast cancer risk among male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute* **99**, 1811-1814, doi:10.1093/jnci/djm203 (2007).
- 17 Iqbal, J. *et al.* The incidence of pancreatic cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *British journal of cancer* **107**, 2005-2009, doi:10.1038/bjc.2012.483 (2012).
- 18 Nyberg, T. *et al.* Prostate Cancer Risks for Male BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: A Prospective Cohort Study. *European urology* **77**, 24-35, doi:10.1016/j.eururo.2019.08.025 (2020).
- 19 Breast Cancer Information Core, <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>.
- 20 Levy-Lahad, E. *et al.* Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jews in Israel: frequency and differential penetrance in ovarian cancer and in breast-ovarian cancer families. *American journal of human genetics* **60**, 1059-1067 (1997).
- 21 Diez, O. *et al.* Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Human mutation* **22**, 301-312, doi:10.1002/humu.10260 (2003).

## Bibliografia

- 22 Malkin, D. *et al.* Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250**, 1233-1238, doi:10.1126/science.1978757 (1990).
- 23 Lynch, E. D. *et al.* Inherited mutations in PTEN that are associated with breast cancer, cowden disease, and juvenile polyposis. *American journal of human genetics* **61**, 1254-1260, doi:10.1086/301639 (1997).
- 24 Pharoah, P. D., Guilford, P., Caldas, C. & International Gastric Cancer Linkage, C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology* **121**, 1348-1353, doi:10.1053/gast.2001.29611 (2001).
- 25 Hemminki, A. *et al.* [A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome]. *Duodecim; laaketieteellinen aikakauskirja* **114**, 667-668 (1998).
- 26 Tan, M. H. *et al.* Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 400-407, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2283 (2012).
- 27 Hearle, N. *et al.* Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**, 3209-3215, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0083 (2006).
- 28 Lim, W. *et al.* Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers. *Gastroenterology* **126**, 1788-1794, doi:10.1053/j.gastro.2004.03.014 (2004).
- 29 Apostolou, P. & Fostira, F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *BioMed research international* **2013**, 747318, doi:10.1155/2013/747318 (2013).
- 30 Easton, D. F. *et al.* Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* **447**, 1087-1093, doi:10.1038/nature05887 (2007).
- 31 Cox, A. *et al.* A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nature genetics* **39**, 352-358, doi:10.1038/ng1981 (2007).
- 32 Stacey, S. N. *et al.* Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nature genetics* **39**, 865-869, doi:10.1038/ng2064 (2007).
- 33 Turnbull, C. & Rahman, N. Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annual review of genomics and human genetics* **9**, 321-345, doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164339 (2008).
- 34 Giordano, S. H., Buzdar, A. U. & Hortobagyi, G. N. Breast cancer in men. *Annals of internal medicine* **137**, 678-687, doi:10.7326/0003-4819-137-8-200210150-00013 (2002).
- 35 DeSantis, C. E. *et al.* Breast cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians* **69**, 438-451, doi:10.3322/caac.21583 (2019).
- 36 Key, T. J., Verkasalo, P. K. & Banks, E. Epidemiology of breast cancer. *The Lancet. Oncology* **2**, 133-140, doi:10.1016/S1470-2045(00)00254-0 (2001).
- 37 Mesa-Eguiagaray, I. *et al.* Distinct temporal trends in breast cancer incidence from 1997 to 2016 by molecular subtypes: a population-based study of Scottish cancer registry data. *British journal of cancer* **123**, 852-859, doi:10.1038/s41416-020-0938-z (2020).
- 38 Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. & Jemal, A. Cancer statistics, 2022. *CA: a cancer journal for clinicians* **72**, 7-33, doi:10.3322/caac.21708 (2022).
- 39 Han, W. *et al.* Young age: an independent risk factor for disease-free survival in women with operable breast cancer. *BMC cancer* **4**, 82, doi:10.1186/1471-2407-4-82 (2004).
- 40 Azim, H. A., Jr. & Partridge, A. H. Biology of breast cancer in young women. *Breast cancer research : BCR* **16**, 427, doi:10.1186/s13058-014-0427-5 (2014).
- 41 Ward, E. *et al.* Cancer disparities by race/ethnicity and socioeconomic status. *CA: a cancer journal for clinicians* **54**, 78-93, doi:10.3322/canjclin.54.2.78 (2004).
- 42 DeSantis, C. E. *et al.* Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA: a cancer journal for clinicians* **66**, 31-42, doi:10.3322/caac.21320 (2016).
- 43 American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2019-2020. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2019. .

- 44 Yedjou, C. G. *et al.* Health and Racial Disparity in Breast Cancer. *Advances in experimental medicine and biology* **1152**, 31-49, doi:10.1007/978-3-030-20301-6\_3 (2019).
- 45 Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians* **69**, 7-34, doi:10.3322/caac.21551 (2019).
- 46 Ziegler, R. G. *et al.* Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *Journal of the National Cancer Institute* **85**, 1819-1827, doi:10.1093/jnci/85.22.1819 (1993).
- 47 Gomez, S. L. *et al.* Hidden breast cancer disparities in Asian women: disaggregating incidence rates by ethnicity and migrant status. *American journal of public health* **100 Suppl 1**, S125-131, doi:10.2105/AJPH.2009.163931 (2010).
- 48 Millikan, R. C. *et al.* Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **109**, 123-139, doi:10.1007/s10549-007-9632-6 (2008).
- 49 Pinheiro, S. P., Holmes, M. D., Pollak, M. N., Barbieri, R. L. & Hankinson, S. E. Racial differences in premenopausal endogenous hormones. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **14**, 2147-2153, doi:10.1158/1055-9965.EPI-04-0944 (2005).
- 50 Kato, I., Cichon, M., Yee, C. L., Land, S. & Korczak, J. F. African American-preponderant single nucleotide polymorphisms (SNPs) and risk of breast cancer. *Cancer epidemiology* **33**, 24-30, doi:10.1016/j.canep.2009.04.009 (2009).
- 51 Haiman, C. A. *et al.* A common variant at the TERT-CLPTM1L locus is associated with estrogen receptor-negative breast cancer. *Nature genetics* **43**, 1210-1214, doi:10.1038/ng.985 (2011).
- 52 Porter, P. L. *et al.* Racial differences in the expression of cell cycle-regulatory proteins in breast carcinoma. *Cancer* **100**, 2533-2542, doi:10.1002/cncr.20279 (2004).
- 53 Keenan, T. *et al.* Comparison of the Genomic Landscape Between Primary Breast Cancer in African American Versus White Women and the Association of Racial Differences With Tumor Recurrence. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **33**, 3621-3627, doi:10.1200/JCO.2015.62.2126 (2015).
- 54 Torre, L. A. *et al.* Cancer statistics for Asian Americans, Native Hawaiians, and Pacific Islanders, 2016: Converging incidence in males and females. *CA: a cancer journal for clinicians* **66**, 182-202, doi:10.3322/caac.21335 (2016).
- 55 DeSantis, C. E., Ma, J., Goding Sauer, A., Newman, L. A. & Jemal, A. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. *CA: a cancer journal for clinicians* **67**, 439-448, doi:10.3322/caac.21412 (2017).
- 56 Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, C. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* **358**, 1389-1399, doi:10.1016/S0140-6736(01)06524-2 (2001).
- 57 Brewer, H. R., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A. & Swerdlow, A. J. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast cancer research and treatment* **165**, 193-200, doi:10.1007/s10549-017-4325-2 (2017).
- 58 Metcalfe, K. A. *et al.* Breast cancer risks in women with a family history of breast or ovarian cancer who have tested negative for a BRCA1 or BRCA2 mutation. *British journal of cancer* **100**, 421-425, doi:10.1038/sj.bjc.6604830 (2009).
- 59 Carter, C. L., Corle, D. K., Micozzi, M. S., Schatzkin, A. & Taylor, P. R. A prospective study of the development of breast cancer in 16,692 women with benign breast disease. *American journal of epidemiology* **128**, 467-477, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a114995 (1988).
- 60 London, S. J., Connolly, J. L., Schnitt, S. J. & Colditz, G. A. A prospective study of benign breast disease and the risk of breast cancer. *Jama* **267**, 941-944 (1992).
- 61 Page, D. L. *et al.* Atypical lobular hyperplasia as a unilateral predictor of breast cancer risk: a retrospective cohort study. *Lancet* **361**, 125-129, doi:10.1016/S0140-6736(03)12230-1 (2003).

- 62 Hartmann, L. C. *et al.* Benign breast disease and the risk of breast cancer. *The New England journal of medicine* **353**, 229-237, doi:10.1056/NEJMoa044383 (2005).
- 63 Balleyguier, C. *et al.* BIRADS classification in mammography. *European journal of radiology* **61**, 192-194, doi:10.1016/j.ejrad.2006.08.033 (2007).
- 64 Wolfe, J. N. Risk for breast cancer development determined by mammographic parenchymal pattern. *Cancer* **37**, 2486-2492, doi:10.1002/1097-0142(197605)37:5<2486::aid-cnrcr2820370542>3.0.co;2-8 (1976).
- 65 Boyd, N. F. *et al.* Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *The New England journal of medicine* **356**, 227-236, doi:10.1056/NEJMoa062790 (2007).
- 66 McCormack, V. A. & dos Santos Silva, I. Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **15**, 1159-1169, doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0034 (2006).
- 67 Boyd, N. F. *et al.* Mammographic breast density as an intermediate phenotype for breast cancer. *The Lancet. Oncology* **6**, 798-808, doi:10.1016/S1470-2045(05)70390-9 (2005).
- 68 Boyd, N. F. *et al.* Heritability of mammographic density, a risk factor for breast cancer. *The New England journal of medicine* **347**, 886-894, doi:10.1056/NEJMoa013390 (2002).
- 69 Nazari, S. S. & Mukherjee, P. An overview of mammographic density and its association with breast cancer. *Breast cancer* **25**, 259-267, doi:10.1007/s12282-018-0857-5 (2018).
- 70 Huo, C. W. *et al.* Mammographic density-a review on the current understanding of its association with breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **144**, 479-502, doi:10.1007/s10549-014-2901-2 (2014).
- 71 Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, C. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *The Lancet. Oncology* **13**, 1141-1151, doi:10.1016/S1470-2045(12)70425-4 (2012).
- 72 Wyshak, G. & Frisch, R. E. Evidence for a secular trend in age of menarche. *The New England journal of medicine* **306**, 1033-1035, doi:10.1056/NEJM198204293061707 (1982).
- 73 Morris, D. H., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A. & Swerdlow, A. J. Secular trends in age at menarche in women in the UK born 1908-93: results from the Breakthrough Generations Study. *Paediatric and perinatal epidemiology* **25**, 394-400, doi:10.1111/j.1365-3016.2011.01202.x (2011).
- 74 Parent, A. S. *et al.* The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocrine reviews* **24**, 668-693, doi:10.1210/er.2002-0019 (2003).
- 75 Brix, N. *et al.* Maternal Smoking During Pregnancy and Timing of Puberty in Sons and Daughters: A Population-Based Cohort Study. *American journal of epidemiology* **188**, 47-56, doi:10.1093/aje/kwy206 (2019).
- 76 Karapanou, O. & Papadimitriou, A. Determinants of menarche. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* **8**, 115, doi:10.1186/1477-7827-8-115 (2010).
- 77 Watkins, D. J. *et al.* In utero and peripubertal exposure to phthalates and BPA in relation to female sexual maturation. *Environmental research* **134**, 233-241, doi:10.1016/j.envres.2014.08.010 (2014).
- 78 Gold, E. B. *et al.* Factors associated with age at natural menopause in a multiethnic sample of midlife women. *American journal of epidemiology* **153**, 865-874, doi:10.1093/aje/153.9.865 (2001).
- 79 Dall, G. V. & Britt, K. L. Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk. *Frontiers in oncology* **7**, 110, doi:10.3389/fonc.2017.00110 (2017).
- 80 Humans, I. W. G. o. t. E. o. C. R. t. Combined estrogen-progestogen contraceptives and combined estrogen-progestogen menopausal therapy. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* **91**, 1-528 (2007).

- 81 Cogliano, V. *et al.* Carcinogenicity of combined oestrogen-progestagen contraceptives and menopausal treatment. *The Lancet. Oncology* **6**, 552-553, doi:10.1016/s1470-2045(05)70273-4 (2005).
- 82 Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, C. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* **347**, 1713-1727, doi:10.1016/s0140-6736(96)90806-5 (1996).
- 83 Morch, L. S. *et al.* Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. *The New England journal of medicine* **377**, 2228-2239, doi:10.1056/NEJMoa1700732 (2017).
- 84 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. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* **350**, 1047-1059 (1997).
- 85 Beral, V., Banks, E. & Reeves, G. Evidence from randomised trials on the long-term effects of hormone replacement therapy. *Lancet* **360**, 942-944, doi:10.1016/S0140-6736(02)11032-4 (2002).
- 86 Ross, R. K., Paganini-Hill, A., Wan, P. C. & Pike, M. C. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *Journal of the National Cancer Institute* **92**, 328-332, doi:10.1093/jnci/92.4.328 (2000).
- 87 Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, C. Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence. *Lancet* **394**, 1159-1168, doi:10.1016/S0140-6736(19)31709-X (2019).
- 88 Ramazzini, B. *De Morbis Artificum Diatriba*, Venice J Corona. First Edition: Modena, 1700. (1743).
- 89 Lane-Clayton, J. *A Further Report on Cancer of the Breast, With Special Reference to Its Associated Antecedent Conditions*. Reports on Public Health and Medical Subjects No. 32. Ministry of Health. London: Published by His Majesty's Stationary Office. (1926).
- 90 MacMahon, B. *et al.* Age at first birth and breast cancer risk. *Bulletin of the World Health Organization* **43**, 209-221 (1970).
- 91 Lambe, M. *et al.* Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. *The New England journal of medicine* **331**, 5-9, doi:10.1056/NEJM199407073310102 (1994).
- 92 Liu, Q. *et al.* Transient increase in breast cancer risk after giving birth: postpartum period with the highest risk (Sweden). *Cancer causes & control : CCC* **13**, 299-305, doi:10.1023/a:1015287208222 (2002).
- 93 Nichols, H. B. *et al.* Breast Cancer Risk After Recent Childbirth: A Pooled Analysis of 15 Prospective Studies. *Annals of internal medicine* **170**, 22-30, doi:10.7326/M18-1323 (2019).
- 94 Meier-Abt, F. & Bentires-Alj, M. How pregnancy at early age protects against breast cancer. *Trends in molecular medicine* **20**, 143-153, doi:10.1016/j.molmed.2013.11.002 (2014).
- 95 Albrektsen, G., Heuch, I., Hansen, S. & Kvale, G. Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects. *British journal of cancer* **92**, 167-175, doi:10.1038/sj.bjc.6602302 (2005).
- 96 Andrieu, N. *et al.* Pregnancies, breast-feeding, and breast cancer risk in the International BRCA1/2 Carrier Cohort Study (IBCCS). *Journal of the National Cancer Institute* **98**, 535-544, doi:10.1093/jnci/djj132 (2006).
- 97 Medina, D. & Smith, G. H. Chemical carcinogen-induced tumorigenesis in parous, involuted mouse mammary glands. *Journal of the National Cancer Institute* **91**, 967-969, doi:10.1093/jnci/91.11.967 (1999).
- 98 Thordarson, G. *et al.* Refractoriness to mammary tumorigenesis in parous rats: is it caused by persistent changes in the hormonal environment or permanent biochemical alterations

- in the mammary epithelia? *Carcinogenesis* **16**, 2847-2853, doi:10.1093/carcin/16.11.2847 (1995).
- 99 Sivaraman, L. & Medina, D. Hormone-induced protection against breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **7**, 77-92, doi:10.1023/a:1015774524076 (2002).
- 100 Radisky, D. C. & Hartmann, L. C. Mammary involution and breast cancer risk: transgenic models and clinical studies. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **14**, 181-191, doi:10.1007/s10911-009-9123-y (2009).
- 101 Husby, A., Wohlfahrt, J., Oyen, N. & Melbye, M. Pregnancy duration and breast cancer risk. *Nature communications* **9**, 4255, doi:10.1038/s41467-018-06748-3 (2018).
- 102 Gonzalez-Jimenez, E., Garcia, P. A., Aguilar, M. J., Padilla, C. A. & Alvarez, J. Breastfeeding and the prevention of breast cancer: a retrospective review of clinical histories. *Journal of clinical nursing* **23**, 2397-2403, doi:10.1111/jocn.12368 (2014).
- 103 Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, C. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet* **360**, 187-195, doi:10.1016/S0140-6736(02)09454-0 (2002).
- 104 Ursin, G. *et al.* Reproductive factors and subtypes of breast cancer defined by hormone receptor and histology. *British journal of cancer* **93**, 364-371, doi:10.1038/sj.bjc.6602712 (2005).
- 105 Jernstrom, H. *et al.* Breast-feeding and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute* **96**, 1094-1098, doi:10.1093/jnci/djh211 (2004).
- 106 Evans, D. G. *et al.* Young age at first pregnancy does protect against early onset breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast cancer research and treatment* **167**, 779-785, doi:10.1007/s10549-017-4557-1 (2018).
- 107 Russo, J., Romero, A. L. & Russo, I. H. Architectural pattern of the normal and cancerous breast under the influence of parity. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **3**, 219-224 (1994).
- 108 Russo, J., Rivera, R. & Russo, I. H. Influence of age and parity on the development of the human breast. *Breast cancer research and treatment* **23**, 211-218, doi:10.1007/BF01833517 (1992).
- 109 Russo, J., Reina, D., Frederick, J. & Russo, I. H. Expression of phenotypical changes by human breast epithelial cells treated with carcinogens in vitro. *Cancer research* **48**, 2837-2857 (1988).
- 110 Jindal, S. *et al.* Postpartum breast involution reveals regression of secretory lobules mediated by tissue-remodeling. *Breast cancer research : BCR* **16**, R31, doi:10.1186/bcr3633 (2014).
- 111 Russo, I. H. & Russo, J. Pregnancy-induced changes in breast cancer risk. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **16**, 221-233, doi:10.1007/s10911-011-9228-y (2011).
- 112 Meier-Abt, F., Bentires-Alj, M. & Rochlitz, C. Breast cancer prevention: lessons to be learned from mechanisms of early pregnancy-mediated breast cancer protection. *Cancer research* **75**, 803-807, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2717 (2015).
- 113 Meier-Abt, F. *et al.* Parity induces differentiation and reduces Wnt/Notch signaling ratio and proliferation potential of basal stem/progenitor cells isolated from mouse mammary epithelium. *Breast cancer research : BCR* **15**, R36, doi:10.1186/bcr3419 (2013).
- 114 Choudhury, S. *et al.* Molecular profiling of human mammary gland links breast cancer risk to a p27(+) cell population with progenitor characteristics. *Cell stem cell* **13**, 117-130, doi:10.1016/j.stem.2013.05.004 (2013).
- 115 Maller, O. *et al.* Collagen architecture in pregnancy-induced protection from breast cancer. *Journal of cell science* **126**, 4108-4110, doi:10.1242/jcs.121590 (2013).
- 116 Loehberg, C. R. *et al.* Assessment of mammographic density before and after first full-term pregnancy. *European journal of cancer prevention : the official journal of the*

- European Cancer Prevention Organisation* **19**, 405-412, doi:10.1097/CEJ.0b013e32833ca1f4 (2010).
- 117 Blakely, C. M. *et al.* Hormone-induced protection against mammary tumorigenesis is conserved in multiple rat strains and identifies a core gene expression signature induced by pregnancy. *Cancer research* **66**, 6421-6431, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4235 (2006).
- 118 Santucci-Pereira, J. *et al.* Genomic signature of parity in the breast of premenopausal women. *Breast cancer research : BCR* **21**, 46, doi:10.1186/s13058-019-1128-x (2019).
- 119 Peri, S. *et al.* Defining the genomic signature of the parous breast. *BMC medical genomics* **5**, 46, doi:10.1186/1755-8794-5-46 (2012).
- 120 Belitskaya-Levy, I. *et al.* Characterization of a genomic signature of pregnancy identified in the breast. *Cancer prevention research* **4**, 1457-1464, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0021 (2011).
- 121 Katz, T. A. Potential Mechanisms underlying the Protective Effect of Pregnancy against Breast Cancer: A Focus on the IGF Pathway. *Frontiers in oncology* **6**, 228, doi:10.3389/fonc.2016.00228 (2016).
- 122 Holmes, M. D., Pollak, M. N. & Hankinson, S. E. Lifestyle correlates of plasma insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 3 concentrations. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **11**, 862-867 (2002).
- 123 Hankinson, S. E. *et al.* Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* **351**, 1393-1396, doi:10.1016/S0140-6736(97)10384-1 (1998).
- 124 Feigman, M. J. *et al.* Pregnancy reprograms the epigenome of mammary epithelial cells and blocks the development of premalignant lesions. *Nature communications* **11**, 2649, doi:10.1038/s41467-020-16479-z (2020).
- 125 Russo, J., Balogh, G. A. & Russo, I. H. Full-term pregnancy induces a specific genomic signature in the human breast. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **17**, 51-66, doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-0678 (2008).
- 126 Russo, J. *et al.* Pregnancy-induced chromatin remodeling in the breast of postmenopausal women. *International journal of cancer* **131**, 1059-1070, doi:10.1002/ijc.27323 (2012).
- 127 Ghosh, S. *et al.* Genome-wide DNA methylation profiling reveals parity-associated hypermethylation of FOXA1. *Breast cancer research and treatment* **147**, 653-659, doi:10.1007/s10549-014-3132-2 (2014).
- 128 Katz, T. A. *et al.* Targeted DNA Methylation Screen in the Mouse Mammary Genome Reveals a Parity-Induced Hypermethylation of Igf1r That Persists Long after Parturition. *Cancer prevention research* **8**, 1000-1009, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-15-0178 (2015).
- 129 Huh, S. J. *et al.* Age- and pregnancy-associated DNA methylation changes in mammary epithelial cells. *Stem cell reports* **4**, 297-311, doi:10.1016/j.stemcr.2014.12.009 (2015).
- 130 van den Brandt, P. A. *et al.* Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *American journal of epidemiology* **152**, 514-527, doi:10.1093/aje/152.6.514 (2000).
- 131 Harris, H. R., Willett, W. C., Terry, K. L. & Michels, K. B. Body fat distribution and risk of premenopausal breast cancer in the Nurses' Health Study II. *Journal of the National Cancer Institute* **103**, 273-278, doi:10.1093/jnci/djq500 (2011).
- 132 Renehan, A. G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R. F. & Zwahlen, M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* **371**, 569-578, doi:10.1016/S0140-6736(08)60269-X (2008).
- 133 Premenopausal Breast Cancer Collaborative, G. *et al.* Association of Body Mass Index and Age With Subsequent Breast Cancer Risk in Premenopausal Women. *JAMA oncology* **4**, e181771, doi:10.1001/jamaoncol.2018.1771 (2018).

- 134 Garcia-Estevez, L. *et al.* Obesity and Breast Cancer: A Paradoxical and Controversial Relationship Influenced by Menopausal Status. *Frontiers in oncology* **11**, 705911, doi:10.3389/fonc.2021.705911 (2021).
- 135 Sanchez-Jimenez, F., Perez-Perez, A., de la Cruz-Merino, L. & Sanchez-Margalet, V. Obesity and Breast Cancer: Role of Leptin. *Frontiers in oncology* **9**, 596, doi:10.3389/fonc.2019.00596 (2019).
- 136 Pan, H. *et al.* Association between serum leptin levels and breast cancer risk: An updated systematic review and meta-analysis. *Medicine* **97**, e11345, doi:10.1097/MD.00000000000011345 (2018).
- 137 Lynch, B. M., Neilson, H. K. & Friedenreich, C. M. Physical activity and breast cancer prevention. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* **186**, 13-42, doi:10.1007/978-3-642-04231-7\_2 (2011).
- 138 Guo, W., Fensom, G. K., Reeves, G. K. & Key, T. J. Physical activity and breast cancer risk: results from the UK Biobank prospective cohort. *British journal of cancer* **122**, 726-732, doi:10.1038/s41416-019-0700-6 (2020).
- 139 Monninkhof, E. M. *et al.* Physical activity and breast cancer: a systematic review. *Epidemiology* **18**, 137-157, doi:10.1097/01.ede.0000251167.75581.98 (2007).
- 140 Zhang, S. M. *et al.* Alcohol consumption and breast cancer risk in the Women's Health Study. *American journal of epidemiology* **165**, 667-676, doi:10.1093/aje/kwk054 (2007).
- 141 Chen, W. Y., Rosner, B., Hankinson, S. E., Colditz, G. A. & Willett, W. C. Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *Jama* **306**, 1884-1890, doi:10.1001/jama.2011.1590 (2011).
- 142 Smith-Warner, S. A. *et al.* Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *Jama* **279**, 535-540, doi:10.1001/jama.279.7.535 (1998).
- 143 Al-Sader, H., Abdul-Jabar, H., Allawi, Z. & Haba, Y. Alcohol and breast cancer: the mechanisms explained. *Journal of clinical medicine research* **1**, 125-131, doi:10.4021/jocmr2009.07.1246 (2009).
- 144 Bhatia, S. *et al.* High risk of subsequent neoplasms continues with extended follow-up of childhood Hodgkin's disease: report from the Late Effects Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **21**, 4386-4394, doi:10.1200/JCO.2003.11.059 (2003).
- 145 Kenney, L. B. *et al.* Breast cancer after childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Annals of internal medicine* **141**, 590-597, doi:10.7326/0003-4819-141-8-200410190-00006 (2004).
- 146 Travis, L. B. *et al.* Breast cancer following radiotherapy and chemotherapy among young women with Hodgkin disease. *Jama* **290**, 465-475, doi:10.1001/jama.290.4.465 (2003).
- 147 Tokunaga, M. *et al.* Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, 1950-1985. *Radiation research* **138**, 209-223 (1994).
- 148 Wintre, M. G. & Hicks, R. P. Characteristics of adolescents and young adults attending an alternative treatment clinic. *Canadian journal of public health = Revue canadienne de sante publique* **78**, 124-128 (1987).
- 149 Brenner, A. V. *et al.* Incidence of Breast Cancer in the Life Span Study of Atomic Bomb Survivors: 1958-2009. *Radiation research* **190**, 433-444, doi:10.1667/RR15015.1 (2018).
- 150 Titus-Ernstoff, L. *et al.* Long-term cancer risk in women given diethylstilbestrol (DES) during pregnancy. *British journal of cancer* **84**, 126-133, doi:10.1054/bjoc.2000.1521 (2001).
- 151 Palmer, J. R. *et al.* Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **15**, 1509-1514, doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0109 (2006).
- 152 Harbeck, N. *et al.* Breast cancer. *Nature reviews. Disease primers* **5**, 66, doi:10.1038/s41572-019-0111-2 (2019).
- 153 Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752, doi:10.1038/35021093 (2000).

- 154 Sorlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10869-10874, doi:10.1073/pnas.191367098 (2001).
- 155 Györffy, B. *et al.* Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast cancer research : BCR* **17**, 11, doi:10.1186/s13058-015-0514-2 (2015).
- 156 Giuliano, A. E. *et al.* Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: a cancer journal for clinicians* **67**, 290-303, doi:10.3322/caac.21393 (2017).
- 157 Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H. & Band, V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer biology & therapy* **10**, 955-960, doi:10.4161/cbt.10.10.13879 (2010).
- 158 Rakha, E. A. *et al.* Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast cancer research : BCR* **12**, 207, doi:10.1186/bcr2607 (2010).
- 159 Goldhirsch, A. *et al.* Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **22**, 1736-1747, doi:10.1093/annonc/mdr304 (2011).
- 160 Coates, A. S. *et al.* Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **26**, 1533-1546, doi:10.1093/annonc/mdv221 (2015).
- 161 Giuliano, A. E., Edge, S. B. & Hortobagyi, G. N. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Annals of surgical oncology* **25**, 1783-1785, doi:10.1245/s10434-018-6486-6 (2018).
- 162 Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation* **121**, 2750-2767, doi:10.1172/JCI45014 (2011).
- 163 Yersal, O. & Barutca, S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World journal of clinical oncology* **5**, 412-424, doi:10.5306/wjco.v5.i3.412 (2014).
- 164 van de Vijver, M. J. *et al.* A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *The New England journal of medicine* **347**, 1999-2009, doi:10.1056/NEJMoa021967 (2002).
- 165 Rakha, E. A. & Green, A. R. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. *Pathology* **49**, 111-119, doi:10.1016/j.pathol.2016.10.012 (2017).
- 166 Vieira, A. F. & Schmitt, F. An Update on Breast Cancer Multigene Prognostic Tests--Emergent Clinical Biomarkers. *Frontiers in medicine* **5**, 248, doi:10.3389/fmed.2018.00248 (2018).
- 167 Oftedal, O. T. The mammary gland and its origin during synapsid evolution. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **7**, 225-252, doi:10.1023/a:1022896515287 (2002).
- 168 Macias, H. & Hinck, L. Mammary gland development. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* **1**, 533-557, doi:10.1002/wdev.35 (2012).
- 169 Slepicka, P. F., Somasundara, A. V. H. & Dos Santos, C. O. The molecular basis of mammary gland development and epithelial differentiation. *Seminars in cell & developmental biology* **114**, 93-112, doi:10.1016/j.semcdb.2020.09.014 (2021).
- 170 Watson, C. J. Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast cancer research : BCR* **8**, 203, doi:10.1186/bcr1401 (2006).
- 171 Schere-Levy, C. *et al.* Leukemia inhibitory factor induces apoptosis of the mammary epithelial cells and participates in mouse mammary gland involution. *Experimental cell research* **282**, 35-47, doi:10.1006/excr.2002.5666 (2003).
- 172 Zhao, L., Melenhorst, J. J. & Hennighausen, L. Loss of interleukin 6 results in delayed mammary gland involution: a possible role for mitogen-activated protein kinase and not

- signal transducer and activator of transcription 3. *Molecular endocrinology* **16**, 2902-2912, doi:10.1210/me.2001-0330 (2002).
- 173 Creamer, B. A. *et al.* Stat5 promotes survival of mammary epithelial cells through transcriptional activation of a distinct promoter in Akt1. *Molecular and cellular biology* **30**, 2957-2970, doi:10.1128/MCB.00851-09 (2010).
- 174 Jena, M. K., Jaswal, S., Kumar, S. & Mohanty, A. K. Molecular mechanism of mammary gland involution: An update. *Developmental biology* **445**, 145-155, doi:10.1016/j.ydbio.2018.11.002 (2019).
- 175 Atabai, K., Sheppard, D. & Werb, Z. Roles of the innate immune system in mammary gland remodeling during involution. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **12**, 37-45, doi:10.1007/s10911-007-9036-6 (2007).
- 176 Green, K. A. & Lund, L. R. ECM degrading proteases and tissue remodelling in the mammary gland. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **27**, 894-903, doi:10.1002/bies.20281 (2005).
- 177 Schedin, P. Pregnancy-associated breast cancer and metastasis. *Nature reviews. Cancer* **6**, 281-291, doi:10.1038/nrc1839 (2006).
- 178 Slepicka, P. F., Cyrill, S. L. & Dos Santos, C. O. Pregnancy and Breast Cancer: Pathways to Understand Risk and Prevention. *Trends in molecular medicine* **25**, 866-881, doi:10.1016/j.molmed.2019.06.003 (2019).
- 179 Visvader, J. E. & Stingl, J. Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes & development* **28**, 1143-1158, doi:10.1101/gad.242511.114 (2014).
- 180 Fu, N. Y., Nolan, E., Lindeman, G. J. & Visvader, J. E. Stem Cells and the Differentiation Hierarchy in Mammary Gland Development. *Physiological reviews* **100**, 489-523, doi:10.1152/physrev.00040.2018 (2020).
- 181 Shackleton, M. *et al.* Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* **439**, 84-88, doi:10.1038/nature04372 (2006).
- 182 Shehata, M. *et al.* Phenotypic and functional characterisation of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast cancer research : BCR* **14**, R134, doi:10.1186/bcr3334 (2012).
- 183 Lim, E. *et al.* Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature medicine* **15**, 907-913, doi:10.1038/nm.2000 (2009).
- 184 Molyneux, G. *et al.* BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell stem cell* **7**, 403-417, doi:10.1016/j.stem.2010.07.010 (2010).
- 185 Cristea, S. & Polyak, K. Dissecting the mammary gland one cell at a time. *Nature communications* **9**, 2473, doi:10.1038/s41467-018-04905-2 (2018).
- 186 Carlsson, A., Lindqvist, M. & Magnusson, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* **180**, 1200, doi:10.1038/1801200a0 (1957).
- 187 Meiser, J., Weindl, D. & Hiller, K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell communication and signaling : CCS* **11**, 34, doi:10.1186/1478-811X-11-34 (2013).
- 188 Nagatsu, T., Levitt, M. & Udenfriend, S. Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* **239**, 2910-2917 (1964).
- 189 Blaschko, H. The activity of l(-)-dopa decarboxylase. *The Journal of physiology* **101**, 337-349, doi:10.1113/jphysiol.1942.sp003988 (1942).
- 190 Holtz, P. Dopadecarboxylase. *Naturwissenschaften* **27**, 724-725, doi:10.1007/BF01494245 (1939).
- 191 Hiroi, T., Imaoka, S. & Funae, Y. Dopamine formation from tyramine by CYP2D6. *Biochemical and biophysical research communications* **249**, 838-843, doi:10.1006/bbrc.1998.9232 (1998).

- 192 Udenfriend, S. & Wyngaarden, J. B. Precursors of adrenal epinephrine and norepinephrine in vivo. *Biochimica et biophysica acta* **20**, 48-52, doi:10.1016/0006-3002(56)90261-x (1956).
- 193 Weinshilboum, R. M., Thoa, N. B., Johnson, D. G., Kopin, I. J. & Axelrod, J. Proportional release of norepinephrine and dopamine- $\beta$ -hydroxylase from sympathetic nerves. *Science* **174**, 1349-1351, doi:10.1126/science.174.4016.1349 (1971).
- 194 Erickson, J. D., Eiden, L. E. & Hoffman, B. J. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 10993-10997, doi:10.1073/pnas.89.22.10993 (1992).
- 195 Vaughan, R. A. & Foster, J. D. Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. *Trends in pharmacological sciences* **34**, 489-496, doi:10.1016/j.tips.2013.07.005 (2013).
- 196 Keibian, J. W. & Calne, D. B. Multiple receptors for dopamine. *Nature* **277**, 93-96, doi:10.1038/277093a0 (1979).
- 197 Bunzow, J. R. *et al.* Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* **336**, 783-787, doi:10.1038/336783a0 (1988).
- 198 Sibley, D. R. & Monsma, F. J., Jr. Molecular biology of dopamine receptors. *Trends in pharmacological sciences* **13**, 61-69, doi:10.1016/0165-6147(92)90025-2 (1992).
- 199 Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M. & Caron, M. G. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological reviews* **78**, 189-225, doi:10.1152/physrev.1998.78.1.189 (1998).
- 200 Vallone, D., Picetti, R. & Borrelli, E. Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **24**, 125-132, doi:10.1016/s0149-7634(99)00063-9 (2000).
- 201 Beaulieu, J. M. & Gainetdinov, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews* **63**, 182-217, doi:10.1124/pr.110.002642 (2011).
- 202 Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of cell science* **115**, 455-465, doi:10.1242/jcs.115.3.455 (2002).
- 203 Klein, M. O. *et al.* Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and molecular neurobiology* **39**, 31-59, doi:10.1007/s10571-018-0632-3 (2019).
- 204 Hikosaka, O., Nakamura, K., Sakai, K. & Nakahara, H. Central mechanisms of motor skill learning. *Current opinion in neurobiology* **12**, 217-222, doi:10.1016/s0959-4388(02)00307-0 (2002).
- 205 Magnusson, J. E. & Fisher, K. The involvement of dopamine in nociception: the role of D(1) and D(2) receptors in the dorsolateral striatum. *Brain research* **855**, 260-266, doi:10.1016/s0006-8993(99)02396-3 (2000).
- 206 Kelley, A. E. & Berridge, K. C. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 3306-3311, doi:20026361 (2002).
- 207 Demarest, K. T., McKay, D. W., Riegler, G. D. & Moore, K. E. Biochemical indices of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity during lactation: a lack of response to prolactin. *Neuroendocrinology* **36**, 130-137, doi:10.1159/000123449 (1983).
- 208 Krulich, L. Neurotransmitter control of thyrotropin secretion. *Neuroendocrinology* **35**, 139-147, doi:10.1159/000123369 (1982).
- 209 Watabe-Uchida, M., Zhu, L., Ogawa, S. K., Vamanrao, A. & Uchida, N. Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. *Neuron* **74**, 858-873, doi:10.1016/j.neuron.2012.03.017 (2012).
- 210 Pivonello, R., Pivonello, C., Simeoli, C., De Martino, M. C. & Colao, A. The dopaminergic control of Cushing's syndrome. *Journal of endocrinological investigation* **45**, 1297-1315, doi:10.1007/s40618-021-01661-x (2022).
- 211 Ben-Jonathan, N. & Hnasko, R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine reviews* **22**, 724-763, doi:10.1210/edrv.22.6.0451 (2001).

- 212 Moore, K. E. Interactions between prolactin and dopaminergic neurons. *Biology of reproduction* **36**, 47-58, doi:10.1095/biolreprod36.1.47 (1987).
- 213 Demarest, K. T., Riegler, G. D. & Moore, K. E. Prolactin-induced activation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons: evidence for both a rapid 'tonic' and a delayed 'induction' component. *Neuroendocrinology* **38**, 467-475, doi:10.1159/000123935 (1984).
- 214 Neville, M. C., McFadden, T. B. & Forsyth, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **7**, 49-66, doi:10.1023/a:1015770423167 (2002).
- 215 Goldstein, D. S. & Holmes, C. Neuronal source of plasma dopamine. *Clinical chemistry* **54**, 1864-1871, doi:10.1373/clinchem.2008.107193 (2008).
- 216 Quickel, K. E., Jr., Feldman, J. M. & Lebovitz, H. E. Inhibition of insulin secretion by serotonin and dopamine: species variation. *Endocrinology* **89**, 1295-1302, doi:10.1210/endo-89-5-1295 (1971).
- 217 Zeng, C. *et al.* Dysregulation of dopamine-dependent mechanisms as a determinant of hypertension: studies in dopamine receptor knockout mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **294**, H551-569, doi:10.1152/ajpheart.01036.2007 (2008).
- 218 Zarei, S. *et al.* Dopamine modulates von Willebrand factor secretion in endothelial cells via D2-D4 receptors. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **4**, 1588-1595, doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01998.x (2006).
- 219 Ehringer, H. & Hornykiewicz, O. [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klinische Wochenschrift* **38**, 1236-1239, doi:10.1007/BF01485901 (1960).
- 220 Spillantini, M. G. *et al.* Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839-840, doi:10.1038/42166 (1997).
- 221 Bird, E. D. Chemical pathology of Huntington's disease. *Annual review of pharmacology and toxicology* **20**, 533-551, doi:10.1146/annurev.pa.20.040180.002533 (1980).
- 222 Creese, I., Burt, D. R. & Snyder, S. H. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* **192**, 481-483, doi:10.1126/science.3854 (1976).
- 223 Carlsson, A. *et al.* Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annual review of pharmacology and toxicology* **41**, 237-260, doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.237 (2001).
- 224 Swanson, J. M. *et al.* Etiologic subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental factors and the dopamine hypothesis. *Neuropsychology review* **17**, 39-59, doi:10.1007/s11065-007-9019-9 (2007).
- 225 Singer, H. S., Butler, I. J., Tune, L. E., Seifert, W. E., Jr. & Coyle, J. T. Dopaminergic dysfunction in Tourette syndrome. *Annals of neurology* **12**, 361-366, doi:10.1002/ana.410120408 (1982).
- 226 Di Chiara, G. & Bassareo, V. Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Current opinion in pharmacology* **7**, 69-76, doi:10.1016/j.coph.2006.11.003 (2007).
- 227 Molitch, M. E. Pathologic hyperprolactinemia. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* **21**, 877-901 (1992).
- 228 Torre, D. L. & Falorni, A. Pharmacological causes of hyperprolactinemia. *Therapeutics and clinical risk management* **3**, 929-951 (2007).
- 229 Birkmayer, W. & Hornykiewicz, O. [The L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) effect in Parkinson's syndrome in man: On the pathogenesis and treatment of Parkinson akinesia]. *Archiv fur Psychiatrie und Nervenkrankheiten, vereinigt mit Zeitschrift fur die gesamte Neurologie und Psychiatrie* **203**, 560-574, doi:10.1007/BF00343235 (1962).
- 230 Birkmayer, W. & Hornykiewicz, O. [Additional Experimental Studies on L-Dopa in Parkinson's Syndrome and Reserpine Parkinsonism]. *Archiv fur Psychiatrie und Nervenkrankheiten* **206**, 367-381, doi:10.1007/BF00341704 (1964).

- 231 Schrag, A. & Quinn, N. Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study. *Brain : a journal of neurology* **123** ( Pt 11), 2297-2305, doi:10.1093/brain/123.11.2297 (2000).
- 232 Webster, J. A comparative review of the tolerability profiles of dopamine agonists in the treatment of hyperprolactinaemia and inhibition of lactation. *Drug safety* **14**, 228-238, doi:10.2165/00002018-199614040-00003 (1996).
- 233 dos Santos Nunes, V., El Dib, R., Boguszewski, C. L. & Nogueira, C. R. Cabergoline versus bromocriptine in the treatment of hyperprolactinemia: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis. *Pituitary* **14**, 259-265, doi:10.1007/s11102-010-0290-z (2011).
- 234 *Ficha técnica Cabergolina Teva 0,5 mg comprimidos EFG. Disponible en: [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/69669/FT\\_69669.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/69669/FT_69669.pdf) [Revisado Junio 2022].*
- 235 *Ficha técnica Cabergolina Teva 1 mg comprimidos EFG y Cabergolina Teva 2 mg comprimidos EFG. Disponible en: [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/69669/FT\\_69669.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/69669/FT_69669.pdf) [Revisado Junio 2022].*
- 236 Boutinaud, M. *et al.* Cabergoline inhibits prolactin secretion and accelerates involution in dairy cows after dry-off. *Journal of dairy science* **99**, 5707-5718, doi:10.3168/jds.2015-10782 (2016).
- 237 Boutinaud, M. *et al.* Inhibiting prolactin by cabergoline accelerates mammary gland remodeling during the early dry period in dairy cows. *Journal of dairy science* **100**, 9787-9798, doi:10.3168/jds.2017-12783 (2017).
- 238 Kvernmo, T., Hartter, S. & Burger, E. A review of the receptor-binding and pharmacokinetic properties of dopamine agonists. *Clinical therapeutics* **28**, 1065-1078, doi:10.1016/j.clinthera.2006.08.004 (2006).
- 239 US Food and Drug Administration. Sandoz Pharmaceutical Corp.: Bromocriptine mesylate (Parlodel); withdrawal of approval of the indication for the prevention of physiological lactation. *Fed Reg* **60**, 3404-3405 (1995).
- 240 Ranke, M. B. & Wit, J. M. Growth hormone - past, present and future. *Nature reviews. Endocrinology* **14**, 285-300, doi:10.1038/nrendo.2018.22 (2018).
- 241 Feldman, M., Ruan, W., Cunningham, B. C., Wells, J. A. & Kleinberg, D. L. Evidence that the growth hormone receptor mediates differentiation and development of the mammary gland. *Endocrinology* **133**, 1602-1608, doi:10.1210/endo.133.4.8404600 (1993).
- 242 Kleinberg, D. L., Feldman, M. & Ruan, W. IGF-I: an essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **5**, 7-17, doi:10.1023/a:1009507030633 (2000).
- 243 Richards, R. G., Klotz, D. M., Walker, M. P. & Diaugustine, R. P. Mammary gland branching morphogenesis is diminished in mice with a deficiency of insulin-like growth factor-I (IGF-I), but not in mice with a liver-specific deletion of IGF-I. *Endocrinology* **145**, 3106-3110, doi:10.1210/en.2003-1112 (2004).
- 244 Kleinberg, D. L. & Barcellos-Hoff, M. H. The pivotal role of insulin-like growth factor I in normal mammary development. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* **40**, 461-471, vii, doi:10.1016/j.ecl.2011.06.001 (2011).
- 245 Kleinberg, D. L., Wood, T. L., Furth, P. A. & Lee, A. V. Growth hormone and insulin-like growth factor-I in the transition from normal mammary development to preneoplastic mammary lesions. *Endocrine reviews* **30**, 51-74, doi:10.1210/er.2008-0022 (2009).
- 246 Subramani, R., Nandy, S. B., Pedroza, D. A. & Lakshmanaswamy, R. Role of Growth Hormone in Breast Cancer. *Endocrinology* **158**, 1543-1555, doi:10.1210/en.2016-1928 (2017).
- 247 Perry, J. K., Mohankumar, K. M., Emerald, B. S., Mertani, H. C. & Lobie, P. E. The contribution of growth hormone to mammary neoplasia. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **13**, 131-145, doi:10.1007/s10911-008-9070-z (2008).
- 248 Wagner, K., Hemminki, K. & Forsti, A. The GH1/IGF-1 axis polymorphisms and their impact on breast cancer development. *Breast cancer research and treatment* **104**, 233-248, doi:10.1007/s10549-006-9411-9 (2007).

## Bibliografia

- 249 Renehan, A. G. *et al.* Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet* **363**, 1346-1353, doi:10.1016/S0140-6736(04)16044-3 (2004).
- 250 van Eijck, C. H. *et al.* Somatostatin-receptor scintigraphy in primary breast cancer. *Lancet* **343**, 640-643, doi:10.1016/s0140-6736(94)92637-9 (1994).
- 251 He, Y. *et al.* The antiproliferative effects of somatostatin receptor subtype 2 in breast cancer cells. *Acta pharmacologica Sinica* **30**, 1053-1059, doi:10.1038/aps.2009.59 (2009).
- 252 Orlando, C. *et al.* Measurement of somatostatin receptor subtype 2 mRNA in breast cancer and corresponding normal tissue. *Endocrine-related cancer* **11**, 323-332, doi:10.1677/erc.0.0110323 (2004).
- 253 Anthony, L. & Freda, P. U. From somatostatin to octreotide LAR: evolution of a somatostatin analogue. *Current medical research and opinion* **25**, 2989-2999, doi:10.1185/03007990903328959 (2009).
- 254 Caplin, M. E. *et al.* Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors. *The New England journal of medicine* **371**, 224-233, doi:10.1056/NEJMoal316158 (2014).
- 255 Vinik, A. I. *et al.* Evaluation of Lanreotide Depot/Autogel Efficacy and Safety as a Carcinoid Syndrome Treatment (Elect): A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* **22**, 1068-1080, doi:10.4158/EP151172.OR (2016).
- 256 Schmid, H. A. Pasireotide (SOM230): development, mechanism of action and potential applications. *Molecular and cellular endocrinology* **286**, 69-74, doi:10.1016/j.mce.2007.09.006 (2008).
- 257 Bruns, C., Lewis, I., Briner, U., Meno-Tetang, G. & Weckbecker, G. SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *European journal of endocrinology* **146**, 707-716, doi:10.1530/eje.0.1460707 (2002).
- 258 Singh, B. *et al.* Insulin-like growth factor-I inhibition with pasireotide decreases cell proliferation and increases apoptosis in pre-malignant lesions of the breast: a phase 1 proof of principle trial. *Breast cancer research : BCR* **16**, 463, doi:10.1186/s13058-014-0463-1 (2014).
- 259 Kleinberg, D. L., Ameri, P. & Singh, B. Pasireotide, an IGF-I action inhibitor, prevents growth hormone and estradiol-induced mammary hyperplasia. *Pituitary* **14**, 44-52, doi:10.1007/s11102-010-0257-0 (2011).
- 260 Barton, M. B. *et al.* Complications following bilateral prophylactic mastectomy. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 61-66, doi:10.1093/jncimonographs/lgi039 (2005).
- 261 den Heijer, M. *et al.* Body image and psychological distress after prophylactic mastectomy and breast reconstruction in genetically predisposed women: a prospective long-term follow-up study. *European journal of cancer* **48**, 1263-1268, doi:10.1016/j.ejca.2011.10.020 (2012).
- 262 Fisher, B. *et al.* Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *Journal of the National Cancer Institute* **90**, 1371-1388, doi:10.1093/jnci/90.18.1371 (1998).
- 263 Cuzick, J. *et al.* Tamoxifen for prevention of breast cancer: extended long-term follow-up of the IBIS-I breast cancer prevention trial. *The Lancet. Oncology* **16**, 67-75, doi:10.1016/S1470-2045(14)71171-4 (2015).
- 264 Nelson, H. D., Fu, R., Zakher, B., Pappas, M. & McDonagh, M. Medication Use for the Risk Reduction of Primary Breast Cancer in Women: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *Jama* **322**, 868-886, doi:10.1001/jama.2019.5780 (2019).
- 265 Smith, S. G. *et al.* Factors affecting uptake and adherence to breast cancer chemoprevention: a systematic review and meta-analysis. *Annals of oncology : official*

- journal of the European Society for Medical Oncology **27**, 575-590, doi:10.1093/annonc/mdv590 (2016).
- 266 Cummings, S. R. *et al.* The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *Jama* **281**, 2189-2197, doi:10.1001/jama.281.23.2189 (1999).
- 267 Martino, S. *et al.* Continuing outcomes relevant to Evista: breast cancer incidence in postmenopausal osteoporotic women in a randomized trial of raloxifene. *Journal of the National Cancer Institute* **96**, 1751-1761, doi:10.1093/jnci/djh319 (2004).
- 268 Roetzheim, R. G. *et al.* Acceptance and adherence to chemoprevention among women at increased risk of breast cancer. *Breast* **24**, 51-56, doi:10.1016/j.breast.2014.11.006 (2015).
- 269 Vogel, V. G. *et al.* Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *Jama* **295**, 2727-2741, doi:10.1001/jama.295.23.joc60074 (2006).
- 270 Freedman, A. N. *et al.* Benefit/risk assessment for breast cancer chemoprevention with raloxifene or tamoxifen for women age 50 years or older. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 2327-2333, doi:10.1200/JCO.2010.33.0258 (2011).
- 271 LaCroix, A. Z. *et al.* Breast cancer incidence in the randomized PEARL trial of lasofoxifene in postmenopausal osteoporotic women. *Journal of the National Cancer Institute* **102**, 1706-1715, doi:10.1093/jnci/djq415 (2010).
- 272 Goss, P. E. *et al.* Exemestane for breast-cancer prevention in postmenopausal women. *The New England journal of medicine* **364**, 2381-2391, doi:10.1056/NEJMoa1103507 (2011).
- 273 Cuzick, J. *et al.* Anastrozole for prevention of breast cancer in high-risk postmenopausal women (IBIS-II): an international, double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **383**, 1041-1048, doi:10.1016/S0140-6736(13)62292-8 (2014).
- 274 Cuzick, J. *et al.* Use of anastrozole for breast cancer prevention (IBIS-II): long-term results of a randomised controlled trial. *Lancet* **395**, 117-122, doi:10.1016/S0140-6736(19)32955-1 (2020).
- 275 Britt, K. L., Cuzick, J. & Phillips, K. A. Key steps for effective breast cancer prevention. *Nature reviews. Cancer* **20**, 417-436, doi:10.1038/s41568-020-0266-x (2020).
- 276 Gail, M. H. *et al.* Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *Journal of the National Cancer Institute* **81**, 1879-1886, doi:10.1093/jnci/81.24.1879 (1989).
- 277 Farkas, A., Vanderberg, R., Merriam, S. & DiNardo, D. Breast Cancer Chemoprevention: A Practical Guide for the Primary Care Provider. *Journal of women's health* **29**, 46-56, doi:10.1089/jwh.2018.7643 (2020).
- 278 Tyrer, J., Duffy, S. W. & Cuzick, J. A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. *Statistics in medicine* **23**, 1111-1130, doi:10.1002/sim.1668 (2004).
- 279 Louro, J. *et al.* A systematic review and quality assessment of individualised breast cancer risk prediction models. *British journal of cancer* **121**, 76-85, doi:10.1038/s41416-019-0476-8 (2019).
- 280 Ball, S., Arevalo, M., Juarez, E., Payne, J. D. & Jones, C. Breast cancer chemoprevention: An update on current practice and opportunities for primary care physicians. *Preventive medicine* **129**, 105834, doi:10.1016/j.ypmed.2019.105834 (2019).
- 281 Bi, W. L. *et al.* Artificial intelligence in cancer imaging: Clinical challenges and applications. *CA: a cancer journal for clinicians* **69**, 127-157, doi:10.3322/caac.21552 (2019).
- 282 Gastouniotti, A., Desai, S., Ahluwalia, V. S., Conant, E. F. & Kontos, D. Artificial intelligence in mammographic phenotyping of breast cancer risk: a narrative review. *Breast cancer research : BCR* **24**, 14, doi:10.1186/s13058-022-01509-z (2022).

- 283 Morgan, M. B. & Mates, J. L. Applications of Artificial Intelligence in Breast Imaging. *Radiologic clinics of North America* **59**, 139-148, doi:10.1016/j.rcl.2020.08.007 (2021).
- 284 Momenimovahed, Z. & Salehiniya, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer (Dove Med Press)* **11**, 151-164, doi:10.2147/BCTT.S176070 (2019).
- 285 Watson, C. J. & Kreuzaler, P. A. Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *The International journal of developmental biology* **55**, 757-762, doi:10.1387/ijdb.113414cw (2011).
- 286 Liu, X. *et al.* Somatic loss of BRCA1 and p53 in mice induces mammary tumors with features of human BRCA1-mutated basal-like breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 12111-12116, doi:10.1073/pnas.0702969104 (2007).
- 287 Jonkers, J. *et al.* Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nature genetics* **29**, 418-425, doi:10.1038/ng747 (2001).
- 288 Luche, H., Weber, O., Nageswara Rao, T., Blum, C. & Fehling, H. J. Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in "knock-in" Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. *European journal of immunology* **37**, 43-53, doi:10.1002/eji.200636745 (2007).
- 289 Nair, A. B. & Jacob, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of basic and clinical pharmacy* **7**, 27-31, doi:10.4103/0976-0105.177703 (2016).
- 290 Walls, G. V. *et al.* Pasireotide Therapy of Multiple Endocrine Neoplasia Type 1-Associated Neuroendocrine Tumors in Female Mice Deleted for an Men1 Allele Improves Survival and Reduces Tumor Progression. *Endocrinology* **157**, 1789-1798, doi:10.1210/en.2015-1965 (2016).
- 291 Castellanos-Martin, A. *et al.* Unraveling heterogeneous susceptibility and the evolution of breast cancer using a systems biology approach. *Genome biology* **16**, 40, doi:10.1186/s13059-015-0599-z (2015).
- 292 Smalley, M. J. Isolation, culture and analysis of mouse mammary epithelial cells. *Methods in molecular biology* **633**, 139-170, doi:10.1007/978-1-59745-019-5\_11 (2010).
- 293 Porter, A. G. & Janicke, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation* **6**, 99-104, doi:10.1038/sj.cdd.4400476 (1999).
- 294 Gown, A. M. & Willingham, M. C. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **50**, 449-454, doi:10.1177/002215540205000401 (2002).
- 295 Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H. & Stein, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International journal of cancer* **31**, 13-20, doi:10.1002/ijc.2910310104 (1983).
- 296 Nielsen, T. O. *et al.* Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *Journal of the National Cancer Institute* **113**, 808-819, doi:10.1093/jnci/djaa201 (2021).
- 297 Penault-Llorca, F. & Radosevich-Robin, N. Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology* **49**, 166-171, doi:10.1016/j.pathol.2016.11.006 (2017).
- 298 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262 (2001).
- 299 Ball, R. K., Friis, R. R., Schoenenberger, C. A., Doppler, W. & Groner, B. Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *The EMBO journal* **7**, 2089-2095 (1988).
- 300 Castillo-Lluva, S. *et al.* A new role of SNAI2 in postlactational involution of the mammary gland links it to luminal breast cancer development. *Oncogene* **34**, 4797-4798, doi:10.1038/onc.2015.322 (2015).

- 301 Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**, 55-63, doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4 (1983).
- 302 Yu, G. Gene Ontology Semantic Similarity Analysis Using GOSemSim. *Methods in molecular biology* **2117**, 207-215, doi:10.1007/978-1-0716-0301-7\_11 (2020).
- 303 Bu, D. *et al.* KOBAS-i: intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis. *Nucleic acids research* **49**, W317-W325, doi:10.1093/nar/gkab447 (2021).
- 304 Corchado-Cobos, R. *Estudio del efecto protector del embarazo y del uso de análogos de la somatostatina frente al cáncer de mama [Tesis de doctorado no publicada]*, Universidad de Salamanca, (2022).
- 305 Maroulakou, I. G. *et al.* Distinct roles of the three Akt isoforms in lactogenic differentiation and involution. *Journal of cellular physiology* **217**, 468-477, doi:10.1002/jcp.21518 (2008).
- 306 Schorr, K. *et al.* Gain of Bcl-2 is more potent than bax loss in regulating mammary epithelial cell survival in vivo. *Cancer research* **59**, 2541-2545 (1999).
- 307 Humphreys, R. C. & Hennighausen, L. Signal transducer and activator of transcription 5a influences mammary epithelial cell survival and tumorigenesis. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **10**, 685-694 (1999).
- 308 Richert, M. M., Schwertfeger, K. L., Ryder, J. W. & Anderson, S. M. An atlas of mouse mammary gland development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **5**, 227-241, doi:10.1023/a:1026499523505 (2000).
- 309 Hennighausen, L. & Robinson, G. W. Information networks in the mammary gland. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 715-725, doi:10.1038/nrm1714 (2005).
- 310 Tsutsui, S. *et al.* Distinct Expression Patterns of Fibrillar Collagen Types I, III, and V in Association with Mammary Gland Remodeling during Pregnancy, Lactation and Weaning. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **25**, 219-232, doi:10.1007/s10911-020-09457-0 (2020).
- 311 Kondratskyi, A., Kondratska, K., Skryma, R. & Prevarskaya, N. Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* **1848**, 2532-2546, doi:10.1016/j.bbamem.2014.10.030 (2015).
- 312 Lima, S. M., Kehm, R. D. & Terry, M. B. Global breast cancer incidence and mortality trends by region, age-groups, and fertility patterns. *EClinicalMedicine* **38**, 100985, doi:10.1016/j.eclinm.2021.100985 (2021).
- 313 Porter, P. "Westernizing" women's risks? Breast cancer in lower-income countries. *The New England journal of medicine* **358**, 213-216, doi:10.1056/NEJMp0708307 (2008).
- 314 Pfeiffer, R. M., Webb-Vargas, Y., Wheeler, W. & Gail, M. H. Proportion of U.S. Trends in Breast Cancer Incidence Attributable to Long-term Changes in Risk Factor Distributions. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **27**, 1214-1222, doi:10.1158/1055-9965.EPI-18-0098 (2018).
- 315 Islami, F. *et al.* Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. *CA: a cancer journal for clinicians* **68**, 31-54, doi:10.3322/caac.21440 (2018).
- 316 <https://www.census.gov/library/stories/2022/04/fertility-rates-declined-for-younger-women-increased-for-older-women.html>.
- 317 Osterman, M. J. K., Hamilton, B. E., Martin, J. A., Driscoll, A. K. & Valenzuela, C. P. Births: Final Data for 2021. *National vital statistics reports : from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System* **72**, 1-53 (2023).
- 318 Max Roser, Esteban Ortiz-Ospina and Hannah Ritchie (2013) - "Life Expectancy". Published online at OurWorldInData.org. Obtenido de: 'https://ourworldindata.org/life-expectancy' [Fuente online]

- 319 Blumen, H., Fitch, K. & Polkus, V. Comparison of Treatment Costs for Breast Cancer, by Tumor Stage and Type of Service. *American health & drug benefits* **9**, 23-32 (2016).
- 320 Cuzick, J. *et al.* Selective oestrogen receptor modulators in prevention of breast cancer: an updated meta-analysis of individual participant data. *Lancet* **381**, 1827-1834, doi:10.1016/S0140-6736(13)60140-3 (2013).
- 321 Waters, E. A., Cronin, K. A., Graubard, B. I., Han, P. K. & Freedman, A. N. Prevalence of tamoxifen use for breast cancer chemoprevention among U.S. women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **19**, 443-446, doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0930 (2010).
- 322 Colditz, G. A. & Rosner, B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *American journal of epidemiology* **152**, 950-964, doi:10.1093/aje/152.10.950 (2000).
- 323 Jones, M. A., Islam, W., Faiz, R., Chen, X. & Zheng, B. Applying artificial intelligence technology to assist with breast cancer diagnosis and prognosis prediction. *Frontiers in oncology* **12**, 980793, doi:10.3389/fonc.2022.980793 (2022).
- 324 Lefrere, H. *et al.* Postpartum breast cancer: mechanisms underlying its worse prognosis, treatment implications, and fertility preservation. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* **31**, 412-422, doi:10.1136/ijgc-2020-002072 (2021).
- 325 Goddard, E. T. *et al.* Association Between Postpartum Breast Cancer Diagnosis and Metastasis and the Clinical Features Underlying Risk. *JAMA network open* **2**, e186997, doi:10.1001/jamanetworkopen.2018.6997 (2019).
- 326 Boyd, N. F., Martin, L. J., Yaffe, M. J. & Minkin, S. Mammographic density and breast cancer risk: current understanding and future prospects. *Breast cancer research : BCR* **13**, 223, doi:10.1186/bcr2942 (2011).
- 327 Lee, S. H. *et al.* Glandular Tissue Component and Breast Cancer Risk in Mammographically Dense Breasts at Screening Breast US. *Radiology* **301**, 57-65, doi:10.1148/radiol.2021210367 (2021).
- 328 Ochi, T., Tsunoda, H., Yamauchi, H. & Takahashi, O. Impact of childbirth history on dense breast in mammographic screening: a cross-sectional study. *BMC women's health* **22**, 194, doi:10.1186/s12905-022-01772-4 (2022).
- 329 Gieniec, K. A. & Davis, F. M. Mammary basal cells: Stars of the show. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* **1869**, 119159, doi:10.1016/j.bbamcr.2021.119159 (2022).
- 330 Li, S., Chang, S., Qi, X., Richardson, J. A. & Olson, E. N. Requirement of a myocardin-related transcription factor for development of mammary myoepithelial cells. *Molecular and cellular biology* **26**, 5797-5808, doi:10.1128/MCB.00211-06 (2006).
- 331 Sun, Y. *et al.* Acute myeloid leukemia-associated Mkl1 (Mrtf-a) is a key regulator of mammary gland function. *Molecular and cellular biology* **26**, 5809-5826, doi:10.1128/MCB.00024-06 (2006).
- 332 Shams, A. Re-evaluation of the myoepithelial cells roles in the breast cancer progression. *Cancer cell international* **22**, 403, doi:10.1186/s12935-022-02829-y (2022).
- 333 Travers, M. T. *et al.* The role of prolactin and growth hormone in the regulation of casein gene expression and mammary cell survival: relationships to milk synthesis and secretion. *Endocrinology* **137**, 1530-1539, doi:10.1210/endo.137.5.8612482 (1996).
- 334 Tonner, E., Allan, G. J. & Flint, D. J. Hormonal control of plasmin and tissue-type plasminogen activator activity in rat milk during involution of the mammary gland. *The Journal of endocrinology* **167**, 265-273, doi:10.1677/joe.0.1670265 (2000).
- 335 Ben-Jonathan, N., Mershon, J. L., Allen, D. L. & Steinmetz, R. W. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine reviews* **17**, 639-669, doi:10.1210/edrv-17-6-639 (1996).
- 336 Gerlo, S., Davis, J. R., Mager, D. L. & Kooijman, R. Prolactin in man: a tale of two promoters. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **28**, 1051-1055, doi:10.1002/bies.20468 (2006).

- 337 Macotela, Y. *et al.* Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes* **61**, 1691-1699, doi:10.2337/db11-1753 (2012).
- 338 Borcharding, D. C. *et al.* Dopamine receptors in human adipocytes: expression and functions. *PLoS one* **6**, e25537, doi:10.1371/journal.pone.0025537 (2011).
- 339 Hugo, E. R., Borcharding, D. C., Gersin, K. S., Loftus, J. & Ben-Jonathan, N. Prolactin release by adipose explants, primary adipocytes, and LS14 adipocytes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **93**, 4006-4012, doi:10.1210/jc.2008-1172 (2008).
- 340 Stewart, W. C., Baugh, J. E., Jr., Floyd, Z. E. & Stephens, J. M. STAT 5 activators can replace the requirement of FBS in the adipogenesis of 3T3-L1 cells. *Biochemical and biophysical research communications* **324**, 355-359, doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.053 (2004).
- 341 Nanbu-Wakao, R., Fujitani, Y., Masuho, Y., Muramatu, M. & Wakao, H. Prolactin enhances CCAAT enhancer-binding protein-beta (C/EBP beta) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) messenger RNA expression and stimulates adipogenic conversion of NIH-3T3 cells. *Molecular endocrinology* **14**, 307-316, doi:10.1210/mend.14.2.0420 (2000).
- 342 Borcharding, D. C. *et al.* Expression and therapeutic targeting of dopamine receptor-1 (D1R) in breast cancer. *Oncogene* **35**, 3103-3113, doi:10.1038/onc.2015.369 (2016).
- 343 Ben-Jonathan, N., Borcharding, D. C. & Hugo, E. R. Dopamine Receptors in Breast Cancer: Prevalence, Signaling, and Therapeutic Applications. *Critical reviews in oncogenesis* **27**, 51-71, doi:10.1615/CritRevOncog.2022043641 (2022).
- 344 Ben-Jonathan, N., Borcharding, D. C., Fox, S. & Hugo, E. R. Activation of the cGMP/protein kinase G system in breast cancer by the dopamine receptor-1. *Cancer drug resistance* **2**, 933-947, doi:10.20517/cdr.2019.83 (2019).
- 345 Chapman, R. S. *et al.* Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes & development* **13**, 2604-2616, doi:10.1101/gad.13.19.2604 (1999).
- 346 Hutt, J. A., O'Rourke, J. P. & DeWille, J. Signal transducer and activator of transcription 3 activates CCAAT enhancer-binding protein delta gene transcription in G0 growth-arrested mouse mammary epithelial cells and in involuting mouse mammary gland. *The Journal of biological chemistry* **275**, 29123-29131, doi:10.1074/jbc.M004476200 (2000).
- 347 Stull, M. A. *et al.* Mammary gland homeostasis employs serotonergic regulation of epithelial tight junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 16708-16713, doi:10.1073/pnas.0708136104 (2007).
- 348 Hernandez, L. L., Collier, J. L., Vomachka, A. J., Collier, R. J. & Horseman, N. D. Suppression of lactation and acceleration of involution in the bovine mammary gland by a selective serotonin reuptake inhibitor. *The Journal of endocrinology* **209**, 45-54, doi:10.1530/JOE-10-0452 (2011).
- 349 Wang, Q. A. *et al.* Reversible De-differentiation of Mature White Adipocytes into Preadipocyte-like Precursors during Lactation. *Cell metabolism* **28**, 282-288 e283, doi:10.1016/j.cmet.2018.05.022 (2018).
- 350 Butte, N. F., Hopkinson, J. M. & Nicolson, M. A. Leptin in human reproduction: serum leptin levels in pregnant and lactating women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **82**, 585-589, doi:10.1210/jcem.82.2.3731 (1997).
- 351 Highman, T. J., Friedman, J. E., Huston, L. P., Wong, W. W. & Catalano, P. M. Longitudinal changes in maternal serum leptin concentrations, body composition, and resting metabolic rate in pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology* **178**, 1010-1015, doi:10.1016/s0002-9378(98)70540-x (1998).
- 352 Balci, H. *et al.* The relationship between prolactin (PRL), leptin, nitric oxide (NO), and cytokines in patients with hyperprolactinemia. *Pituitary* **12**, 170-176, doi:10.1007/s11102-008-0140-4 (2009).
- 353 Park, J. W., Zhao, L., Willingham, M. C. & Cheng, S. Y. Inhibition of STAT3 signaling blocks obesity-induced mammary hyperplasia in a mouse model. *American journal of cancer research* **7**, 727-739 (2017).

## *Bibliografia*

- 354 McFarland-Mancini, M., Hugo, E., Loftus, J. & Ben-Jonathan, N. Induction of prolactin expression and release in human preadipocytes by cAMP activating ligands. *Biochemical and biophysical research communications* **344**, 9-16, doi:10.1016/j.bbrc.2006.03.168 (2006).
- 355 Sarkar, C., Basu, B., Chakroborty, D., Dasgupta, P. S. & Basu, S. The immunoregulatory role of dopamine: an update. *Brain, behavior, and immunity* **24**, 525-528, doi:10.1016/j.bbi.2009.10.015 (2010).

