

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
FACULTAD DE MEDICINA



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

**CARACTERIZACIÓN DE NF-KB EN CÁNCER DE
MAMA: POSIBLE FACTOR PRONÓSTICO Y
PREDICTIVO**

Tesis doctoral presentada por JESSICA FURRIOL PALMER,
Licenciada en Biología, para optar al título de Doctor.

Directoras de la tesis:

Dra. ANA LLUCH HERNÁNDEZ

Dra. PILAR EROLES ASENSIO

SERVICIO DE HEMATOLOGÍA Y ONCOLOGÍA
FUNDACIÓN DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO/INCLIVA



Fundación Investigación Clínica de Valencia
Instituto de Investigación Sanitaria – INCLIVA

Valencia 2013



**Facultad de Medicina y
Odontología
Departamento de Fisiología**

Dra. **Ana Lluch Hernández**, Catedrática del Departamento de Medicina Interna de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València y Jefa del Servicio de Hematología y Oncología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Dra. **Pilar Eroles Asensio**, Investigadora de la Fundación para la Investigación del Hospital Clínico de Valencia/Instituto de Investigación INCLIVA.

CERTIFICAN:

Que Dña. Jessica Furriol Palmer, Licenciada en Biología por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección la presente tesis doctoral titulada:

**CARACTERIZACIÓN DE NF-KB EN CÁNCER DE MAMA:
POSIBLE FACTOR PRONÓSTICO Y PREDICTIVO**

para la obtención del título de Doctora.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación.

Fdo. Dra. Ana Lluch Hernández Fdo. Dra. Pilar Eroles Asensio

Valencia 2013

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mis directoras de tesis el haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis y por su apoyo todos estos años.

A Ana por darme la oportunidad de formar parte de tu grupo y haberme dado una visión clínica de las cosas, enseñándome la importancia de la investigación translacional.

A Pilar por todo el camino que hemos recorrido y por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas.

A Fede porque por muy ocupado que estuvieras, siempre has estado ahí dispuesto a ayudar, hasta finalmente convertirte en mi tutor.

A Gloria los consejos que me has dado no tienen precio. Has estado ahí cuando más lo necesitaba.

Por supuesto en los agradecimientos no pueden faltar mis compañeros de laboratorio, con los que he trabajado y convivido todos los días durante la realización de mi tesis especialmente a Maider, con la que he compartido más que tiempo de laboratorio y que me ha ayudado en todo lo que he necesitado. También a Sandra, Patri, Bego, Edu, Joan y María por lo bueno y a veces lo malo que hemos pasado juntos, pero sobretodo por las risas que hemos compartido.

También quisiera agradecer la ayuda prestada a Jaume, Octavio y Elisa del Departamento de Patología, a Maite de onco por haberme ayudado con la parte clínica de la tesis y a Antonio, Julio y Marisa por hacer divertidos los lunes.

A Joan Albanell, Fredi Rojo y Ana Rovira por aceptarme en su laboratorio. A Irene, Alba y el resto por ayudarme mientras estuve allí.

Por otra parte, agradezco la ayuda que me han prestado a nivel administrativo a Gabi, Ruth, Jessi, Yolanda y a las datas.

Quisiera expresar mi agradecimiento al departamento de Fisio, donde realmente empecé a saber lo que era la ciencia:

Pepe te estoy muy agradecida de la oportunidad que me diste de trabajar en el departamento gracias a la cual aprendí a manejarme en un laboratorio. Sin esa experiencia no podría haber realizado esta tesis doctoral.

A las secres Mari, Elena y Eva por estar siempre dispuestas a ayudar.

A Pain y Lele por ser más que mis compañeras. A Ana, Mery, Chelo y Juan Sastre por ayudarme a dar mis primeros pasos en ciencia. A todos los demás, que sois muchos, por los buenos ratos que hemos pasado.

También quiero agradecer esta tesis a mis amigos. A los cerveceros de los jueves: las mejores cervezas del mundo me las he tomado con vosotros. Rubén, me encanta hablar contigo, me das siempre una visión diferente y generalmente menos mala de las cosas. Amparo nuestras risas brujeando no tienen precio. Cuando quieras nos hacemos otro viaje de chicas. Pepe, sé que tú has entendido el proceso de esta tesis mejor que nadie y me has ayudado mucho en todo el laaaargo proceso de llegar aquí. Manu, el último en llegar. Cuando seas rico espero que te acuerdes de tus amigos biólogos.

A los buñoleros, Rosi porque tras más de dieciséis de amistad seguimos pasando horas y horas hablando y siempre tenemos algo de decirnos. Raquel que desde hace tanto estás ahí, nuestras

tortillas de patatas son las mejores con diferencia. Debéis de ser la pedagoga y la economista que más sabéis de cáncer de mama del mundo. Espero que podamos seguir opinando constructivamente por muchos años. Javi, por poner cara de interesado cuando en realidad no me escuchas. Al final todos habéis acabado sufriendo mi tesis.

A mis demás amigos de Buñol, que en un momento u otro han acabado sabiendo más de lo que deseaban sobre tesis doctorales, cáncer y biología.

Y dejando al final lo más importante, gracias a mi familia por todo el apoyo que me habéis dado. A mis padres, Oti y Rafa. Papá, podemos seguir discutiendo horas y horas y si te portas bien quitaré la mesa. Y Oti, ya puedes dedicar una poesía a mi tesis.

A mi hermano, Rafa. Quería un hermano y me concedieron el deseo, y no sabes lo orgullosa que estoy de ti. Me alegro de que seas mi hermano, pero sobretodo de que seas mi amigo.

A mis tíos, Dora y Rafa. Dora, ya no vas a tener excusa para llamarme por teléfono con lo de la tesis, aunque sé que me llamarás igualmente, sabes que eres mi tía favorita. Tío, siempre te has interesado por lo que hacía aunque no fuera tu campo y a veces tus preguntas me pusieran en un aprieto.

A mis primos, Rafa y Cristina. ¡Mis chicos! Espero que siempre estemos unidos. Para mí ya sabéis que sois mis hermanicos.

A David, por haber sufrido esta tesis junto a mí. Por todas las malas leches y agobios. Y también por las risas que hemos compartido, por estar ahí y apoyarme cuando lo necesito y por nuestro futuro. ¡Por fin!

RESUMEN

La activación del factor de transcripción NF- κ B juega un papel importante en el proceso de la oncogénesis. El propósito del presente estudio fue determinar si NF- κ B se encuentra activado en cáncer de mama e identificar la correlación de su actividad con las características clínico-patológicas del tumor. Además, se analizaron aquellos genes cuya expresión está regulada por NF- κ B en tejido tumoral, tejido adyacente al tumor y tejido normal procedente de reducciones mamarias. Finalmente se estudio si NF- κ B o alguno de sus genes diana podría tener un papel en el tratamiento del cáncer de mama.

Para el estudio de la activación de NF- κ B se utilizaron muestras de tejido congelado procedentes de cirugía que fueron incluidas en OCT (compuesto para la temperatura óptima de corte) y a las que se les realizó un análisis histopatológico para comprobar la calidad. De las 450 muestras que analizamos, seleccionamos 148 muestras de carcinoma mamario y 16 de tejido adyacente no tumoral. Se obtuvieron los extractos proteicos de todas ellas y la determinación de la activación de las cinco subunidades de NF- κ B se realizó mediante ELISA y se validó mediante western blot. Para la determinación de la expresión génica utilizamos tejido parafinado. Se extrajo el ARN y se realizó la transcripción inversa. La calidad de la muestra se determinó mediante el kit comercial "RT² RNA QC PCR array". El perfil génico se realizó con "RT² Profiler PCR Array Human NF- κ B Signaling Targets". La sensibilidad al tratamiento con el fármaco quimioterápico doxorubicina se realizó con las líneas celulares derivadas de carcinoma mamario MCF7, MDAMB231, MDAMB468, SKBR3 y BT474. La activación de NF- κ B inducida por la doxorubicina se evaluó dichas líneas celulares, realizándose también la comparación de la expresión génica antes y después del tratamiento.

Se observó que las subunidades de NF- κ B p65, p50, p52 y relB se encuentran activadas de forma significativa en tejido tumoral frente a tejido no tumoral, siendo el valor- $p \leq 0,005$ en todos los casos. Además, en carcinoma ductal invasivo la activación de relB estaba asociada al tamaño tumoral ($p=0,004$), la invasión de tejidos adyacentes ($p=0,01$) y afectación ganglionar ($p= 0,003$) mientras que el aumento de la activación de la subunidad p65 estaba asociado a invasión linfática ($p=0,033$). Asimismo los niveles de activación de p52 y c-rel fueron más altos en carcinoma ductal invasivo que en carcinoma ductal *in situ* con valores- p de 0,008 y $p=0,019$ respectivamente. Por otra parte, valores de

activación altos para p52 y relB en tumores positivos para receptores de estrógenos estuvieron significativamente asociados a recidiva tras el tratamiento. Respecto al análisis de expresión de genes diana de NF-kB, encontramos diferencias significativas entre la expresión de tejido normal/adyacente y tumoral en los genes *CXCL10*, *CXCL9*, *MMP9* y *LTA* cuya expresión fue mayor en tejido tumoral y *MYC*, *EGFR* y *MAP2k6* cuya expresión disminuía. También observamos que la expresión de *MMP9*, *CXCL9* y *MYC* en tejido adyacente al tumor estaba aumentada respecto a tejido normal.

En líneas celulares observamos que el tratamiento con doxorubicina producía la activación de NF-kB y de la expresión de genes asociados a actividades quimocina y citocina, señalización intercelular y respuesta inflamatoria mientras que la expresión de genes relacionados con actividades anti-apoptóticas y transducción de señales estaba disminuída.

Estos datos indican que NF-kB está constitutivamente activado en cáncer de mama y sugiere que la actividad de NF-kB está asociada con la progresión tumoral y la supervivencia libre de enfermedad. Por otro lado, algunos genes asociados a NF-kB con expresión diferente entre tejido tumoral y normal podrían actuar como dianas terapéuticas potenciales en cáncer de mama ya que su expresión se modifica tras el tratamiento con doxorubicina. Finalmente se sugiere que el microambiente tumoral podría tener un papel destacado en la progresión del cáncer y la resistencia a fármacos.

ABSTRACT

Activation of transcription factor NF- κ B has been shown to play a role in oncogenesis. The purpose of the study was to determine whether NF- κ B is activated in breast tumour carcinoma tissues and to identify any correlation between its activity and the clinical-pathological features of tumours. Besides we analyse genes whose expression is regulated by NF- κ B in tumoral tissue, adjacent tumoral tissue and normal breast tissue. Finally we studied if NF- κ B or its target genes could have a role in the treatment of breast cancer.

For the study of activation of NF- κ B we used frozen breast tissues from surgery. For quality control the frozen tissues were included in optimal cutting temperature compound (OCT) and a histopathological analysis was performed. Of them, we select 148 human breast carcinoma tissues and 16 adjacent non-tumour tissues. Nuclear protein extracts were obtained and NF- κ B activation was determined by ELISA analysis and data were validated by western blot. To determine gene expression we used paraffin-embedded breast cancer tissues. The RNA was extracted and reverse transcription performed. The quality of samples was determined with RT² RNA QC PCR array. The RNA profile was identified with RT² Profiler PCR Array Human NF- κ B Signaling Targets. Sensibility to doxorubicin was tested in MCF7, MDAMB231, MDAMB468, SKBR3 and BT474 breast cancer-derived cell lines. Doxorubicin-induced NF- κ B activation was assessed in cells lines and a comparison between gene expression before and after the treatment with doxorubicin was performed.

NF- κ B study showed that p65, p50, p52 and relB subunits activation was significantly higher in breast tumours than in normal adjacent tissues ($p \leq 0.005$ in all cases). In invasive ductal carcinoma (IDC) relB activation was related to tumor size ($p=0.004$), invasion of adjacent tissues ($p=0.01$) and lymph nodes invasion ($p=0.003$) and p65 increased levels were associated with lymph nodes invasion ($p=0.033$). p52 and c-rel levels were higher in invasive ductal carcinoma (IDC) than in ductal carcinoma in situ (DCIS) with $p=0.008$ and $p=0.019$ respectively. Higher p52 and relB activation levels in oestrogen receptor-positive tumour tissues were significantly related to patients relapse. On the other hand we detect significant differences in the expression between normal/adjacent and tumoral tissues in genes *CXCL10*, *CXCL9*, *MMP9* and *LTA* whose levels were higher in tumoral tissue and *MYC*, *EGFR* and *MAP2k6* whose levels were lower. We also found that *MYC*, *CXCL9* and *MMP9*

expression was higher in adjacent tissue than normal tissue, pointing the importance of microenvironment in cancer. In cell lines we found that doxorubicin treatment enhanced NF- κ B activation and expression of genes related to chemokine and cytokine activities, cell-cell signalling and inflammatory response whereas gene expression associated with anti-apoptosis activity and signal transduction was decreased.

These data indicate NF- κ B is constitutively activated in human breast carcinoma tissues and suggest NF- κ B activity is related to tumour progression and disease-free patient survival. On the other hand, some genes related to NF- κ B with differential expression between tumor and normal tissue could be a potential target in breast cancer as its expression is modified by doxorubicin. Finally our data suggest microenvironment could have a role in cancer progression and drugs' resistance.

ÍNDICE GENERAL

Clave de abreviaturas.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	7
1. Estructura e histología de la glándula mamaria.....	9
2. Características del cáncer.....	10
3. Cáncer de mama. Epidemiología.....	11
3.1. Tipos de neoplasias mamarias.....	12
3.1.1. Cáncer de mama no invasivo (<i>in situ</i>)	12
3.1.1.1. Carcinoma ductal <i>in situ</i>	12
3.1.1.2. Carcinoma lobular <i>in situ</i>	13
3.1.2. Cáncer de mama invasivo.....	13
3.1.2.1. Carcinoma ductal infiltrante o invasivo.....	13
3.1.1.2. Carcinoma lobular <i>in situ</i>	13
3.1.3. Carcinoma inflamatorio.....	14
4. Factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama.....	14
4.1. La historia familiar.....	14
4.2. La edad en el diagnóstico.....	15
4.3. El tamaño tumoral.....	15
4.4. La afectación ganglionar.....	16
4.5. El grado histológico.....	16
4.6. Los receptores hormonales.....	16
4.7. La sobre-expresión del proto-oncogén <i>Her2/neu</i>	17
5. Clasificación del cáncer de mama.....	17
5.1. Triple negativo.....	19
5.1.1. Tipo basal.....	19
5.1.2. <i>Claudin-Low</i>	20
5.2. Luminal.....	20
5.2.1. Luminal A.....	20
5.2.2. Luminal B.....	21

5.3. Células tumorales con sobre-expresión de Her2.....	21
5.4. No clasificados o <i>normal-like</i>	21
6. Tratamiento del cáncer de mama.....	22
6.1. Terapia según momento del tratamiento.....	13
6.1.1. Terapia neoadyuvante.....	23
6.1.2. Terapia adyuvante.....	23
7. Fármacos.....	23
7.1. Terapia con antraciclinas.....	23
7.2. Terapia con taxanos.....	25
7.3. Terapia hormonal.....	26
7.3.1. Moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM)	26
7.3.1.1. Agonistas.....	26
7.3.1.2. Agonistas/antagonistas.....	26
7.3.1.3. Antagonistas.....	26
7.3.2. Inhibidores de la aromatasas.....	27
7.3.3. Agonistas de hormonas liberadoras de hormonas luteinizantes (LHRH).....	28
7.3.4. Otros agentes hormonales.....	28
7.4. Trastuzumab.....	28
7.5. Otras terapias.....	28
8. Quimiorresistencia y búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en el cáncer.....	29
8.1. Una posible diana terapéutica en cáncer: NF-κB.....	30
8.2. NF-κB y resistencia a fármacos.....	31
8.3. Mecanismos de la activación de NF-κB en cáncer.....	32
8.4. Aspectos generales de NF-κB.....	33
8.5. Inductores de la actividad de NF-κB.....	34
8.6. Genes diana de NF-κB.....	35

8.7. Estructura de NF-kB.....	37
8.7.1. Clase I.....	37
8.7.2. Clase II.....	37
8.8. Activación de NF-kB.....	38
8.8.1. Ruta clásica o canónica.....	38
8.8.2. Ruta alternativa o no canónica.....	39
8.9. Regulación de NF-kB.....	40
8.9.1. Inhibidores de NF-kB: la familia IκB.....	41
8.9.2. Modificaciones regulatorias y formación de complejos en NF-kB.....	42
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	43
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
1. Materiales.....	49
1.1. Ámbito y sujetos de estudio.....	49
1.1.1. Muestras tumorales congeladas.....	49
1.1.2. Muestras parafinadas.....	50
1.2. Líneas celulares. Descripción.....	51
1.3. Aparataje.....	52
2. Métodos.....	54
2.1. Cultivos celulares.....	54
2.1.1. Medios.....	54
2.1.2. Mantenimiento de células.....	54
2.1.3. Inactivación del suero bovino fetal.....	54
2.1.4. Tratamiento con tripsina-EDTA.....	55
2.1.5. Congelación.....	55
2.1.6. Descongelación.....	56
2.2. Viabilidad celular: método MTT.....	57
2.2.1. Fundamento.....	57
2.2.2. Protocolo.....	57

2.3. Mantenimiento de muestras tumorales por congelación.....	58
2.3.1. Fundamento.....	58
2.3.2. Protocolo.....	58
2.4. Mantenimiento de las células tumorales en OCT.....	58
2.4.1. Fundamento.....	58
2.4.2. Protocolo.....	58
2.5. Mantenimiento de las muestras tumorales por inclusión en parafina.....	59
2.5.1. Fundamento.....	59
2.5.2. Protocolo.....	59
2.6. Inmunohistoquímica.....	60
2.6.1. Fundamento.....	60
2.6.2. Reactivos.....	60
2.6.3. Protocolo.....	61
2.7. Método para determinar la concentración de proteínas: Método de Bradford.....	63
2.7.1. Fundamento.....	63
2.7.2. Reactivos.....	63
2.7.3. Protocolo.....	64
2.7.4. Cálculos.....	64
2.8. Extracción de proteínas nucleares a partir de tejido congelado .	64
2.8.1. Fundamento.....	64
2.8.2. Reactivos.....	64
2.8.3. Protocolo.....	65
2.8.4. Cuantificación.....	65
2.9. Extracción de proteínas nucleares a partir de células.....	66
2.9.1. Fundamento.....	66
2.9.2. Reactivos.....	66
2.9.3. Protocolo.....	66

2.9.4. Cuantificación.....	67
2.10. ELISA.....	67
2.10.1. Fundamento.....	67
2.10.2. Protocolo.....	68
2.11. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y Western Blotting.....	69
2.11.1. Fundamento.....	69
2.11.2. Protocolo.....	70
2.12. Extracción de ARN total de parafinas.....	72
2.12.1. Fundamento.....	72
2.12.2. Protocolo.....	72
2.13. Extracción de ARN total de células.....	73
2.13.1. Fundamento.....	73
2.13.2. Protocolo.....	73
2.14. Retrotranscripción.....	74
2.14.1. Fundamento.....	74
2.14.2. First strand kit. Protocolo.....	75
2.14.3. cDNA Archive Kit. Protocolo.....	75
2.15. Control de calidad del ARN: RT ² RNA QC PCR Array.....	75
2.15.1. Fundamento.....	75
2.15.2. Protocolo.....	76
2.16. RT ² Profiler PCR Array Human NF-kB Signaling Targets.....	77
2.16.1. Fundamento.....	77
2.16.2. Protocolo.....	77
2.17. Pre-amplificación de cDNA.....	78
2.17.1. Fundamento.....	78
2.17.2. Protocolo.....	78
2.18. Amplificación cuantitativa de ARN (PCR en tiempo real).....	78
2.18.1. Fundamento.....	78

2.18.2. Protocolo.....	79
2.19. Análisis estadístico de los resultados.....	79
IV. RESULTADOS.....	81
1. Caracterización de NF-kB en líneas celulares de mama tratadas con doxorubicina.....	83
1.1. Sensibilidad de las líneas celulares SKBR3, MDAMB468, MDAMB231 y BT474 al tratamiento con doxorubicina a diferentes concentraciones.....	83
1.2. Determinación de la unión NF-KB-ADN tras el tratamiento con doxorubicina 5µM a distintos tiempos	84
1.3. Determinación de la unión NF-KB/ADN tras los tratamientos con doxorubicina 5µM y el inhibidor MLN20.....	85
2. Determinación de la activación de NF-kB en muestras de tejido....	86
2.1. Determinación de la calidad y la fracción tumoral de las muestras congeladas.....	86
2.2. Medida semicuantitativa de las subunidades p65 y p50 en el núcleo mediante western blot. Validación del ELISA.....	86
2.3. Determinación de la unión NF-kB/ADN en tejido tumoral respecto a no tumoral.....	87
2.4. Diferencias en la unión NF-kB/ADN entre carcinomas ductales infiltrante e <i>in situ</i>	89
2.5. Determinación de la unión NF-kB/ADN en tejido tumoral respecto a la afectación de los nódulos ganglionares.....	90
2.6. Determinación de la unión NF-kB/ADN en tejido tumoral en función del tamaño del tumor en el diagnóstico.....	91
3. Relación entre la evolución de las pacientes tras el tratamiento y los niveles de activación de las subunidades de NF-kB.....	92
3.1. Recidiva en pacientes según receptores hormonales.....	93
3.2. Asociación de la activación de NF-kB con receptores de estrógenos y progesterona en carcinomas tratados con	

tamoxifeno.....	94
4. Cambios en la expresión génica en líneas celulares mamarias tras tratamiento con doxorubicina.....	95
4.1. Diferencias en el transcriptoma de MDAMB231, MCF7 y SKBR3 tras el tratamiento con doxorubicina.....	95
4.2. Diferencias en el transcriptoma de MDAMB231, MCF7 y SKBR3 tras el tratamiento con doxorubicina detectadas por PCR cuantitativa. Validación.....	97
5. Análisis de la expresión de genes seleccionados en muestras de cáncer de mama.....	99
5.1. Expresión diferencial en tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral.....	99
5.2. Expresión diferencial en tejido adyacente no tumoral de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama y tejido mamario normal.....	101
5.3. Diferencias en la expresión entre tejido tumoral y tejido normal.....	103
5.4. Correlaciones en la expresión de los genes seleccionados	104
5.5. Clasificación por perfil génico de las muestras mamarias.....	104
6. Relación de los genes estudiados con NF-kB	105
V. DISCUSIÓN.....	107
1. Caracterización de la activación de NF-kB en líneas celulares derivadas de carcinoma mamario tras el tratamiento con doxorubicina.....	109
2. Cáncer de mama. Búsqueda de nuevos marcadores.....	110
2.1. Búsqueda de nuevos marcadores en cáncer: NF-kB	111
2.2. Determinación de la calidad de los tejidos.....	112
2.3. Validación de ELISA por Western Blot.....	112
2.4. Diferencias en la activación de NF-kB entre tejido tumoral y adyacente.....	113

2.5. Niveles de unión NF-kB/ADN en muestras de tejido tumoral y relación con diferentes características clinicopatológicas.....	114
3. Activación de NF-kB en carcinoma de mama dependiente de receptores estrogénicos.....	116
4. Líneas celulares. Cambios en la expresión génica tras el tratamiento con doxorubicina	117
5. Tejidos. Características de la expresión génica.....	119
5.1. Diferencias en la expresión en tejido mamario.....	120
5.2. Diferencias en la expresión y posible implicación en el tratamiento	121
5.3. Correlaciones en la expresión y clasificación por perfil genómico.....	126
5.4. NF-kB y expresión de genes.....	127
6. Perspectivas futuras.....	127
VI. CONCLUSIONES.....	129
VII. REFERENCIAS	133
VIII. ANEXOS	149
Anexo 1.....	151
Anexo 2.....	155

CLAVE DE ABREVIATURAS

ACTB	Actina beta
ADM	Adrenomedulina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGT	Angiotensinógeno
AKT1	Homólogo del oncogen murino de V-akt de timoma viral
ALDH1	Aldehido deshidrogenasa 1
ALDH3A2	Aldehido deshidrogenasa 3 miembro A2
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
B2M	Microglobulina 2 beta
BCL-2	Linfoma 2 de células beta
BCL2A1	Proteína A1 asociada a BCL2
BCL2L1	BCL2-like 1
BCL-3	Linfoma 3 de células beta
BCR-ABL	Translocación Filadelfia.
BIRC2	Baculoviral IAP repetición 2
BIRC3	Baculoviral IAP repetición 3
BRCA1	Cáncer de mama 1
BRCA2	Cáncer de mama 2
BSA	Albúmina de suero bovino
C3	Componente complemento 3
CCL11	Ligando 11 de quimocina (motivo C-C)
CCL2	Ligando 2 de quimocina (motivo C-C)
CCL22	Ligando 22 de quimocina (motivo C-C)
CCL5	Ligando 5 de quimocina (motivo C-C)
CCND1	Ciclina D1
CCR5	Receptor 5 de la quimocina (motivo C-C)
CD40	Receptor de la superfamilia de TNF miembro 5
CD44	Molécula CD44
CD49f	Integrina alfa 6
CD69	Molécula CD69
CD80	Molécula CD80
CD83	Molécula CD83
CDI	Carcinoma ductal infiltrante

CDKN1A	Inhibidor cinasa dependiente de ciclinas 1A (p21, Cip1)
CDKN2A	Inhibidor cinasa dependiente de ciclinas 2A
cDNA	ADN cíclico
CFB	Factor complemento B
CK14	Citoqueratina 14
CK17	Citoqueratina 17
CK5/6	Citoqueratina 5/6
CK8/18	Citoqueratina 8/18
CLI	Carcinoma lobulillar infiltrante
CMF	Ciclofosfamida-metotrexano-fluoracil
c-rel	Homólogo del oncogen viral de la reticuloendoteliosis v-rel
CSF1	Factor estimulador de colonias 1 (Macrófago)
CSF2	Factor estimulador de colonias 2 (granulocitos-macrófagos)
CSF2RB	Receptor del factor estimulador de colonias 2, beta, baja afinidad (granulocitos-macrófagos)
CSF3	Factor estimulador de colonias 3 (granulocitos)
CXCL1	Ligando 1 de la quimocina (motivo C-X-C) (Actividad estimuladora del crecimiento de melanoma alfa)
CXCL10	Ligando 10 de la quimocina (motivo C-X-C)
CXCL2	Ligando 2 de la quimocina (motivo C-X-C)
CXCL9	Ligando 9 de la quimocina (motivo C-X-C)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGF	Factor de crecimiento de la epidermis
EGFR	Receptor del factor epidérmico de crecimiento
EGR2	Gen de respuesta al crecimiento temprano 2
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERBB2	HER2/neu
F3	Factor de coagulación III (tromboplastina, factor tisular)
F8	Factor de coagulación VIII, componente pro-coagulante
FAS	Receptor de la superfamilia TNF, miembro 6
FASLG	Ligando Fas (superfamilia TNF, miembro 6)

FGFR2	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2
GADD45B	Paro del crecimiento inducible por daño a ADN, beta
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GATA3	Factor de transcripción GATA3
GCI	Grupo de carcinomas infiltrantes
gDNA	ADN genómico
GRB7	Proteína de unión al factor de crecimiento 7
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico
HER1	Receptor 1 del factor de crecimiento epidermal
HER2/neu	Receptor 2 del factor de crecimiento epidermal
HGDC	Contaminación de ADN genómico
HGF	Factor de crecimiento hepático
HL	Hormona luteizante
HPRT1	Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1
HRAS	TP21
ICAM1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFNB1	Interferón beta 1, fibroblastos
IFNG	Interferon, gamma
IkB	Inhibidor de kB
IKBa	NFKBIA
IKK	Cinasas de los inhibidores de NF-kB
IKKb	Cinasa del inhibidor de NF-kB subunidad beta
IKKa	Cinasa del inhibidor de NF-kB subunidad alfa
IKKy NEMO	Cinasa del inhibidor de NF-kB subunidad gamma
IL12B	Interleuquina 12B
IL15	Interleuquina 15
IL1A	Interleuquina 1 alfa
IL1B	Interleuquina 1 beta
IL1R2	Receptor de la interleuquina 1, tipo II
IL1RN	Antagonista del receptor de la interleuquina 1
IL2	Interleuquina 2
IL2RA	Receptro de la interleuquina 2, alfa
IL4	Interleuquina 4
IL6	Interleuquina 6

IL8	Interleuquina 8
INS	Insulina
IRF1	Factor regulador del interferón 1
Ki67	Antígeno Ki67
LHRH	Agonistas de hormonas liberadoras de hormonas luteinizantes
LTA	Linfotoxina alfa (superfamilia TNF, miembro 1)
LTB	Linfotoxina beta (superfamilia TNF, miembro 3)
MAP2K6	Proteína cinasa-cinasa activada por mitógenos 6
MMP9	Metaloproteínasa 9
MTT	Bromuro 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
MYC	Homólogo del oncogén viral aviar de mielocitomatosis V-myc
MYD88	Gen de respuesta primaria a la diferenciación mielóide 88
NaCl	Cloruro de sodio
NCOA3	Receptor nuclear coactivador 3
NEMO	Modulador esencial de NF- κ B
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NF- κ B1	Factor nuclear kappaB1(p50, p50/105)
NF- κ B2	Factor nuclear kappaB2 (p52, p52/100)
NFKBIA	Inhibidor alfa de NF- κ B (IKBa)
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NIK	Dominio inductor de NF- κ B
NQO1	NAD(P)H deshidrogenasa, quinona 1
NR4A2	Subfamilia del receptor nuclear 4, grupo A, miembro 2
OCI	Otros carcinomas incasivos
OCT	Compuesto para la temperatura óptima de corte
p50	NF- κ B1 o p50/105
p52	NF- κ B2 o p52/100
p65	REL A
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGFB	Polipéptido beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEST	Dominio prolina ácido glutámico, serina y treonina
P-FEC	Paclitaxel 5-FU/epirubicina/ciclofosfamida
PLAU	Activador de plasminogen, urocinasa

PTEN	Homólogo de la fosfatase y la tensina.
PTGS2	Prostaglandina-endoperoxido sintasa 2
RAS	Familia oncogénica RAS
RB1	Retinoblastoma 1
RE	Receptores de estrógenos
REL	Homólogo del oncogén V-rel de la reticuloendoteliosis viral
RELA	Homólogo del oncogén V-rel de la reticuloendoteliosis viral A (p65)
RELB	Homólogo del oncogén V-rel de la reticuloendoteliosis viral B
RIN	Número de integridad del ARN
RPG	Receptores de progesterona
RPLP0	Proteína ribosomal grande PO
RPS3	Proteína ribosomal S3
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de acrilamida-SDS
SELE	Selectina E
SELP	Selectina P (antígeno CD62)
SERM	Modulador selectivo de los receptores de estrógenos
SNAP25	Proteína sinaptosomal-asociada, 25kDa
SOD2	Superóxido dismutasa 2, mitocondrial
SR-IkBa	Super-represor IkBa
STAT1	Transductor de señales y activador de la transcripción 1, 91kDa
STAT3	Transductor de señales y activador de la transcripción 3 (factor de respuesta a fase aguda)
STAT5B	Transductor de señales y activador de la transcripción 5B
TAT	Tejido adyacente al tumor
TBE	Tampón tris-borato
TBS	Tampón tris salino
TBS-T	Tampón tris salino con Tween 20
TE	Tampón tris-ácido clorhídrico
TEMED	Tetrametil-etileno-diamina
TN	Tejido normal
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFRSF1B	Superfamilia del receptor de necrosis tumoral, miembro 1B

TNFSF10	Superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 10
TP21	Proteína transformadora p21
TP53	Proteína tumoral p53
TRAF2	Factor 2 asociado al receptor de TNF
TT	Tejido tumoral
TWIST1	Proteína 1 Twist-related
VCAM1	Molécula de adhesión vascular y celular 1
WB	Western blot
XIAP	Inhibidor de la apoptosis ligado a X

I. INTRODUCCIÓN

1. Estructura e histología de la glándula mamaria.

La glándula mamaria consiste en un disco cónico de tejido glandular y grasa. El tejido glandular está formado por entre 15 y 20 lóbulos unidos por una red de tubos delgados llamados ductos. Cada lóbulo a su vez se subdivide en lóbulos más pequeños (lobulillos) separados por bandas suspensorias fibrosas llamadas ligamentos de Cooper, que conectan la piel con la fascia (tejido conectivo) que cubre los músculos pectorales. Estos lobulillos están formados a su vez por entre diez y cien acinos o alveolos, cada uno con un conducto excretor denominado conducto terminal. Los acinos están estructurados por un conjunto de células secretoras que producen la secreción láctea y conforman una cavidad a la cual vierten dicha secreción. Éstos se encuentran rodeados de células mioepiteliales y capilares sanguíneos que participan activamente en el proceso de secreción y eyección de la leche (*Figura 1.1*).

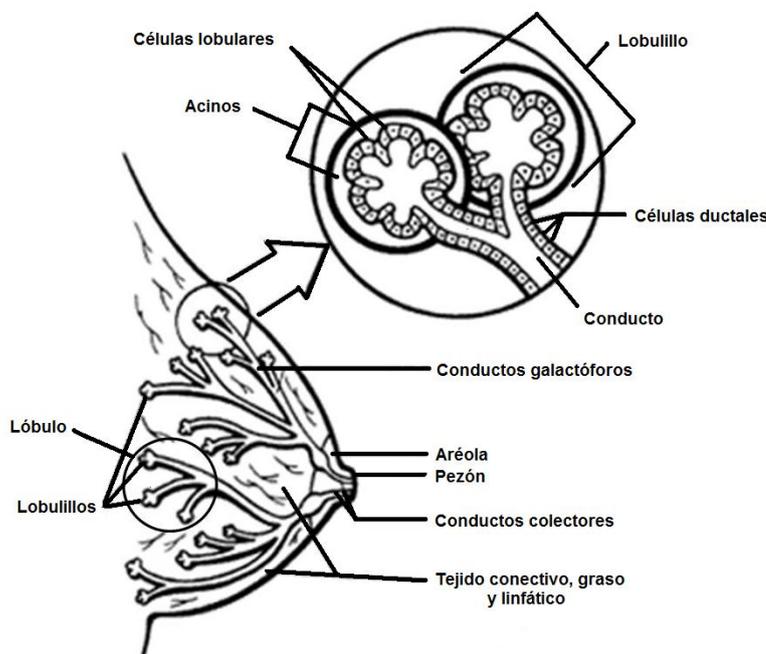


Figura 1.1: Estructura del tejido mamario: lóbulo, lobulillos, acinos, conductos galactóforos, conductos colectores y pezón, rodeados de tejido conectivo, grasa y linfático. Modificado de www.infocancer.org

A lo largo de la vida la glándula mamaria experimenta cambios tanto estructurales como morfológicos debidos a los cambios hormonales. El desarrollo normal de la mama depende directamente de la acción de tres grupos hormonales: los estrógenos, la somatotropina y las hormonas adrenales.

Por otra parte, la progesterona y la prolactina son esenciales para el desarrollo funcional y la secreción láctea.

2. Características del cáncer.

A pesar de la gran variabilidad en los cambios que originan un carcinoma, actualmente se sabe que todos adquieren unas propiedades comunes. Hanahan y Weinberg resumieron las características comunes del cáncer en seis en el año 2000 (1) y las ampliaron a diez en el año 2011 (2) basándose en nuevos datos (3-5). Estas características constituyen un marco lógico que permite entender la diversidad de las enfermedades neoplásicas. Se pueden resumir en: la capacidad de las células que forman el tumor y de su microambiente de producir señales de proliferación continuamente, la capacidad de las células para replicarse de forma mantenida, la resistencia a la muerte celular, la inducción de la angiogénesis, la activación de la invasión y la metástasis, la desregulación energética, la capacidad de evitar la destrucción inmune y como características que permiten que estos procesos puedan ocurrir, la inestabilidad y mutación del genoma y la inflamación promovida por el tumor (*figura 1.2*). En todo caso, actualmente se acepta que las células cancerígenas reclutan y corrompen a otros tipos celulares normales que les ayudan a llevar a cabo los procesos anteriores (6).

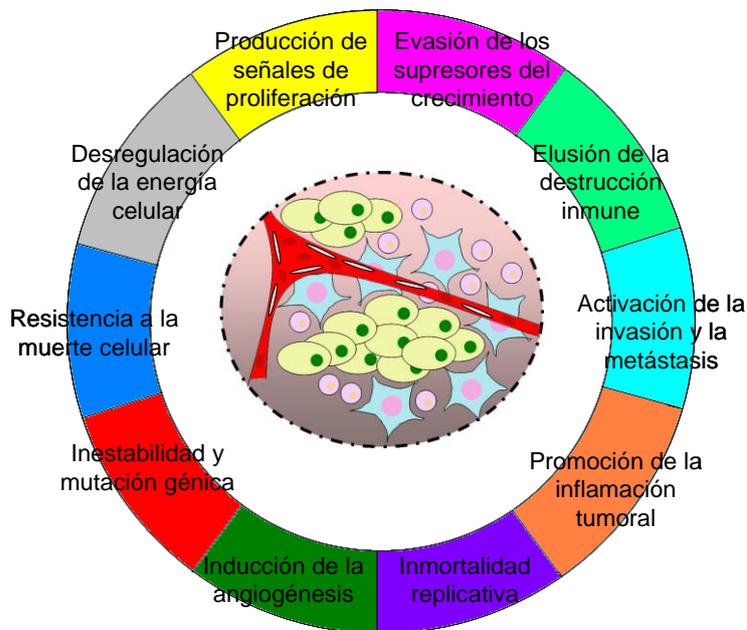


Figura 1.2. Las características comunes del cáncer. Modificado de (1, 2)

3. Cáncer de mama. Epidemiología.

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres y la primera causa de mortalidad en mujeres con edades comprendidas entre 35 y 54 años (7, 8). Se estima que una de cada ocho mujeres españolas desarrollará cáncer de mama a lo largo de su vida. En nuestro país se diagnostican cada año más de 16.000 casos nuevos, lo que supone 70 pacientes por cada 100.000 habitantes. Tan solo en la Comunidad Valenciana se diagnostican alrededor de 2.000 casos de cáncer de mama anuales (9).

International Agency for Research on Cancer

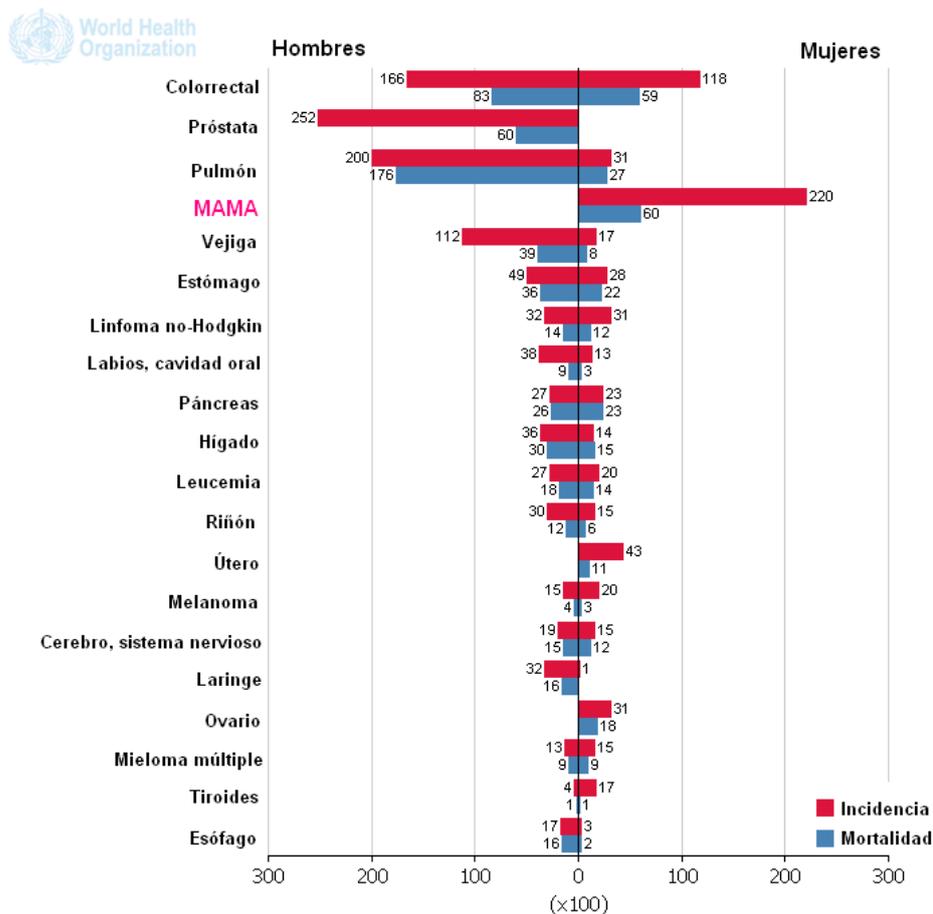


Figura I.3. Incidencia del cáncer en España separada por sexos. Datos del año 2008. Modificado de *International Agency for Research on Cancer*. Organización Mundial de la Salud (Globocan 2008).

Afortunadamente, desde hace algunos años, la tasa de mortalidad en cáncer de mama sigue una tendencia decreciente asociada principalmente a la detección precoz de la enfermedad, así como a la optimización de los tratamientos. Actualmente en función de las características clínico-patológicas

del tumor se pueden utilizar tanto tratamientos locorreregionales, como la cirugía y la radioterapia, combinados o no con tratamiento a nivel sistémico como la quimioterapia y la hormonoterapia (10, 11).

Actualmente los tratamientos sistémicos adyuvantes a la cirugía son claves en relación con la reducción de la mortalidad asociada al cáncer de mama (12, 13). Aún así, debido principalmente a la gran heterogeneidad existente en este tipo de tumor respecto a las alteraciones moleculares, la composición celular y los factores pronósticos, pacientes con historia clínico-patológica similar pueden tener una respuesta muy distinta a un mismo tratamiento. Esta diversidad genera un reto hacia la búsqueda de nuevos marcadores que permitan una clasificación clínicamente útil que facilite tanto el pronóstico como la predicción y que conlleve la posibilidad de un tratamiento individualizado para cada paciente según sus características moleculares, reduciendo así la mortalidad asociada a esta enfermedad (14).

3.1. Tipos de neoplasias mamarias

Más del 90% de las neoplasias mamarias derivan de los componentes epiteliales de la mama. Sin embargo, según las características estructurales y el lugar de origen se puede subdividir en (15):

3.1.1. Cáncer de mama no invasivo (*in situ*).

Las células tumorales permanecen confinadas en la estructura ductal o lobular. Se subdividen a su vez en:

3.1.1.1. Carcinoma ductal *in situ*.

Se origina en células de las paredes de los conductos mamarios. Es un cáncer muy localizado que no se ha extendido a otras zonas ni ha producido metástasis. Se le considera enfermedad “premaligna” y se puede extirpar fácilmente. Representa aproximadamente entre el 10 y el 20% de los casos.

3.1.1.2. Carcinoma lobular *in situ*.

Se origina en las glándulas mamarias (o lóbulos). No se considera un verdadero cáncer ya que en principio es benigno, aunque aumenta el riesgo de desarrollar cáncer en el futuro. Es poco frecuente, representando entre el 1 y el 5% de los casos diagnosticados.

3.1.2. Cáncer de mama invasivo

Las células cancerígenas son capaces de diseminarse más allá del tejido en el cual apareció el tumor y crecer en los tejidos sanos adyacentes. También se puede subdividir en (16):

3.1.2.1. Carcinoma ductal infiltrante o invasivo.

Se inicia en el conducto mamario pero logra atravesarlo y pasa al tejido adiposo de la mama desde donde puede extenderse a otras partes del cuerpo. Es el tipo más frecuente, siendo el diagnosticado en aproximadamente el 80% de los casos.

3.1.2.2. Carcinoma lobular infiltrante o invasivo.

Representa entre el 10 y el 15 % de los carcinomas diagnosticados. En general está compuesto de pequeñas células uniformes que invaden el tejido parenquimatoso estructurándose en una sola fila y de forma concéntrica alrededor de los ductos. Comienza en las glándulas mamarias pero se puede extender y destruir otros tejidos del cuerpo. Suele tener grado tumoral bajo con poca o nada atipia nuclear y tasa mitótica baja. Además, al no formar microcalcificaciones, es difícil detectarlo con mamografías o ultrasonidos (17).

3.1.3. Carcinoma inflamatorio.

No es un subtipo en sí mismo, pero se separa de los grupos anteriores debido a su agresividad y rápido crecimiento. Es un cáncer poco común, tan sólo representa un 1% del total de los tumores cancerígenos de la mama. El diagnóstico clínico inicial está caracterizado por la aparición de edema, eritema y aumento de temperatura local (conocido como “piel de naranja”) que puede llegar a afectar a la totalidad de la glándula mamaria. El diagnóstico histopatológico confirma la afectación de los linfáticos dérmicos por las células tumorales. El bloqueo que producen las células cancerosas sobre los vasos linfáticos es el responsable de dichas características clínicas.

Además existen otros subtipos minoritarios de tumores mamarios tales como los mucinosos mucinosos, tubulares , sarcomas ó el carcinoma medular (18, 19).

4. Factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama.

Establecer un pronóstico y seleccionar el mejor tratamiento para cada paciente constituye el paso clave para la curación del cáncer de mama. Mientras los factores pronósticos informan del riesgo de recidiva de la paciente, los factores predictivos ayudan en la selección de la terapia más efectiva para reducir este riesgo (20). En el carcinoma de mama se han identificado diversos factores etiopatológicos relacionados con un aumento en el riesgo de desarrollar la enfermedad, entre ellos:

4.1. Factores hereditarios.

Mujeres con familiares de primer grado afectados de cáncer de mama tienen un riesgo tres veces mayor de desarrollar esta enfermedad que la población general (21). Este riesgo se incrementa si además la edad de desarrollo del cáncer fue temprana o la enfermedad fue bilateral (22). Aproximadamente entre el 5 y el 10% de todos los cánceres de mama tienen componentes hereditarios. Hasta la fecha, se han descrito distintos genes cuyas mutaciones están relacionadas con la aparición de la enfermedad,

siendo *BRCA1* (23) y *BRCA2* (24) los mejor estudiados. Estos genes se encuentran mutados sobre todo en familias con cáncer de mama diagnosticado a edad temprana, aunque su mutación también se relaciona con pacientes con enfermedad bilateral o con cáncer de mama masculino. Además, estas mutaciones también están relacionadas con el cáncer de ovario. Para una mujer portadora de mutaciones en el gen *BRCA1*, el riesgo de padecer cáncer de mama antes de los 70 años es aproximadamente 65%, mientras que para una portadora de la mutación *BRCA2* es del 45% (25). Además de las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, también se ha descrito una relación entre cáncer de mama familiar y mutaciones en otros genes como *Tp53* y *PTEN* (26-28) además de otros genes considerados de baja penetrancia.

4.2. **La edad en el diagnóstico.**

El cáncer de mama es raro en mujeres menores de 35 años. En general el riesgo a padecer cáncer de mama aumenta a partir de los 45 años y por tanto es a partir de esta edad cuando más se vigila su posible aparición (29). Aproximadamente el 95% de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama lo son después de cumplir los 40 años, y un 45% son diagnosticadas más allá de los 65 años (30). La edad clásicamente se ha considerado como factor pronóstico principalmente por su asociación con la agresividad tumoral, estando asociado el diagnóstico a edad temprana con características biológicas de mayor agresividad.

4.3. **El tamaño tumoral.**

Clásicamente se considera un factor pronóstico, aunque también se ha sugerido como parámetro de control de calidad en los programas de detección precoz mediante mamografía, ya que permite evaluar la capacidad del radiólogo para detectar carcinomas no palpables (31).

4.4. **La afectación ganglionar.**

Una de las principales vías de diseminación de las células cancerosas es la linfática hacia los ganglios de la axila homolateral. Cuando los ganglios están afectados, se considera que la enfermedad tiene peor pronóstico. De hecho, en ausencia de terapia adyuvante sistémica, la probabilidad de recidiva en 10 años es aproximadamente un 24% para pacientes sin afectación ganglionar y un 76% para pacientes que sí presentan ganglios afectados (32-34).

4.5. **El grado histológico.**

Generalmente se considera como un indicador morfológico de la agresividad del tumor (35, 36). Para calcular el grado histológico de un tumor se tiene en cuenta factores como la formación de túbulos, el número de mitosis y si existe pleomorfismo en el núcleo. Todos estos factores combinados se miden como grado Bloom-Richardson o como grado Scarff-Bloom-Richardson (37). En general, se considera de peor pronóstico cuanto más indiferenciadas se encuentran las células tumorales (38).

4.6. **Los receptores hormonales.**

Son principalmente los receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RPG). Ambos receptores hormonales se utilizan como guía a la hora de suministrar a la paciente terapia hormonal. Clásicamente, se consideran receptores positivos cuando la concentración de proteína en el citosol es igual o mayor a 10fmol/mg. La presencia de receptores estrógenicos implica que las rutas metabólicas relacionadas con el procesamiento de estrógenos se han mantenido activas aunque la célula sea cancerígena, particularmente si también los receptores de progesterona son positivos, ya que estos receptores se expresan tras la activación transcripcional del gen que lo codifica por un complejo estrógenos-RE funcional. La importancia de los receptores estriba en que entre el 50-60% de pacientes con RE positivos en sus células tumorales responden favorablemente a la terapia hormonal, siendo este porcentaje mayor en los casos en los que los RE son más altos o tanto RE como RPG son positivos (39). Además, pacientes RE positivos poseen una supervivencia libre

de enfermedad mayor tras el tratamiento, una mejor supervivencia global y también una supervivencia tras recidiva mayor que los RE negativos (32).

4.7. **La sobre-expresión del proto-oncogen *Her2/neu*.**

Se define como proto-oncogén a un locus que está implicado en el crecimiento celular y proliferación y cuya forma mutada puede provocar transformación neoplásica (40). Dentro de estos proto-oncogenes, el más estudiado hasta el momento en relación con el cáncer de mama es *ERBB2* (o *Her2/neu*), gen que codifica para la proteína HER2/neu (*Human Epidermal growth factor receptor 2*). HER2 es un receptor tirosin-cinasa de membrana celular implicado en rutas de señales de transducción reguladoras del crecimiento y diferenciación celular (41). Aproximadamente entre el 15-20% de los cánceres de mama tienen una amplificación del gen *Her2/neu* o sobreexpresión de su proteína. El incremento de este receptor se asocia con mayor recidiva de la enfermedad y peor pronóstico, si bien actualmente existen diversos fármacos anti-HER2 tales como trastuzumab y lapatinib y otros en estudio como pertuzumab o TDM1 que han mejorado el pronóstico en este subtipo (42).

5. Clasificación del cáncer de mama.

Para categorizar a las pacientes con cáncer de mama, determinar su pronóstico y decidir la terapia apropiada se han utilizado tanto factores clínicos como patológicos. Mediante técnicas patológicas se han determinado principalmente receptores de estrógenos y progesterona, expresión de ki67 y amplificación de *HER2*.

Considerando estos factores en combinación con el diagnóstico clínico, se ha llegado a una clasificación de grupos de riesgo en cáncer de mama que si bien es de gran utilidad para determinar el pronóstico y el riesgo en grupos de

pacientes, su función está limitada cuando se aplica a pacientes individuales debido a que pacientes con características similares pueden llegar a tener respuestas clínicas muy distintas. Debido a esto, en años recientes se está buscando refinar el diagnóstico y mejorar las predicciones en el pronóstico del cáncer usando nuevas tecnologías que permitan dar una medicación individualizada a cada paciente (43, 44).

El problema principal a la hora de dar o no un tratamiento, viene dado por la gran heterogeneidad que existe en cáncer de mama. Hasta ahora, el método de clasificación que mejor ha funcionado ha sido el de agrupar a los tumores de mama de acuerdo con sus patrones de expresión génica (45). Para ello, se buscaron patrones moleculares que fueran estables y homogéneos, es decir, que no cambiaran dentro del tumor primario y que además las células metastásicas también los conservaran (46), si bien en algunos casos se ha encontrado cierta variabilidad entre tumor primario y su metástasis.

Uno de los primeros modelos que se desarrolló se basó en el patrón de cinco genes que, además de cumplir las características anteriores, su expresión combinada se correspondía con el pronóstico (45, 47, 48). Estos genes son aquellos que codifican para los receptores de estrógenos, los receptores de progesterona, *HER2*, *HER1* y *citoqueratina 5/6* (49, 50). Basándose en la expresión de estos cinco genes, se pudo clasificar al cáncer de mama en 5 subtipos. Sin embargo, actualmente parece que el modelo de expresión que mejor clasifica los distintos subtipos según su riesgo es el basado en 6 biomarcadores: receptores de estrógenos, receptores de progesterona, *HER2*, *Ki67*, *CK5/6* y *EGFR* (51-55). Actualmente se clasifica el cáncer de mama en los siguientes subgrupos (*tabla I.1*):

	Marcadores IHQ	Grado	Proliferación	Otros marcadores	Pronóstico	Beneficio QT
Tipo basal	RE: - RPG: - HER2: - Ki67: alto CK5/6 EGFR: +	GI/II: 7 -12% GIII: 88 -93%	Alta	RB1: bajo/ - CDKN2A: alta BRCA1: baja/ - FGFR2: amp	Pobre	Alto (>40%)
Claudin -low	RE - RPG: - HER2: - Ki67: medio CK5/6 EGFR: +/-	GI/II: 62 -23% GIII: 38 -77%	Intermedia/alta	CDH1:baja/ - Claudina: baja/ -	Intermedio	Intermedio (25-40%)
Luminal A	RE: + RPG: + HER2: - Ki67: bajo CK5/6 EGFR: -	GI/II: 70 -87% GIII: 13 -30%	Baja	FOXA 1 alto	Bueno	Bajo (0 -5%)
Luminal B	RE: +/- RPG: +/- HER2: +/- Ki67: alto CK5/6 EGFR: -	GI/II: 38 -59% GIII: 41 -62%	Alta	FGFR1 y ZIC3 amplificados	Intermedio o pobre	Intermedio (10-20%)
Sobre - expresión de Her2	RE: - RPG: - HER2: + - Ki67: alto CK5/6 EGFR: -/+	GI/II: 11 -45% GIII: 55 -89%	Alta	GRB7: alto	Pobre	Intermedio (25-40%)
Normal -like	RE: +/- HER2: - Ki67: bajo/medio CK5/6 EGFR -/+	GI/II: 37 -80% GIII: 20 -63%	Baja/intermedia	Intermedio	Bajo (0 -5%)

Tabla 1.1. Clasificación de los subtipos moleculares de cáncer de mama caracterizados por microarrays de expresión. GI: grado I, GII: grado II, GIII: grado III. +: positivo, -: negativo. El pronóstico se refiere a tratamiento quimioterápico convencional. Modificada de (55, 56).

5.1. Triple negativo.

Clínicamente, se trata de tumores negativos para receptores de estrógenos, receptores de progesterona y HER2 y positivos para citoqueratina 5/6. Este tipo tumoral está asociado a cánceres de grado alto y a mujeres jóvenes. Se considera que tiene mal pronóstico ya que no existe un tratamiento específico para este subtipo tumoral (51, 57, 58). Actualmente se tiende a subdividir a los tumores triples negativos en los tipos basal y *claudin-low* ya que estos subtipos tienen un mayor valor pronóstico.

5.1.1. Tipo basal.

En general se consideran negativos para receptores de estrógenos y progesterona y para *HER2*, aunque en un 9% de los casos expresan receptores hormonales y en un 10% sobreexpresan *HER2*, a diferencia de los tumores de mama estrictamente triple negativos. Además expresan

CK5/6, CK14, CK17, vicentina, EGFR y CDKN2A, amplifica *FGFR2* y expresan bajos niveles de *RB1* y *BRCA1* (55, 59). Suelen presentar alto grado histológico y tener mal pronóstico. Aproximadamente entre el 10 y el 20% de los tumores pertenecen a este grupo (60).

5.1.2. Claudin-Low.

Identificados en 2007 por Perou y col. (61). Se caracteriza por una baja expresión de los genes relacionados con las uniones estrechas y la adhesión intercelular, tales como *claudina -3,- 4,-7, cingulina, ocludina y E-cadherina* y una elevada expresión de los genes relacionados con la respuesta inmune y la matriz extracelular/mesenquimales tales como *laminina, integrina alfa 7, vimentina, N-cadherina y TWIST1*. Además presentan poca expresión del cluster de genes de proliferación, lo que sugiere que son poco proliferativos. Este subgrupo se sitúa próximo al subtipo basal-like, ya que ambos comparten algunas características a nivel de expresión génica, como son una baja expresión de *HER2* y del grupo de genes luminales (*RE, GATA3, CK8/18*). Son poco frecuentes, entre el 12 y el 14% del total de tumores diagnosticados. Generalmente son carcinomas ductales infiltrantes de alto grado. Las células neoplásicas de estos tumores recuerdan al fenotipo de las células madre cancerosas por su mínima expresión de marcadores de diferenciación epitelial y una elevada expresión de *CD44, CD49f y ALDH1*.

5.2. Luminal.

Expresan receptores de estrógenos y su patrón concuerda con el componente epitelial luminal de la glándula mamaria (45). También expresan citoqueratinas luminales y menos del 20% tienen mutación en p53 (62). Se subdivide en:

5.2.1. Luminal A.

Alta expresión de genes relacionados con los receptores de estrógenos y baja expresión de los relacionados con la proliferación celular comparado

con luminal B (47, 62). A nivel inmunohistoquímico se caracteriza por la presencia de RE, RPG, BCL-2 y citoqueratinas CK8/18, y por la ausencia de sobreexpresión de *HER2*. Es el tipo tumoral más frecuente, ya que aproximadamente entre el 50 y el 60% de los tumores diagnosticados son de este tipo (47). Su pronóstico es mejor que para luminal B. Generalmente se trata con hormonoterapia y en casos seleccionados reviven tratamiento con fármacos citotóxicos.

5.2.2. Luminal B.

Grado mayor que el luminal A, aunque puede haber excepciones. Expresan RE y/o RPG, además de *EGFR*, *HER2*, ciclina E1 y Ki67. Se consideran de peor pronóstico que los luminal A (47). Aproximadamente incluye entre el 10 y el 20% de los tumores diagnosticados. Generalmente se trata con quimioterapia seguido de hormonoterapia.

5.3. Células tumorales con sobre-expresión de *HER2*.

Se identifica por *microarrays* de expresión. La diferencia principal con el *HER2* determinado por inmunohistoquímica o por hibridación *in situ* por fluorescencia es que estos últimos no muestran cambios en la expresión del ARN para definir el grupo: puede ocurrir que sí se produzca mayor expresión del gen *HER2* pero que no esté amplificado (48, 63). Este grupo incluye tumores negativos para receptores de estrógenos y genes relacionados que además sobre-expresan otros genes dentro del amplicón *ERBB2*, como el *GRB7* (45). Este tipo tumoral generalmente tiene mutaciones en *p53* y normalmente son de grado 3 (48, 49). Tiene mal pronóstico y alto riesgo de recidiva (24-26).

5.4. No clasificados o *normal-like*.

En este grupo se incluyen los tumores que son negativos para los cinco marcadores: receptores de estrógenos, receptores de progesterona, *HER2*, *HER1* y citoqueratina 5/6 (46). Son tumores mal caracterizados que expresan

genes habitualmente activados en tejido adiposo. Pertenecen a este grupo entre el 6 y el 10% de los tumores diagnosticados.

6. Tratamiento del cáncer de mama.

La terapia primaria para cáncer de mama generalmente incluye la extirpación del tumor ya sea por mastectomía o por tumorectomía seguido o no de radioterapia (64). Durante ambos tipos de cirugía, se extirpa el ganglio centinela y en caso de estar afectado por células cancerígenas se procede a una linfadenectomía axilar.

Una vez llevada a cabo la cirugía en función del tamaño tumoral, la afectación ganglilar y el tipo de cirugía realiza a la paciente se adecúa el tratamiento ya sea con radioterapia (65) y/o con terapia adyuvante (66), cuyo propósito es inhibir la proliferación celular y acabar con toda célula cancerosa que se pudiera haber diseminado (67). La terapia adyuvante para el cáncer de mama implica la quimioterapia y/o la terapia hormonal (68) en el caso de que las células tumorales sean hormonodependientes y/o tratamiento anti-HER2 en pacientes con sobre-expresión de este proto-oncogén.

Generalmente para decidir el tipo de tratamiento que la paciente va a recibir, se tienen en cuenta diversos factores relacionados tanto con la propia paciente como con la enfermedad. En relación con la paciente se valora: estado menopáusico, edad biológica y co-morbilidades. Por otra parte los factores relacionados con la enfermedad son: el estado hormonal, sobreexpresión de *HER2*, presencia de adenopatías, metástasis en el diagnóstico e infiltración tumoral en otros tejidos (69).

6.1. Terapia según momento del tratamiento.

6.1.1. Terapia neoadyuvante.

La terapia sistémica neoadyuvante, también conocida como quimioterapia preoperatoria se realiza previamente a la cirugía. Sus objetivos principales son aumentar la supervivencia global de la paciente,

la posibilidad de efectuar cirugía conservadora y/o evaluar la respuesta al tratamiento (70, 71). Generalmente el tratamiento neoadyuvante es a base de quimioterapia asociado a trastuzumab en caso de pacientes positivas para *HER2*, y terapia hormonal en pacientes de edad avanzada (72).

6.1.2. Terapia adyuvante

Se denomina terapia adyuvante a un tratamiento sistémico dado tras la cirugía capaz de maximizar el control de los síntomas, prevenir complicaciones e incrementar la probabilidad de supervivencia manteniendo la calidad de vida del paciente (73). La terapia adyuvante se utiliza para eliminar cualquier célula cancerígena que se haya podido diseminar aunque no se haya detectado ni por imagen ni por tests de laboratorio (13, 74, 75). Se puede administrar tanto a pacientes que hayan recibido terapia neoadyuvante antes de la cirugía como *de novo*. Generalmente pacientes luminal A y B que han recibido neoadyuvancia se tratan en adyuvancia con hormonoterapia, mientras que las pacientes *HER2+* con tratamiento neoadyuvante previo reciben tratamiento con trastuzumab y hormonoterapia si con positivas para receptores. Mujeres que no han recibido tratamiento neoadyuvante se tratan en función de las características del tumor y de la paciente.

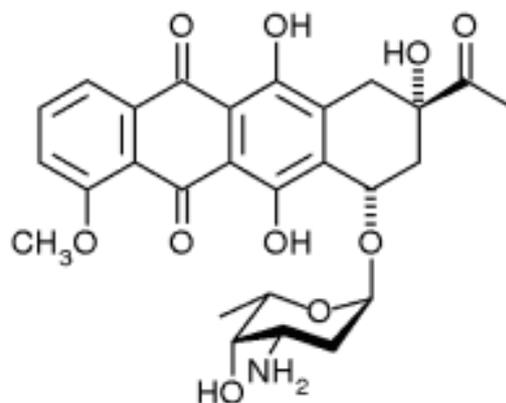
7. Fármacos.

7.1. Terapia con Antraciclinas.

Las antraciclinas son unos de los quimioterápicos más utilizados en tratamiento de cáncer de mama tanto solos como en combinación con otros fármacos (76, 77).

Las antraciclinas son antibióticos derivados de *Streptomyces peucetius* var. *cassius* usadas para el tratamiento tanto de tumores sólidos como hematológicos. Existen distintos tipos de antraciclinas, pero todas ellas comparten estructuras anulares tetracíclicas unidas con un azúcar mediante un enlace glucosídico (figura 1.4) (78).

Figura 1.4. Estructura de una antraciclina prototipo. Se observa el anillo tetracíclico.



Los mecanismos de acción no se conocen completamente, aunque para la mayoría de antraciclinas se consideran que son principalmente (79):

- ◆ Inhibición de la síntesis de ADN y ARN al ser capaz la molécula de intercalarse entre los pares de bases y unirse covalentemente al ADN (78, 80) previniendo de esta forma la replicación de las células cancerígenas.
- ◆ Utilización de la enzima topoisomerasa II como diana citotóxica. Las antraciclinas provocan que la topoisomerasa II se una covalentemente a la doble cadena de ADN en división que se genera en su ciclo, evitando así que éste continúe e induciendo de esta forma mutagénesis y muerte celular (81).
- ◆ Aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno capaces de dañar al ADN y a las membranas celulares (82).

Las antraciclinas comerciales más utilizadas en el tratamiento de cáncer de mama son la doxorubicina y la epirrubicina (83).

7.2. Terapia con taxanos

Los taxanos son fármacos que estabilizan a los microtúbulos durante la división celular evitando así la proliferación. Los microtúbulos son estructuras tubulares formadas por la polimerización de un dímero de dos proteínas, la alfa y la beta-tubulina que se encuentran en células eucariotas y que se originan en los centros organizadores de microtúbulos y se extienden a lo largo de todo el citoplasma. Los microtúbulos intervienen en diversos procesos como el movimiento de orgánulos y la división celular. En el ciclo celular normal, las células forman microtúbulos al comienzo de la división celular y éstos se rompen al terminar la división. La acción de los taxanos es estabilizar estos microtúbulos e impedir que se rompan normalmente inhibiendo así la división. Actualmente existen dos taxanos comercialmente disponibles, el paclitaxel (Taxol) y el docetaxel (Taxotere) (84).

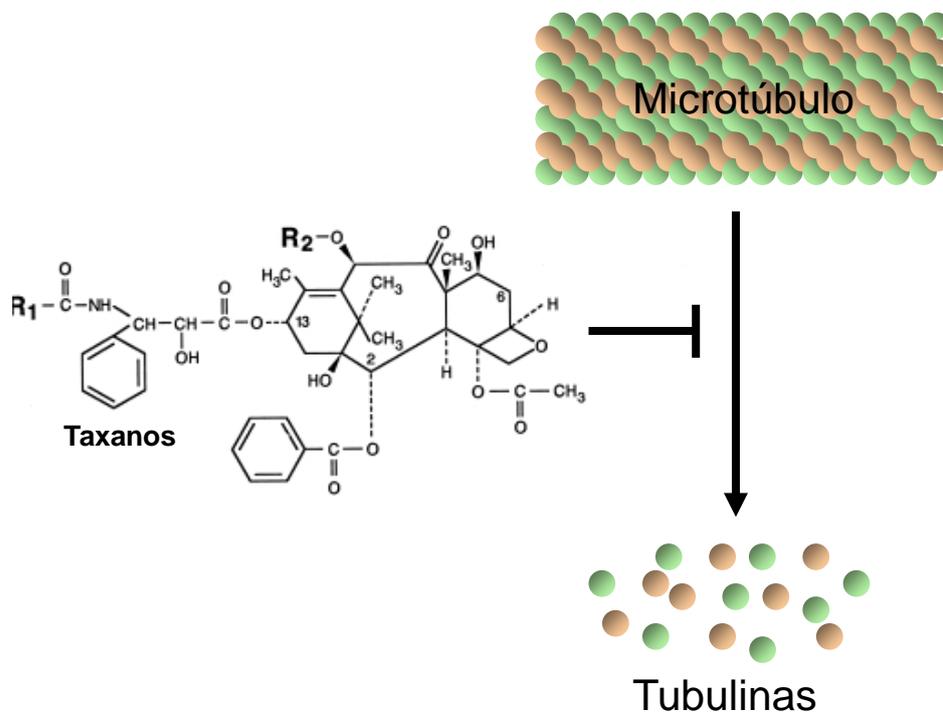


Figura 1.5. Representación esquemática de la acción de los taxanos en microtúbulos. Los taxanos inhiben la despolimerización de los microtúbulos inhibiendo así su división.

7.3. Terapia hormonal

La terapia hormonal consiste en la administración de fármacos que bloquean la acción de las hormonas que estimulan el crecimiento de las células cancerosas. Este tipo de terapia reduce la recurrencia del tumor y la mortalidad tanto en mujeres pre- como post-menopáusicas con receptores hormonales positivos, aunque es inefectiva para pacientes con tumores con receptores negativos (85). Aproximadamente las paciente con receptores hormonales positivos son entre el 60-70% del total de las diagnosticadas (86). Existen distintas clases de fármacos que se emplean en terapia hormonal pero se poden dividir principalmente en los siguientes grupos:

7.3.1. Moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM).

Actúan sobre los receptores de estrógenos y su acción varía según el tejido (87). Los SERM se pueden subdividir en:

7.3.1.1. Agonistas: son moléculas que se unen al receptor en vez de la molécula que se uniría de forma natural. Esencialmente mimetizan la acción de la molécula endógena, es decir, la que se produce de forma natural y normalmente tienen igual o mayor afinidad por el receptor que esta última.

7.3.1.2. Agonistas/antagonistas: se comportan como antagonistas en algunos tejidos y como agonistas en otros. Son reguladores competitivos. El más conocido es el tamoxifeno, que se ha usado históricamente tanto para tratar a mujeres pre- como post-menopáusicas (88), y aún hoy es el tratamiento más utilizado en premenopáusicas (86, 89).

7.3.1.3. Antagonista: son moléculas que se unen al receptor bloqueando la respuesta biológica y previniendo la activación (*figura 1.6*).

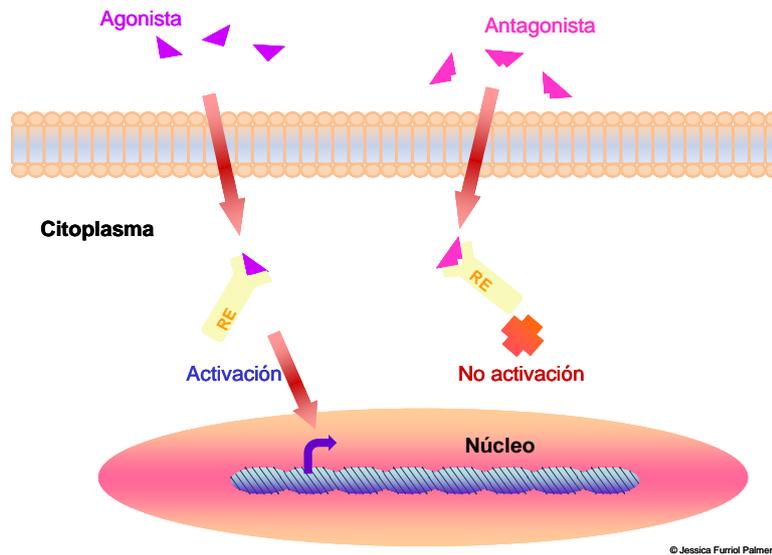


Figura I.6. Diferencias en la acción de fármacos agonistas y antagonistas. Un fármaco agonista tiene un sitio activo similar al del ligando endógeno así que se une al receptor y la ruta metabólica se pone en marcha, mientras que los fármacos que actúan como antagonistas son lo suficientemente parecidos al ligando endógeno como para unirse al receptor pero al mismo tiempo suficientemente distintos como para no producir efecto.

7.3.2. Inhibidores de la aromatasa.

Inhiben a la enzima aromatasa, que es la encargada de la conversión de los precursores de andrógenos del tejido periférico en estrógenos, que constituyen la mayor fuente de estrógenos circulantes en mujeres postmenopáusicas (*figura I.7*) (90). Actualmente estos inhibidores están desplazando al tamoxifeno como tratamiento hormonal en mujeres postmenopáusicas (89, 91). Los inhibidores de aromatasa más conocidos son: el letrozol, el anastrozol y el exemenestane.

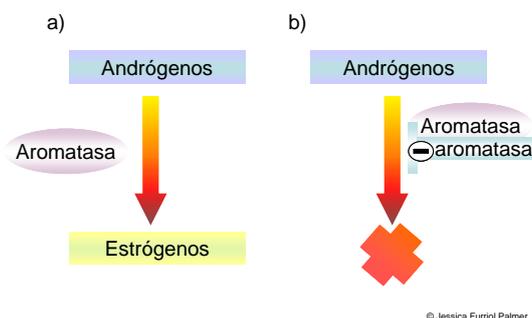


Figura I.7. Acción de los inhibidores de aromatasa.

7.3.3. Agonistas de hormonas liberadoras de hormonas luteinizantes (LHRH).

La hormona luteinizante (HL) es segregada por células de la glándula pituitaria y estimula a los ovarios para producir y segregar estrógenos. Los LHRH bloquean la acción de la hormona luteizante y por tanto la producción de estrógenos (92, 93). Se utilizan para la ablación ovárica.

7.3.4. Otros agentes hormonales.

Los andrógenos y los agentes progestacionales (hormonas masculinas) se utilizan para el cáncer avanzado de mama sensible a hormonas cuando otros medicamentos no han sido efectivos (93, 94).

7.4. Trastuzumab.

El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor de HER2/neu evitando la división incontrolada de las células cancerígenas. Los receptores de HER son proteínas que se encuentran en la membrana celular y que a través de diferentes señales moleculares regulan el crecimiento, la supervivencia, la adhesión, la migración y la diferenciación celular. En pacientes con HER2 sobre-expresado el tratamiento con trastuzumab aumenta la supervivencia global. Generalmente, se administra junto a otros tratamientos (95).

7.5. Otras terapias

A pesar de que los tratamientos quimioterápicos más usados en cáncer de mama son aquellos basados en antraciclinas, taxanos o combinaciones de ambos, se ha descrito que en algunos casos se produce resistencia (96). De hecho, se calcula que aproximadamente el 90% de los fallos en el tratamiento de cáncer de mama metastático son debidos a la resistencia tanto intrínseca como adquirida a estos fármacos (97). Debido a esto, actualmente se están buscando nuevas dianas terapéuticas para el cáncer de mama que permitan el desarrollo de nuevos fármacos que ayuden a combatir la resistencia tanto a

taxanos como a antraciclinas. Además, los avances en genómica y proteómica nos acercan al desarrollo de nuevas estrategias para combatir la enfermedad y a un tratamiento personalizado de los pacientes, teniendo en cuenta tanto su posible resistencia a fármacos como sus características moleculares. Algunos de los fármacos que se han desarrollado para tratar a pacientes con cáncer de mama resistente (98) o que se utilizan junto a taxanos y antraciclinas se describen en la tabla I.2.

Fármaco	Acción
Antraciclinas	Se intercala entre las pares de bases inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos. Provoca la unión covalente de la topoisomerasa II con el ADN induciendo mutagénesis. Aumenta ROS provocando daño al ADN y las membranas celulares.
Taxanos	Inhibe la despolimeración de los microtúbulos inhibiendo la duplicación.
Trastuzumab	Interfiere con el receptor HER2/neu inhibiendo la duplicación.
Capecitabina	Análogo de la pirimidina. Bloquea la duplicación.
Ixabepilona	Análogo de la epotilona B. Se une a la tubulina estabilizando los microtúbulos y parando el ciclo celular.
Gemcitabina	Análogo de la citidina. Se une al ADN e inhibe la ADN polimerasa.
Fosfamida*	Alquilante. Interfiere en la síntesis de ácidos nucleicos y en la división celular.
Flourouracil*	Análogo del uracilo. Inhibidor de la timidato sintasa. Bloquea la duplicación.
Metotrexano*	Inhibidor de la dihidrofolato reductasa. Inhibe la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas.

* Generalmente se administran en combinación.

Tabla 1.2. Resumen de la acción de los distintos tipos de quimioterapia utilizados en cáncer de mama.

8. Quimiorresistencia y búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en el cáncer.

El cáncer es una enfermedad muy compleja en la que influyen tanto factores etiológicos como la propia biología molecular de la célula. Generalmente, se considera que las células cancerosas tienen mecanismos moleculares

modificados que provocan una salida de los controles de proliferación y homeostasis celular (99). Estos mecanismos pueden ser intrínsecos a las propias células cancerígenas o derivados de señales que se originan en el microambiente tumoral. Generalmente, las células cancerígenas en estado avanzado poseen mecanismos mediante los cuales son capaces de resistir a las señales de inhibición del crecimiento o de apoptosis mientras que por otra parte consiguen mayor potencial de duplicación o incrementan su capacidad de provocar angiogénesis o metástasis. Estas características especiales de las células tumorales provocan en algunos casos resistencia a los fármacos que se administran para el tratamiento de la enfermedad ya que éstas son capaces de evitar los mecanismos de muerte celular inducidos por este tratamiento de forma que las células cancerígenas continúan proliferando. Es por esto que la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y de nuevos tratamientos anticancerígenos que eviten la resistencia a los fármacos, también denominada quimiorresistencia, es actualmente uno de los retos más importante en la cura del cáncer (100-102).

8.1. Una posible diana terapéutica en cáncer: NF- κ B.

Una ruta de señalización importante en tumorigénesis es la de la familia de factores de transcripción NF- κ B cuya activación constitutiva es un marcador de varios tipos de cánceres (103-106). De hecho, diversos estudios han demostrado que NF- κ B y otros factores regulatorios asociados como las subunidades I κ B quinasas y BCL-3, están relacionados con diversos cánceres tanto hematológicos como de tumores sólidos (107, 108). Esto no es sorprendente teniendo en cuenta que esta ruta es capaz de regular la expresión de genes implicados en procesos como la supervivencia celular, el crecimiento, la angiogénesis, respuesta inmune, inflamación y la apoptosis, todos ellos alterados en cáncer además de ser inducida por gran cantidad de factores, desde mitógenos hasta fármacos.

Como ejemplo de la posible importancia de NF- κ B en el tratamiento del cáncer y sus posibles implicaciones terapéuticas, se ha observado que en varios cánceres hematológicos tales como el síndrome mielodisplásico, la leucemia mieloide aguda, la leucemia linfocítica aguda, la leucemia mieloide crónica, la leucemia linfocítica crónica, linfomas y en múltiple mieloma la ruta de NF- κ B se encuentra constitutivamente activa . De hecho, varios fármacos utilizados para el tratamiento de mieloma múltiple, incluyendo los inhibidores del proteosoma, talidomida, lenalidomina y trióxido arsénico, bloquean la activación de NF- κ B.

También en tumores sólidos se ha estudiado la importancia de NF- κ B: en cáncer colorrectal se ha observado que la activación constitutiva de NF- κ B está asociada con angiogénesis y resistencia al tratamiento, de hecho se ha probado *in vitro* que diferentes inhibidores de NF- κ B podrían ser útiles para el tratamiento (108).

Todos estos datos sugieren que la inhibición de NF- κ B podría tener un papel en la muerte celular o la inhibición del crecimiento del tumor y por tanto podría ser una posible diana terapéutica en el tratamiento del cáncer.

8.2. NF- κ B y resistencia a fármacos.

La quimioresistencia es uno de los grandes retos en el tratamiento del cáncer por lo que una de las estrategias más buscadas actualmente es incrementar la eficacia de la quimioterapia con nuevos fármacos o combinación de estos que puedan reducir la resistencia a los tratamientos.

Una de las posibles diana para nuevos fármacos en estudio actualmente es la familia de factores de transcripción NF- κ B. La relación de NF- κ B con cáncer radica en su activación en respuesta a distintos tipos de quimioterápicos tales como el paclitaxel, la daunomicina y la doxorubicina [113, 114]. A su vez la activación de la transcripción de genes anti-apoptóticos por NF- κ B se ha ligado a la habilidad de los tumores para resistir los efectos citotóxicos de la

quimioterapia. Consecuentemente con estos datos, la inhibición de NF- κ B en combinación con las terapias anticancerígenas podría llevar al tumor a la inhibición de su crecimiento o incluso a su muerte, si bien debido a la gran cantidad de genes dependientes de NF- κ B que existen, se necesitarían nuevos estudios que nos proporcionaran una información más detallada sobre su funcionamiento.

8.3. Mecanismos de la activación aberrante de NF- κ B en cáncer.

La activación constitutiva de la familia de factores de transcripción κ B (NF- κ B) se considera que es un marcador en varios tipos de cánceres tanto hematológicos como de tumores sólidos. Una de las formas ya caracterizada que provoca la activación constitutiva de NF- κ B es la actividad aberrante de IKK. El mecanismo exacto por el cual las subunidades cinasa se activan aún no se conoce, pero por ejemplo se ha observado que tanto en el caso de IKK β como IKK α necesitan que dos de sus residuos serina se fosforilen (109) y que si estos residuos serina mutan a alanina, no se produce activación de la cinasa, mientras que si el cambio es a glutamina, queda activada constitutivamente (110).

Además, varios oncogenes como *RAS*, *BCR-ABL* y *MYC* son capaces de inducir la actividad de NF- κ B. Por ejemplo NF- κ B es necesario para que el oncogén *H-RAS* induzca proliferación anómala y tumorigénesis (111). También BCR-ABL, una oncoproteína quimérica que es responsable de la leucemia mieloide crónica, puede inducir señales de supervivencia mediante la activación de NF- κ B. Además, la inhibición de NF- κ B por I κ B α super-represor (SR-I κ B α) que es resistente a la degradación bloquea el crecimiento tumoral inducido por BCR-ABL.

También se han observado en tumores tanto sólidos como hematológicos amplificación cromosomal y otras aberraciones de genes que codifican para NF- κ B. Por ejemplo, se han encontrado deleciones en el gen *NF- κ B2* que como consecuencia tienen la pérdida de las repeticiones de anquirinas de p100 y la generación de proteínas constitutivamente activas p52, que se han asociado con linfomas de células T y B y con mieloma múltiple.

8.4. Aspectos generales de NF- κ B.

La familia de factores transducción de señales Rel/NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) fue descrita por primera en 1986 por David Baltimore y Ranjan Sen (112) como un factor que regulaba la formación de la variedad *kappa* de la cadena ligera de la inmunoglobulina en células B y desde entonces la importancia de esta familia no ha parado de crecer. NF- κ B comprende toda una familia de factores de transcripción eucarióticos que incluyen proteínas conservadas desde *Drosophila sp.* hasta humanos (113) relacionadas a través de una región denominada Dominio de Homología Rel (RH, por sus siglas en inglés: *Rel homology*) que se corresponde con una región de aproximadamente 300 aminoácidos muy conservada localizada en el extremo N-terminal de la proteína y que es responsable de la localización de la zona de unión con el ADN, de la dimerización y de la interacción con las proteínas inhibidoras específicas denominadas I κ B (114, 115). En mamíferos se han descrito cinco miembros de la familia de NF- κ B:

- ◆ NF- κ B1, también denominado p50 o p50/p105.
- ◆ NF- κ B2, también denominado p52 o p52/p100.
- ◆ Rel A, también denominado p65.
- ◆ RelB.
- ◆ c-Rel.

Estas cinco subunidades se encuentran unidas de dos en dos formando tanto homodímeros como heterodímeros, exceptuando a la subunidad RelB, que solo forma heterodímeros. La composición de los dímeros de NF- κ B pueden variar dependiendo del tipo celular, la naturaleza del estímulo inductor o el tiempo de respuesta tras la exposición inicial al estímulo (116, 117). Dado que las subunidades de NF- κ B se expresan en casi todos los tipos celulares y que actualmente se conocen cientos de activadores (118), el número de diferentes contextos en los cuales un dímero de NF- κ B puede ser inducido es

enorme. También debido a esta heterogeneidad, NF- κ B es capaz a su vez de inducir gran cantidad de genes implicados en diversos procesos celulares tales como la regulación de la respuesta inmune, la apoptosis, la inflamación, la proliferación, la migración y adhesión celular, la angiogénesis y el desarrollo, entre otros (118-120). De hecho, se considera a NF- κ B como un mediador central en la respuesta inmune humana además de un regulador de la respuesta al estrés.

8.5. Inductores de la actividad de NF- κ B.

Existen múltiples factores capaces de inducir a NF- κ B (*fig.7*). De entre ellos, resultan especialmente importantes para este trabajo los fármacos capaces de activar NF- κ B muchos de los cuales se utilizan actualmente en el tratamiento de distintos tipos de cáncer. De entre ellos, varios se utilizan en el tratamiento del cáncer de mama, tales como la antraciclina doxorubicina y el taxol paclitaxel. La activación del NF- κ B por la doxorubicina y por paclitaxel fue descrita por Das y White (121) en células de adenocarcinoma, donde llegaron a la conclusión de que si bien el mecanismo de activación de NF- κ B era diferente para ambos fármacos, en ambos casos se activaba. También observaron la activación de NF- κ B mediada por otros fármacos antineoplásicos como los alcaloides vinblastina y vincristina. Además sugirieron la hipótesis de que la activación de proteína-cinasa C podía contribuir a la activación de NF- κ B por agentes antineoplásicos.

Otros factores que inducen NF- κ B son citocinas como la IL-15 (122), la IL-2 (123), la IL-1 y el TNF α (124), mitógenos, factores de crecimiento, como por ejemplo el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (125) o el factor de crecimiento nervioso (NGF) (126) y hormonas como la insulina (127).

También en condiciones fisiológicas en las que se da situación de estrés tales como la adhesión (128) o la despolarización (129), también se ha observado inducción de NF- κ B.

NF- κ B también puede actuar como intermediario entre la infección por microorganismo y la activación de citocinas y por tanto de la inflamación.

Algunos de los microorganismos que activan NF- κ B son: *Helicobacter pylori* (130), bacteria capaz de crecer en el mucus del epitelio estomacal humano y que es la causante principal de la mayor parte de úlceras, algunos tipos de gastritis e incluso de cáncer gástrico en humanos (131), *Mycobacteria tuberculosis*, responsable de la tuberculosis en humanos donde NF- κ B media la inducción de IL-6 en respuesta a la infección de esta bacteria (132) o *Neisseria gonorrhoeae*, responsable de la enfermedad de transmisión sexual gonorrea, donde NF- κ B juega un papel crucial en la activación del promotor de IL-6 (133). Otros factores que están relacionados con la activación de NF- κ B son: el peróxido de hidrógeno (134), el ozono (135), el cobalto y el níquel (136), el plomo (137).

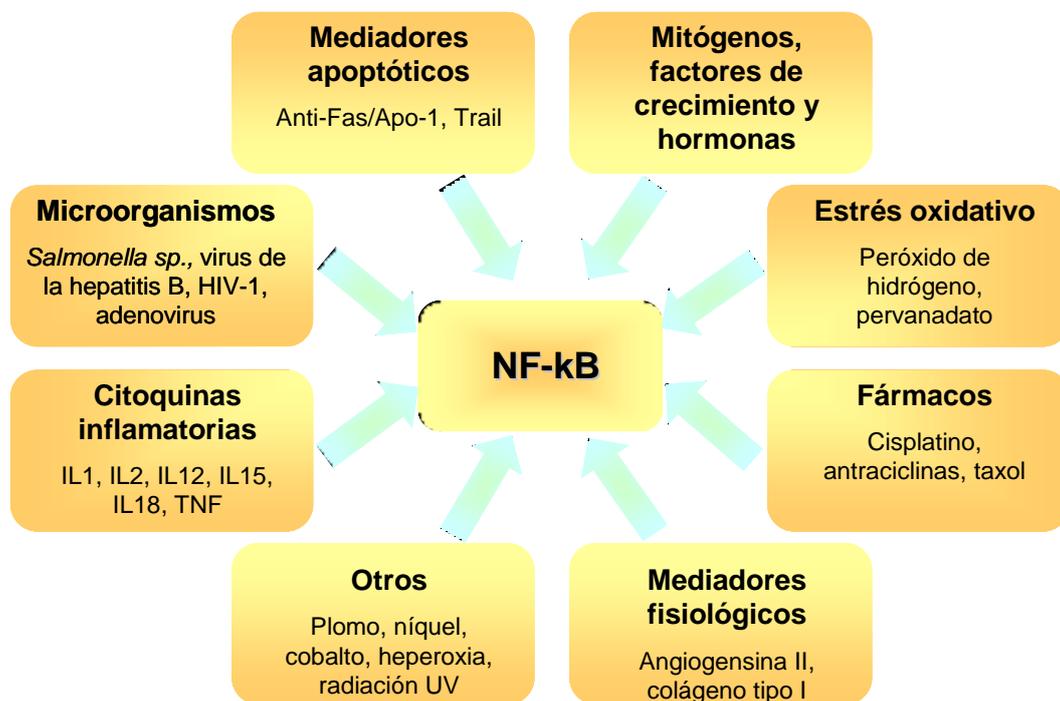


Figura 1.8. Algunos inductores de la actividad de NF- κ B. En esta figura se observan algunos estímulos que puede provocar la activación de NF- κ B.

8.6. Genes diana de NF- κ B.

La activación de NF- κ B se corresponde en general con un aumento de la supervivencia celular si bien cada vez existen más evidencias que demuestran

que en ciertas circunstancias también puede actuar como supresor de tumores (117). Algunos genes cuya transcripción está regulada por NF-kB y que a su vez la función está relacionada con algún aspecto de la oncogénesis, se indican en la *figura 1.8*. Como puede observarse algunos genes diana de NF-kB son loci que codifican para proteínas relacionadas con procesos tales como el desarrollo y la diferenciación, la apoptosis, la respuesta inmune o la inflamación, altamente implicados en el desarrollo y la progresión del cáncer (138, 139). Su relevancia es mayor si además tenemos en cuenta que otras vías potencialmente oncogénicas como la de RAS, relacionada con distintos tipos de cánceres como el de próstata, el melanoma y el de mama, ejercen su efecto a través de la activación de NF-kB (140-142). Además puede regular a otros factores de transcripción a su vez implicados en procesos relacionados con la oncogénesis, tales como MYC relacionado con metástasis en cáncer de mama (143-146) o STAT1 y STAT3.

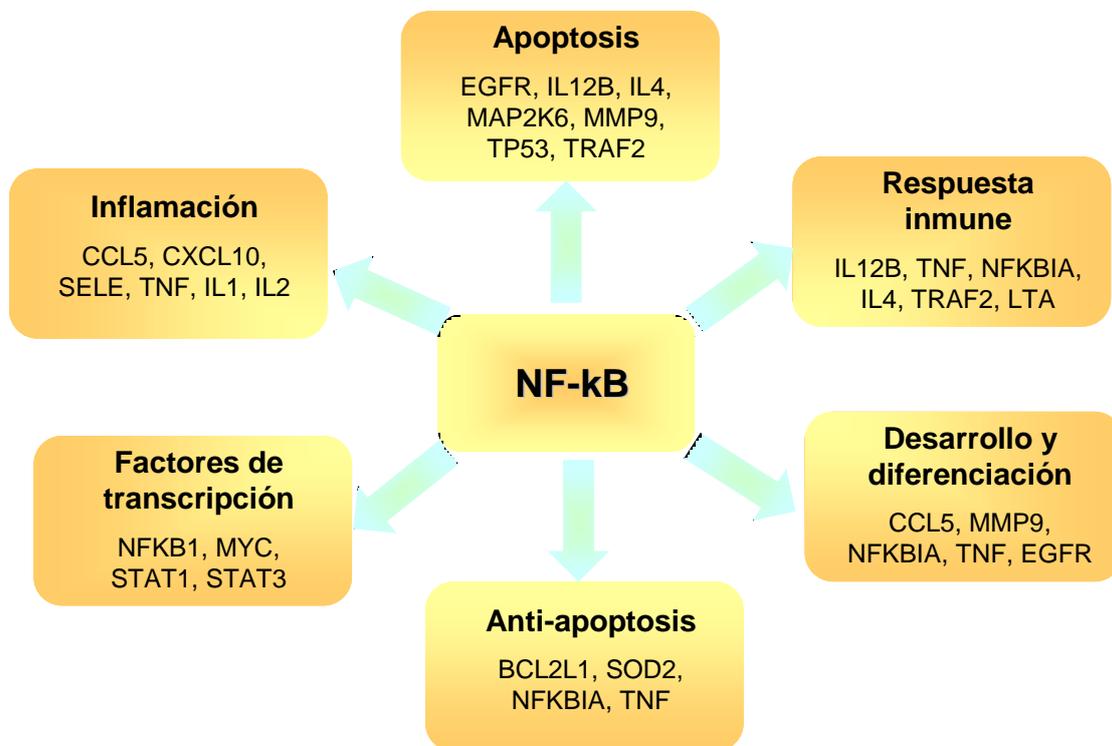


Figura 1.9. Representación de algunos genes regulados por NF-kB relacionados con distintos aspectos de la oncogénesis.

8.7. Estructura de NF-kB.

Como ya se ha especificado anteriormente, en vertebrados la familia de factores de transcripción NF-kappaB (NF-kB) incluye cinco miembros llamados p65, p50/p105, p52/p100, c-Rel y RelB que forman heterodímeros y homodímeros capaces de unirse al ADN. Su sitio de unión son 10 pares de bases llamadas sitios kB que regulan la expresión de gran variedad de genes. En la mayoría de las células, los complejos NF-kB se encuentran en el citoplasma en forma inactivada y unidos a Ikb (familia de proteínas inhibidoras) (120). Para que NF-kB se active, necesita liberarse de Ikb y translocarse al núcleo. Estructuralmente, NF-kB posee un dominio de homología REL (RHD) en su extremo N-terminal que le permite formar complejos proteína/ADN. Este RHD posee además en su extremo C-terminal un dominio de dimerización que contiene un sitio de interacción para Ikb. Según esta secuencia C-terminal del dominio de homología REL, se pueden dividir las proteínas de la familia NF-kB en dos clases:

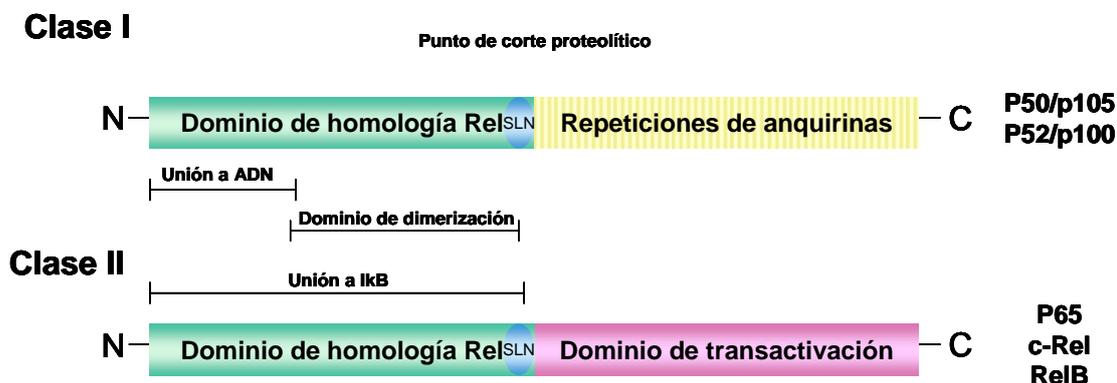
8.7.1. Clase I.

Incluye a las proteínas p50/p105 y p52/p100. Estas proteínas tienen un dominio C-terminal que contiene copias múltiples de repeticiones de anquirina que actúan inhibiéndolas. Estas proteínas se sintetizan como precursores (p105 y p100) que necesitan pasar por un proceso proteolítico para generar las subunidades maduras p50 y p52 respectivamente. Su procesamiento está mediado por la ruta de las ubiquitinas/proteosoma e incluye la degradación selectiva de la región C-terminal rica en repeticiones de anquirina. Como consecuencia los miembros de esta primera clase no son normalmente activadores de la transcripción excepto si forman dímeros con la clase II de los factores de transcripción de NF-kB.

8.7.2. Clase II.

Incluye a las proteínas c-Rel, RelB y p65. En este caso las proteínas son sintetizadas como productos maduros y no requieren procesamiento

proteolítico. Esta segunda familia contiene un dominio C-terminal activador de la transcripción. Pueden formar dímeros tanto entre ellas como con proteínas de la clase I, a excepción de RelB.



© Jessica Furriol Palmer

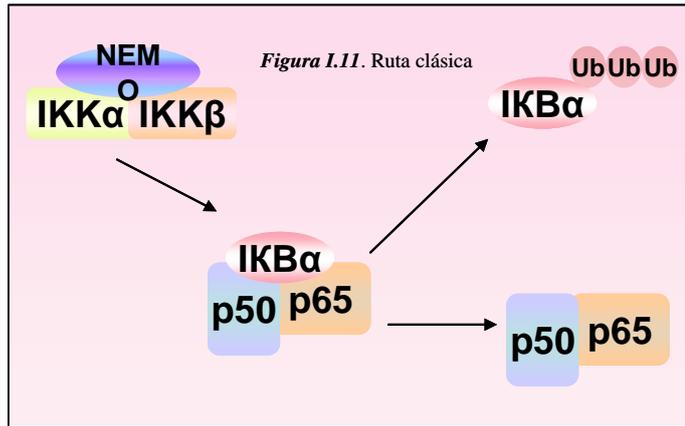
Figura I.10. Estructura general de las proteínas de clase I y clase II de NF-κB. Ambas poseen un dominio de unión/dimerización llamado *Dominio de Homología Rel*, pero mientras la clase I tiene una zona de repeticiones de anquirinas que actúa como dominio inhibidor, la clase II tiene un dominio de transactivación que le permite translocarse al núcleo una vez activa.

8.8. Activación de NF-κB.

En la mayoría de células, NF-κB se encuentra en el citoplasma en la forma inactiva unido a IκB. Cuando la célula recibe alguna señal extracelular capaz de activar NF-κB, IκB se degrada rápidamente y NF-κB se trasloca al núcleo, se une al ADN y activa la expresión génica, de forma que se puede decir que NF-κB actúa como un factor inducible. Además, por el hecho de que la actividad de NF-κB no requiere la síntesis de nueva proteína permite que la señal se transmita rápidamente del citoplasma al núcleo. Actualmente se conocen dos rutas principales por las que NF-κB puede activarse (147):

8.8.1. Ruta clásica o canónica: la llegada del estímulo provoca la activación del complejo IKK (IκB cinasa) que es una cinasa dependiente de serina compuesta de al menos tres subunidades catalíticas denominadas IKKα, IKKβ e IKKγ [o NEMO, por NF-κB *Essential Modulator*

(modulador esencial de NF- κ B)]. Mientras que IKK α e IKK β son

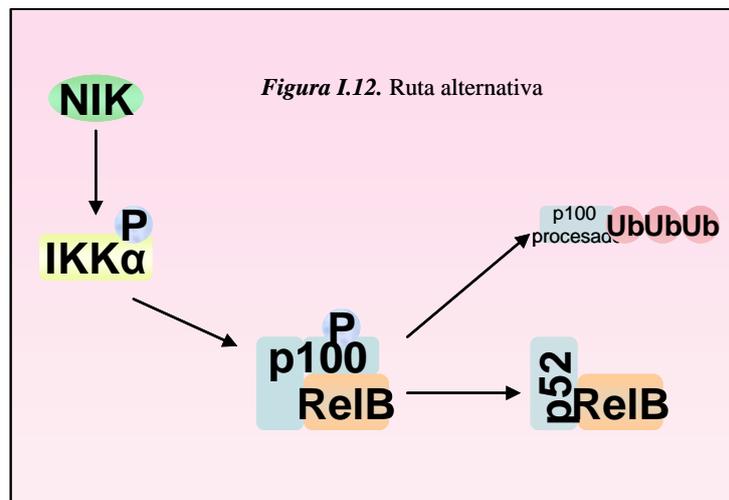


subunidades catalíticas, IKK γ es la subunidad reguladora que actúa como activador-represor de las subunidades catalíticas. IKK es capaz de fosforilar I κ B, que se

suelta de NF- κ B dejando de inhibir su translocación. I κ B se ubiquitina y se degrada en el proteosoma mientras NF- κ B se activa y es capaz de translocarse al núcleo e inducir la transcripción de sus genes diana (148).

8.8.2. Ruta alternativa o no canónica: en este caso, NIK [NF- κ B-*Inducing Domain* (dominio inductor de NF- κ B)] fosforila a IKK α que a su vez fosforila a residuos específicos de serina que se encuentran en el extremo C-terminal de las repeticiones de anquirinas (149). Este proceso de fosforilación permite que p100 sea reconocido por el complejo ligasa SCF^{I κ B}E3 lo que conlleva su poliubiquitinación. Sin embargo, debido a la

presencia de un codón de parada entre el extremo N-terminal de p52 y la porción C-terminal de las repeticiones de anquirinas, la molécula de p100 solo se degrada parcialmente lo que



da como resultado que el fragmento N-terminal de p52 que está unido a RelB no se degrade (150, 151). Finalmente, el heterodímero p52: RelB se trasloca al núcleo donde se une a sus genes diana.

En ambas rutas (*figura 1.13*), el complejo NF- κ B entra en el núcleo donde activa a sus genes diana. En la ruta clásica, uno de los genes diana activados es el que codifica para I κ Ba, que puede entrar al núcleo, unirse a NF- κ B y exportar el complejo de nuevo al citoplasma. Por tanto, la activación/desactivación de NF- κ B es generalmente un proceso muy rápido y autorregulado.

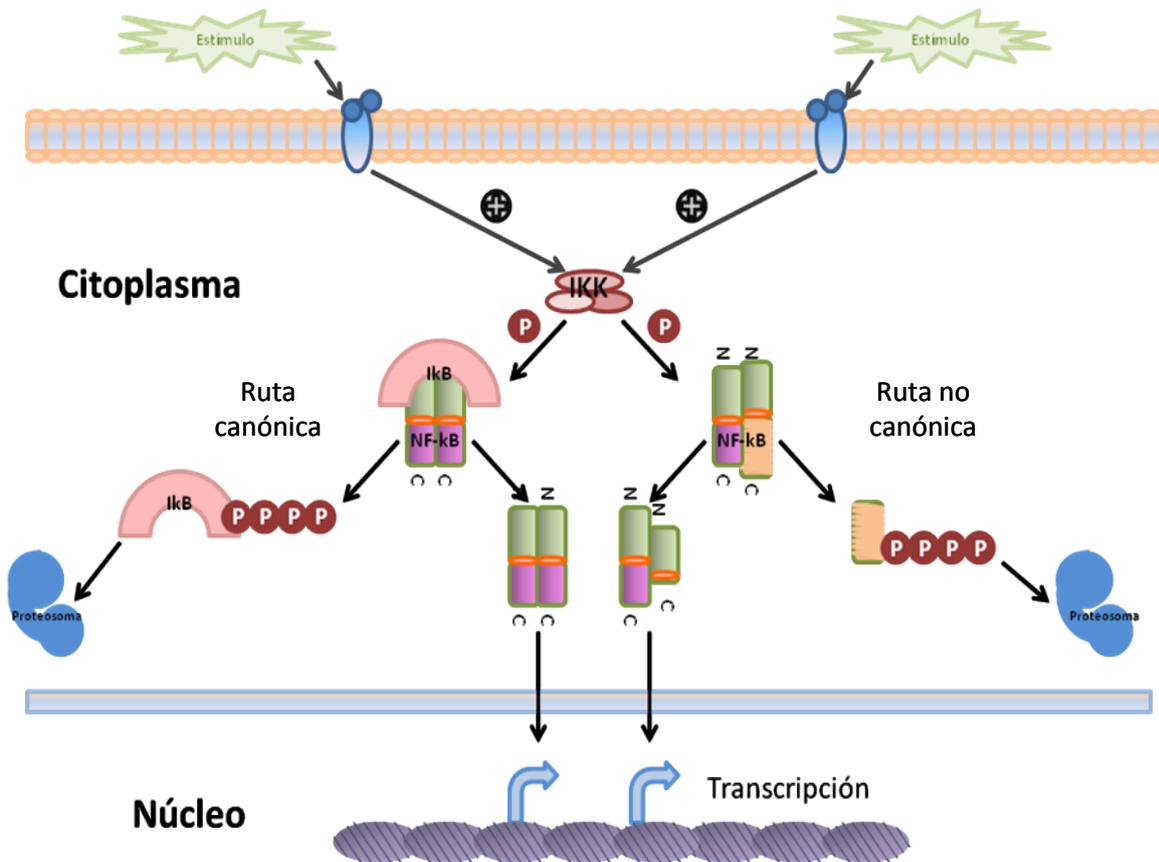


Figura 1.13. Esquema general de las rutas canónica y no canónica de NF- κ B.

8.9. Regulación de NF- κ B.

Actualmente se conocen dos procesos generales mediante los cuales se regula a la familia de factores de transcripción NF- κ B, si bien debido a la complejidad de esta familia, se cree que todavía queda mucho por conocer. Estos procesos son:

8.9.1. Inhibidores de NF- κ B: la familia I κ B.

La actividad de NF- κ B está regulada principalmente por la interacción con las proteínas inhibitorias I κ B, de las que existen distintos tipos que tienen a su vez diferentes afinidades por los complejos individuales de NF- κ B. En mamíferos, las más importantes son I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ . Todas las I κ Bs contienen seis o siete repeticiones de anquirinas pero además en el caso de I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ contienen una región regulatoria N-terminal que se requiere para la degradación inducida por estímulos, que es el paso clave en la activación de NF- κ B y un dominio C-terminal que contiene prolina, ácido glutámico, serina y treonina (PEST) (*figura 1.12*). Las I κ Bs además se expresan de forma diferencial en los diferentes tejidos. I κ B también juega un papel importante en la terminación de la actividad de NF- κ B, ya que una vez se sintetiza, entra en el núcleo donde se une a NF- κ B rompiendo su unión al ADN y exportándolo al citoplasma (116, 148, 152).



Figura 1.12. Estructura básica de las proteínas inhibitorias I κ B. Se observan las repeticiones de anquirinas (Ank), el dominio regulador (RR) en el extremo N-terminal y el dominio prolina ácido glutámico, serina y treonina (PEST).

Cada I κ B tiene sus propias preferencias de unión y están sujetas a regulación transcripcional por miembros de la familia NF- κ B (153, 154).

La interacción NF- κ B-I κ B más estudiada es la que se produce entre I κ B α y el heterodímero p50:p65. Aunque también se ha observado que I κ B ϵ regula preferentemente al homodímero p65:p65 y al heterodímero c-Rel:p65 (154-156). La función de I κ B β es la menos conocida, aunque parece que se une preferentemente al heterodímero p65:p50 asociados a sitios κ B en el ADN, lo que sugiere que su acción pueda ser la de regular su función nuclear (157, 158).

8.9.2. Modificaciones regulatorias y formación de complejos en NF-kB.

Además de las múltiples modificaciones post-traduccionales que controlan la actividad de los componentes de la ruta de NF-kB, como el complejo IκB cinasa (IKK), las proteínas inhibidoras IκB y las propias subunidades de NF-kB, también existen otras formas de regulación de estos factores de transcripción. De hecho, se han estudiado distintas modificaciones regulatorias que afectan a NF-kB, como son la forforilación, la ubiquitinación, la acetilación, la nitrosilación, la metilación, la oxidación-reducción y la isomerización que a su vez pueden variar dependiendo de los estímulos que lleguen a la célula. De hecho frecuentemente el efecto puede ser totalmente distinto e incluso antagónico dependiendo del contexto (159).

Por otra parte, un reciente estudio (160) ha constatado que NF-kB es capaz de formar un complejo con la proteína ribosomal S3 (RPS3) que influenciaría la función de NF-kB tanto en su afinidad por el ADN, aumentándola cuando se forma el complejo, como en que punto de la cromatina en el que se une y por tanto donde empieza a transcribir. Estos datos sugieren que la afinidad y la especificidad de NF-kB pueden verse influenciadas por su interacción con proteínas auxiliares.

Por otra parte se ha observado que como consecuencia de la inducción de la actividad de NF-kB por el factor de necrosis tumoral (TNF), IKKα puede ser inducido a entrar en el núcleo donde se une a un promotor asociado al sitio kB asociado a su vez a la fosforilación de la histona H3 lo que conlleva al aumento de la transcripción de los genes dependientes del sitio kB.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

Los niveles de activación de las subunidades del factor de transcripción NF-kB pueden permitir la identificación de pacientes con mayor riesgo de recaída y con mayor probabilidad de resistencia al tratamiento con fármacos antitumorales.

Así mismo, cambios en la expresión de genes transcritos por NF-kB tras la administración de fármacos antitumorales, pueden ser causantes de la resistencia al tratamiento y constituyen potenciales dianas terapéuticas.

2. OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis doctoral se basaron en la caracterización de NF-kB en cáncer de mama en tejido humano y su posible relación con el tratamiento y con la recidiva. Además también se estudiaron genes con expresión diferencial en líneas celulares tras el tratamiento con doxorubicina y se analizó la expresión en tejido tumoral, tejido adyacente y tejido normal de genes que podrían tener un papel tanto en el desarrollo como en la resistencia al tratamiento en el tumor.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la activación de NF-kB en líneas celulares derivadas de tumores mamarios tratadas con doxorubicina.
2. Estudiar la activación de NF-kB como factor pronóstico en pacientes de cáncer de mama.
 - 2.1. Posibles diferencias en la activación de NF-kB en tejido tumoral y no tumoral
 - 2.2. Correlación entre activación de las diferentes subunidades de NF-kB y características clínico-patológicas.

3. Estudiar el valor predictivo de NF-kB en cáncer de mama.
 - 3.1. Evolución de las pacientes tras el tratamiento y niveles de activación de las subunidades de NF-kB.
 - 3.2. Asociación del tiempo libre de enfermedad con el tratamiento.
4. Caracterizar la expresión de genes regulados por NF-kB tras la administración de doxorubicina en líneas celulares derivadas de mama. Posibles implicaciones en el tratamiento.
5. Estudiar la expresión de genes regulados por NF-kB en tejido tumoral, tejido adyacente al tumor y tejido normal.
 - 5.1. Posible implicación de los genes estudiados en el desarrollo y tratamiento del cáncer de mama.
 - 5.2. Implicación del microambiente en el desarrollo del cáncer de mama.
6. Correlacionar la activación de NF-kB con la expresión génica de los genes seleccionados.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1. 1. Ámbito y sujetos de estudio

Todas las muestras, tanto congeladas como parafinadas, provienen de pacientes del Hospital Clínico de Valencia que previamente habían dado su consentimiento informado para la utilización de las muestras en estudios clínicos. Este consentimiento informado había pasado previamente el comité de ética del Hospital Clínico Universitario de Valencia. De todas las muestras seleccionadas se recopilaron datos clínico-patológicos como la edad de aparición del cáncer, estadio, grado, tipo histológico, afectación ganglionar, tamaño tumoral, metástasis y seguimiento.

1.1.1. Muestras tumorales congeladas.

El conjunto de muestras empleadas proviene de la resección quirúrgica de tumores de mama pertenecientes al Banco de Tumores del Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia. A efecto de establecer el valor pronóstico de algunos parámetros clínicos y moleculares determinados en el estudio, todas las muestras que se incluyeron en el análisis habían sido recogidas entre los años 1988 y 2001, con lo que se aseguró un seguimiento mínimo de 8 años. A fin de determinar la calidad y la fracción tumoral de las muestras congeladas, éstas se incluyeron en OCT y fueron cortadas mediante un microtomo a -20°C y teñidas con la tinción hematoxilina-eosina. De las 450 muestras analizadas mediante esta técnica se consideraron óptimas para el estudio 164. Las características de las muestras congeladas que finalmente fueron incluidas en el estudio se pueden observar en la tabla III.1.

Tabla III.1. Características de las muestras congeladas utilizadas en este estudio.		
	Nº	%
Pacientes estudiadas*	164	100
Tipo histológico		
Grupo de carcinomas infiltrantes (GCI)	127	76,5%
Carcinoma ductal Infiltrante (CDI)	98	59,0%
Otros carcinomas invasivos (OCI)**	29	17,5%
Carcinoma ductal <i>in situ</i>	10	6,0%
Tejido adyacente no tumoral	16	9,6%
Edad		
Media	56,7	
Rango	30-86	
≤50	60	37,0%
>50	102	63,0%
Tamaño tumoral (para GCI)		
T1 (≤ 2cm)	17	13,4%
T2 (> 2cm ≤ 5cm)	71	55,9%
T3 (> 5cm)	16	12,6%
Ganglios axilares (para GCI)		
Afectados (N1, N2, N3, N4)	86	67,7%
No afectados (N0)	32	25,2%
Grado de diferenciación (para GCI)		
I	23	25,6%
II	42	46,7%
III	25	27,8%
Receptores de estrógenos		
Positivo	104	68,0%
Negativo	49	32,0%
Receptores de progesterona		
Positivo	81	53,0%
Negativo	72	47,0%

*Pacientes de las que no disponíamos de información no se incluyeron en la tabla.

**Otros carcinomas invasivos: incluyecarcinoma lobular, medular, mucinoso papilar y secretor.

1.1.2. Muestras parafinadas.

Las muestras parafinadas procedieron de tejido mamario obtenido en la cirugía, del que parte fue procesado para la realización de estudios histológicos. El tejido se incluyó en parafina para su correcta conservación y tinción si ese era el caso. Las parafinas utilizadas en este trabajo nos fueron cedidas por el Biobanco del INCLIVA/Hospital Clínico Universitario de Valencia situado en el Servicio de Anatomía Patológica. En el caso de las muestras utilizadas para la extracción de ARN, se obtuvieron muestras tanto tumorales como de tejido adyacente no tumoral, además de muestras provenientes de tejido sano. Las características de las pacientes

se puede observar en la tabla III.2. La determinación de la calidad de los tejidos y la selección fueron realizadas por los patólogos Jaime Ferrer, Octavio Burgués y la técnico de patología Elisa Alonso.

Tabla III.2. Características de las muestras parafinadas utilizadas en este estudio.		
Pacientes estudiadas	Nº	%
	19	100
Tipo histológico		
Carcinoma ductal Infiltrante (CDI)	15	79,0%
Carcinoma lobulillar Infiltrante (CLI)	4	21,0%
Edad		
Media	55	
Rango	28-62	
≤50	5	26,3%
>50	14	73,7%
Tamaño tumoral		
T1 (≤ 2cm)	12	63,2%
T2 (> 2cm ≤ 5cm)	7	36,8%
Ganglios axilares		
N1	6	31,6%
N0	13	68,4%
Grado de diferenciación		
I	2	10,5%
II	11	57,9%
III	6	31,6%
Receptores de estrógenos		
Positivo	16	84,2%
Negativo	3	15,8%
Receptores de progesterona		
Positivo	14	73,7%
Negativo	5	26,3%
Her2		
Positivo	3	15,8%
Negativo	16	84,2%

1.2. Líneas celulares. Descripción.

Se utilizaron seis líneas celulares derivadas de carcinoma de mama:

- MCF7: derivada de un carcinoma ductal infiltrante de mama. Posee tanto receptores de estrógenos como de progesterona positivos. No sobre-expresa Her2. Crecen de forma adherente y morfología epitelial. Su subtipo cancerígeno es luminal.
- MDAMB468: derivada de un adenocarcinoma de mama de una paciente con metástasis. Expresa *EGF* [*Epidermal Growth Factor* (factor de crecimiento de la epidermis)]. Crecen de forma adherente y

morfología epitelial. Esta línea celular es negativa para receptores de estrógenos y no sobre-expresa *HER2*. Se englobaría del subtipo cancerígeno basal.

- MDAMB231: derivada de un adenocarcinoma mamario. Crecen en forma adherente y con morfología epitelial. Esta línea celular tiene receptores de estrógenos negativos y no sobre-expresa *HER2*. Se incluiría dentro del subtipo basal.
- SKBR3: derivadas de cáncer de mama. Es hipertriploide y por tanto su genotipo es muy complicado. Su morfología es epitelial y crecen de forma adherente. Se engloba dentro del subtipo tumoral luminal, con amplificación de *HER2* y receptores de estrógenos negativos.
- BT474: derivado de un carcinoma ductal. Crece de forma adherente formando colonias con múltiples capas que raramente confluyen. Se engloba dentro del subtipo tumoral luminal, con receptores de estrógenos positivos y amplificación de *HER2*.

1.3. APARATAJE UTILIZADO.

- **Centrífugas.**

Para tubos de microcentrífuga se utilizó una centrífuga de la marca Eppendorf, modelo 5415R.

Para la centrifugación tanto de placas como de tubos se utilizaron las centrífugas Eppendorf modelo 5804 si no era necesaria la refrigeración y Eppendorf modelo 5804R y MPW modelo 350R, en el caso de que sí fuera necesaria la refrigeración.

- **Autoclave.**

Marca SELECTA, model Autester-G.

- **Campana de flujo laminar.**

Haraeus Gemini.

Faster modelo Bio60.

- **Estufas termostatazadas de cultivo.**

Heraeus BB6060.

Jouan IG 150.

- **Homogeneizador.**

Heidolph modelo ReaxTop.

- **pHmetro.**

El pHmetro empleado es de la marca CRISON, modelo Microph 2001, con un electrodo incorporado INGLOD.

- **Baño.**

Selecta modelo Precistern.

- **Congelador a -80°C.**

Heraeus modelo HeraFreeze.

Thermo Scientific Forma 900 Series.

- **Microscopio.**

Microscopio óptico invertido Carl Zeiss hasta 100X.

- **Plataforma oscilante.**

Marca VWR modelo Rocking Platform.

- **Balanzas.**

Balanza Scaltec con una precisión de 0.1g.

Balanza Ae Adam modelo PGW 753i con una precisión de 0.001g.

- **Sistema de purificación de agua.**

Marca MILLIPORE, modelos Milli-Q y Milli-RO.

- **Cubetas de electroforesis.**

Marca BIORAD, modelo Mini-PROTEAN 3 Cell.

- **Cubetas de electrotransferencia.**

Marca BIORAD, modelo Mini Trans-Blot Cell.

- **Fuentes de alimentación para la electroforesis.**

Se utilizaron 2 fuentes de alimentación, una de la marca SIGMA, modelo PS 250-2, y otra de la marca BIORAD, modelo 200/2.0 Power Supply.

- **Sistema de Análisis de Imágenes.**

Marca FUJIFILM, modelo LAS-1000 plus.

- **Espectrofotómetro/fluorímetro de placas y cubetas.**

Marca Molecular Device, modelo Spectra max 384 plus.

- **Campana de extracción de gases.**

Marca Burdinola, modelo OR-ST 1500.

- **Termobloque.**

Marca Eppendorf, modelo Thermomixer comfort.

- **Sistema de purificación de agua.**

Marca Millipore, modelos Milli-Q y Milli-RO.

2. MÉTODOS

2.1. CULTIVOS CELULARES

2.1.1. Medios

Para MCF7 se utilizó el medio DMEM *low glucose*. Para MDAMB231, MDAMB468, SKBR3, BT474 y MCF10A se usó el medio DMEM F12. Todos los medios fueron suplementados con 10% SBF y 1% antibióticos. Además, en el caso de BT474 se añadió al medio 10mg/mL de insulina. Los medios, el suero y los antibióticos fueron adquiridos de la compañía SIGMA-ALDRICH mientras la insulina nos fue proporcionada por Actrapid.

2.1.2. Mantenimiento de células.

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en sus medios correspondientes con sus suplementos en una estufa con atmósfera húmeda a 37°C y con 5% de CO₂. La manipulación de los cultivos y la preparación de las soluciones se llevaron a cabo en campanas de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

2.1.3. Inactivación del suero bovino fetal.

El suero que se utiliza para suplementar el medio de cultivo debe estar previamente inactivado, es decir, se deben desnaturalizar las proteínas que contiene para evitar que interfieran en el metabolismo celular, Para inactivarlo, lo que se hace es incubar el suero a 56°C durante 30 minutos. Una vez inactivado se puede mantener congelado a -20°C.

2.1.4. Tratamiento con tripsina-EDTA.

Las 5 líneas celulares utilizadas crecen adheridas al frasco de cultivo, por tanto para la realización del sub-cultivo, es decir, el traspaso de las células a otra placa, se necesita que se separen del fondo. Para esto se usa generalmente la tripsina-EDTA (*Ethylene-Dinitrilo Tetraacetic Acid*). La tripsina es una enzima proteolítica que interfiere en la adhesión célula-célula mediada por cadherinas. Como en presencia de calcio estas moléculas son resistentes a la tripsina, se le añade EDTA, que es un quelante del calcio. De esta forma las cadherinas pasan a ser susceptibles a la tripsina y las células se separan. Normalmente el protocolo consiste en lavar las células con PBS y cubrirlas con una capa de tripsina-EDTA entre 3 y 5 minutos (o hasta que se despeguen) a 37°C.

2.1.5. Congelación

La congelación debe ser un proceso lento. Primero se prepara el medio de congelación. En nuestro caso, el medio de congelación utilizado para todas las líneas celulares está compuesto por un 90% de SBF y 10% de DMSO como criopreservante, ya que evita que se formen cristales de hielo durante el proceso de congelación. Una vez preparado el medio de congelación, se elimina el medio de cultivo de la placa y se lava 2 veces con 2-3mL de PBS. Una vez hechos los lavados, se añade tripsina-EDTA y se deja a 37°C hasta que se despeguen las células (2-5 minutos). Una vez despegadas, se recogen con 6-7mL de medio de cultivo y se pasan a un tubo de 10 o 15mL que se centrifuga durante 5 minutos, a 1500rpm a temperatura ambiente. Una vez llevado a cabo este paso, se elimina el sobrenadante, que contiene los restos de medio y tripsina-EDTA y se resuspende el sedimento en 1mL del medio de congelación previamente preparado. Se toma una pequeña muestra (entre 5-10uL) y se cuenta el número de células en microscopio utilizando una cámara de Neubauer. La cámara de Neubauer es un portaobjetos con dos zonas ligeramente deprimidas en el fondo de las cuales se ha marcado una cuadrícula de dimensiones conocidas. A esta cámara se le pone un cubreobjetos

encima y luego se introduce el medio con las células (en el caso de haber muchas células se realizan diluciones). Se cuentan las células que hay en el microscopio y se valora el número de células. La fórmula general para calcular el número de células es: células por μl (partículas contadas)/ (superficie contada (mm^2) x profundidad de la cámara (mm) x dilución).

En nuestro caso:

$$\text{Número de células en el medio} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células en 4 cuadrantes}}{4} \times 10000 \times \text{dilución}$$

Una vez contadas las células, se calcula la dilución que necesitamos para que en cada criotubo tengamos según el tipo celular entre $2,5 \times 10^6$ - 6×10^6 células en 1mL. Cuando ya tenemos los criotubos con el número de células correspondientes, se guarda a -80°C durante 2 días en una caja especial de crioconservación que contiene isopropanol, un alcohol que debido a sus características químicas se mantiene en estado líquido a -80°C y evita que la congelación se produzca de forma brusca. Una vez transcurridos los 2 días, se guarda definitivamente la muestra en nitrógeno líquido, cuya temperatura máxima es $-195,8^\circ\text{C}$, ya que a una temperatura mayor el nitrógeno pasa a vapor.

2.1.6. Descongelación.

La descongelación debe ser un proceso rápido para evitar la formación de cristales de hielo que pueden dañar las estructuras celulares e incluso matar a la célula.

Al tratarse de un proceso rápido, los medios que se van a utilizar deben ser atemperados a 37°C antes de proceder al proceso de descongelación. Una vez ya están preparados, se extraen los criotubos del tanque de nitrógeno y se rocían con etanol para que la descongelación se produzca más rápidamente. Los criotubos rociados se dejan en la estufa a 37°C hasta su completa descongelación. Una vez

descongelados, se resuspenden las células en 6 o 7 mL de medio de cultivo, ya que aunque el DMSO se utiliza como criopreservador, posee cierta toxicidad para las células por lo que se intenta minimizar el daño diluyéndolo. Se mezcla suavemente el medio con el medio de congelación en un tubo de 10 o 15 mL y se centrifuga el tubo a 1500rpm durante 5 minutos a TA. Tras la centrifugación, las células quedan en el sedimento, por lo que elimina el sobrenadante y se resuspenden en 1mL de medio de cultivo, del que se toma una alícuota que se tiñe con “*Trypan Blue*”, un tinte vital que tiñe específicamente células muertas, ya que mientras las células vivas tienen la membrana intacta y no dejan pasar el colorante, las membranas de células muertas son porosas y se tiñen de azul. La alícuota teñida se mira bajo el microscopio y se cuentan las células vivas. Según la cantidad de células vivas que tengamos, se sembrarán una o más placas. Generalmente, sembramos $2,5 \times 10^6$ - 6×10^6 células/mL en frascos T75 con 15 mL de medio y dejamos crecer en la estufa a 37°C con 5% CO₂.

2.2. Viabilidad celular: método MTT

2.2.1. Fundamento

El compuesto MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) es un tetrazol que emite en el amarillo el cual es metabolizado por enzimas reductoras que lo transforman en formazán, que emite en el azul. Mediante este viraje de color, se cuantifica la cantidad de MTT transformado. Ya que la reducción solo se puede llevar a cabo cuando las enzimas reductoras están activas y por tanto las células vivas, este método se utiliza para la determinación de la viabilidad celular y de la proliferación. Este método fue desarrollado por Mossmann en el año 1983. En nuestro caso utilizamos el “*Cell Growth Determination Kit, MTT Based*” de Sigma-Aldrich.

2.2.2. Protocolo

Se sembraron entre 5000 y 10000 células según el tipo celular y se dejaron crecer durante 24 horas. Tras este tiempo, se añadió el

tratamiento con doxorubicina a distintas concentraciones y se mantuvieron en crecimiento entre 4 y 48 horas más según el ensayo. Por último, se añadió DMSO en el mismo volumen que cantidad de medio en el pocillo durante 4 horas lo que provoca la solubilización del formazán. La absorbancia se midió a 530nm con longitudes de onda como referencia entre 630 y 690nm.

2.3. Mantenimiento de muestras tumorales por congelación.

2.3.1. Fundamento

Para preservar la integridad del tejido tumoral y su correcta conservación, se procedió a su congelación.

2.3.2. Protocolo

Se extrajo quirúrgicamente el tumor del que se contó una fracción que se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. De esta forma, se para el metabolismo celular y se asegura una mejor conservación, Una vez congeladas, las muestras se conservaron a -80°C hasta su posterior utilización.

2.4. Mantenimiento de las muestras tumorales en OCT.

2.4.1. Fundamento

El OCT [*Optimal Cutting Temperature Compound* (compuesto para la temperatura óptima de corte)] es un método de congelación y conservación de tejidos. Se trata de un medio donde se embebe el tejido que luego puede usarse tanto para análisis histológicos como para técnicas moleculares.

2.4.2. Protocolo

Se prepara el molde donde se añade OCT hasta aproximadamente la mitad. Se corta el tejido en trozos de aproximadamente 0,5x0,5mm e inmediatamente después se pone el trozo de tejido en el molde que se cubre con OCT hasta el borde, se congela rápidamente en nitrógeno

líquido y se guarda a -80°C.

2.5. Mantenimiento de las muestras tumorales por inclusión en parafina

2.5.1. Fundamento

La inclusión de muestras en parafina es el proceso mediante el cual se interrumpen los procesos de degradación que aparecen tras la muerte celular conservando de esta forma la arquitectura y composición tisular de la manera más próxima posible a la célula viva.

2.5.2. Protocolo

En primer lugar y tras recibir de cirugía la pieza de tejido, se procede a su tallado. Este proceso consiste en hacer secciones de la muestra para su mejor fijación. Tras esto, se fijan las muestras por inmersión en un baño de formol tamponado al 4%. A continuación, las muestras se someten a un progresivo proceso de deshidratación que permite eliminar el agua existente en el tejido. Esta operación se lleva a cabo empleando baños sucesivos de 2 ó 3 horas de duración cada uno, en alcoholes de graduación creciente 50%, 70%, 80%, 95% y, por último, alcohol absoluto. Tras la deshidratación las muestras se someten a un proceso de aclarado, que se sustituye el agente deshidratante (etanol en nuestro caso) por una sustancia miscible en el medio de inclusión, en este caso el xileno. Para llevar a cabo este proceso, se sumergen las muestras tisulares en 3 baños sucesivos de 30 minutos cada uno en distintos recipientes con xileno. Una vez completado este proceso, se procede a la infiltración o impregnación de la muestra, que consiste en rellenar o infiltrar completamente la muestra histopatológica con el medio que se va a utilizar para la inclusión en el bloque final. En el estudio de la histopatología de la mama la sustancia de infiltración empleada es la parafina líquida a una temperatura de 58° a 65° C, dependiendo del punto de fusión de la misma. En este punto, las muestras se pasan directamente desde el último baño de xilol a un recipiente con parafina líquida. Para facilitar la completa impregnación y eliminación total de los restos de xilol se realizan dos baños sucesivos en diferentes recipientes

con parafina líquida de 2 horas de duración cada uno de ellos y un último baño de 4 horas de duración que permite que la impregnación sea perfecta. Una vez completada la infiltración de la muestra, ésta se encastra en un molde metálico para la confección del bloque. Los tejidos infiltrados se orientan de forma adecuada, en función de la superficie de interés, en el molde metálico y se recubren con la misma parafina líquida con la que han sido infiltrados. El material metálico del molde junto con un enfriamiento lento a 10^o-15^o C confieren una dureza homogénea al bloque. En este punto, la muestra puede guardarse en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Valencia o cortarse en el microtomo para hacer preparaciones para inmunohistoquímica.

2.6. INMUNOHISTOQUÍMICA

2.6.1. Fundamento

La inmunohistoquímica corresponde a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten la identificación de antígenos presentes en muestras tisulares o citológicas fijadas en parafina utilizando anticuerpos marcados. Se basa en la capacidad de los anticuerpos marcados con sustancias que emiten, absorben o producen coloración de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta técnica permite la localización microanatómica de la expresión de distintos antígenos y su correlación con los parámetros morfológicos, aumentando la sensibilidad y especificidad y proporcionando información adicional.

2.6.2. Reactivos

- Paraformaldehído
- Xileno
- Etanol 100%
- Etanol 95%
- Etanol 70%
- Etanol 50%

- Etanol 30%
- PBS
- Tampón: 0.5% de BSA y 2% de suero bovino fetal.
- Anticuerpo primario
- Anticuerpo secundario
- Hematoxilina de Harris
- Eosina
- Anticuerpos primarios
- Anticuerpo secundario
- Líquido bloqueante
- Polilisina

2.6.3. Protocolo

Primero, la muestra fijada en el bloque de parafina se corta con el microtomo. Los cortes son generalmente de 5 μ m de grosor y se realizan sobre un recipiente con agua entre 40 y 50^o C donde se quedan flotando para ser recogidos posteriormente introduciendo un portaobjetos de forma vertical en el agua de manera que el corte se queda depositado sobre dicho portaobjetos. Una vez tenemos el corte en el portaobjetos, se recubre de polilisina y se seca en estufa a 60^o C de 10 a 20 minutos (o a 37^o C durante 14-16 horas), lo que permite que el corte quede perfectamente adherido antes de proceder a su tinción. Para la tinción, en primer lugar se elimina la parafina del corte siguiendo un proceso de desparafinización. Para ello, los cortes histológicos se dejan en estufa a 60^o C durante 14 horas, de manera que la parafina pasa a estado líquido. Posteriormente, las muestras se hidratan de forma progresiva para lo que se realiza una primera incubación en xilol durante 20 minutos, seguido de 5 lavados de 2 minutos de duración cada uno de ellos en distintas cubetas que contienen xilol. A continuación, se hidrata el tejido realizando lavados sucesivos de los cortes con alcoholes de concentración decreciente 100^o, 70^o, 50^o y 30^o, seguido de sucesivos lavados que se

efectúan empleando agua bidestilada. De esta manera, la muestra va adquiriendo el nivel de hidratación óptimo para su tinción, ya que los colorantes son miscibles en agua.

Para observar la estructura de las células, primero se tiñeron los tejidos fijados con Hematoxilina de Harris: 0.5% Hematoxilina, 5% alcohol absoluto, 10% alúmina potásica, 0.25% óxido de mercurio. Antes de ser aplicada a la muestra, la solución se suplementa con 0.8% ácido acético y se filtra. Este colorante tiñe específicamente los núcleos celulares. Los cortes se lavan tres veces sucesivas con agua destilada durante 2 minutos. A continuación se tiñen durante 3 ó 4 minutos con una solución de 0.5% eosina, que marca el componente citoplásmico, y posteriormente las preparaciones se lavan tres veces sucesivas con agua destilada durante 2 minutos. En este punto y antes de proceder a su montaje y posterior observación, las muestras se someten a un proceso de deshidratación. Con este fin, los cortes se pasan por gradientes crecientes de etanol. El primer baño, de 2 minutos, se realiza con 70% etanol para posteriormente pasarlos a un recipiente que contiene 80% etanol, en donde permanecen 2 minutos más. En este momento las preparaciones se pasan a un baño de 95% etanol, donde se incuban 2 minutos antes de ser transferidas a un recipiente con xilol, en donde permanecen durante un período de 10 minutos. A continuación, se llevan a cabo varias inmersiones de un minuto de duración de las preparaciones en diferentes recipientes con xilol con el fin de lograr la perfecta deshidratación de los cortes. Por último, las preparaciones son recubiertas con un cubreobjetos impregnado en medio de montaje para histología (Entellan[®], Merck KG, Darmstadt, Alemania) para asegurar su conservación y se mira la muestra bajo el microscopio.

En nuestro caso se miraron bajo el microscopio de fluorescencia las distintas subunidades de NF- κ B. Para ello, se pusieron los cortes en PBS durante 5 minutos para eliminar posibles artefactos. Tras esto se post-fija el corte durante 2 minutos en paraformaldehído. Opcionalmente, se pueden bloquear las preparaciones incubando 10 minutos a temperatura ambiente con un 10% de suero de la especie de la que se ha obtenido el anticuerpo secundario y lavar con tampón durante 5 minutos. Una vez

realizado este proceso, se ponen las preparaciones en un tampón 0,5% de BSA y 2% de suero bovino fetal durante 5 minutos. Tras esto, se incuban las preparaciones en una cámara húmeda durante toda la noche con el anticuerpo primario para que así se una a su proteína diana. Al día siguiente se lavan las preparaciones con tampón durante 5 minutos para eliminar el anticuerpo no unido y se bloquea 5 minutos más para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo secundario. En este punto se añade el anticuerpo secundario y se deja en cámara húmeda entre 30 y 60 minutos. Tras esto, se lavan las preparaciones con tampón durante 5 minutos y se observan los resultados bajo el microscopio de fluorescencia. Las inmunohistoquímicas utilizadas en esta tesis se realizaron en el Servicio de patología del Hospital Clínico Universitario y fueron supervisadas por Jaime Ferrer y Octavio Burgués.

2.7. Método para determinar la concentración de proteínas: método Bradford.

2.7.1. Fundamento

El método Bradford (161) es un ensayo colorimétrico para medición de concentración proteica basado en la absorbancia. El componente más importante del reactivo de Bradford es el colorante de Coomassie. Este colorante es de color rojo, pero al unirse a las proteínas vira a color azul y de esta forma el máximo del espectro de absorción pasa de 465nm (forma no unida a la proteína) a 595nm (forma unida a la proteína) siendo proporcional el incremento de la absorbancia a 595nm a la cantidad o concentración de proteína presente en la muestra de interés.

2.7.2. Reactivos:

- Agua Bidestilada
- Bradford Reagent (Biorad®)
- Homogenado de tejido
- BSA para la realización de la recta patrón.

2.7.3. Protocolo

Se realiza una recta patrón de con diferentes concentraciones de BSA que típicamente van de 0,2ug/uL a 1,4ug/uL, para posteriormente interpolar nuestras muestras de concentración desconocida. Tras esto, se añaden 5uL de muestra y 245uL de reactivo de Bradford a cada pocillo de la placa de 96. Se deja sin que le de la luz directa hasta que se observa el viraje de color rojo a azul y se lee la absorbancia a 595 nm. Generalmente, se hacen las medidas por duplicado tanto para la curva patrón como para las muestras de interés.

2.7.4. Cálculos

Los cálculos consisten en la realización de una recta patrón de concentración de proteínas conocida (en nuestro caso utilizamos BSA) y la interpolación de la absorbancia de la muestra para conocer su concentración.

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}$$

2.8. Extracción de proteínas nucleares a partir de tejido congelado

2.8.1. Fundamento

Las distintas subunidades de NF- κ B solo están en forma activa cuando se traslocan al núcleo. Para posibles interferencias a la hora de valorar la activación de estas subunidades, separamos las proteínas citoplasmáticas de las nucleares, que más tarde usaremos con las técnicas de Western Blotting y ELISA.

2.8.2. Reactivos

- Tampón de lisis

- Tampón hipotónico
- DTT 1M y 10mM
- Inhibidor de proteasas
- Detergente

2.8.3. Protocolo

*Todo el proceso se lleva a cabo en frío.

El primer paso es la homogeneización del tejido de forma mecánica en un mortero con nitrógeno líquido. Este paso es importante para que los reactivos puedan estar en contacto con la mayor cantidad de tejido posible. Se pasa la muestra a un tubo de microcentrífuga y se resuspende en 500uL de tampón hipotónico al que se le ha añadido previamente DTT como agente reductor de proteínas, detergente para romper la membrana plasmática de la célula e inhibidor de proteasas. Para que la reacción se lleve a cabo, se incuba en hielo al menos durante 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifuga a 850g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante es la fracción citoplasmática, que podemos recoger en un tubo de microcentrífuga y guardar a -80°C. El sedimento que queda en el tubo son los núcleos, de los que romperemos su membrana añadiendo 50uL de tampón de lisis al que hemos añadido inhibidor de proteasas y DTT 10mM. Una vez hecho esto, se deja en incubación a 4°C durante 30 minutos en una plataforma oscilante a 150rpm. Cada 5-10 minutos se le da un pulso en el agitador de tubos. Tras este tiempo, se centrifuga la muestra durante 30 minutos a 14000g a 4°C. El sobrenadante que obtenemos tras la centrifugación es la fracción nuclear, que podemos conservar a -80°C hasta su utilización.

2.8.4. Cuantificación

Los valores de concentración de proteínas en los extractos se determinaron mediante el método de Bradford.

2.9. Extracción de proteínas nucleares a partir de células

2.9.1. Fundamento

Las cinco subunidades de NF- κ B solo están en forma activa cuando en forma de dímeros se traslocan al núcleo. Debido a que más tarde queremos determinar la cantidad de NF- κ B activado, eliminamos toda la parte de proteínas citoplasmáticas que podrían interferir en nuestros resultados.

2.9.2. Reactivos

- Tampón de lisis
- Tampón hipotónico
- PBS
- DTT 1M y 10mM
- Inhibidor de proteasas
- Detergente

2.9.3. Protocolo

*Todo el proceso se lleva a cabo en frío.

Primero se aspira el medio celular del frasco (generalmente del tipo T75) y se hacen 2 lavados con 2-3mL de PBS al que hemos añadido inhibidor de fosfatasas. Tras los lavados, se añade 1mL de PBS al que también se le ha añadido inhibidor de fosfatasas y se rasca la placa. La muestra se pasa a un tubo de microcentrífuga y se centrifuga durante 5 minutos a 500rpm a 4°C. Una vez centrifugada, se desecha el sobrenadante, ya que contiene la fracción no proteica. Se resuspende el sedimento en 150uL de tampón hipotónico y se incuba en hielo al menos durante 15 minutos para que la reacción de rotura de membrana citoplasmática se lleve a cabo. Una vez transcurrido este tiempo, se añaden 25uL de detergente y se le

da un pulso de al menos 10 segundos a velocidad máxima en un agitador de tubos para que se acaben de romper las membranas. Se centrifuga a 14000g durante 30 segundos a 4°C. El sobrenadante resultante es la fracción citoplasmática, que podemos recoger en un tubo de microcentrífuga y guardar a -80°C. El sedimento que queda en el tubo son los núcleos, de los que romperemos su membrana añadiendo 50uL de tampón de lisis al que hemos añadido inhibidor de proteasas y DTT 10mM. Una vez hecho esto, se deja en incubación a 4°C durante 30 minutos en una plataforma oscilante a 150rpm. Una vez transcurrido el tiempo correspondiente, se le da un pulso de al menos 30 segundos a velocidad máxima en el agitador de tubos y se centrifuga la muestra durante 10 minutos a 14000g a 4°C. El sobrenadante que obtenemos tras la centrifugación es la fracción nuclear, que podemos conservar a -80°C hasta su utilización.

2.9.4. Cuantificación.

Se obtuvieron los valores de concentración de proteínas por el método de Bradford.

2.10. ELISA.

2.10.1. Fundamento

La técnica de ELISA "*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*" (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto puede ser medido espectrofotométricamente.

En nuestro caso utilizamos el ELISA comercial transAm NF-kB de Active motif. En este método cada uno de los pocillos de la placa lleva inmovilizado un oligonucleótido que contiene la región consenso de NF-kB 5'-GGGATTTCC-3. Esta región actúa como sitio de unión específico

de la forma activa de NF- κ B. Además, los anticuerpos primarios utilizados reconocen un epítipo en p50, p52, p65, c-Rel y RelB que solamente es accesible cuando NF- κ B está activado y unido a su ADN diana. A esto se une un anticuerpo secundario HRP-conjugado que nos da una señal colorimétrica que es posible cuantificar con un espectrofotómetro.

2.10.2. Protocolo

*El ensayo se lleva a cabo en placas de 96 pocillos.

A cada uno de los pocillos de la placa se le añaden 30uL de tampón de unión. Una vez realizado este paso que permitirá la unión de la proteína al fondo de la placa, se añaden otros 20uL de muestra diluida en tampón de lisis completo para una concentración final entre 2 y 20ug de proteína. En nuestro caso utilizamos 10ug de proteína por muestra. Así mismo, se preparara de la misma manera un control positivo (extracto de células Raji) y otro negativo. Además, se deja un pocillo como blanco, al que solo le añadimos 20uL de tampón de lisis sin muestra. Una vez hecho esto, se cubre la placa con una pegatina adherente y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente en una plataforma oscilante a 100rpm. Durante este tiempo, los extractos proteicos de nuestras muestras se unirán al fondo de los pocillos, Una vez transcurrido este tiempo, se desecha el contenido de los pocillos y se lava 3 veces con 200uL de tampón de lavado para eliminar todo lo que no se haya unido. En este momento, añadimos 100uL del anticuerpo primario con una dilución 1:1000. En este caso utilizamos los anticuerpos que se unen específicamente a las distintas subunidades de NF- κ B. Se cubre la placa y se deja 1 hora a temperatura ambiente sin agitación. Transcurrido este tiempo, se desecha el anticuerpo y se lava 3 veces con 200uL de tampón de lavado: de esta forma, se elimina cualquier resto que puede quedar del anticuerpo. Una vez lavados los pocillos, se añaden 100ul del anticuerpo secundario HRP-conjugado con una dilución 1:1000 diluido en tampón de unión a anticuerpos. Se cubre la placa y se incuba 1 hora a temperatura ambiente sin agitación. Durante este tiempo, los anticuerpos secundarios se unirán al primario consiguiendo así una amplificación de señal. Una vez pasada

la hora, se desecha el sobrenadante y se vuelve a lavar 3 veces con 200uL de tampón de lavado para eliminar los restos de anticuerpo que pudieran quedar. Por último, se añaden 100uL de solución de revelado y se incuba la placa sin que le de la luz directa hasta que el color amarillo de la solución vira a azul. Una vez esto ocurre, se le añaden 100uL de solución de parada de la reacción se lee en 5 minutos a 450nm y a 655nm, que es la longitud de onda de referencia.

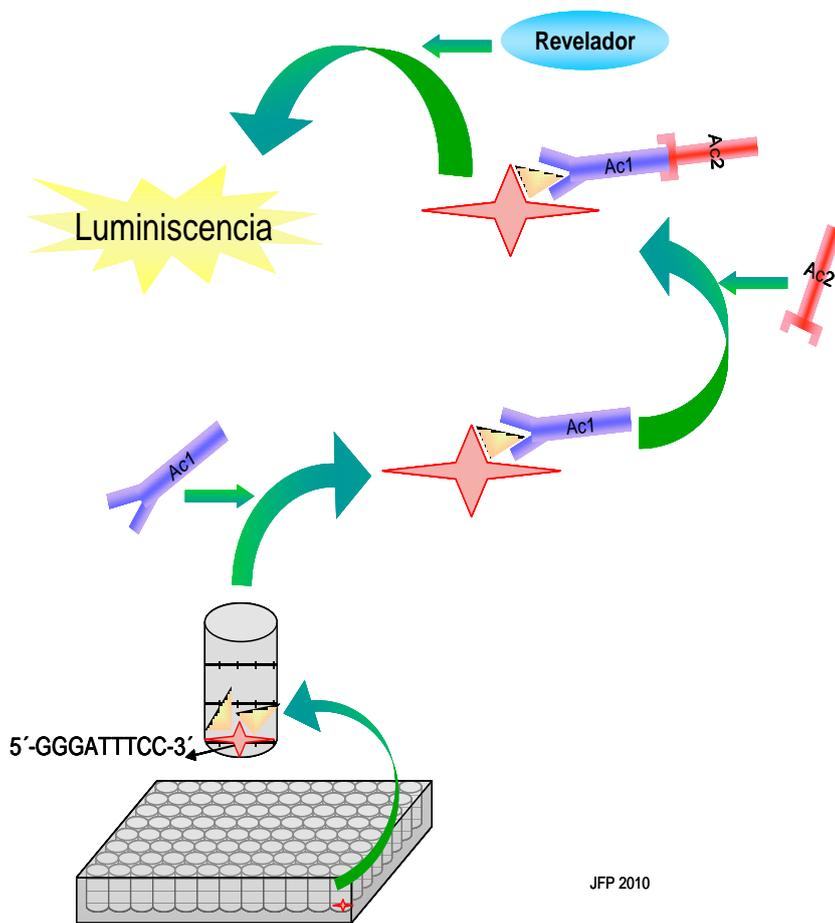


Figura III.1.
Esquema de la técnica de ELISA.

JFP 2010

2.11. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y Western Blotting.

2.11.1. Fundamento

La electroforesis es una técnica que se utiliza para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico. Para la separación de proteínas, generalmente se usa el SDS-PAGE "Sodium

Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis” (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). Este método se basa en la separación de proteínas desnaturalizadas según su peso molecular. Para ello se añade a las muestras el detergente SDS y el agente reductor β -mercaptoetanol. El SDS es un detergente aniónico capaz de eliminar las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas y que además confiere una carga negativa a cada proteína en proporción a su masa, mientras que el β -mercaptoetanol se utiliza para la desnaturalización de los enlaces disulfuro, ya que estos no se ven afectados por el SDS. Al añadir estos dos compuestos químicos asumimos que la distancia de migración de las proteínas en el gel está directamente vinculada sólo al tamaño de la proteína desplegada (longitud de su cadena, número de aminoácidos o masa molecular).

2.11.2. Protocolo

Para detectar la expresión tanto de p65 como de p50 se cargaron 20ug de proteína nuclear en geles discontinuos al 12% de Acrilamida (29:1Acrilamida:Bisacrilamida) con un 0,1% de SDS, sobre los que se aplicó un campo eléctrico de voltaje constante de 100 Voltios durante el tiempo necesario para la correcta separación de las proteínas en tampón

Anticuerpo	Casa Comercial	Nº catálogo	Pm (KDa)	Dilución
NF-KB p65	Cell Signaling	3034	65	1:1000
NF-KB p105/p50	Cell Signaling	3035	50	1:1000
Anti-rabbit IgG HRP linked	Cell Signaling	7074	NV	1:1000

Tris-Glicina (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0,1%, SDS, pH 8,3). Una vez finalizado el

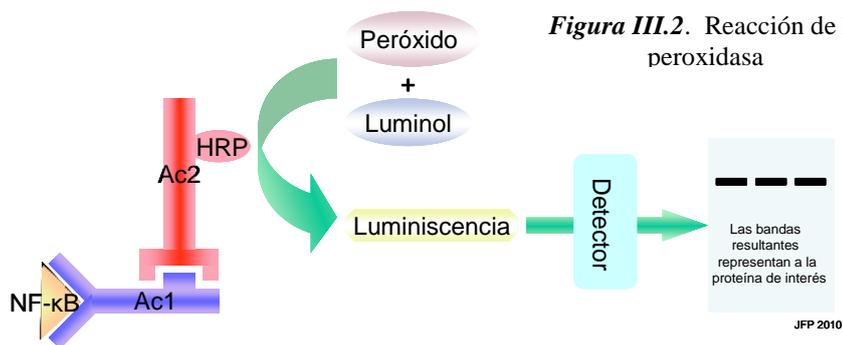
desplazamiento electroforético el gel se tranfiera a una a una membrana de Nitrocelulosa (Schelider & Schuel, USA), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas por medio del sistema Miniprotean II (Bio-Rad, USA). A este proceso se le denomina Western Blotting. El proceso se desarrolla durante 60 minutos, a una temperatura de 4°C para evitar sobrecalentamiento y una intensidad constante de 240 mA en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8,3).

Tras las tranferencia se incuban las membranas durante 10 minutos a temperatura ambiente en tampón de bloqueo, que contiene 5% de BSA p/v y 0,1% de Tween-20 en 1XTBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6).

Este paso permite evitar uniones inespecíficas del anticuerpo. A continuación se realizan 3 lavados de 5 minutos en una plataforma oscilante con 10-15mL de TBS-T. Una vez se tienen las membranas sin restos de tampón de bloqueo, se incuban con el anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C con agitación.

Al día siguiente, se realizan otros 3 lavados de 5 minutos con 15mL de TBS-T con agitación y tras esto las membranas se incuban durante 60 minutos

con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidada de rábano



y anti-IgG de conejo en el tampón de bloqueo. Generalmente la dilución que se utiliza es 1:1000. Una vez transcurrido el tiempo se vuelve a lavar la membrana 3 veces con lavados de 5 minutos en 15mL de TBS-T. Una vez quitados los posibles restos de anticuerpo y de solución de bloqueo, se incuban la membrana durante un minuto con la solución reveladora *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* de la marca Pierce capaz de detectar la peroxidasa de rábano (*figura III.2*) e inmediatamente después se expone en un digitalizador de imagen de la marca Fujifilm que lleva integrado el programa *Image Gauge 4.0* con el que se puede digitalizar la imagen que se obtiene de la membrana y hacer una densitometría de bandas que permite hacer una valoración semicuantitativa de la cantidad de proteína presente en la muestra.

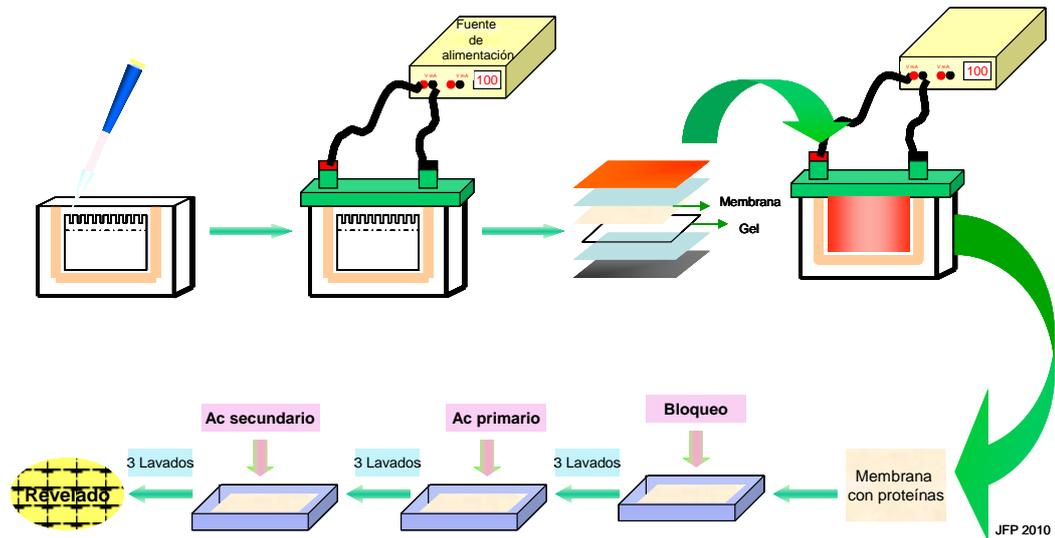


Figura III.3. Esquema de las técnicas combinadas SDS-Page/Western Blotting

2.12. Extracción de ARN total de parafinas.

2.12.1. Fundamento.

El análisis de ácidos nucleicos se ha convertido en una herramienta muy importante en el diagnóstico e investigación en biología molecular. Actualmente, sobretodo para estudios retrospectivos, el material más comúnmente analizado son los tejidos embebidos en parafina. El material biológico conservado de esta forma constituye una fuente incalculable de información, sin embargo, la obtención de ARN a partir de este tejido es bastante complicada debido a que ha estado expuesto a degradación. Es por esto que existen en el mercado diversos kits de extracción exclusivos para este tipo de muestras. Tras varias pruebas con distintos kits comerciales, optamos por el “RecoverAll Total Acid Nucleic Isokation Kit” de Ambion ya que fue el que nos proporcionó mejores resultados.

2.12.2. Protocolo

La extracción se hizo a partir de cortes entre 5 y 10 μM de bloques de parafina y a partir de cortes longitudinales de tejido que se habían seleccionado previamente por ser tener una buena representatividad del tumor o por tratarse de tejido adyacente. En todo caso, los tejidos se desparafinan con 2 baños de xileno 100% para la eliminación de los

reactivos de fijación. Una vez tenemos el tejido desparafinado, se lava con etanol 100% para eliminar los restos de xileno que podríamos encontrar. A cada muestra se le añade proteasa y un tampón de digestión que en nuestro caso dejamos durante 1 hora a 50°C seguido de 15 min a 80°C. A este homogenado se le añade un tampón de aislamiento que se filtra a través de una membrana donde que debido a las condiciones del tampón se unen específicamente todos los ácidos nucleicos de la muestra mientras que otros componentes como sales y proteínas no. Tras esto se lava la membrana con tampón de lavado 1 y tampón de lavado 2/3. En este punto se procede a eliminar el ADN unido al filtro mediante una digestión de 30 minutos con DNase. Tras esta digestión, se procede a la eliminación de los fragmentos de ADN mediante pasos secuenciales de lavado con tampón de lavado 1 y tampón de lavado 2/3. Finalmente, el ARN purificado se separa de la columna mediante agua libre de nucleasas y la muestra se guarda a -80°C. La concentración y pureza del ARN se midió mediante NanoDrop 2000.

2.13. Extracción de ARN total de células.

2.13.2. Fundamento

Uno de los aspectos más importante en al aislamientos de ácidos nucleicos y proteínas es prevenir su degradación durante el procedimiento. Para evitar esto, utilizamos el kit de extracción “Total DNA, RNA and protein isolation” comercializado por Macherey-Nagel. En este kit, las células son lisadas por incubación en una solución que contiene gran cantidad de sales caotrópicas que inactivan virtualmente cualquier enzima. Además, permite la separación de los ácidos nucleicos de las proteínas en un simple paso de centrifugado a través de una membrana donde se unen específicamente los ácidos nucleicos dejando pasar a las proteínas. De esta forma se pueden conseguir de una misma muestra tanto ácidos nucleicos como proteínas totales purificadas.

2.13.3. Protocolo

Una vez las células se tripsinizan, éstas se incuban en una solución

que contiene iones caotrópicos y β -mercaptoetanol para proceder a su disgregado. Se vortea y una vez tenemos obtenemos el extracto celular, se añade a una columna y se centrifuga a 11000g, 1min. De esta forma se separan los ácidos nucleicos y las proteínas de todo el material sobrante tales como ácidos grasos, que se quedan en la membrana. A este lisado se le añaden 350 μ L de etanol absoluto para ajustar las condiciones de unión de ARN y se filtra mediante otra membrana diferente que une ácidos nucleicos dejando pasar a las proteínas. En este punto, podemos guardar el filtrado para obtener proteínas y extraer ARN de la columna. En el caso del ARN, se hace un paso de lavado y se añade rDNase que degrada el ADN. A partir de aquí, se hacen tres lavados para eliminar los posibles restos de ADN y finalmente se añaden 60 μ L de agua a la columna para solubilizar el ARN, se centrifuga a 11000g, 1 min. y se guarda a -80°C hasta su posterior uso. La concentración y la calidad de las muestras se midieron mediante la tecnología Agilent y se llevó a cabo en la Unidad de Análisis Multigénico, UCIM/INCLIVA/Hospital Clínico de Valencia bajo la supervisión de la Dra. Eva Serna.

2.14. Retrotranscripción.

2.14.1. Fundamento

Antes de analizar la expresión de genes es necesaria la retranscripción de ARN a cDNA, ya que esta última molécula es mucho más estable y nos permite evitar en gran medida la degradación debida a la conservación y la manipulación. En nuestro caso, utilizamos el RT² “First Strand Kit” (Qiagen) en el caso de muestras que se iban a utilizar con SABiosciences' RT² Profiler™ PCR Arrays ya que ha sido específicamente diseñado y optimizado para el análisis de la expresión de genes con este kit y con “*cDNA Archive Kit*” de Applied Biosystems para las muestras analizadas mediante “Taqman”. En ambos casos la reacción se llevó a cabo en un termociclador “GeneAmp PCR System 9700” de Applied Biosystems.

2.14.2. First stand kit. Protocolo.

Brevemente, se prepara el “DNA elimination mixture”: 1µg de ARN total de la muestra más 2µL de 5x gDNA elimination buffer hasta un volumen de 10µL y se incuba a 42°C durante 5 minutos. Durante este tiempo se prepara el “RT cocktail”. Por muestra sería: 4µL BC3 (5x RT buffer 3), 1µL P2 (Primer and external control mix), 2µL RE3 (RT Enzyme mix) y 3µL de H₂O. Esta mezcla se añade al “Genomic DNA Elimination Buffer” y se incuba a 42°C exactamente 15 minutos e inmediatamente se para la reacción calentando a 95°C durante 5 minutos. A esta reacción se le añade 91µL de H₂O y se congela a -20°C.

2.14.3. cDNA Archive Kit. Protocolo.

En nuestro caso se añadió a cada 200ng de muestra 10X Reverse Transcription Buffer, 25x dNTPs, 10X Random primers y MultiScribe Reverse Transcriptase 50U/µL y agua libre de nucleasas hasta un volumen de 50 µL y se incubaron 10 min a 25°C y 120 min a 37°C.

2.15. Control de calidad del ARN: RT² RNA QC PCR Array.

2.15.1. Fundamento

Este paso permite saber la calidad del ARN antes de la caracterización mediante el RT² Profiler™ PCR Array. Este array contiene distintos controles de la PCR que son:

Pocillo	Control para
Dos genes "housekeeping" (HK1, HK2)	Integridad del ARN
Control de ADN genómico (GDC)	Contaminación de ADN genómico
Control de la transcripción no inversa (NRT)	Contaminación de ADN genómico
Control sin plantilla (NTC)	Contaminación de ADN no específica.
Control de la transcripción inversa (RTC)	Inhibición de la transcripción inversa
Control positivo de la PCR (PPC)	Inhibición de la amplificación de la PCR

El fallo de cualquiera de estos controles podría resultar en falsos negativos o positivos en la PCR posterior.

2.15.2. Protocolo

Se prepara en un tubo de 1,5mL las siguientes mezclas y añadir a los pocillos de una placa de 96:

Mezcla experimental 1	Volumen	Pocillos
2x SABioscience PCR Master Mix	75 μ L	
cDNA	6 μ L	
ddH ₂ O	69 μ L	
Volumen total	150 μ L	25 μ L L/pocillo. Filas de A a E
Mezcla experimental 2		
2x SABioscience PCR Master Mix	45 μ L	
ddH ₂ O	45 μ L	
Volumen total	90 μ L	25 μ L/pocillo. Filas G y H
Mezcla experimental 3		
Dilución 1:100 ARN total	1 μ L	
Mezcla experimental 2	24 μ L	
Volumen total	25 μ L	25 μ L /pocillo. Fila F

Una vez añadidas las mezclas, se pone la placa de 96 pocillos en el termociclador (ABI 7900HT, *Applied Biosystems*) y se usa el siguiente programa en 2 pasos:

1 ciclo 10 minutos, 95°C,

40 ciclos 15 segundos 95°C y 1 minuto a 60°C.

Una vez tenemos realizada la reacción, se comprueba que las muestras están en buenas condiciones y si se pueden utilizar para el siguiente paso, que sería el *RT² Profiler PCR Array*.

2.16. RT² Profiler PCR Array Human NF-kB Signaling Targets

2.16.1. Fundamento

El “Human NF-kB signaling Targets RT² Profiler PCR Array” (SABiosciences) perfila la expresión de 84 genes que responden a las señales de transducción de NF-kB. Este *array* incluye los factores de transcripción de NF-kB y genes diana identificados en diversos estudios. En nuestro caso se analizaron mediante esta técnica la expresión de los genes de la *tabla III.2*.

ADM	AGT	AKT1	ALDH3A2	BCL2A1	BCL2L1	BIRC2	BIRC3	C3	C4A	CCL2	CCL22
CCL5	CCND1	CCR5	CD40	CD80	CD83	CDKN1A	CFB	CSF1	CSF2	CSF2RB	CSF3
CXCL1	CXCL10	CXCL2	CXCL9	EGFR	EGF2	F3	F8	FAS	FASLG	GADD45B	ICAM1
IFNB1	IFNG	IL12B	IL15	IL1A	IL1B	IL1R2	IL1RN	IL2	IL2RA	IL4	IL6
IL8	INS	IRF1	LTA	LTB	MAP2K6	MITF	MMP9	MYC	MYD88	NCOA3	NFKB1
NFKB2	NFKBIA	NQO1	NR4A2	PDGFB	PLAU	PTGS2	REL	RELA	RELB	SELE	SELP
SNAP25	SOD2	STAT1	STAT3	STAT5B	TNF	TNFRSF1B	TNFSF10	TP53	TRAF2	VCAM1	XIAP
B2M	HPRT1	RPL13A	GADPH	ACTB	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Tabla III. 2. Genes incluidos en el “Human NF-kB signaling Targets RT² Profiler PCR Array”

2.16.2. Protocolo

Primero se prepara la mezcla de los reactivos, que incluye 2x SABioscience RT² qPCR Master Mix y el cDNA en agua. A cada pocillo se le añaden 25µL de este tampón de reacción y se pone la placa en un termociclador con *real-time* (en nuestro caso ABI 7900HT, *Applied Biosystems*.) El programa utilizado es:

1 ciclo 10 minutos, 95°C,

40 ciclos 15 segundos 95°C y 1 minuto a 60°C.

Paso de disociación.

El programa te da los Ct que más tarde se analizarán para saber la expresión.

Cada control y cada muestra fueron medidos por duplicado y más tarde se validaron los genes de interés por Taq-man Real-time. La cantidad estimada de transcrito fue normalizada con los ARNm de NADPH, B2M, HPRT1, RPL13A y ACTB y los resultados se expresan en porcentaje gen de interés/ARNm de los genes control. Para el análisis de los resultados se utilizó el programa “RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5” de SABIOSCIENCE.

2.17. Pre-amplificación de cDNA

2.17.2. Fundamento

En el caso de muestras de ARN/cDNA que provenían de parafinas, realizamos un paso de pre-amplificación anterior a la amplificación propiamente dicha para enriquecer la muestra de cDNA. Debido a la degradación de ARN su cantidad en muestras embebidas en parafina es pequeña por lo que para poder detectarla más tarde mediante RT PCR, se realiza este paso.

2.17.2. Protocolo

En nuestro caso, utilizamos 2X de TaqMan PreAmp Master Mix de Applied biosystems, 20X de las diferentes sondas de interés y 250ng de cDNA y agua hasta un volumen total de 25uL. Cada mix con la muestra se puso en un pocillo de una placa de 96 y se llevó a cabo la reacción de amplificación mediante el siguiente programa: 95°C, 10min; 14 ciclos de (95°C, 15seg. Y 60°C a 4min). Una vez amplificadas las muestras se congelaron a -20°C para su mantenimiento y posterior utilización.

2.18. Amplificación cuantitativa del ARN (PCR en tiempo real)

2.18.1. Fundamento

La PCR cuantitativa o PCR en tiempo real es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y

simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN). En nuestro caso partimos de cDNA, es decir de ADN complementario obtenido a partir de ARN mediante retrotranscripción.

2.18.2. Protocolo

Primero se añadió a la master mix 2X (Applied biosystems) la sonda de interés, agua y el cDNA hasta un volumen final de 10 o 20 μ L dependiendo del ensayo. Tras esto se llevó a cabo la reacción de amplificación mediante el programa estándar de la Real-Time PCR cuyas condiciones son: 1 ciclo de (2min a 50°C, 10min a 95°C); 40 ciclos de (15seg. 95°C, 1min a 60°C). La fluorescencia se midió al final de cada ciclo. Cada muestra se analizó por triplicado y se calculó la expresión génica normalizada con un control endógeno (GADPH).

2.19. Análisis estadístico de los resultados

En todos los casos la significancia estadística se evaluó con los programas SPSS y STATgraphics si no se establece lo contrario.

Para el análisis estadístico de los resultados en experimentos con células, se realizó en un primer lugar el análisis de la varianza. La hipótesis nula fue aceptada para todos los valores de aquellos grupos en los cuales F no fue significativa para un p-valor $\leq 0,05$. En los grupos en los que F fue significativa se analizó la significancia estadística mediante el test de la t de student. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. En líneas celulares se realizaron al menos 3 experimentos independientes. El un p valor de menos de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Para determinar el punto de corte óptimo para las muestras de NF-kB se utilizó el análisis por regresión.

Debido a la variabilidad existente entre muestras de origen humano nuestros datos no se ajustaban a la normal por lo que el tratamiento estadístico se realizó en los casos de muestras parafinadas y congeladas mediante pruebas no paramétricas para muestras independientes. Para ello se utilizaron los tests Krustal-Wallis y U de Mann-Whitney. La supervivencia acumulativa fue analizada mediante el método Kaplan-Meier y las diferencias en las curvas de supervivencia se compararon por el test log-rank.

En todos los casos se consideraron dos niveles de significación: uno cuando $p < 0,05$ y otro cuando $p < 0,01$

En el caso del análisis de ARN cada muestra tanto celular como parafinada fue medida por triplicado mediante PCR en tiempo real (RT-PCR). Para el análisis cuantitativo de los resultados de la PCR se determinó el número de copias relativas calculadas como: número de copias = 2^X [donde $X = \Delta C_t$ (para grupo control) - ΔC_t (para grupo experimental)] y se compararon tratamiento versus no tratamiento en caso de células y tumor versus no tumor en caso de muestras parafinadas. La cantidad estimada de transcrito se normalizó utilizando los datos de expresión del ARNm de GADPH, HPRT1, B2M, RPL13A en el caso del array de expresión y GADPH y HPRT1 en el caso de la RT-PCR realizada mediante la técnica taqman. De esta forma se compensaron las variaciones debidas a a la calidad o la cantidad del ARNm del que partíamos y las diferencias en la eficiencia de la transcriptasa inversa. Los datos de las figuras indican la media \pm desviación estándar y fueron analizados por el test de la t-student. Un valor-p $< 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. En el caso de los arrays se utilizó el programa "RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5" de SABIOSCIENCE para su análisis. Las agrupaciones de muestras y la visualización de figuras se realizaron mediante el programa J-Express 2.0 (162, 163).

Para la interpretación funcional de los genes utilizamos la herramienta Profiling of complex functionality (ProfCom) (164) que está disponible en la página <http://webclu.bio.wzw.tum.de/profcom/start.php>

IV. RESULTADOS

1. Caracterización de NF- κ B en líneas celulares de mama tratadas con doxorubicina.

1.1. Sensibilidad de las líneas celulares SKBR3, MDAMB468, MDAMB231 y BT474 al tratamiento con doxorubicina a diferentes concentraciones.

El efecto citotóxico del fármaco antitumoral doxorubicina se examinó en cuatro líneas celulares derivadas de cáncer de mama: SKBR3, MDAMB468, MDAMB231 y BT474 mediante el ensayo de viabilidad MTT. Los resultados (*figura IV.1*) muestran que la doxorubicina ejerce un efecto citotóxico en las cuatro líneas celulares que es dependiente de la concentración. No obstante se observan diferencias entre las distintas líneas siendo el efecto a bajas concentraciones más acusado en MDAMB231 y SKBR3. Más específicamente, la línea SKBR3 parece muy sensible al tratamiento ya que a una concentración de 1 μ M durante 24h la viabilidad baja aproximadamente un 70%, mientras en el caso de MDAMB231, MDAMB468 y BT474 tan solo lo hace entre un 20-30%. Con la línea MCF7 también se realizó una curva de viabilidad a concentraciones de 0-0,25-1-2,5-5-10-25 y 50 μ M. Los resultados fueron similares (dato no mostrado). A partir de estos resultados, se optó por utilizar la concentración 5 μ M para los experimentos siguientes.

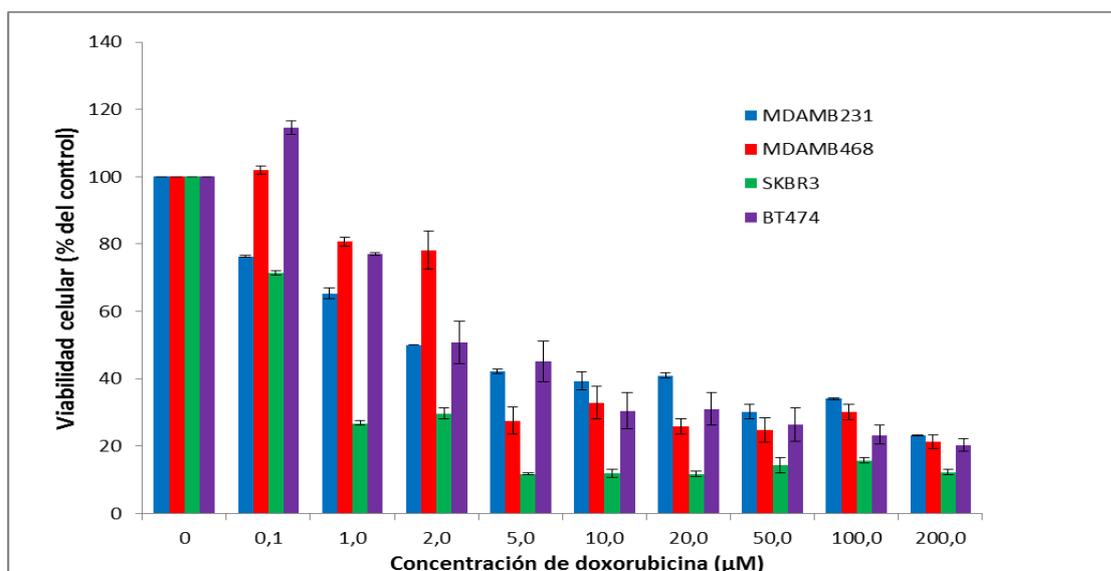


Figura IV.1. Efecto citotóxico a las 24h del fármaco doxorubicina a distintas concentraciones calculado mediante MTT. La media y la desviación estándar son de 3 experimentos independientes.

1.2. Determinación de la unión NF-KB-ADN tras el tratamiento con doxorubicina 5 μ M a distintos tiempos.

Se determinó en las líneas SKBR3, MCF7 y MDAMB231 mediante ELISA la unión de las subunidades p65, p50, p52, c-rel y relB al ADN tras el tratamiento con doxorubicina con una concentración de 5 μ M a 2, 6 y 22 horas. Observamos que los niveles de NF-kB a las 2h de tratamiento con doxorubicina eran prácticamente idénticos al caso control cuyos valores utilizamos para homogeneizar los datos. A las 6 horas de tratamiento con doxorubicina los niveles de la subunidad p65 aumentaba en las 3 líneas y relB en MCF7 y MDAMB231 en comparación con 2 horas mientras que a las 22 horas, si bien su nivel continuaba siendo mayor que a las 2 horas, disminuía en comparación con 6 horas, lo que debería corresponderse con su salida del núcleo. En el caso de SKBR3 la cantidad de p52 fue indetectable en todos los casos y debido a la alta mortalidad detectada a las 22 horas, no tenemos datos para este punto (*figura IV.2*).

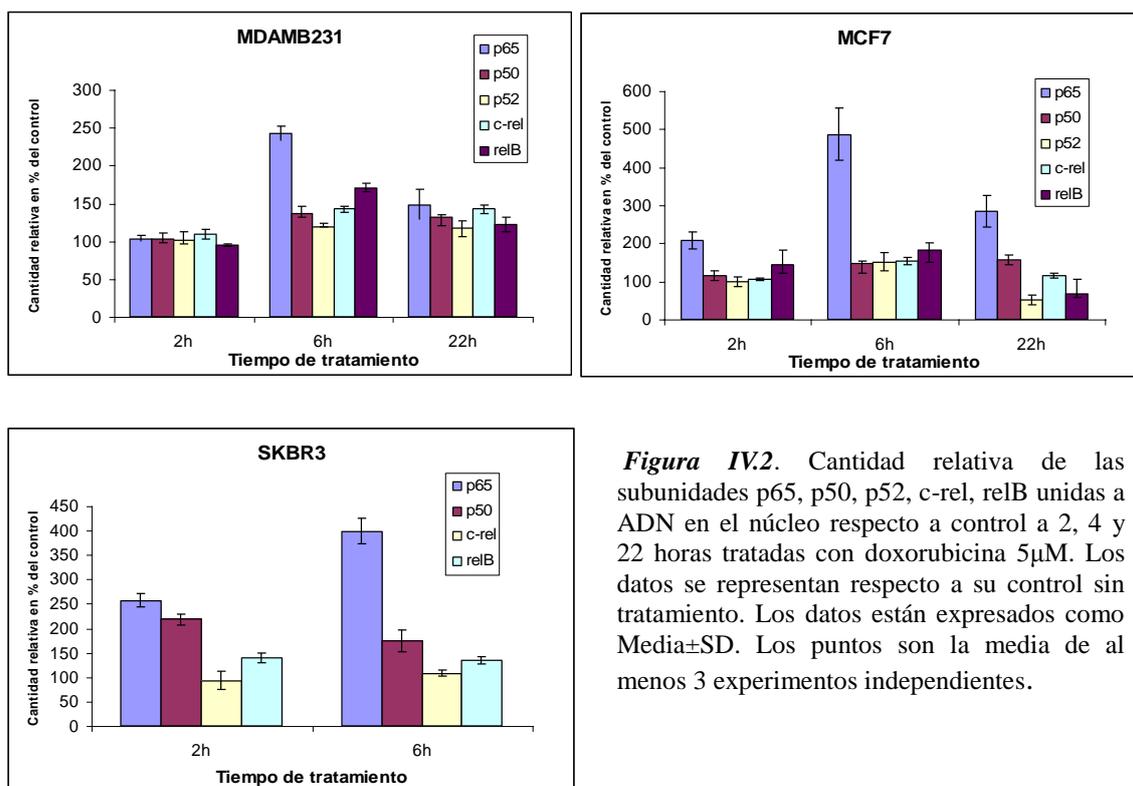


Figura IV.2. Cantidad relativa de las subunidades p65, p50, p52, c-rel, relB unidas a ADN en el núcleo respecto a control a 2, 4 y 22 horas tratadas con doxorubicina 5 μ M. Los datos se representan respecto a su control sin tratamiento. Los datos están expresados como Media \pm SD. Los puntos son la media de al menos 3 experimentos independientes.

1.3. Determinación de la unión NF-KB/ADN tras los tratamientos con doxorubicina 5 μ M y el inhibidor MLN20.

Se trató a la línea celular MDAMB231 con doxorubicina 5 μ M, el inhibidor de NF-kB MLN20 100nM y doxorubicina 5 μ M más MLN20 100nM durante 24 horas y se procedió a la extracción de proteínas nucleares y medición de la unión de las subunidades p65, p50, p52, c-rel y relB al ADN mediante ELISA (figura IV.3). Primero se comprobó que el tratamiento con MLN20 no modificaba ninguna de las subunidades por si mismo. Se observó asimismo que el tratamiento con doxorubicina aumentaba p65, p50 y en menor medida relB respecto a control mientras no modificaba la unión de c-rel y relB. El tratamiento conjunto doxorubicina más MLN20 disminuía al menos en parte el efecto de la doxorubicina aunque los niveles continuaron siendo significativamente más altos en p50 y p65 respecto a tratamiento solo con doxorubicina. Respecto a las subunidades p52 y c-rel no se observaron diferencias significativas con ninguno de los 3 tratamientos respecto a control.

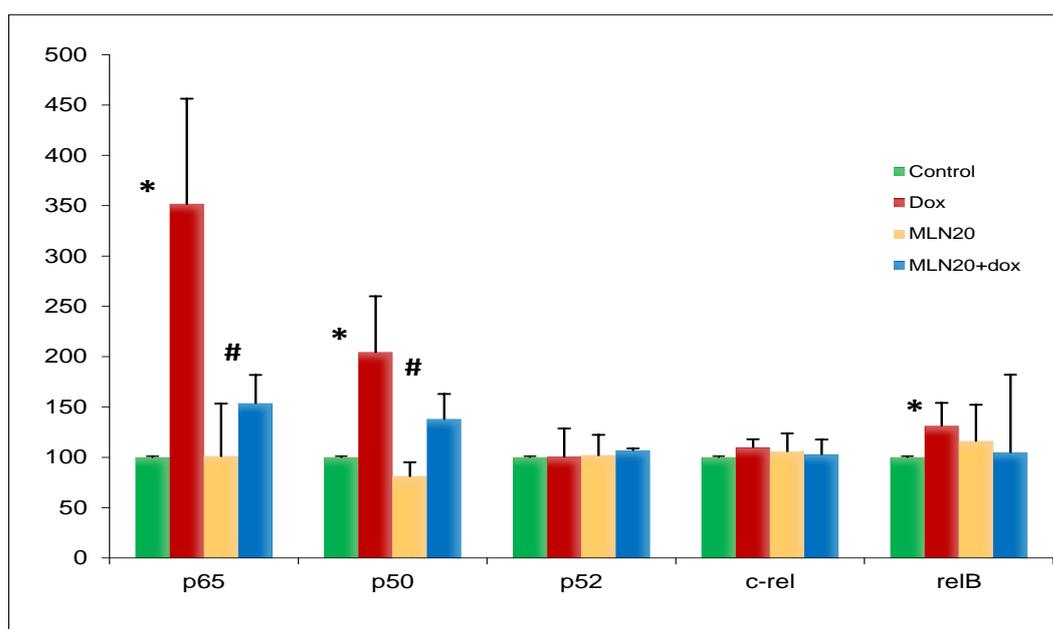


Figura IV.3. Cantidad relativa en el núcleo de las subunidades p65, p50, p52, c-rel y relB tras tratamiento con doxorubicina 5 μ M y del inhibidor de NF-kB MLN20 en MDAMB231. p50 y p65 aumentan con el tratamiento, mientras que MLN20 no tiene efecto sobre ellas. Con el tratamiento doxorubicina+MLN20 se inhibe la unión de las subunidades pero no llegan a bajar al nivel basal. *Control vs doxorubicina $p < 0,05$; #Doxorubicina vs Doxorubicina+MLN20 $p < 0,05$. Los datos están expresados como media \pm SD (n=3)

2. Determinación de la activación de NF-kB en muestras de tejido.

2.1. Determinación de la calidad y la fracción tumoral de las muestras congeladas.

Debido a que las muestras congeladas fueron recogidas durante varios años en distintas condiciones de extracción y conservación procedimos a determinar su fracción tumoral y su calidad antes de su utilización. Para ello optamos por realizar preparaciones de OCT de las muestras congeladas disponibles que más tarde se cortaron, tiñeron con la tinción hematoxilina-eosina y se observaron al microscopio. De esta forma pudimos establecer tanto la fracción tumoral como su estado de conservación, para lo que tuvimos en cuenta estado de degradación, presencia de necrosis y estado de compactación de las células. De los aproximadamente 450 tumores analizados, tan sólo se consideraron óptimos 164, que fueron los que se procedieron a analizar mediante las diferentes técnicas posteriores.

2.2. Medida semicuantitativa de las subunidades p65 y p50 en el núcleo mediante western blot. Validación del ELISA.

Para comprobar la cantidad relativa de p50 y p65 en el núcleo de células tumorales de pacientes de cáncer de mama, seleccionamos 20 muestras de las que en 11 se midió la subunidad p65 y en 9 la subunidad p50 mediante la técnica de "western blot". Los niveles de p65 y p50 de estas muestras se compararon con los valores obtenidos por ELISA obteniendo resultados similares (*tabla IV.1*). Los extractos nucleares utilizados provenían de las mismas muestras pero de diferentes extracciones. Respecto a las divergencias, en el caso de la subunidad p50 para la muestra 1394 los valores diferentes se pueden deber a que la fracción tumoral del tejido usado para Western Blot fue 70%, mientras que la fracción tumoral de la muestra utilizada para ELISA fue 0% ya que procedían de 2 fracciones diferentes del mismo tumor. En el caso de los valores de p65 para muestra 5877 la diferencia podría deberse también a que al tratarse de distintas extracciones se hubiera extraído de diferente

tejido tumoral o que debido a que el western blot es una técnica menos sensible no se haya podido detectar, si bien en este caso concreto no tenemos datos. En caso del ELISA se tomó como positivo el percentil mayor de 75% y negativo el menor de 25% para los valores del ELISA. En el caso de Western blot se consideró positivo si se observaba proteína en la membrana y negativo cuando se observaba muy poca o nada. En todo caso la convergencia entre datos entre western blot y ELISA fue del 90%.

Muestra	WB p65	ELISA p65	Muestra	WB p50	ELISA p50
4468	+	+	969	+	+
4670	+	+	1010	-	-
4677	+	+	1144	+	+
5159	-	-	1394*	+	-
5410	-	-	2639	-	-
5740	+	+	3116	-	-
5877**	-	+	3181	-	-
6252	+	+	3773	+	+
5270	+	+	4227	+	+
7481	-	-			
7677	-	-			

Tabla IV.1. Comparación de los resultados para las subunidades p65 y p50 mediante las técnicas de ELISA y western blot.

Una vez validada mediante Western-blot la técnica de ELISA para la determinación de la activación de las diferentes subunidades de NF-kB se procedió al análisis de los datos en función de las diferentes características de las muestras estudiadas.

2.3. Determinación de la unión NF-kB/ADN en tejido tumoral respecto a no tumoral.

Se compararon los valores de las distintas subunidades de NF-kB mediante ELISA en muestras de tejido mamario no tumoral y muestras de tejido mamario tumoral (fracción tumoral mayor del 50%) en ambos casos provenientes de pacientes de cáncer de mama. Se observó que en cuatro de las cinco

subunidades (p65, p50, p52 y relB) se encontraban diferencias significativas que en todos los casos estaban relacionadas con un aumento de la unión al ADN de la subunidad en tejido tumoral (*figura IV.4*), siendo el rango de las medias para p65, p50, p52, c-rel y relB en tejido no tumoral 34,38, 30,63, 28,06, 44,13 y 71,84 y para tejido tumoral 79,89, 80,34, 79.61 77,39 y 68,62 respectivamente.

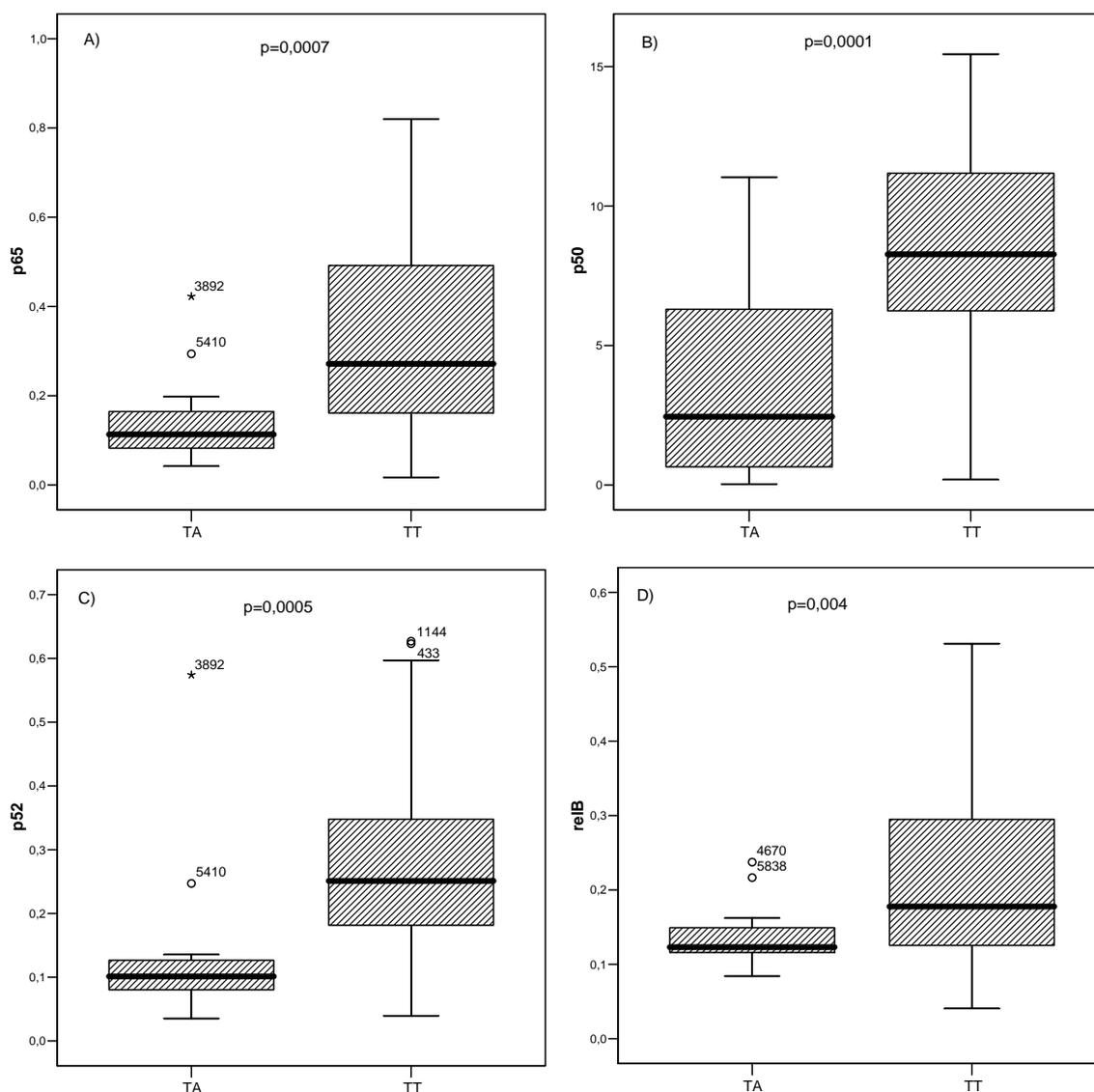


Figura IV.4. Box-plot de A) p65, B) p50, C) p52 y D) relB para muestras de tejido no tumoral vs. fracción tumoral $\geq 50\%$. El análisis se realizó por Kruskal-Wallis. TA: tejido adyacente no tumoral n=16; TT: tejido con $\geq 50\%$ de fracción tumoral n=127.

2.4. Diferencias en la unión NF-kB/ADN entre carcinomas ductales infiltrante e *in situ*.

Se realizó el análisis de la activación de las subunidades de NF-kB dependiendo de la habilidad de los carcinomas ductales de infiltrar tejido adyacente. Los resultados mostraron que las subunidades p52, c-rel y relB se encontraban en mayor medida unidas a ADN cuando el carcinoma era infiltrante en comparación con carcinomas *in situ* (figura IV.5), mientras que no se encontraron diferencias significativas en p65 y p50. Los p-valores fueron 0,008 para p52 con una activación 50,75% mayor en CDI que en CDIS, 0,019 para c-rel con valores de activación 47,78% mayores para CDI que para CDIS y 0,01 para relB con valores de activación para CDI 48,78% mayores que para CDIS. Estos datos sugieren que p52, c-rel y relB están asociados a la capacidad del tumor de invadir tejidos adyacentes.

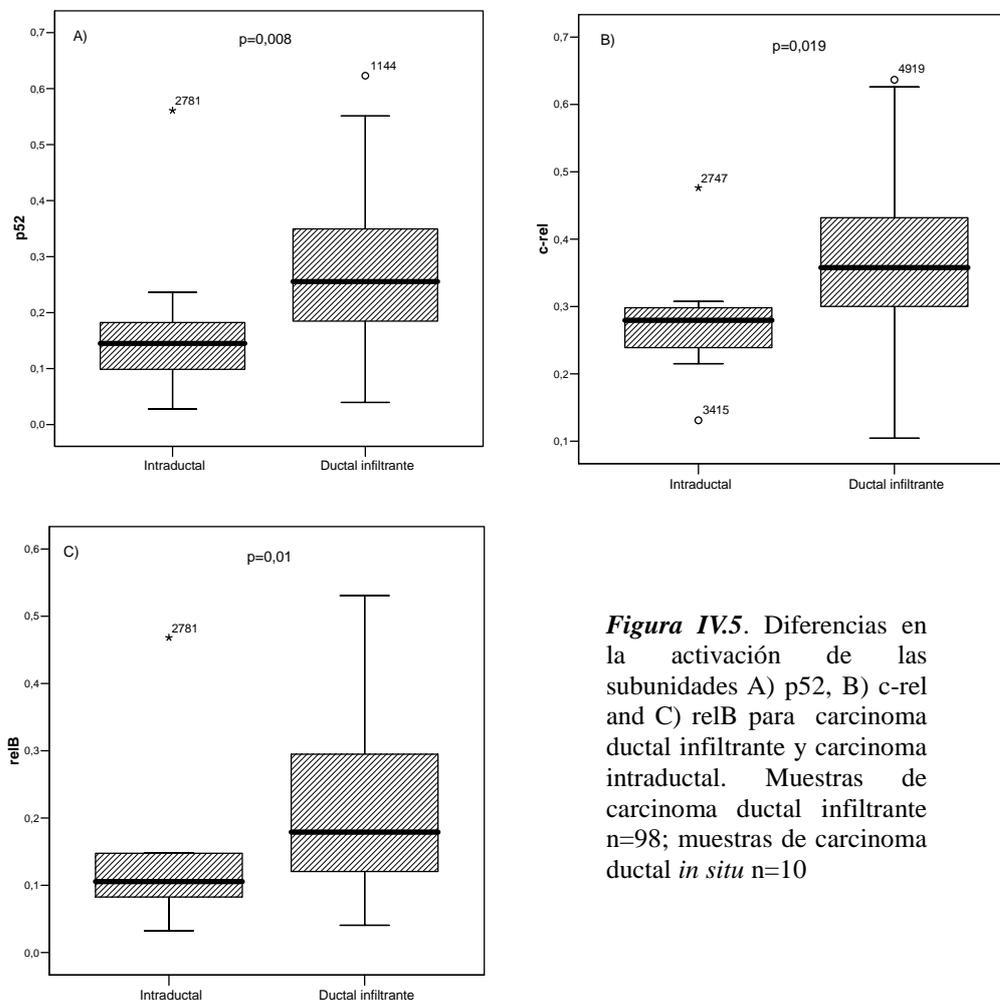


Figura IV.5. Diferencias en la activación de las subunidades A) p52, B) c-rel and C) relB para carcinoma ductal infiltrante y carcinoma intraductal. Muestras de carcinoma ductal infiltrante n=98; muestras de carcinoma ductal *in situ* n=10

2.5. Determinación de la unión NF-kB/ADN en tejido tumoral respecto a la afectación de los nódulos ganglionares.

Se examinó la relación entre la afectación de los nódulos ganglionares en el diagnóstico y la activación de NF-kB en carcinomas infiltrantes. Los resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa en la activación de la subunidad relB cuyos niveles se incrementaban un 25,37% ($p=0,016$) cuando los nódulos linfáticos estaban afectados (*figura IV.6*). Debido a que la mayoría de las muestras tumorales utilizadas son histológicamente CDI, se llevó a cabo el análisis de este subgrupo separadamente. Los resultados para CDI mostraron una diferencia significativa en la activación de las subunidades relB y p65 cuyos niveles se incrementaban un 36,47% ($p=0,003$) y 26,74% ($p=0,033$) respectivamente cuando los nódulos linfáticos estaban afectados (*figura IV.7*). No se encontraron diferencias significativas para las subunidades p50, p52 y c-rel en relación con invasión ganglionar, si bien observamos una tendencia para p50 en carcinoma ductal infiltrante en el cual valores mayores de p50 correlacionaban con ganglios afectados ($p=0,086$).

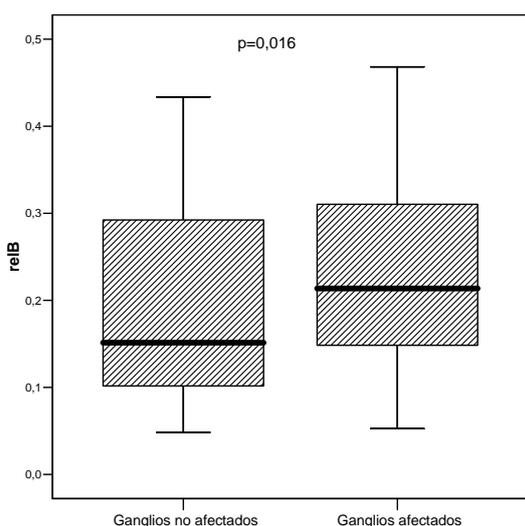


Figura IV.6. Activación de relB en función de la afectación ganglionar en el diagnóstico en el grupo de carcinomas infiltrantes. n=34 en grupo de ganglios no afectados y n=86 en grupo de ganglios afectados.

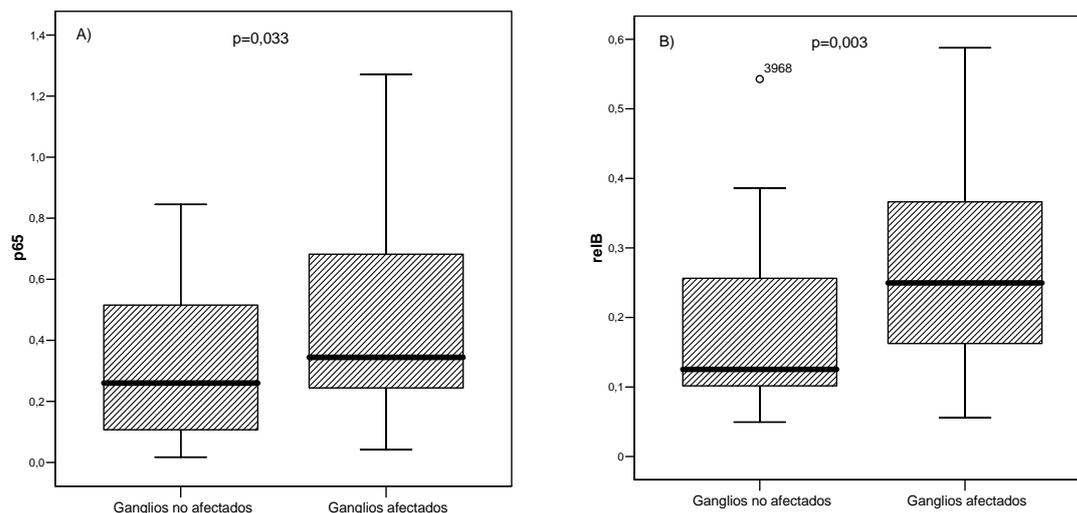


Figura IV.7 .Activación de las subunidades p65 y relB en función de la afectación ganglionar en el momento del diagnóstico en carcinoma ductal infiltrante. n=25 en grupo de ganglios no afectados y n=68 en grupo de ganglios afectados. A) p65; B) relB.

2.6. Determinación de la unión NF-kB/ADN en tejido tumoral en función del tamaño del tumor en el diagnóstico.

Para determinar si el estado de desarrollo del tumor estaba relacionado con la activación de NF-kB, se compararon los valores obtenidos con el tamaño tumoral. En el análisis general con todas las muestras de tipo infiltrante independientemente del tipo histológico se observó que a mayor tamaño, los valores de relB aumentaban [$p=0,019$; los valores de activación de relB para T3 (n=16) fueron un 5,64% mayores que para T2 (n=68) los cuales fueron un 39,43% mayores que para T1 (n=17)] (*figura IV.8.A*).

Tal como se hizo con la afectación de los nódulos ganglionares, realizamos un nuevo análisis utilizando específicamente el tipo histológico carcinoma ductal infiltrante. Interesantemente, los resultados teniendo en cuenta solo CDI no solo preservaban la relación de relB con el tamaño tumoral sino que además aumentaba la significancia. Se observó que el incremento en la activación de relB era dependiente del tamaño tumoral ($p=0,004$) con valores de activación para T3 (n=12) un 13,93% mayores que para T2 (n=52) que a su vez fueron 51,57% mayores que para T1 (n=12) (*figura IV.8.B*). Respecto a la activación de p65, p50, p52 y c-rel no se encontraron diferencias significativas. Estos

datos junto a los anteriores de afectación ganglionar sugieren que relB está relacionado con el desarrollo del tumor.

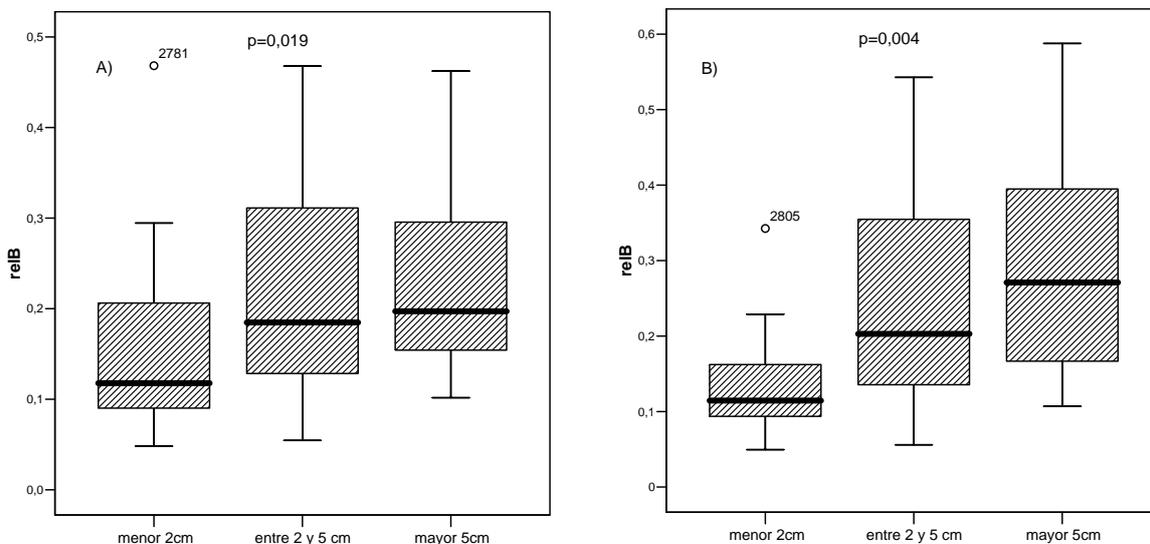


Figura IV. Tamaño tumoral en el momento del diagnóstico. **A)** Carcinomas. N=17 si tamaño < 2cm, n=68 si tamaño >2 y <5cm y n=16 si tamaño > 5cm. **B)** Carcinoma ductal infiltrante. N=12 si tamaño < 2cm, n=52 si tamaño >2 y <5cm y n=12 si tamaño > 5cm.

3. Relación entre la evolución de las pacientes tras el tratamiento y los niveles de activación de las subunidades de NF-kB.

Se estimó la probabilidad de recidiva de las pacientes tras el tratamiento según los valores de las diferentes subunidades de NF-kB, no encontrando diferencias significativas respecto a la supervivencia exceptuando la relación que más abajo se describe de pacientes con receptores de estrógenos positivos y tratamiento con el inhibidor hormonal tamoxifeno junto a doxorubicina. En general se considera que la doxorubicina no afecta a los receptores hormonales, por lo que solo se tuvo en cuenta el tratamiento con tamoxifeno (165-167).

3.1. Recidiva en pacientes según receptores hormonales.

A partir de los datos de receptores hormonales tanto de estrógenos como de progesterona, se estimó la probabilidad de recidiva de las pacientes tras la cirugía. Observamos que pacientes negativas para receptores de estrógenos o progesterona tenían mayor probabilidad de recidiva tras la cirugía que aquellas que eran positivas ($p=0,001$ y $p=0,011$ respectivamente) (*figura IV.9 A y B*) y que ésta no solo se mantenía sino que además aumentaba si ambos receptores eran negativos (datos no mostrados, $p=0,0002$). Además, al agrupar las muestras en 3 grupos dependiendo si eran positivas o negativas para ambos receptores o solo tenían uno de ellos positivo observamos que pacientes con solo uno de los receptores positivo formaban un grupo intermedio ($p=0,0009$) (*figura IV.9.C*).

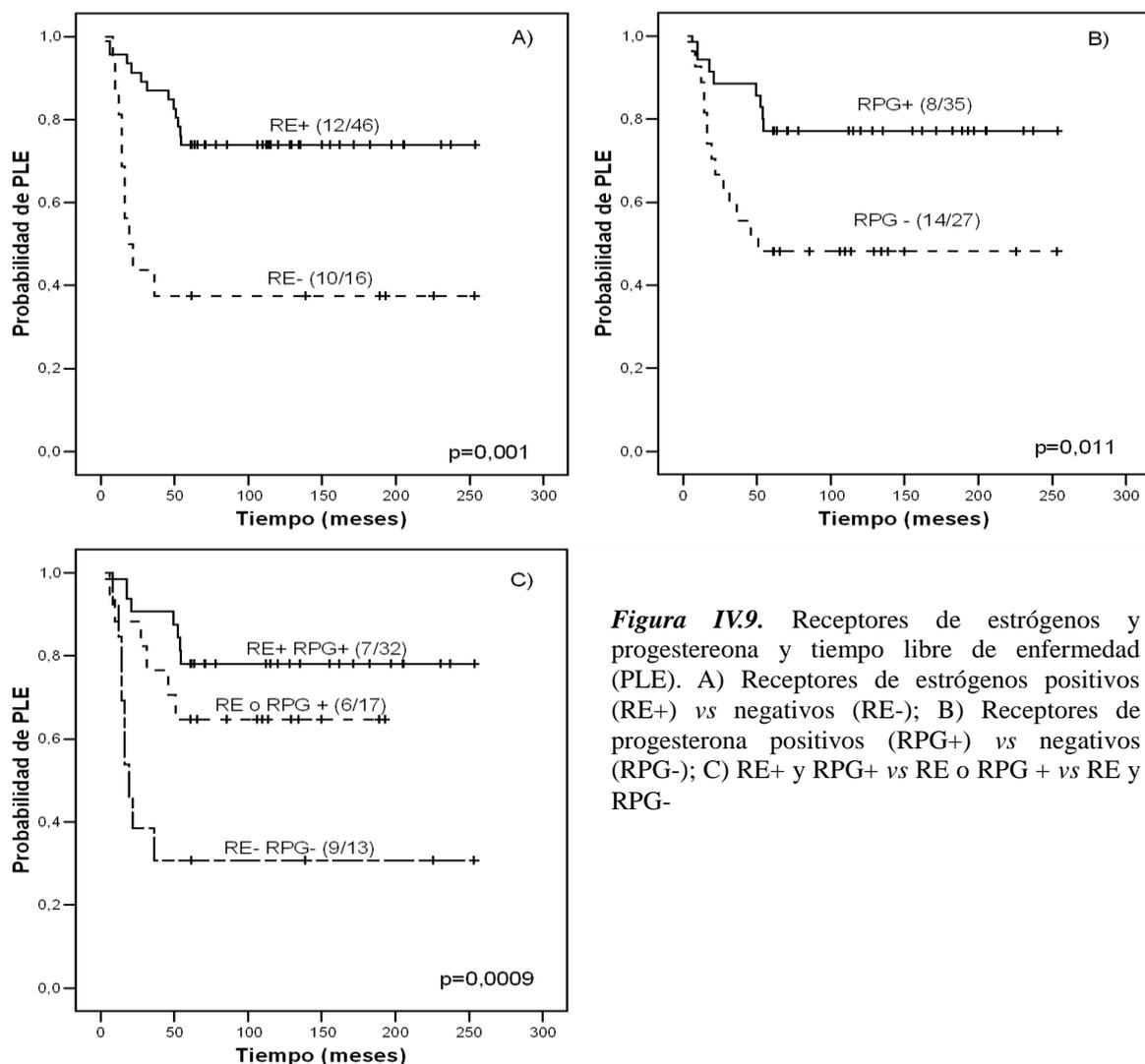


Figura IV.9. Receptores de estrógenos y progesterona y tiempo libre de enfermedad (PLE). A) Receptores de estrógenos positivos (RE+) vs negativos (RE-); B) Receptores de progesterona positivos (RPG+) vs negativos (RPG-); C) RE+ y RPG+ vs RE o RPG+ vs RE y RPG-

3.2. Asociación de la activación de NF-kB con receptores de estrógenos y progesterona en carcinomas tratados con tamoxifeno.

En el análisis general de la relación de receptores de estrógenos y progesterona según la unión NF-kB/ADN no obtuvimos ningún resultado significativo. Sin embargo, al analizar la relación entre la activación de las diferentes subunidades de NF-kB y la supervivencia tras la cirugía en el grupo de pacientes positivas para receptores de estrógenos tratadas con tamoxifeno y doxorubicina con al menos 5 años de seguimiento se observó que niveles mayores de activación de p52 y relB estaban asociados a un peor pronóstico con un valor p significativo de 0,0375 para p52 y una fuerte tendencia para relB con un valor p de 0,0533. Para el análisis de relB utilizamos 47 muestras de carcinoma infiltrante agrupadas en valores altos (n=21) y valores bajos (n=26) de receptores de estrógenos. Para p52 se usaron 43 muestras de carcinoma infiltrante agrupadas por niveles altos (n=19) y niveles bajos (n=24) de receptores de estrógenos. Para determinar el punto de corte óptimo se utilizó el análisis por regresión.

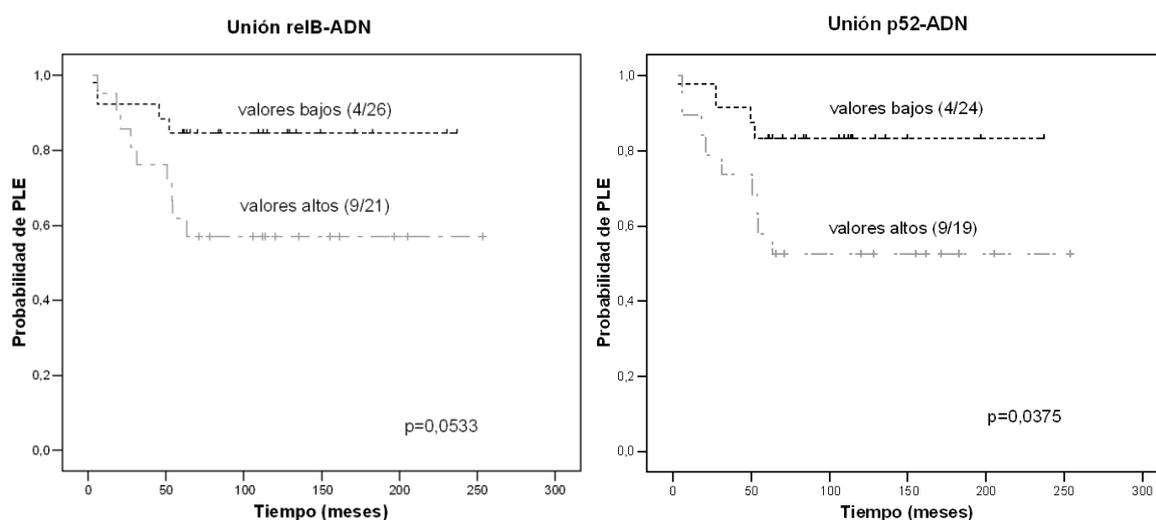


Figura IV.10. Asociación de receptores de estrógenos positivos, NF-kB y tiempo libre de enfermedad tras la cirugía (PLE). A) Valores altos de relB se asocian a peor pronóstico. B) Valores bajos de p52 se asocian a mejor pronóstico.

4. Cambios en la expresión génica en líneas celulares mamarias tras tratamiento con doxorubicina.

Se propuso identificar genes cuya expresión se modificaba tras el tratamiento con el fármaco antitumoral doxorubicina y cuya expresión estaba al menos en parte mediada por NF-kB. Para llevar a cabo los ensayos se seleccionaron tres líneas celulares con características diferentes: MDAMB231, con receptor de estrógenos y HER2 negativos, SKBR3, con receptor de estrógenos negativos y HER2 amplificado y MCF7 con receptores de estrógenos y progesterona positivos y HER2 negativo. Por nuestros datos previos conocíamos que el pico de activación de NF-kB tras el tratamiento con doxorubicina 5uM se encontraba entre 6 y 8 horas utilizando esta última en los siguientes experimentos. La variación de la expresión génica de los loci de interés se determinó mediante un array de expresión comercial y se validó mediante PCR cuantitativa utilizando sondas taqman.

4.1. Diferencias en el transcriptoma de MDAMB231, MCF7 y SKBR3 tras el tratamiento con doxorubicina.

El análisis de la expresión diferencial de los genes tras el tratamiento con doxorubicina 5uM se realizó mediante el “Human NF-kB signaling Targets RT² Profiler PCR Array” (SABiosciences). Este array permite perfilar la expresión de 84 genes que responden a las señales de transducción de NF-kB (*Anexo 2*).

Una vez realizado el análisis y normalizados los resultados, obtuvimos un conjunto de genes cuya expresión tras el tratamiento estaba modificada respecto al control. Entre los loci detectados seleccionamos aquellos cuyo cambio absoluto era de al menos de 3 ciclos. Observamos que en la línea celular MDAMB231 existían diferencias en la expresión de 26 genes, de los cuales 11 estaban sobre-expresados tras el tratamiento y en 15 la expresión era menor. Teniendo en cuenta estos genes, se realizó el perfil funcional mediante el programa ProfCom basado en términos de “gene ontology” (GO) determinando de esta manera que los genes sobre-expresados estaban

relacionados principalmente con la respuesta inflamatoria y con la señalización célula a célula, ambos procesos asociados a la muerte celular, mientras que genes asociados a la transducción de señales y anti-apoptóticos aparecían disminuidos. En MCF7 obtuvimos diferencias en la expresión de 26 genes, de los que en 7 aumentaba y en 19 disminuía la expresión. En este caso debido al bajo número de genes con sobre-expresión, no se pudo analizar su perfil funcional, si bien los genes cuya expresión disminuía estaban asociados con transducción de señales y anti-apoptosis. Por último, en SKBR3 observamos diferencias en 32 genes de los cuales 25 aumentaban su expresión tras el tratamiento y 7 la disminuían. Al analizar su perfil funcional, los genes sobre-expresados se asociaron con actividades quimocina y citosina, quimiotaxis, señalización célula a célula y respuesta inflamatoria principalmente. Interesantemente, mientras que la expresión de genes tras el tratamiento en general bajaba en las líneas MDAMB231 y MCF7, en SKBR3 el comportamiento era contrario y en general se observaba un aumento de la expresión (*figura IV.11*).

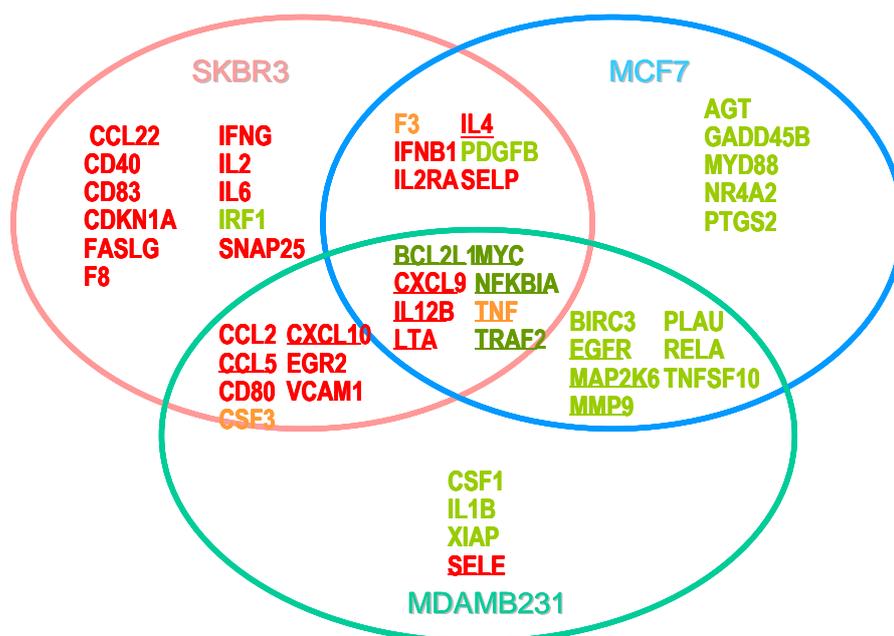


Figura IV.11. Genes cuya expresión se ha modificado tras el tratamiento con doxorrubicina en las tres líneas celulares. En rojo genes que se sobre-expresan, en verde genes cuya expresión disminuye y en naranja genes que se comparten de manera diferente según la línea celular. Subrayados los genes que se utilizaron posteriormente para la validación de resultados y los ensayos con muestras parafinadas humanas.

4.2. Diferencias en el transcriptoma de MDAMB231, MCF7 y SKBR3 tras el tratamiento con doxorubicina detectadas por PCR cuantitativa. Validación.

A partir de los 48 genes cuya expresión había sido medida mediante el array y se había modificado tras el tratamiento con doxorubicina en al menos una de las líneas celulares, seleccionamos 15 para la validación de la técnica mediante PCR cuantitativa utilizando sondas taqman.

La selección de los genes para su validación se realizó en base a que su expresión diferencial estuviera relacionada con algún proceso asociado al cáncer y que a su vez se hubiera modificado tras el tratamiento, escogiendo preferentemente aquellos cuya expresión se encontraba alterada en las tres líneas celulares y su cambio múltiplo fuera mayor de 3 unidades (*tabla VI.2*).

Tabla IV.2. Genes validados por sondas Taqman

Nombre	Descripción	Referencia	GeneBank
BCL2L1	BCL2-like 1	Hs00236329	NM_138578
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	Hs00174575	NM_002985
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Hs99999049	NM_001565
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	Hs00171065	NM_002416
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Hs01076078	NM_005228
IL12B	Interleukin 12B	Hs01011518	NM_002187
IL4	Interleukin 4	Hs00174122	NM_000589
LTA	Lymphotoxin α	Hs04188773	NM_000595
MAP2K6	Mitogen activated protein kinase kinase 6	Hs00992389	NM_002758
MMP9	Matrix metalloproteinase 9	Hs00234579	NM_004994
MYC	V-myc myelocytomatosis viral	Hs99999003	NM_002467
NFKBIA	Nuclear factor of K ligth polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor α	Hs00153283	NM_020529
SELE	Selectin E	Hs00174057	NM_000450
TNF	Tumor necrosis factor	Hs99999043	NM_000594
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	Hs00184192	NM_021138

Al analizar las diferencias en la expresión de estos 15 genes tras el tratamiento con doxorubicina, observamos que *CXCL9* al contrario que en el array donde si se detectaba aunque a ciclos cercanos a 30, en la validación aparecía en las 3 líneas celulares a ciclos muy elevados o no se detectaba mediante la técnica taqman, por lo que se decidió eliminar este gen del análisis. Por otra parte observamos que la *IL12B* e *IL4* solo se detectaban en la línea MDAMB231, dónde ambos aumentaban tras el tratamiento. *SELE* aumentaba su expresión en las líneas SKBR3 y MCF7 y no se detectó en MDAMB231,

CCL5 aumentaba en MCF7 y MDAMB231, *MMP9* disminuía en MCF7 mientras que la expresión de *BCL2L1*, *EGFR*, *MAP2k6*, *MYC*, *TRAF2* y *NF-KBIA* disminuyó, *LTA* y *CXCL10* aumentó y *TNF* disminuyó en MCF7 y SKBR3 y aumentó en MDAMB231 tras el tratamiento en las 3 líneas celulares (figura IV.12). En algunos casos los cambios múltiples de la expresión fueron muy altos, Esto se puede observar principalmente en *CXCL10*, *LTA* y *SELE* cuya expresión era baja en células control y muy alta en células tratadas y en menor medida en *MYC* y *NF-KBIA* dónde ocurre al contrario.

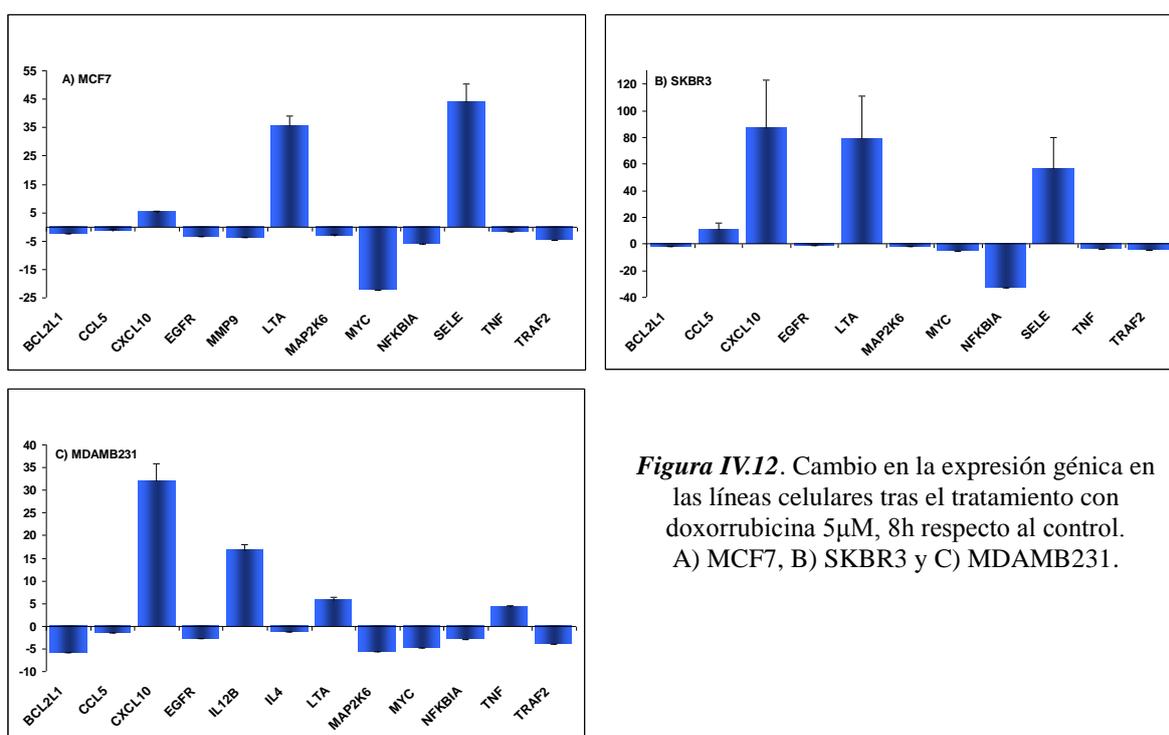


Figura IV.12. Cambio en la expresión génica en las líneas celulares tras el tratamiento con doxorubicina 5µM, 8h respecto al control. A) MCF7, B) SKBR3 y C) MDAMB231.

En la validación de los resultados encontramos una correlación de más del 90% entre los resultados obtenidos por sondas taqman y por array de expresión. Las discrepancias podrían deberse a que en algunos casos si bien se detectó la expresión del gen a ciclos inferiores de 30 en una de las condiciones, en la otra, ya fuera control o tratamiento con doxorubicina, o no se detectó o lo hizo a ciclos muy altos no incluyéndose en el análisis. Como conclusión consideramos que la correlación entre ambas técnicas era buena.

5. Análisis de la expresión de genes seleccionados en muestras de cáncer de mama.

En base a los datos preliminares obtenidos en líneas celulares y a partir de material parafinado cedido por el Biobanco del INCLIVA/Hospital Clínico Universitario de Valencia, determinamos la expresión en muestras parafinadas tumorales y no tumorales de cáncer de mama de los 15 genes seleccionados previamente, si bien en el análisis de expresión dos de los quince genes (*IL4* e *IL12B*) presentaron valores de expresión muy bajos en tejido mamario que fue insuficiente para tenerlos en cuenta en los análisis posteriores. Los genes seleccionados fueron aquellos cuya expresión variaba tras el tratamiento con doxorubicina en al menos 2 líneas celulares y que por sus funciones podrían tener relación con la progresión del cáncer. Todos los datos de expresión fueron normalizados con los genes *GADPH* y *HPRT1*.

5.1. Expresión diferencial en tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral.

A partir de 19 muestras pareadas de las que disponíamos de tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral, procedimos al análisis de la expresión diferencial de los 15 genes seleccionados anteriormente, de los cuales obtuvimos resultados fiables de 13 como ya se ha comentado.

Nuestros resultados indicaron que los niveles de expresión de *CXCL10*, *CXCL9*, *MMP9* y *LTA* aumentaban significativamente (valores de p 0,002, 0,008 y 0,022 y 0,030 respectivamente) en tejido tumoral (TT) respecto a adyacente no tumoral (TAT). Mientras que los valores de *EGFR*, *MAP2k6* y *MYC* disminuían con valores de p de 0,002, 0,0001 y 0,017, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en la expresión del resto de genes seleccionados entre tejido tumoral y adyacente no tumoral. El comportamiento en cuanto a la expresión génica no fue homogéneo en todas las muestras como se puede apreciar en la *figura IV.13*. Esto es lógico por tratarse de muestras humanas donde existe una variabilidad mayor que en experimentos con líneas celulares. Más concretamente y teniendo como punto de corte diferencias en $\pm 1,5$ cambios, la expresión de *CXCL10* aumentaba en 13 de 19 muestras, disminuía en 1 y no cambiaba en 5, en el caso de *CXCL9*, su

expresión aumentaba en 12, disminuía en 4 y no variaba en 3 muestras. Respecto a *MMP9* su expresión aumentaba en 14, disminuía en 4 y no había diferencias en 1 muestra, en el caso de *LTA* aumentaba la expresión en el tejido tumoral en 11 muestras, bajaba en 4 y se mantenía igual en el resto, en relación con *EGFR*, su expresión en tejido tumoral disminuía en 13 muestras, aumentaba en 4 y no variaba en los demás casos, en el caso de *MAP2k6* su expresión disminuía en 13, aumentaba en 1 y no cambiaba en 5 muestras. Por último, la expresión de *MYC* en tejido tumoral disminuía en 10 casos y aumentaba con valores de aproximadamente 2 cambios en 4, sin haber diferencias en el resto. Por otra parte, en algunos casos como en *LTA* y *CXCL9* obtuvimos diferencias en el número de cambios muy altas debido a que en una de las muestras de tejido, fuera TAT o TT, existía expresión muy alta del gen de interés mientras que en la muestra pareada la expresión era muy baja aunque detectable.

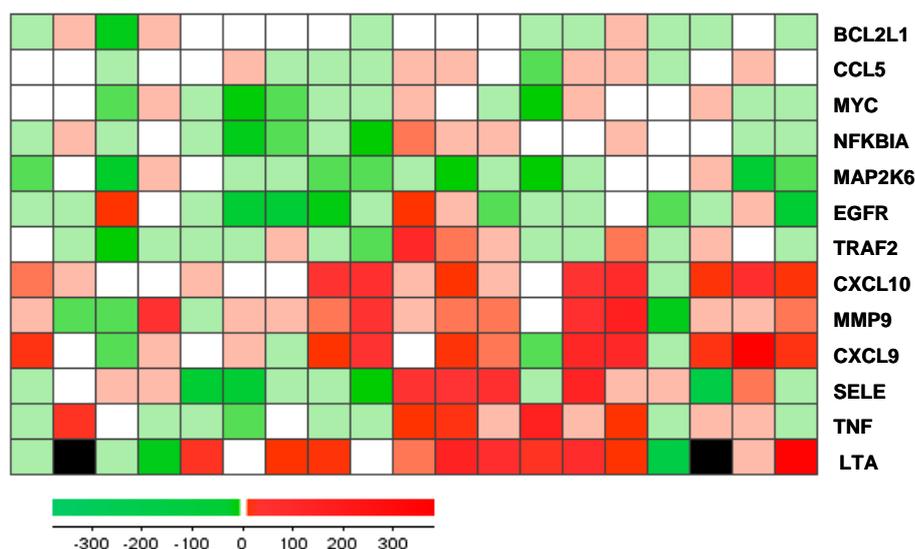


Figura IV.13. Diferencia de expresión génica entre tejido tumoral (TT) y tejido adyacente no tumoral (TAT) de muestras pareadas calculado como $2^{-\Delta Ct}$ donde $\Delta Ct = Ct_{TT} - Ct_{TAT}$. Se observa 2 grupos, uno en el que en tejido tumoral están sobre-expresadas *CXCL9*, *CXCL10* y *MMP9* y otro en el que su expresión disminuye respecto a tejido tumoral. Tonos verdes: disminuye la expresión en TT respecto a TAT. Tonos rojos: aumenta la expresión en TT respecto a TAT. Blanco: no existen cambios en la expresión. Negro: valores perdidos. La figura se realizó mediante el programa J-Express.

5.2. Expresión diferencial en tejido adyacente no tumoral de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama y tejido mamario normal.

Para comprobar si existían diferencias en la expresión de los genes seleccionados entre tejido normal y tejido adyacente al tumor, se compararon 8 muestras provenientes de cirugía mamaria reductora y 19 muestras de tejido adyacente no tumoral de pacientes con cáncer de mama. Al realizar esta comparación se observó que se encontraban diferencias significativas en la expresión génica de *MMP9* ($p=1,29 \times 10^{-12}$; Intervalo de confianza (IC) [7,51;10,56]), *MYC* ($p=4,45 \times 10^{-5}$; IC [1,37;3,14]) y en mucha menor medida en *CXCL9* ($p=0,029$; IC [0,19;3,15]), mientras que el comportamiento del resto de genes fue similar independientemente de que se tratara de tejido adyacente al tumor o tejido normal no observándose diferencias significativas entre ellos (figura IV.14).

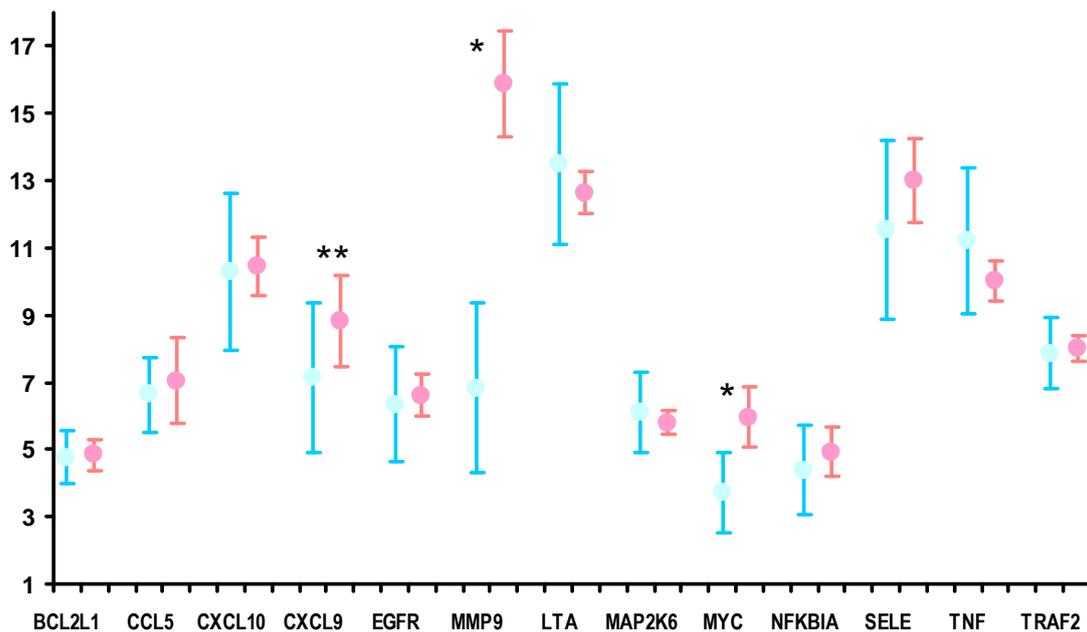


Figura IV.14. Ciclos de detección de los genes ajustado por *GAPDH*. Normal vs Adyacente. Azul TAT n=19. Rosa TN n=8. *valor- $p < 0,00001$; **valor- $p < 0,05$. Ciclos más altos menos expresión.

Debido a que estos genes se expresan de forma diferente entre tejido normal adyacente y tejido normal del mismo órgano decidimos realizar las comparaciones de expresión del tejido tumoral con ambos. Como se puede observar en la *figura IV.15*, las expresiones de *MMP9*, *MYC* y *CXCL9* son claramente mayores en tejido tumoral que en tejido normal. Sin embargo, mientras que en el caso de *CXCL9* y *MMP9* su expresión sigue siendo mayor en tejido tumoral que en adyacente, en *MYC* su transcrito está aumentado en tejido adyacente respecto a tejido tumoral.

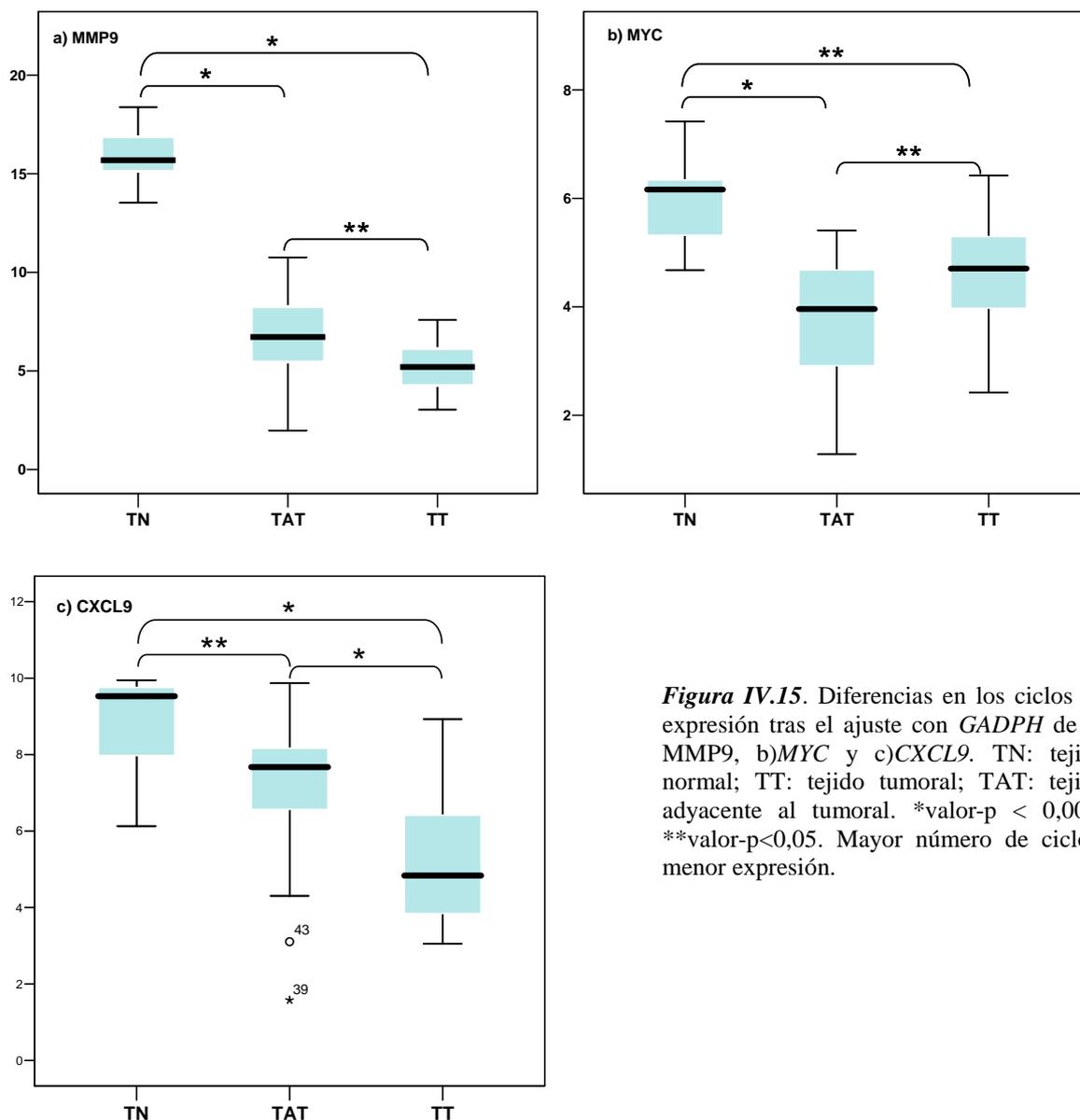


Figura IV.15. Diferencias en los ciclos de expresión tras el ajuste con *GADPH* de a) *MMP9*, b) *MYC* y c) *CXCL9*. TN: tejido normal; TT: tejido tumoral; TAT: tejido adyacente al tumoral. *valor-p < 0,005; **valor-p<0,05. Mayor número de ciclos, menor expresión.

En conclusión nuestros resultados indican que la expresión de los 14 genes seleccionados es similar entre el tejido adyacente no tumoral de pacientes de cáncer de mama y de tejido mamario de personas no afectadas por la enfermedad exceptuando *MMP9*, *MYC* y *CXCL9*. Estos datos plantean el problema de cual sería el control ideal para realizar las comparaciones de expresión en TT.

5.3. Diferencias en la expresión entre tejido tumoral y tejido normal

A partir de los datos anteriores donde observamos diferencias en la expresión entre tejido adyacente al tumor y tejido no tumoral, decidimos comparar tejido normal con tumoral y comprobar si los resultados eran similares a tejido adyacente versus tejido tumoral. Los resultados fueron similares a los obtenidos en el grupo TAT vs. TT exceptuando *MYC*, que parece aumentar en tejido tumoral respecto a normal, *TNF*, que en este caso sale significativo pero no así en el anterior y *LTA*, que deja de ser significativo (figura IV.16).

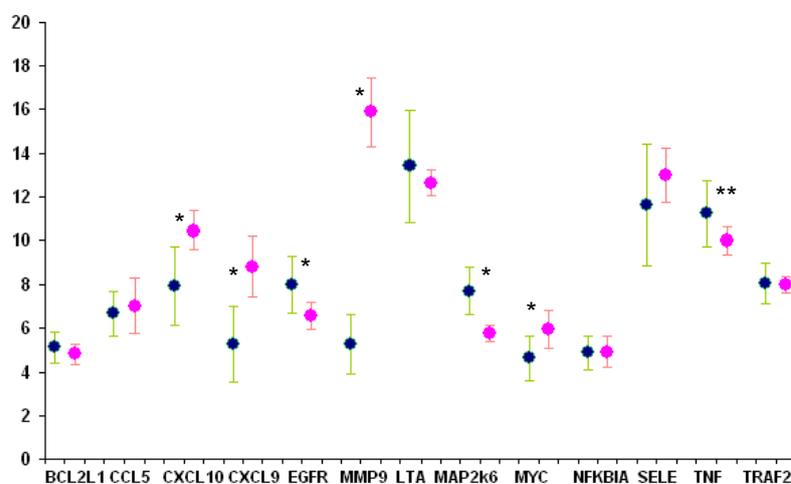


Figura IV.16. Ciclos de detección de los genes ajustados por *GAPDH*. Normal (TN) vs tumoral (TT). Verde TT n=19; rosa TN n=8. *valor-p < 0,005; **valor-p<0,05.

5.4. Correlaciones en la expresión de los genes seleccionados.

Para el cálculo de las correlaciones entre la expresión de los genes seleccionados se utilizó el test de Pearson. Este permite medir la similitud o co-expresión entre loci y modelizar que grupos de genes se expresan de forma conjunta. Para ello utilizamos las 46 muestras de las que poseíamos información, incluyendo tejido tumoral, tejido adyacente no tumoral y tejido normal. Las condiciones seleccionadas para predecir la existencia o no de similitud en la expresión fueron un índice de correlación de Pearson mayor a 0,5 con un valor-p menor a 0,001 y que la similitud si se analizaba por separado se mantuviera en al menos 2 de los 3 casos. Teniendo en cuenta estas condiciones obtuvimos dos grupos de genes cuya expresión parece ligada. En el primer grupo observamos que la expresión de *CXCL10* estaba relacionada con los niveles de *CXCL9* ($r^2=0,833$), es decir, que a la vez se asociaban a *CCL5* ($r^2=0,632$). En el segundo grupo, se observó una correlación significativa entre *NF-KBIA* y los niveles de *TNF* ($r^2=0,553$). Respecto a la expresión del resto de genes, no se encontraron correlaciones que cumplieran nuestros criterios.

5.5. Clasificación por perfil génico de las muestras mamarias.

Se realizó el perfil génico de las 46 muestras de tejido mamario de las que teníamos datos de expresión incluyendo 19 muestras de tejido tumoral (TT), 19 de tejido adyacente al tumor (TAT) y 8 de tejido normal procedente de reducción mamaria. A pesar del bajo número de muestras en cada grupo, al realizar un análisis cluster jerárquico no supervisado, observamos que las muestras se distribuían en grupos según fueran TT, TAT o TT. De hecho, el 70% de las muestras TAT se encontraban incluidas en una rama del cladograma, 81% de las de TT en otra y el 80% de las TN en otra rama, tal como se puede observar en la *figura IV.17*.

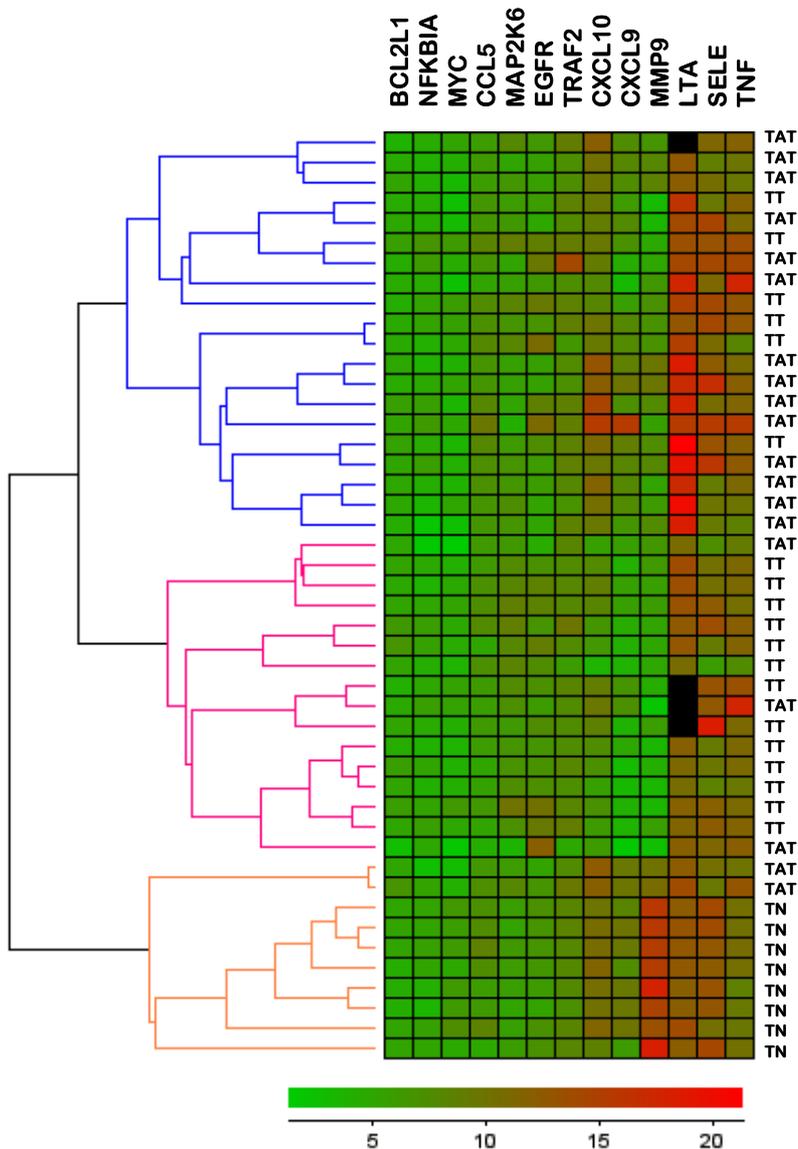


Figura IV.17. Análisis cluster jerárquico de 46 muestras mamarias. Se observa que las muestras se agrupan según tipo. Datos representados como: CtcADN de interés - CtcADN *GADPH*. TT: Tejido tumoral (n=19); TN: tejido normal (n=8); TAT: tejido adyacente al tumor (n=19). Verde: mayor expresión; rojo: expresión menor; negro: valores perdidos.

6. Relación de los genes estudiados con NF- κ B.

Para determinar la relación de las distintas subunidades de NF- κ B con la variación en la expresión de los genes estudiados, se analizó por inmunohistoquímica la cantidad relativa de cada subunidad de NF- κ B. Para ello se utilizaron 10 muestras tumorales de las que disponíamos de datos de expresión y suficiente material para realizar la inmunohistoquímica de las cinco subunidades de NF- κ B. A pesar de que los resultados se consideran

preliminares debido al bajo número de muestras, observamos que existía una relación entre localización de relB en el núcleo y aumento de *NF-KBIA* y *TRAF2* (valores de p 0,079 y 0,053, respectivamente) y entre localización de p65 en el núcleo y mayor expresión de *LTA* (valor de p=0,019). Los resultados obtenidos mediante esta aproximación deben ser validados en un número más amplio de muestras para comprobar que se mantiene la relación.

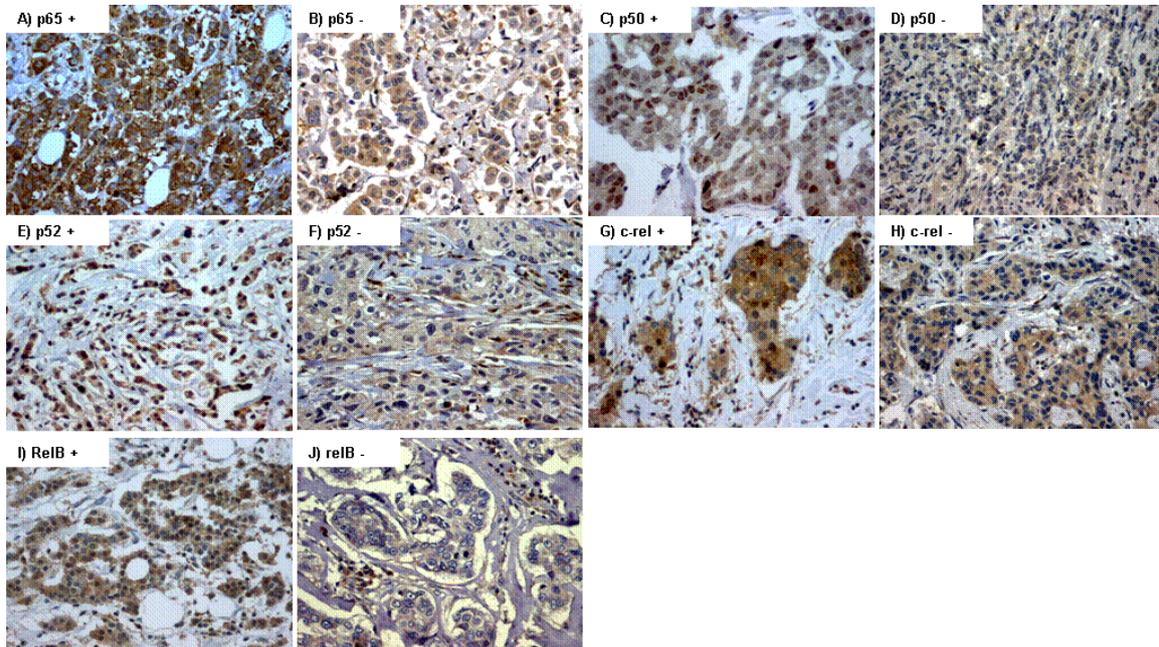


Figura IV.18. Imágenes representativas de la expresión nuclear en muestras de cáncer de mama positiva (+) o negativa (-) en A y B) p65; C y D) p50; E y F) p52; G y H) c-rel e I y J) relB medidas por inmunohistoquímica (DAB, 400X). Se considera que tinción nuclear de NF-kB es un indicador de la activación de NF-kB.

V. DISCUSIÓN

1. Caracterización de la activación de NF-kB en líneas celulares derivadas de carcinoma mamario tras el tratamiento con doxorubicina.

Para la caracterización de la activación de NF-kB tras la administración del fármaco doxorubicina se seleccionaron cinco líneas celulares (MCF7, MDAMB231, MDAMB468, SKBR3 y BT474) derivadas de carcinomas mamaros con diferentes características clínico-patológicas. Se optó por el tratamiento con la antraciclinas doxorubicina al ser un fármaco muy utilizado en cáncer de mama pero cuya administración se ha ligado a un aumento de NF-kB que podría estar relacionado con mecanismos de resistencia al fármaco (168, 169). El primer ensayo que se realizó fue una curva de viabilidad a distintas concentraciones de doxorubicina para la selección de la concentración óptima a utilizar en los experimentos siguientes. La concentración elegida fue 5uM, ya que tras un tratamiento de 24 horas la viabilidad se encontraba entre el 40 y el 60% en 4 de 5 de las líneas celulares estudiadas siendo la excepción SKBR3 cuya viabilidad disminuía hasta un 15-20%.

Tras seleccionar la concentración de 5uM doxorubicina, elegimos las líneas celulares SKBR3, MDAMB231 y MCF7 y las tratamos a distintos tiempos midiendo la activación de las diferentes subunidades de NF-kB por ELISA. A las 6 horas, la subunidad p65 estaba aumentada en las 3 líneas de forma significativa, lo que implicaría que la doxorubicina actúa específicamente activando esta subunidad, si bien en MDAMB231 y MCF7 también aumentaba relB. Curiosamente, a las 22 horas parecía que la activación de p65 y relB bajaba de nuevo. Esto podría deberse a que una vez ya han activado sus genes dianas, aunque el inductor perdure, las subunidades se desactivan. Esto estaría en relación con la autorregulación del ciclo de NF-kB. De hecho, en la ruta clásica, el complejo NF-kB entra en el núcleo donde activa la transcripción de multitud de genes incluyendo Ikb α (NF-KBIA) que se une a NF-kB y lo exporta de nuevo al citoplasma. Por otra parte, en el caso de la línea celular SKBR3 no obtuvimos datos de proteína ni para p52 ni para 22 horas. A 22 horas se debió a la gran mortandad de las células, En el caso de p52, la

concentración fue tan baja que el ensayo no la detectó. Finalmente, se seleccionó la línea MDAMB231 y se la trató con MLN20, un inhibidor de NF- κ B para confirmar que el aumento de NF- κ B que observábamos tras el tratamiento con doxorubicina era real o se trataba de un artefacto. Los resultados indicaron que MLN20 revertía al menos en parte la activación de NF- κ B por la doxorubicina. Estos ensayos permitieron comprobar el buen funcionamiento del ELISA que más tarde se utilizó para medir activación de NF- κ B en tejidos de carcinoma mamario.

2. Cáncer de mama. Búsqueda de nuevos marcadores.

El cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea histopatológicamente, molecularmente y fenotípicamente, en la que también están implicados factores etiológicos. Aunque la biología de la división celular, la diferenciación y la apoptosis es muy similar en células normales y cancerígenas, estas últimas difieren de las normales en que están reguladas de forma aberrante dando como resultado un fenotipo alterado (170) en el que generalmente al menos la proliferación, la diferenciación, la organización cromosómica o genética y/o la apoptosis escapan al control celular. Sin embargo, la manera en que cada célula tumoral escapa a estos controles varía de tumor a tumor lo que origina una gran diversidad dentro de una enfermedad con la misma denominación (45). Esta variabilidad en los mecanismos implicados en el desarrollo del tumor provoca que pacientes con parámetros clínicos y biomarcadores (actualmente en cáncer de mama se utilizan RE, RPG y HER2) similares tengan una respuesta muy distinta a un mismo tratamiento. El hecho de que los fármacos convencionales no sean siempre eficientes ha inducido a que en los últimos años se busquen nuevas estrategias terapéuticas basadas en la medicina individualizada en la que el tipo de tratamiento dependa de las características moleculares de cada persona.

Por ello actualmente se considera que es un reto muy importante la identificación de nuevos marcadores moleculares capaces de predecir la agresividad del tumor y la progresión de la enfermedad, para lo que es necesario conocer que rutas están desreguladas en células tumorales. Una de

estas dianas terapéuticas potenciales alterada en distintos tipos de cáncer es NF-kB. Esta familia de factores de transcripción se ha asociado a procesos vinculados a carcinogénesis como la angiogénesis, la inflamación o la apoptosis. Además, la activación de la transcripción de genes anti-apoptóticos por NF-kB se ha ligado a la habilidad de los tumores para resistir los efectos citotóxicos de la quimioterapia ya que se activa en respuesta a diversos fármacos como la doxorubicina, utilizada en el tratamiento del cáncer de mama (171). Sin embargo, su activación por quimioterápicos también se ha ligado a la expresión de genes pro-apoptóticos (172-175) lo que no es de extrañar teniendo en cuenta la gran complejidad de esta ruta, la gran variedad de inductores que pueden activarla y la gran cantidad de genes que controla (138, 176).

Existen varias estrategias que se pueden utilizar para inhibir o modificar la función de NF-kB. Éstas se pueden resumir en nuevos fármacos cuyas dianas sean el propio NF-kB, sus inhibidores, o rutas de señalización reguladas por él. Nuestra hipótesis de partida es que NF-kB es una posible diana terapéutica en el tratamiento del cáncer de mama, sin embargo, al tratarse de una ruta involucrada en el control de una gran cantidad de procesos celulares, ampliamos el estudio analizando el comportamiento de algunos genes que están al menos en parte regulados por NF-kB y que a su vez podrían ser potenciales dianas.

2.1. Búsqueda de nuevos marcadores en cáncer: NF-kB.

Uno de los retos actuales es la búsqueda de marcadores moleculares que nos permitan un tratamiento individualizado de los pacientes. Múltiples evidencias sugieren que la activación de NF-kB está relacionada con diferentes enfermedades, incluyendo varios tipos de carcinoma. Para clarificar y caracterizar la importancia de la activación de NF-kB en carcinoma mamario, analizamos la activación de las cinco subunidades que componen la familia nuclear de factores de transcripción kB. El ensayo elegido para realizar este análisis fue el ELISA. Este método permite una doble selección del antígeno al

poseer un oligonucleótido que codifica para un sitio consenso de NF-kB al que solo se une NF-kB si se encuentra en la forma activada, además, el anticuerpo primario utilizado reconoce un epítipo el cual solo está accesible cuando NF-kB está activado y unido a su ADN diana. Además, al ser un método muy sensible, nos permitió obtener resultados partiendo de menor cantidad de muestras que con otros ensayos como el Western Blot o el EMSA.

2.2. Determinación de la calidad de los tejidos.

Las muestras congeladas utilizadas en este estudio proceden de tejido sobrante tras cirugía por mastectomía o tumorectomía llevadas a cabo entre los años 1988 y 2001. Debido al tiempo transcurrido y a las diferentes condiciones de conservación, se optó por comprobar la de calidad del tejido antes de extraer la proteína del tejido congelado. Para ello se incluyó el tejido en OCT, se hicieron cortes en un criotomo a -20°C para evitar la descongelación del tejido, se tiñó y se observó su calidad mediante microscopía. Este paso no solo nos permitió elegir que tejido se encontraban en mejores condiciones si no que también nos permitió saber con seguridad que el tejido que utilizamos era o no tumoral.

2.3. Validación de ELISA por Western Blot.

Un método globalmente utilizado para la determinación semicuantitativa de proteínas es la técnica del Western Blot. Sin embargo, este método necesita de una cantidad relativamente alta de proteína de partida, que en nuestro caso era el factor limitante al tratarse de muestras de tejido tumoral proveniente de pacientes. Por ello, si bien utilizamos el Western Blot como técnica de validación de nuestros resultados por ELISA, se realizó en una cantidad limitada de muestras. Por otra parte, ambas técnicas son diferentes y mientras mediante Western Blot se determina semicuantitativamente la cantidad de proteína, el ELISA proporciona el dato de si una proteína está o no unida al ADN. Por esta razón, utilizamos extracciones de proteínas nucleares para

llevar a cabo estas técnicas ya que según la hipótesis más aceptada NF-kB se trasloca al núcleo y regula a sus genes diana cuando se activa, así que en este caso la cantidad de proteína del núcleo sería aproximadamente igual a la unida al ADN.

Por otra parte, se optó por la validación de las subunidades p65 y p50 ya que son las más descritas en la bibliografía previa. En total analizamos 20 muestras mediante Western Blot y ELISA y obtuvimos un 90% de concordancia. La mínima variabilidad detectada se puede deber a que aunque se trataran de muestras del mismo tejido provenían de extracciones diferentes. En todo caso, consideramos que la reproducibilidad era buena y utilizamos el ELISA para el análisis de las siguientes muestras.

2.4. Diferencias en la activación de NF-kB entre tejido tumoral y adyacente.

Una vez seleccionadas las muestras procedimos a su análisis mediante la técnica de ELISA. El primer paso fue comprobar si la unión NF-kB/ADN era diferente entre muestras de tejido tumoral y muestras de tejido adyacente no tumoral procedentes de mama. Para ello, seleccionamos 16 muestras de tejido adyacente y 127 de tejido tumoral (GCI). Tras comparar ambos grupos observamos que las subunidades p65, p50, p52 y relB de NF-kB estaban en mayor medida unidas a ADN y por tanto más activadas en tejido tumoral en comparación con tejido adyacente no tumoral con valores de p significativos al 99%. Sin embargo, en la unión de la subunidad c-rel con el ADN no se detectaron diferencias significativas.

Estos resultados son consistentes con estudios previos en los cuales ya se había observado que la activación de NF-kB estaba relacionada con tejido tumoral. En mama, Cogswell *et al.* observaron que las proteínas p50, p52 y c-rel estaban aumentadas en tejido tumoral respecto a tejido adyacente no tumoral en 17 muestras apareadas, si bien no encontraron esta tendencia en p65 (177). Por otra parte, en otros tipos tumorales como adenocarcinoma

pancreático (178), carcinoma gástrico (179) o carcinoma colorrectal (180) se ha descrito la activación de p65 en tejido tumoral comparando con tejidos no tumorales. También otros estudios han relacionado la activación de p65 con la expresión de genes que aumentan la proliferación celular y la supervivencia en diferentes cánceres (181, 182).

Exceptuando el artículo de Cogswell, la activación de las subunidades de NF-kB en tejido tumoral mamario ha sido poco estudiada, e incluso en otros tipos tumorales la mayor parte de la información existente se refiere al papel de p65 y p50.

Hasta la fecha este ha sido el estudio con muestras de tejido de pacientes más extenso que se ha realizado y que además ha tenido en cuenta las 5 subunidades de NF-kB. La activación aberrante de NF-kB en tejido tumoral muestra un cambio en la regulación de esta familia de factores de transcripción que a su vez provocan variaciones en la transcripción de sus genes diana que pueden estar a su vez implicados en el desarrollo del tumor.

2.5. Niveles de unión NF-kB/ADN en muestras de tejido tumoral y relación con diferentes características clinicopatológicas.

Tres factores que se tienen en cuenta a la hora de determinar el pronóstico y elegir el tratamiento en pacientes con cáncer de mama son si el tumor ha invadido tejido adyacente, si los ganglios linfáticos están afectados y el tamaño tumoral. Es por esto que sabiendo por el análisis anterior que había diferencias significativas en la activación de NF-kB en tejido tumoral respecto a no tumoral, procedimos al análisis de estos tres factores en relación con la activación de NF-kB en muestras con fracción tumoral mayor del 50%.

Primero comparamos los niveles de activación de las diferentes subunidades de NF-kB y la capacidad del tumor para invadir tejidos adyacentes. Utilizamos para el análisis tumores ductales que histológicamente se subdividen en infiltrantes (CDI) si ha invadido tejido colindante e in situ (CDIS) para evitar que las diferencias pudieran deberse al tipo tumoral y no su capacidad invasiva. Al

analizar la activación de NF- κ B, observamos niveles más altos de relB, p52 y c-rel en CDI que en CDIS, con valores de p significativos al 99%, mientras que no encontramos diferencias significativas en la activación de p65 y p50. Estos datos sugieren que existe una relación entre la capacidad de invadir tejidos adyacentes y el incremento de la actividad de relB, p52 y c-rel y están en concordancia con otros como el estudio de Cai et al. (183) quien encontró que la activación de p52 estaba relacionada con mal pronóstico en cáncer de próstata o Cogswell, et al. (177) que describió que los complejos de unión de NF- κ B que contenían p50, p52 y c-rel estaban activados en cáncer de mama. El estudio de Cogswell, si bien muy interesante, fue realizado con líneas celulares y solo se analizaron diecisiete casos de carcinomas de mama. Interesantemente, nosotros hemos encontrado la misma asociación entre la activación de p52 y c-rel en tejidos tumorales pero no hemos encontrado asociación con activación de p50, aunque sí estaba aumentado en tejidos tumorales versus tejidos normales adyacentes.

Por otra parte, procedimos al análisis de la afectación ganglionar y el tamaño tumoral. En este caso encontramos diferencias significativas al 95% en la unión de la subunidad relB/ADN que estaba aumentada en el grupo de carcinomas invasivos (GCI) cuando había afectación ganglionar y el tamaño tumoral era mayor. Debido a que la mayoría de nuestras muestras son histológicamente carcinoma ductal infiltrante, pensamos que los datos probablemente estarían influenciados por este subtipo. Por esta razón decidimos analizar a los carcinomas ductales invasivos de forma separada. De esta forma observamos que relB no solo estaba significativamente más activo en el caso de que hubiera afectación ganglionar y tamaño mayor sino que además el p-valor era menor. Además, en el caso de ganglios afectados, obtuvimos resultados significativos para p65 y una tendencia para p50 que tenían valores de activación aumentados. Esta última asociación de p65 y p50 se había descrito previamente en cáncer colorrectal. También en adenocarcinoma de próstata (184) se había encontrado anteriormente asociación entre niveles más altos de p65 en tejido tumoral respecto a tejido benigno a la vez que lo correlacionaron con progresión de la enfermedad.

Estos datos sugieren la subunidad relB está asociada con la progresión del tumor, ya que se encuentra aumentada cuando los ganglios linfáticos están afectados, el tamaño tumoral es mayor y las células tumorales son capaces de invadir tejidos adyacentes, aunque más estudios son necesarios para determinar si la activación de relB es debida a la progresión del tumor o su activación provoca que el carcinoma sea más agresivo.

3. Activación de NF-kB en carcinoma de mama dependiente de receptores estrogénicos.

El papel de la activación constitutiva de NF-kB ha sido ligado al desarrollo y progresión de carcinoma de mama negativo para receptores de estrógenos (RE) (185) pero poca atención se ha prestado a la relación entre la activación de NF-kB y carcinomas de mama positivos para RE (186, 187). Por ello, decidimos analizar los niveles de activación de NF-kB y el tiempo en el cual la paciente permanecía libre de enfermedad en pacientes positivas para RE tratadas con el fármaco antiestrogénico tamoxifeno que tuvieran al menos 5 años de seguimiento.

Al contrario que Zhou et al. (187, 188) que detectaron activación de p65 y p50 en cáncer de mama nosotros no encontramos relación entre altos niveles de p50 activa y recidiva tras la cirugía. Sin embargo, observamos que niveles de activación menores de p52 ($p=0,0375$) y relB (0,0533) estaban relacionados supervivencia libre de enfermedad de la paciente. De hecho la expresión constitutivamente alta de relB ha sido asociada con tumores mamarios más agresivos (189) y mayor crecimiento de tumores de próstata (190). Estos datos sugieren que valores aumentados de la activación de p52 y relB podrían estar relacionados con resistencia endocrina ya sea de novo o adquirida. Consecuentemente podrían ser indicadores del riesgo de recidiva temprana y actuar como factores pronósticos en carcinoma de mama dependiente de estrógenos.

4. Líneas celulares. Cambios en la expresión génica tras el tratamiento con doxorubicina.

Se realizó el perfil funcional de los genes cuya expresión variaba tras el tratamiento con el fármaco doxorubicina mediante el programa ProfCom (164), el cual permite identificar cuales son los complejos funcionales, es decir en que procesos están implicados, los genes de interés. Tras el tratamiento con el fármaco doxorubicina, observamos que aunque entre las líneas celulares SKBR3, MDAMB231 y MCF7 existían diferencias en que genes variaban su expresión, estos se podían agrupar en aquellos asociados con actividades quimocina y citosina, quimotaxis, señalización célula-célula y respuesta inflamatoria que en general se sobre-expresaban y aquellos relacionados con anti-apoptosis y transducción de señales, cuya expresión disminuía. De entre todos los genes cuya expresión variaba tras el tratamiento observamos que en las tres líneas aumentaban *CXCL9*, *IL12B* y *LTA* y disminuían *MYC*, *BCL2L1*, *NF-KBIA* y *TRAF2*. Ya que los cambios en la expresión de estos genes ocurrían en las tres líneas celulares, nos centramos en ellos para la discusión. También seleccionamos *CXCL10* que se sobre-expresaba en SKBR3 y MDAMB231 por su relación con *CXCL9*, *LTA* e *IL12B*, y *EGFR* cuya expresión disminuía en MCF7 y MDAMB231 por su asociación con *MYC*.

La expresión de *CXCL9*, *CXCL10*, *IL12B* y *LTA* está asociada a procesos angiostáticos. *IL12B* es una de las subunidades necesarias para la formación de *IL12*, implicada en procesos antiangiogénicos a través del aumento de interferón gamma que a su vez aumenta la expresión de *CXCL10* (191, 192), asociada a quimiotaxis, inducción de la apoptosis, regulación del crecimiento celular y mediación de la angiogénesis, al igual que *CXCL9*, cuya expresión aparece generalmente ligada a *CXCL10* y asociada a procesos angiostáticos (193, 194). A su vez, *LTA* regula e induce a *CXCL10* (195).

Uno de los mecanismos antitumorales conocidos de la doxorubicina es su capacidad antiangiogénica que ha sido descrita en diversos modelos (196-199) si bien el mecanismo mediante el cual actúa no se conoce. Nuestros datos nos

permiten realizar la hipótesis de que una de las vías que utiliza la doxorubicina para inhibir la angiogénesis está relacionada con el aumento de la expresión de estos cuatro genes (*figura V.1*) todos ellos implicados en su inhibición.

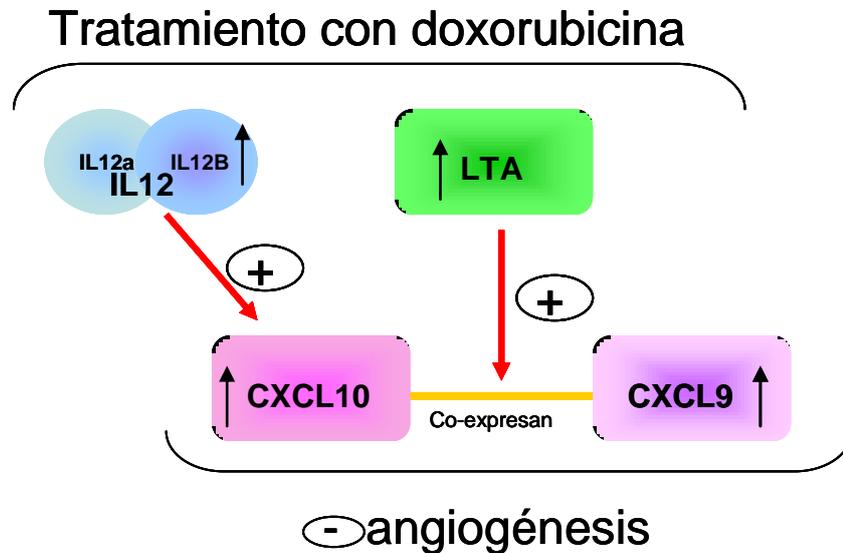


Figura V.1. Posible mecanismo/modelo de acción de la doxorubicina e inactivación de la angiogénesis. Hipótesis

La disminución de *MYC*, *BCL2L1*, *NF-KBIA* y *TRAF2*, por su parte, parece estar relacionada con una disminución del crecimiento celular y la inducción a la apoptosis.

EGFR está asociado con proliferación celular, angiogénesis y movilidad celular (200) y su aumento parece promover el crecimiento en tumores sólidos (201), relacionándose con mal pronóstico en aproximadamente 52% de los casos. Por otra parte, *EGFR* regula *MYC* mediante la activación de las rutas Ras/Raf/MEK/ERK y PI3K-Akt (146) y la doxorubicina es dependiente de *MYC* para lograr su función anti-apoptótica (202). Por otra parte se ha descrito que la doxorubicina produce disminución de los niveles de mRNA de *MYC* en MCF7 a la vez que para el ciclo celular e induce la fragmentación del ADN (203). En nuestro caso, la expresión de *MYC* disminuía en las 3 líneas celulares tras el tratamiento, sin embargo, en *EGFR* solo disminuía en MCF7 y MDAMB231. Esto podría ser debido a que existen otras rutas que regulan *MYC* que no son dependientes de *EGFR*.

Otro de los genes que modificaba su expresión tras el tratamiento con el fármaco, fue el gen regulador de la apoptosis *BCL2L1*. *BCL2L1* tiene dos variantes alternativas de su transcrito, una anti-apoptótica, BCL-xl y otra pro-apoptótica, BCL-xs (204). En nuestro caso, si bien sabemos que la transcripción de *BCL2L1* baja tras el tratamiento, deberíamos realizar nuevos experimentos para determinar cual es la variante alternativa que se está traduciendo o que está variando su cantidad en la célula.

También encontramos que la expresión de *NF-KBIA* (*IKBa*) estaba disminuida tras el tratamiento con doxorubicina. *NF-KBIA* inhibe la actividad de NF-kB uniéndose a él y evitando que se trasloque al núcleo, si bien lo hace de una manera no estable y autorregulada: si NF-kB pasa al núcleo, se une al ADN y activa la transcripción de varios genes, incluido la de *NF-KBIA*, que se une a NF-kB exportándolo de nuevo al citoplasma (205). El heterodímeros al que se une *NF-KBIA* y que regula su transcripción es el p65/p50. Sin embargo, como ya se ha especificado, *NF-KBIA* y NF-kB se autorregulan, por lo que el cambio en la expresión podría deberse a que al tiempo de tratamiento que se seleccionó, NF-kB no está unido o acaba de unirse al ADN y aún no ha aumentado la expresión de *NF-KBIA* o porque está desregulado debido al efecto del fármaco en la célula. En todo caso, *NF-KBIA* se activa por respuesta inmune e inflamatoria y se ha descrito que está disminuido en metástasis de riñón (206), lo que se relacionaría con un aumento de los genes activados por NF-kB.

5. Tejidos. Características de la expresión génica.

Actualmente sabemos que la carcinogénesis es un proceso que consta de varios pasos en los cuales las células normales acumulan alteraciones genéticas hasta transformarse en cancerígenas. Además, Los tumores evolucionan para conseguir el máximo soporte de las células estromales adyacentes que no solo actúan como tejido de sostén sino que participan en la tumorogénesis, contribuyendo al desarrollo y a la expresión de ciertas

capacidades características de los tumores. Por ello la tendencia es no solo estudiar a las células tumorales, sino también su microambiente.

Nuestro conocimiento en las interacciones entre tumor y el microambiente es limitado. Recientemente, en un estudio realizado por microscopía intravital en ratas se ha observado que el microambiente contribuye críticamente a la respuesta a fármacos (207).

En otro estudio (208) se analizó la expresión génica en el estroma asociado a carcinoma ductal infiltrante e in situ. Los resultados sugirieron que el estroma adyacente al tumor coevoluciona con el tejido del tumor incluso antes de que la invasión se produzca.

En otro trabajo de revisión en cáncer de colon se ha descrito que el estroma influencia la iniciación y promoción del cáncer secretando citocinas y factores de crecimiento o expresando distintos receptores (209) lo que afecta al desarrollo del tumor.

Por otra parte, en otro estudio se realizó un perfil de expresión comparando el tejido adyacente al tumor de 34 pacientes con 10 muestras procedentes de reducciones mamarias y no encontraron diferencias significativas entre ambos (210), sin embargo, al tratarse de un estudio de genoma completo y debido a la gran complejidad que presenta el genoma humano, se pudo perder información en el análisis.

Es por esto que en este trabajo no solo hemos estudiado el tejido tumoral respecto a tejido normal, sino que también hemos comparado ambos casos con tejido adyacente no tumoral en busca de información sobre los procesos moleculares que se producen en el microambiente.

5.1. Diferencias en la expresión en tejido mamario.

La selección de los genes se hizo en base a cuales habían variado su expresión en células tras el tratamiento con doxorubicina. Comparamos la

expresión de estos genes en tres grupos: tejido tumoral, tejido adyacente al tumor y tejido normal y observamos la variación de los loci seleccionados. Ya que todas las pacientes fueron tratadas posteriormente con antraciclinas, podemos hipotetizar que estos genes estarán modificados tras la administración del fármaco. La detección de niveles diferentes de los genes seleccionados en muestras tumorales pre-tratamiento podrían predecir la eficacia del fármaco en estas pacientes.

En todo caso, aunque las líneas celulares son ampliamente utilizadas como modelo en investigación, se debe tener en cuenta que se trata de clones de células inmortalizadas cuyo comportamiento es homogéneo, al contrario de lo que ocurre en células tumorales normales, que influyen y a su vez están influenciadas por el microambiente, si bien debido a la dificultad de obtener muestras tanto de metástasis como de tejido post-tratamiento, este ha sido el mejor acercamiento que se ha podido realizar.

5.2. Diferencias en la expresión y posible implicación en el tratamiento.

Encontramos diferencias significativas en la expresión entre tejido tumoral y tejido adyacente al tumor en 7 genes, 4 que aumentaban en tejido tumoral, *CXCL10*, *CXCL9*, *MMP9* y *LTA* y 3 cuya expresión disminuía frente a tejido adyacente, *MYC*, *EGFR* y *MAP2k6*. De entre ellos, *CXCL9* y *MMP9* estaban a su vez significativamente aumentados en tejido tumoral y adyacente frente a tejido normal, mientras *MYC* si bien se expresaba más en tejido tumoral que normal, la mayor expresión se encontraba en tejido adyacente.

Como ya se ha comentado anteriormente, *CXCL10* y *CXCL9* están asociadas a procesos angiostáticos. Sin embargo si bien en general había un aumento significativo de su expresión en tejido tumoral frente a tejido normal y adyacente, ésta no se producía en todos los pacientes debido a la heterogeneidad presente en las muestras. Además, *CXCL9* presentaba diferencias entre tejido normal y adyacente, siendo su expresión menor en tejido normal que en tejido adyacente. Interesantemente, se ha descrito en una muestra de 55 paciente de carcinoma renal que *CXCL10* y *CXCL9* estaban

altamente expresados en tumores que raramente recaían tras la cirugía y que además, sus valores correlacionan inversamente con la densidad de vascularización (211). En otros estudios en cáncer de mama se ha observado que niveles altos de *CXCL9* están asociados con supervivencia libre de enfermedad en pacientes tratadas con CMF (212), si bien en este estudio no contaron con grupo control. También en cáncer de mama se ha descrito que mayor expresión de *CXCL10* y *CXCL9* está asociado con un aumento de la infiltración inmune y una mejora en la supervivencia de las pacientes con tumores sólidos (213). Por otra parte se ha publicado que existe más *CXCL10* en carcinoma infiltrante y CDIS que en tejido normal. Además en las líneas celulares MCF7 y MDAMB435 se observó que *CXCL10* aumentaba activando preferentemente al receptor *CXCR3B* e inhibiendo el crecimiento. Si silenciaban este receptor, *CXCL10* se unía a *CXCR3A* y se activaban señales proliferativas (214). Por otra parte, *CXCL9*, al contrario que *CXCL10*, aparecía aumentado en tejido adyacente respecto a tejido normal de forma significativa. Además, en tejido tumoral la expresión de *CXCL9* era aún mayor. En todo caso se ha descrito que en algunos ocasiones se encuentra la expresión de *CXCL9* aumentada en células endoteliales asociadas al tumor además de en el propio tumor y que esto está relacionado con un mejor pronóstico (213). Por otra parte este aumento de *CXCL9* si bien significativo en conjunto, no ocurriría en todas las pacientes, habiendo algunas con valores bajos tanto de *CXCL9* como de *CXCL10*. Además, la mayor expresión en tejido adyacente podría deberse como ya se ha comentado anteriormente a que el microambiente no solo influye sino que es influido por el tumor. Por otra parte, el tratamiento con doxorubicina podría actuar activando la expresión de estas citocinas y por tanto evitando la angiogénesis y aumentando la respuesta inmune al tumor. En nuestras muestras necesitaríamos un tiempo de seguimiento más amplio para comprobar si existe asociación entre el tratamiento con doxorubicina, niveles de *CXCL10* y *CXCL9* y tiempo libre de enfermedad de la paciente. En todo caso, hipotetizamos que las pacientes que más se beneficiarían de este tratamiento serían aquellas con valores de expresión de *CXCL10* y *CXCL9* más bajos.

Por su parte, la función de la *LTA* en cáncer ha sido poco estudiada y tan solo se ha encontrado asociación entre algunos polimorfismos y mayor probabilidad de padecer carcinoma gástrico (215, 216) y con niveles de esteroides en cáncer de mama (217). En todo caso, se ha descrito que *LTA* está relacionada con *TNF* teniendo funciones similares (218) y que media la respuesta inmune e inflamatoria frente a patógenos (219). Por otra parte, *LTA* regula la actividad de las enzimas que están relacionados con la síntesis de estrógenos y también en el bloqueo de la respuesta proliferativa de MCF7 al estradiol mediante la disminución de receptores de estrógenos (220). Esto podría indicar un doble papel para *LTA* en cáncer. Por un lado, su incremento de expresión produciría un aumento de la respuesta inmune en el tumor, lo que sería positivo en la iniciación del tumor. Sin embargo, por otro lado, al producir disminución en los receptores de estrógenos que son una de las dianas terapéuticas más utilizadas en el tratamiento del cáncer de mama, su expresión tendría un efecto negativo en la progresión del tumor, al menos en las pacientes hormono- dependientes.

Otro de los genes cuya expresión aumentaba en tejido tumoral frente tanto a tejido adyacente como a tejido normal fue *MMP9*. *MMP9* es una metaloproteinasa que degrada la pared celular promoviendo la invasión a la vez que activa factores angiogénicos (221). La expresión alta de *MMP9* está asociada con factores más agresivos y en concordancia con nuestros datos, también está aumentada en tejido estromal, lo que se asocia con peor pronóstico (222). Por otra parte, también se ha propuesto que los niveles de *MMP9* en suero puedan utilizarse como biomarcador para la clasificación de cáncer de mama (223) ya que en plasma aumentan en pacientes de esta enfermedad. Por otra parte, se ha postulado que fármacos inhibidores de *MMP9* en combinación con otros quimioterápicos podrían utilizarse en el tratamiento contra el cáncer (207). Nuestros resultados indican que en tejido normal, los niveles de *MMP9* son bajos, mientras que en tejido adyacente al tumor y en tejido tumoral aumentan muy significativamente, siendo todavía mayores en tejido tumoral. Esto indicaría que el microambiente está implicado de alguna manera en el aumento de la producción de este enzima y que

pacientes con valores altos tienen mayor riesgo de metástasis. Al tratar a las células con doxorubicina, observamos que en 2 de las 3 líneas celulares (MCF7 y MDAMB231) disminuía la expresión de *MMP9*. Este podría ser otro de los mecanismos utilizados por el fármaco para evitar la angiogénesis y la posterior metástasis de las células tumorales. Estos datos también sugieren que una expresión alterada de *MMP9* que mantuviese niveles elevados de esta metaloproteinasa podría causar resistencia al tratamiento con doxorubicina.

MYC es un factor de transcripción que controla la proliferación, el metabolismo, la diferenciación y la apoptosis cuya expresión está normalmente estrictamente regulada (224) y cuya sobre-expresión contribuye a la iniciación del cáncer de mama (225, 226). Sin embargo, se ha descrito que en células cancerígenas su expresión puede estar desregulada y que esto se asocia a mal pronóstico (227, 228). Interesantemente, en nuestro caso observamos que aunque *MYC* está sobre-expresado en tejido tumoral frente al tejido normal, todavía poseía niveles de expresión más altos en el tejido adyacente al tumor, si bien esto no se observaba en todos los casos.

Estos datos sugieren que *MYC* no solo posee una expresión aberrante en la células tumorales sino que también se sobre-expresa en el tejido adyacente, lo que podría ser debido a la capacidad de *MYC* de aumentar su expresión en el microambiente celular. Este tema ha sido recientemente revisado por Whitfield y Soucek (227, 228), que llegaron a la conclusión de que el aumento de *MYC* en el microambiente podría ser una de las muchas funciones fisiológicas que posee *MYC* que actúa como un integrador de los programas intracelulares y extracelulares normales asociados al proceso de organogénesis y regeneración tisular en la célula normal y que se desregula en el caso de células tumorales produciendo el crecimiento del tejido maligno. En otro trabajo (229) se ha descrito que pacientes de cáncer de mama con *MYC* amplificado tienen mejor respuesta al tratamiento con P-FEC y en otro predicen que los tumores que sobre-expresan *MYC* son más sensibles a doxorubicina (202). En nuestro caso, en las líneas celulares tratadas con doxorubicina disminuía la expresión de

MYC, lo que sugiere una actividad inhibidora de este fármaco.

Otro de los genes cuya expresión disminuía en tejido tumoral frente a adyacente y normal fue *EGFR*. *EGFR* es un miembro de la familia de receptores tirosin-cinasa ErbB que se sobre-expresa en 18-35% de cánceres de mama (230). Su sobre-expresión en tumores primarios se ha asociado a mal pronóstico aunque no en todos los estudios se ha encontrado esta asociación. Por otra parte, *EGFR* está asociado con proliferación celular, angiogénesis y movilidad celular (200) y regula a *MYC* mediante la activación de las rutas Ras/Raf/MEK/ERK y PI3K-Akt (146) En nuestro caso, *EGFR* solo aparecía sobre-expresado en 4 muestras tumorales, siendo su expresión baja en tejido normal y adyacente. Según los datos publicados, estas pacientes tendrían un peor pronóstico. Además, el tratamiento con doxorubicina disminuye los niveles de *EGFR* en líneas celulares, lo que sugiere que este fármaco también actúa en las rutas relacionadas con los receptores de tirosina-cinasa, en la que no solo se incluye *EGFR* sino también *HER2*.

Por último, otro gen cuya expresión estaba modificada en el tejido tumoral fue *MAP2k6*. *MAP2k6* es un componente principal de las rutas de señalización de las MAP cinasas actuando como punto de integración entre múltiples señales bioquímicas y cuya función principal es la fosforilación y activación de p38, una proteína cinasa que responde a estrés celular y citocinas y que se ha descrito como supresor de tumores (231, 232), si bien al regular la expresión de mediadores inflamatorios clave como citocinas y proteasas, puede tener cierta actividad pro-tumoral (233). En todo caso, se considera que la ruta *MAP2k6/p38* está generalmente alterada en tumores y que su inactivación provoca la progresión del ciclo celular. Nuestros datos sugieren que la expresión de *MAP2k6* está disminuida en tumores, provocando que la activación de la ruta *MAP2k6/p38* se vea reducida y ayudando a la progresión del ciclo celular en el tejido tumoral.

Por otra parte, la administración de doxorubicina disminuía la expresión de MAP2k6 en las líneas celulares MCF7 y MDAMB231. Esto indicaría que la terapia con doxorubicina modifica de alguna manera su expresión. A pesar de que esto podría indicar una disminución de p38, ésta también se activa por otros mecanismos. Sería necesario un estudio más detallado de la ruta para saber si p38 realmente disminuye o si existen mecanismos compensatorios que evitan que esto ocurra tras el tratamiento.

5.3. Correlaciones en la expresión y clasificación por perfil genómico.

Tras la realización del estudio de correlaciones entre los genes seleccionados observamos que los niveles de *NF-KBIA* aparecían correlacionados con los de *TNF* y los de *CCL5* con *CXCL10* y *CXCL9*.

CCL5, *CXCL10* y *CXCL9* están relacionadas con inflamación y respuesta inmune, ambos procesos íntimamente ligados al cáncer (234). Por otro lado, a pesar de asociarse con inflamación, aún no hemos empezado a entender los mediadores inflamatorios celulares y moleculares que llevan a la carcinogénesis y por qué en algunos casos las células inmunes pueden actuar como pro- o anti-carcinogénicas. En todo caso, parece que la sobreexpresión de estas quimocinas en tumor está asociada a mejor pronóstico. Además, como ya se ha comentado, tanto *CXCL10* como *CCL5* son regulados por LTA (195) y *CXCL9* está íntimamente asociada a *CXCL10*, por lo que su correlación en la expresión podría venir dada por esta relación.

La correlación en la expresión de *TNF* y *NF-KBIA* no ha sido descrita anteriormente en cáncer hasta donde nosotros conocemos. *NF-KBIA* es un inhibidor de la familia de factores de transcripción *NF-kB* y se asocia con la inhibición de la respuesta inflamatoria, mientras que *TNF* es una citocina relacionada con inflamación. Aparentemente su correlación debería ser inversa, sin bien en células de leucemia mielógena humanas (k562) la expresión de ambas se reducía tras el tratamiento con curcumina, (235), aunque no analizaron la correlación.

Por otra parte, tras clasificar a los tejidos de los que disponíamos jerárquicamente en clusters no supervisados según la expresión de los genes estudiados, éstos se organizaban en 3 grupos los cuales concordaban aproximadamente con el tipo de tejido, permitiéndonos distinguir entre tejido tumoral, tejido adyacente y tejido normal. Por otra parte, la expresión de los genes entre tejido tumoral y adyacente se agrupaban en una misma rama, lo que nos indicaría que los genes expresados en ambos tejidos tienen un comportamiento más similar entre ellos que respecto a tejido normal.

5.4. NF- κ B y expresión de genes.

Para comprobar si los niveles de NF- κ B en el núcleo estaban relacionados con la expresión de los genes seleccionados, se realizó una medida semicuantitativa de las distintas subunidades de NF- κ B por inmunohistoquímica. Solo obtuvimos una relación significativa entre localización de p65 en núcleo y aumento de la expresión de LTA. LTA como ya se ha comentado anteriormente está implicado en la respuesta inmune e inflamatoria y su aumento podría ser debido a un mecanismo de defensa celular ya que el tumor no es un sistema cerrado y existen otras células no tumorales a su alrededor. Por otra parte, se ha descrito en múltiples ocasiones que en la iniciación del tumor el proceso de inflamación juega un papel importante.

Debido al bajo número de muestras de las que teníamos información de las 5 subunidades y de expresión, los datos obtenidos no son representativos. En todo caso, los resultados deberán ser validados con un mayor número de muestras para llegar a una conclusión.

6. Perspectivas futuras

En el futuro se pretende aumentar el número de muestras en el estudio de expresión de genes relacionados con la activación de NF- κ B y realizar un análisis según las características clínico-patológicas para validar los resultados

preliminares detectados en muestras tumorales humanas. Además, se pretende aumentar el tiempo de seguimiento lo que nos permitirá analizar si las diferencias detectadas en la expresión de los genes analizados están relacionadas con la evolución de la paciente tras el tratamiento con doxorubicina. También se pretende obtener muestras de pacientes pre- y post-tratamiento apareadas y analizar tanto la activación de NF- κ B como la expresión génica de sus genes diana tras la administración del tratamiento con antraciclinas. Además, estos genes cuya expresión varía tras el tratamiento serían candidatos a intervenir en los procesos de resistencia.

Son necesarios estudios en mayor profundidad de las rutas metabólicas para obtener conclusiones sólidas que permitan predecir la evolución del paciente tras el tratamiento en función de las características moleculares del tumor.

—

VI. CONCLUSIONES

1. El fármaco doxorubicina activa a NF- κ B en líneas celulares derivadas de carcinoma mamario humano y su efecto se revierte mediante la administración del inhibidor MLN20.
2. La actividad de las subunidades p65, p50, p52 y relB de NF- κ B está aumentada en tejido tumoral respecto a tejido normal lo que podría indicar su implicación en el desarrollo del cáncer de mama a través de la regulación de sus genes dianas.
3. La subunidad relB está fuertemente asociada a la progresión tumoral, encontrándose su actividad incrementada en pacientes con ganglios linfáticos positivos, tamaño tumoral mayor e invasión de tejidos adyacentes. Un estudio más profundo sería necesario para determinar si se trata de un posible factor pronóstico de la enfermedad.
4. Nuestros datos sugieren que valores altos de las subunidades p52 y relB están relacionadas con resistencia endocrina, siendo posibles indicadores de recidiva temprana en pacientes de cáncer de mama positivos para receptores de estrógenos.
5. El tratamiento de líneas celulares derivadas de carcinoma mamario con doxorubicina provoca el aumento de genes asociados con actividades quimocina y citocina, señalización célula-célula y respuesta inflamatoria y disminución de genes anti-apoptóticos y transducción de señales.
6. Los genes *CXCL9*, *MMP9* y *MYC* poseen expresión aumentada en tejido adyacente respecto a normal. Esto indicaría una implicación del ambiente en la tumorigénesis contribuyendo al desarrollo y a la expresión de ciertas capacidades tumorales.
7. Los genes expresados diferencialmente entre tejido tumoral y tejido adyacente al tumor están relacionados principalmente con señalización celular y respuesta inflamatoria aquellos que están sobre-expresados (*CXCL10*, *CXCL9*, *LTA* y *MMP9*) y con muerte celular aquellos cuya expresión es menor (*EGFR*, *MAP2k6* y *MYC*).

VII. REFERENCIAS

- 1.Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100: 57-70.
- 2.Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144: 646-74.
- 3.Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 2008;13: 472-82.
- 4.Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 2009;136: 823-37.
- 5.Ullrich E, Bonmort M, Mignot G, Kroemer G, Zitvogel L. Tumor stress, cell death and the ensuing immune response. *Cell Death Differ* 2008;15: 21-8.
- 6.Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012;21: 309-22.
- 7.Ministerio de Sanidad y Consumo, editor. La situación del cáncer en España; 2006.
- 8.Sant M, Francisci, S., Capocaccia, R., Verdecchia, A., Allemani, C., Berrino, F. Time trends of breast cancer survival in Europe in relation to incidence and mortality. *Int J Cancer* 2006;119: 2417-22.
- 9.Dirección General de Salud Pública. Impacto del cáncer en la Comunidad Valenciana. In: Valenciana G, editor. *www.spsangva.es*.
- 10.Kamangar F, Dores, G.M., Anderson, W.F. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. *J Clin Oncol* 2006;24: 2137-50.
- 11.Vidal-Lancis C, Martínez-Sánchez, J.M., Mateos-Mazón, M., Peris-Tuser, M. Mortalidad por cáncer de mama: evolución en España y sus comunidades autónomas durante el período 1980-2005. *Rev Esp Salud Publica* 2010;84.
- 12.Clarke M, Collins, R., Darby, S., Davies, C., Elphinstone, P., Evans, E., Godwin, J., Gray, R., Hicks, C., James, S., MacKinnon, E., McGale, P., McHugh, T., Peto, R., Taylor, C., Wang, Y.; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and on 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet* 2005;366: 2087-106.
- 13.Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group EBCTCG. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet* 2005;365: 1687-717.
- 14.Parker JS, Mullins, M., Cheang, M.C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., Quackenbush, J.F., Stijleman, I.J., Palazzo, J., Marron, J.S., Nobel, A.B., Mardis, E., Nielsen, T.O., Ellis, M.J., Perou, C.M., Bernard, P.S. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009;27: 1153-4.
- 15.Rosen PP. The pathological classification of human mammary carcinoma: past, present and future. *Ann Clin Lab Sci* 1979;9: 144-56.
- 16.Yoder BJ, Wilkinson, E.J., Massoll, N.A. Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast. *Breast J* 2007;13: 172-9.
- 17.Yeatman TJ, Cantor, A.B., Smith, T.J., Smith, S.K., Reintgen, D.S., Miller, M.S., Ku, N.N., Baekey, P.A., Cox, C.E. Tumor biology of infiltrating lobular carcinoma. Implications for management. *Ann Surg* 1995;222: 549-59.
- 18.Harvey JA. Unusual breast cancers: useful clues to expanding the differential diagnosis. *Radiology* 2007;242: 683-94.
- 19.van Bogaert LJ. Recent progress in the histological typing of human breast tumours. *Diagn Histopathol* 1981;4: 349-53.
- 20.Goldhirsch A, Ingle, J.N., Gelber, R.D., Coates, A.S., Thürlimann, B., Senn, H.J.;

Panel members. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Annals of Oncology* 2009;20: 1319-29.

21. Pharoah PD, Dayk, N.E., Duffy, S., Easton, D.F., Ponder, B.A. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 1997;71: 800-9.

22. Featherstone C, Colley, A., Tucker, K., Kirk, J., Barton, M.B. Estimating the referral rate for cancer genetic assessment from a systematic review of the evidence. *Br J Cancer* 2007;96: 391-8.

23. Miki Y, Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W., *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994;266: 66-71.

24. Wooster R, Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., Micklem, G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995;378: 789-92.

25. Antoniou A, Pharoah, P.D., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D.M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., Gronwald, J., Gorski, B., Tulinius, H., Thorlacius, S., Eerola, H., Nevanlinna, H., Syrjäkoski, K., Kallioniemi, O.P., Thompson, D., Evans, C., Peto, J., Lalloo, F., Evans, D.G., Easton, D.F. 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. *Am J Hum Genet* 2003;72: 1117-30.

26. Baer HJ, Brawarsky, P., Murray, M.F., Haas, J.S. Familial Risk of Cancer and Knowledge and Use of Genetic Testing. *J Gen Intern Med* 2010;25: 717-24.

27. Hedenfalk I, Ringner, M., Ben-Dor, A., Yakhini, Z., Chen, Y., Chebil, G., Ach, R., Loman, N., Olsson, H., Meltzer, P., Borg, A., Trent, J. Molecular classification of familial non-BRCA1/BRCA2 breast cancer. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100: 2532-7.

28. Hedenfalk IA, Ringnér, M., Trent, J.M., Borg, A. Gene expression in inherited breast cancer. *Adv Cancer Res* 2002;84: 1-34.

29. Boyle P, Ferlay, J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005;16: 481-8.

30. Nattinger AB. In the clinic. Breast cancer screening and prevention. *Ann Intern Med* 2010;152: ITC41.

31. NHS BSP Publications, editor. Royal College of Radiologists: Quality Assurance Guidelines for Radiologists; 1990.

32. Donegan WL. Tumor-related prognostic factor for breast cancer. *Cancer J Clin* 1997;47: 28-51.

33. Jatoi I, Hilsenbeck, S.G., Clark, G.M., Osborne, C.K. Significance of axillary lymph node metastasis in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17: 2334-40.

34. Yang JH, Slack, N.H., Nemoto, T. Effect of axillary nodal status on the long-term survival following mastectomy for breast carcinoma: Nodal metastases may not always suggest systemic disease. *J Surg Oncol* 1987;36: 243-8.

35. Davis BW, Gelber, R.D., Goldhirsch, A., Hartmann, W.H., Locher, G.W., Reed, R., Golouh, R., Sävve-Söderbergh, J., Holloway, L., Russell, I., *et al.* Prognostic significance of tumor grade in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Cancer* 1986;58: 2662-70.

36. Fisher ER, Anderson, S., Redmond, C., Fisher, B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project Protocol B-06: 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. *Cancer* 1993;71: 2507-14.

37. Bloom HJ, Richardson, W.W. Histologica grading and prognosis in breast cancer A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957;11: 359-77.
38. Henson DE, Ries, L., Freedman, L.S., Carriaga, M. Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. *Cancer* 1991;68: 2142-9.
39. Donegan WL. Prognostic factors: Stage and receptor status in breast cancer. *Cancer* 1992;70: 1755-64.
40. Bos TJ. Oncogenes and cell growth. *Adv Exp Med Biol* 1992;321: 45-9.
41. Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* 2001;3: 385-9.
42. Santin AD, Bellone, S., Roman, J.J., McKenney, J.K., Pecorelli, S. Trastuzumab treatment in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma overexpressing HER2/neu. *Int J Gynaecol Obstet* 2008;102: 128-31.
43. Palazzo A, Iacovelli, R., Cortesi, E. Past, Present and Future of Targeted Therapy in Solid Tumors. *Curr Cancer Drug Targets* 2010;10: 433-61.
44. Subramanian J, Simon, R. What should physicians look for in evaluating prognostic gene-expression signatures? *Nat Rev Clin Oncol* 2010 7: 327-34.
45. Perou CM, Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L., Brown, P.O., Botstein, D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406: 747-52.
46. Muñoz M, Estévez, L.G., Alvarez, I., Fernández, Y., Margelí, M., Tusquets, I., Seguí, M.A., Lluch, A. Evaluation of international treatment guidelines and prognostic tests for the treatment of early breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2008;34: 701-9.
47. Sørlie T, Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C.M., Lønning, P.E., Brown, P.O., Børresen-Dale, A.L., Botstein, D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100: 8418-23.
48. Sørlie T, Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Eystein Lønning, P., Børresen-Dale, A.L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 98: 10869-74.
49. Carey LA, Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M. A., Tse, C. K., Edmiston, S., Deming, S. L., Geradts, J., Cheang, M. C., Nielsen, T. O., Moorman, P. G., Earp, H. S., Millikan, R. C. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 2006;295: 2492-502.
50. Tang P, Skinner, K.A., Hicks, D.G. Molecular classification of breast carcinomas by immunohistochemical analysis: are we ready? *Diagn Mol Pathol* 2009;18: 125-32.
51. Cheang MC, Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S.K., Perou, C.M., Nielsen, T.O. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res* 2008;14: 1368-76.
52. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, *et al.* Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101: 736-50.
53. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, *et al.* Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res* 2008;14: 1368-76.
54. de Snoo F, Bender R, Glas A, Rutgers E. Gene expression profiling: decoding breast

- cancer. *Surg Oncol* 2009;18: 366-78.
- 55.Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet* 2011;378: 1812-23.
- 56.Eroles P, Bosch A, Perez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev* 2012;38: 698-707.
- 57.Bosch A, Eroles, P., Zaragoza, R., Viña, J.R., Lluch, A. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev* 2010;36: 206-15.
- 58.Slamon DJ, Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., Norton, L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344: 783-92.
- 59.Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 2011;5: 5-23.
- 60.Moulder S, Hortobagyi GN. Advances in the treatment of breast cancer. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83: 26-36.
- 61.Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome biology* 2007;8: R76.
- 62.Sotiriou C, Neo, S.Y., McShane, L.M., Korn, E.L., Long, P.M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S.B., Harris, A.L., Liu, E.T. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100: 10393-8.
- 63.Weigelt B, Glas, A.M., Wessels, L.F., Witteveen, A.T., Peterse, J.L., van't Veer, L.J. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100: 15901-5.
- 64.The Steering Committee on Clinical Practice Guidelines for the Care and Treatment of Breast Cancer. *CMAJ* 1998;158.
- 65.Truong PT, Olivotto, I.A., Whelan, T.J., Levine, M; Steering Committee on Clinical Practice Guidelines for the Care and Treatment of Breast Cancer. Clinical practice guidelines for the care and treatment of breast cancer: 16. Locoregional post-mastectomy radiotherapy. *CMAJ* 2004;170: 1263-73.
- 66.Markiewicz DA, Schultz, D.J., Haas, J.A., Harris, E.E., Fox, K.R., Glick, J.H., Solin, L.J. The effects of sequence and type of chemotherapy and radiation therapy on cosmesis and complications after breast conservation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;35: 661-8.
- 67.Papac RJ, Wood, D.A. Current concepts of cancer chemotherapy. *Calif Med* 1962;96: 420-5.
- 68.Ward JH. Duration of adjuvant endocrine therapy of breast cancer: how much is enough? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010;22: 51-5.
- 69.Cardoso F, Bedard, P.L., Winer, E.P., Pagan, O., Senkus-Konefka, E., Fallowfield, L.J., Kyriakides, S., Costa, A., Cufer, T., Albain, K.S.; ESO-MBC Task Force. International guidelines for management of metastatic breast cancer: combination vs sequential single-agent chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2009;101: 1174-81.
- 70.Mauri D, Pavlidis, N., Ioannidis, J.P. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2005;97: 188-94.
- 71.Specht J, Galow, J.R. Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Semin Radiat Oncol* 2009;19: 222-8.
- 72.Mathew J, Asgeirsson, K.S., Jackson, L.R., Cheung, K.L., Robertson, J.F. Neoadjuvant endocrine treatment in primary breast cancer - review of literature. *Breast*

- 2009;18: 339-44.
- 73.Mayer EL, Burstein, H.J. Chemotherapy for metastatic breast cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007;21: 257-72.
- 74.Chia SK, Speers, C.H., D'yachkova, Y., Kang, A., Malfair-Taylor, S., Barnett, J., Coldman, A., Gelmon, K.A., O'reilly, S.E., Olivotto, I.A. The impact of new chemotherapeutic and hormone agents on survival in a population-based cohort of women with metastatic breast cancer. *Cancer* 2007;110: 973-9.
- 75.Pagani O, Senkus, E., Wood, W., Colleoni, M., Cufer, T., Kyriakides, S., Costa, A., Winer, E.P., Cardoso, F.; ESO-MBC Task Force. International guidelines for management of metastatic breast cancer: can metastatic breast cancer be cured? *J Natl Cancer Inst* 2010;102: 456-63.
- 76.Launchbury AP, Habboubi, N. Epirubicin and doxorubicin: a comparison of their characteristics, therapeutic activity and toxicity. *Cancer Treat Rev* 1993;19: 197-228.
- 77.Leonard RC, Williams, S., Tulpule, A., Levine, A.M., Oliveros, S. Improving the therapeutic index of anthracycline chemotherapy: focus on liposomal doxorubicin (Myocet). *Breast* 2009;18: 218-24.
- 78.Cutts SM, Nudelman, A., Rephaeli, A., Phillips, D.R. The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB Life* 2005;57: 73-81.
- 79.Saffi J, Agnoletto, M.H., Guecheva, T.N., Batista, L.F., Carvalho, H., Henriques, J.A., Stary, A., Menck, C.F., Sarasin, A.. Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XPD-mutated DNA repair-deficient human cells. *DNA Repair (Amst)* 2010;9: 40-7.
- 80.Cullinane C, Phillips, D.R. Induction of stable transcriptional blockage sites by adriamycin: GpC specificity of apparent adriamycin-DNA adducts and dependence on iron(III) ions. *Biochemistry* 1990;29: 5638-46.
- 81.Burden DA, Osheroff, N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1998;1400: 139-54.
- 82.Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999;57: 727-41.
- 83.Gluck S. Adjuvant chemotherapy for early breast cancer: optimal use of epirubicin. *Oncologist* 2005;10: 780-91.
- 84.Bria E, Nistico, C., Cuppone, F., Carlini, P., Ciccarese, M., Milella, M., Natoli, G., Terzoli, E., Cognetti, F., Giannarelli, D. Benefit of taxanes as adjuvant chemotherapy for early breast cancer: pooled analysis of 15,500 patients. *Cancer* 2006;106: 2337-1344.
- 85.Lønning PE. Evolution of endocrine adjuvant therapy for early breast cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2010;19: S19-S30.
- 86.Stuart-Harris R, Davis, A. Optimal adjuvant endocrine therapy for early breast cancer. *Womens Health (Lond Engl)* 2010;6: 383-98.
- 87.Riggs BL, Hartmann, L.C. Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med* 2003;348: 618-29.
- 88.Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group. Thürlimann B, Keshaviah, A., Coates, A.S., Mouridsen, H., Mauriac, L., Forbes, J.F., Paridaens, R., Castiglione-Gertsch, M., Gelber, R.D., Rabaglio, M., Smith, I., Wardley, A., Price, K.N., Goldhirsch, A. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353: 2747-57.
- 89.Sehdev S, Martin, G., Sideris, L., Lam, W., Brisson, S. Safety of adjuvant endocrine therapies in hormone receptor-positive early breast cancer. *Curr Oncol* 2009;16: S14-23.
- 90.Lønning PE. Aromatase inhibitors and inactivators for breast cancer treatment. *Eur J Cancer* 2002;38: S47-S8.

91. Verma S, Sehdev, S., Joy, A., Madarnas, Y., Younus, J., Roy, J.A. An updated review on the efficacy of adjuvant endocrine therapies in hormone receptor- positive early breast cancer. *Curr Oncol* 2009;16: S1-S13.
92. Hackshaw A. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists in the treatment of breast cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2009;10: 2633-9.
93. Utsumi T, Kobayashi, N., Hanada, H. Recent perspectives of endocrine therapy for breast cancer. *Breast Cancer* 2007;14: 194-9.
94. Gligorov J, Azria, D., Namer, M., Khayat, D., Spano, J.P. Novel therapeutic strategies combining antihormonal and biological targeted therapies in breast cancer: focus on clinical trials and perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;64: 115-28.
95. Slamon D, Eiermann W, Robert N, *et al.* Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2011;365: 1273-83.
96. Chien AJ, Moasser, M.M. Cellular mechanisms of resistance to anthracyclines and taxanes in cancer: intrinsic and acquired. *Semin Oncol* 2008;2: S1-S14.
97. Longley DB, Johnston, P.G. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 2005;205: 275-92.
98. Moreno-Aspitia A, Perez, E.A. Anthracycline- and/or taxane-resistant breast cancer: results of a literature review to determine the clinical challenges and current treatment trends. *Clin Ther* 2009;31: 1619-40.
99. Hanahan D, Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100: 57-70.
100. Djeu JY, Wei, S. Clusterin and chemoresistance. *Adv Cancer Res* 2009;109: 77-92.
101. LaPensee EW, Ben-Jonathan, N. Novel roles of prolactin and estrogens in breast cancer: resistance to chemotherapy. *Endocr Relat Cancer* 2010;17: R91-107.
102. Scata KA, El-Deiry, W.S. p53, BRCA1 and breast Cancer chemoresistance. *Adv Exp Med Biol* 2007: 70-86.
103. Chen W, Li Z, Bai L, Lin Y. NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target. *Front Biosci* 2011;16: 1172-85.
104. Eberle KE, Sansing HA, Szaniszló P, Resto VA, Berrier AL. Carcinoma matrix controls resistance to cisplatin through talin regulation of NF-kB. *PLoS One* 2011;6: e21496.
105. Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 2003;22: 3138-51.
106. Zhang W, Ding W, Chen Y, *et al.* Up-regulation of breast cancer resistance protein plays a role in HER2-mediated chemoresistance through PI3K/Akt and nuclear factor-kappa B signaling pathways in MCF7 breast cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2011;43: 647-53.
107. Fuchs O. Transcription factor NF-kappaB inhibitors as single therapeutic agents or in combination with classical chemotherapeutic agents for the treatment of hematologic malignancies. *Curr Mol Pharmacol* 2010;3: 98-122.
108. Sakamoto K, Maeda S. Targeting NF-kappaB for colorectal cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14: 593-601.
109. Mercurio F, Zhu H, Murray BW, *et al.* IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I kappa B kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 1997;278: 860-6.
110. Israel A. Signal transduction. I kappa B kinase all zipped up. *Nature* 1997;388: 519-21.
111. Jo H, Zhang R, Zhang H, *et al.* NF-kappa B is required for H-ras oncogene induced abnormal cell proliferation and tumorigenesis. *Oncogene* 2000;19: 841-9.
112. Sen R, Baltimore, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986 Aug 29;46(5):705-16 1986;46: 705-16.
113. Morisato D, Anderson, K.V. Signaling pathways that establish the dorsal-ventral

- pattern of the *Drosophila* embryo. *Annu Rev Genet* 1995;29.
114. Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14: 649-83.
115. Ghosh S, Karin, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002;109: S81-S96.
116. Hayden MS, Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008;132: 344-62.
117. Perkins ND, Gilmore, T.D. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ* 2006;13: 759-72.
118. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18: 6853-66.
119. Lawrence T, Fong, C. The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42: 519-23.
120. Li X, Stark, G.R. NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 2002;30: 285-96.
121. Das KC, White, C.W. Activation of NF-kappaB by antineoplastic agents. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 1997;272: 14914-20.
122. McDonald PP, Russo, M.P., Ferrini, S., Cassatella, M.A. Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. *Blood* 1998;92: 4828-35.
123. Hazan U, Thomas, D., Alcamì, J., Bachelier, F., Israel, N., Yssel, H., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F. Stimulation of a human T-cell clone with anti-CD3 or tumor necrosis factor induces NF-kappa B translocation but not human immunodeficiency virus 1 enhancer-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 7861-5.
124. Osborn L, Kunkel, S., Nabel, G.J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86: 2336-40.
125. Shen BJ, Chang, C.J., Lee, H.S., Tsai, W.H., Miao, L.H., Lee, S.C. Transcriptional induction of the *agp/ebp (c/ebp beta)* gene by hepatocyte growth factor. *DNA Cell Biol* 1997;16: 703-11.
126. Wood JN. Regulation of NF-kappa B activity in rat dorsal root ganglia and PC12 cells by tumour necrosis factor and nerve growth factor. *Neurosci Lett* 1995;192: 41-4.
127. Bertrand F, Philippe, C., Antoine, P.J., Baud, L., Groyer, A., Capeau, J., Cherqui, G. Insulin activates nuclear factor kappa B in mammalian cells through a Raf-1-mediated pathway. *J Biol Chem* 1995;270: 24435-41.
128. Lin TH, Rosales, C., Mondal, K., Bolen, J. B., Haskill, S., Juliano, R. L. Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic cells. A possible signaling role for the Syk tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1995;270: 16189-97.
129. Kaltschmidt C, Kaltschmidt, B., Baeuerle, P.A. Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF-kappa B in primary neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92: 9618-22.
130. Münzenmaier A, Lange, C., Glocker, E., Covacci, A., Moran, A., Bereswill, S., Baeuerle, P.A., Kist, M., Pahl, H.L. A secreted/shed product of *Helicobacter pylori* activates transcription factor nuclear factor-kappa B. *J Immunol* 1997;159: 6140-7.
131. Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol* 2009;44: 239-48.
132. Zhang Y, Broser, M., Rom, W.N. Activation of the interleukin 6 gene by *Mycobacterium tuberculosis* or lipopolysaccharide is mediated by nuclear factors NF-IL6 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91: 2225-9.

- 133.Naumann M, Wessler, S., Bartsch, C., Wieland, B., Meyer, T.F. Neisseria gonorrhoeae epithelial cell interaction leads to the activation of the transcription factors nuclear factor kappaB and activator protein 1 and the induction of inflammatory cytokines. *J Exp Med* 1997;186: 247-58.
- 134.Schreck R, Rieber, P., Baeuerle, P.A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991;10: 2247-58.
- 135.Haddad EB, Salmon, M., Koto, H., Barnes, P.J., Adcock, I., Chung, K.F. Ozone induction of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) and nuclear factor-kappa b in rat lung: inhibition by corticosteroids. *FEBS Lett* 1996;379: 265-8.
- 136.Goebeler M, Roth, J., Bröcker, E.B., Sorg, C., Schulze-Osthoff, K. Activation of nuclear factor-kappa B and gene expression in human endothelial cells by the common haptens nickel and cobalt. *J Immunol* 1995;155: 2459-67.
- 137.Ramesh GT, Manna, S.K., Aggarwal, B.B., Jadhav, A.L. Lead activates nuclear transcription factor-kappaB, activator protein-1, and amino-terminal c-Jun kinase in pheochromocytoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;155: 280-6.
- 138.Kim HJ, Hawke, N., Baldwin, A.S. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ* 2006;13: 738-47.
- 139.Shen HM, Tergaonkar, V. NFkappaB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. *Apoptosis* 2009;14: 348-63.
- 140.Amiri KI, Richmond, A. Role of nuclear factor-kappa B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24: 301-13.
- 141.Huber MA, Azoitei, N., Baumann, B., Grünert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., Wirth, T. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 2004;114: 569-81.
- 142.Min J, Zaslavsky, A., Fedele, G., McLaughlin, S.K., Reczek, E.E., De Raedt, T., Guney, I., Strohlic, D.E., Macconail, L.E., Beroukhim, R., Bronson, R.T., Ryeom, S., Hahn, W.C., Loda, M., Cichowski, K. An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor-kappaB. *Nat Med* 2010;16: 286-94.
- 143.Trimboli AJ, Fukino K, de Bruin A, *et al.* Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res* 2008;68: 937-45.
- 144.Wolfer A, Ramaswamy S. Prognostic signatures, cancer metastasis and MYC. *Cell Cycle* 2010;9: 3639.
- 145.Wolfer A, Wittner BS, Irimia D, *et al.* MYC regulation of a "poor-prognosis" metastatic cancer cell state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107: 3698-703.
- 146.Xu J, Chen Y, Olopade OI. MYC and Breast Cancer. *Genes Cancer* 2010;1: 629-40.
- 147.Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004;25: 280-8.
- 148.Karin M, Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18.
- 149.Scheidereit C. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 2006;25: 6685-705.
- 150.Amir RE, Haecker, H., Karin, M., Ciechanover, A.,. Mechanism of processing of the NF-kappa B2 p100 precursor: identification of the specific polyubiquitin chain-anchoring lysine residue and analysis of the role of NEDD8-modification on the SCF(beta-TrCP) ubiquitin ligase. *Oncogene* 2004;23: 2540-7.
- 151.Vallabhapurapu S, Karin, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009;27: 693-733.

- 152.Kanarek N, London N, Schueler-Furman O, Ben-Neriah Y. Ubiquitination and degradation of the inhibitors of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2: a000166.
- 153.Weil R, Whiteside, S.T., Israël, A. Control of NF-kappa B activity by the I kappa B beta inhibitor. *Immunobiology* 1997;198: 14-23.
- 154.Whiteside ST, Israël, A. I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol* 1997;8: 75-82.
- 155.Li Z, Nabel, G.J. A new member of the I kappaB protein family, I kappaB epsilon, inhibits RelA (p65)-mediated NF-kappaB transcription. *Mol Cell Biol* 1997;17: 6184-90.
- 156.Whiteside ST, Epinat, J.C., Rice, N.R., Israël, A. I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kB activity. *EMBO J* 1997;16: 1413-26.
- 157.Suyang H, Phillips, R., Douglas, I., Ghosh, S. Role of unphosphorylated, newly synthesized I kappa B beta in persistent activation of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 1996;16: 5444-9.
- 158.Thompson JE, Phillips, R.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Ghosh, S. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* 1995;80: 573-82.
- 159.Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 2006;25: 6717-30.
- 160.Wan F, Anderson, D.E., Barnitz, R.A., Snow, A., Bidere, N., Zheng, L., Hegde, V., Lam, L.T., Staudt, L.M., Levens, D., Deutsch, W.A., Lenardo, M.J. Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation. *Cell* 2007;131: 927-39.
- 161.Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;7: 248-54.
- 162.Stavrum AK, Petersen K, Jonassen I, Dysvik B. Analysis of gene-expression data using J-Express. *Curr Protoc Bioinformatics* 2008;Chapter 7: Unit 7 3.
- 163.Dysvik B, Jonassen I. J-Express: exploring gene expression data using Java. *Bioinformatics* 2001;17: 369-70.
- 164.Antonov AV, Schmidt T, Wang Y, Mewes HW. ProfCom: a web tool for profiling the complex functionality of gene groups identified from high-throughput data. *Nucleic Acids Res* 2008;36: W347-51.
- 165.El-Yazigi A, Berry J, Ezzat A, Wahab FA. Effect of tamoxifen on the pharmacokinetics of doxorubicin in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Ther Drug Monit* 1997;19: 632-6.
- 166.Kurebayashi J, Nukatsuka M, Nagase H, *et al.* Additive antitumor effect of concurrent treatment of 4-hydroxy tamoxifen with 5-fluorouracil but not with doxorubicin in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;59: 515-25.
- 167.Kurebayashi J, Nukatsuka M, Sonoo H, Uchida J, Kiniwa M. Preclinical rationale for combined use of endocrine therapy and 5-fluorouracil but neither doxorubicin nor paclitaxel in the treatment of endocrine-responsive breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;65: 219-25.
- 168.Park J, Kanayama A, Yamamoto K, Miyamoto Y. ARD1 binding to RIP1 mediates doxorubicin-induced NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;422: 291-7.
- 169.Tapia MA, Gonzalez-Navarrete I, Dalmases A, *et al.* Inhibition of the canonical IKK/NF kappa B pathway sensitizes human cancer cells to doxorubicin. *Cell Cycle*

2007;6: 2284-92.

170.Andreeff M, Goodrich DW, Pardee AB. Cell Proliferation, Differentiation, and Apoptosis. In: Bast RC Jr KD, Pollock RE, et al., editors, editor. Holland-Frei Cancer Medicine. 5th edition ed: BC Decker; 2000.

171.Bednarski BK, Ding X, Coombe K, Baldwin AS, Kim HJ. Active roles for inhibitory kappaB kinases alpha and beta in nuclear factor-kappaB-mediated chemoresistance to doxorubicin. *Mol Cancer Ther* 2008;7: 1827-35.

172.Ashikawa K, Shishodia S, Fokt I, Priebe W, Aggarwal BB. Evidence that activation of nuclear factor-kappaB is essential for the cytotoxic effects of doxorubicin and its analogues. *Biochem Pharmacol* 2004;67: 353-64.

173.Bednarski BK, Baldwin AS, Jr., Kim HJ. Addressing reported pro-apoptotic functions of NF-kappaB: targeted inhibition of canonical NF-kappaB enhances the apoptotic effects of doxorubicin. *PLoS One* 2009;4: e6992.

174.Campbell KJ, Rocha S, Perkins ND. Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF-kappa B. *Mol Cell* 2004;13: 853-65.

175.Ho WC, Dickson KM, Barker PA. Nuclear factor-kappaB induced by doxorubicin is deficient in phosphorylation and acetylation and represses nuclear factor-kappaB-dependent transcription in cancer cells. *Cancer Res* 2005;65: 4273-81.

176.Aggarwal BB, Sung B. NF-kappaB in Cancer: A Matter of Life and Death. *Cancer Discov* 2011;1: 469-71.

177.Cogswell PC, Guttridge DC, Funkhouser WK, Baldwin AS, Jr. Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene* 2000;19: 1123-31.

178.Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999;5: 119-27.

179.Sasaki N, Morisaki T, Hashizume K, *et al.* Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. *Clin Cancer Res* 2001;7: 4136-42.

180.Kojima M, Morisaki T, Sasaki N, *et al.* Increased nuclear factor-kB activation in human colorectal carcinoma and its correlation with tumor progression. *Anticancer Res* 2004;24: 675-81.

181.Duan J, Friedman J, Nottingham L, Chen Z, Ara G, Van Waes C. Nuclear factor-kappaB p65 small interfering RNA or proteasome inhibitor bortezomib sensitizes head and neck squamous cell carcinomas to classic histone deacetylase inhibitors and novel histone deacetylase inhibitor PXD101. *Mol Cancer Ther* 2007;6: 37-50.

182.Wang CY, Mayo, M.W., Baldwin, A.S. Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996;274: 784-7.

183.Cai C, Jiang FN, Liang YX, *et al.* Classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: a comparison among normal prostate, benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Pathol Oncol Res* 2011;17: 873-8.

184.Shukla S, MacLennan GT, Fu P, *et al.* Nuclear factor-kappaB/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression. *Neoplasia* 2004;6: 390-400.

185.Cao Y, Karin M. NF-kappaB in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003;8: 215-23.

186.Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ, Jr., Sledge GW, Jr. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol* 1997;17: 3629-39.

187.Zhou Y, Eppenberger-Castori S, Marx C, *et al.* Activation of nuclear factor-kappaB

- (NFkappaB) identifies a high-risk subset of hormone-dependent breast cancers. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37: 1130-44.
- 188.Zhou Y, Eppenberger-Castori S, Eppenberger U, Benz CC. The NFkappaB pathway and endocrine-resistant breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12 Suppl 1: S37-46.
- 189.Mineva ND, Wang X, Yang S, *et al.* Inhibition of RelB by 1,25-dihydroxyvitamin D3 promotes sensitivity of breast cancer cells to radiation. *J Cell Physiol* 2009;220: 593-9.
- 190.Xu Y, Jossen S, Fang F, *et al.* RelB enhances prostate cancer growth: implications for the role of the nuclear factor-kappaB alternative pathway in tumorigenicity. *Cancer Res* 2009;69: 3267-71.
- 191.Kanegane C, Sgadari C, Kanegane H, *et al.* Contribution of the CXC chemokines IP-10 and Mig to the antitumor effects of IL-12. *J Leukoc Biol* 1998;64: 384-92.
- 192.Tannenbaum CS, Tubbs R, Armstrong D, Finke JH, Bukowski RM, Hamilton TA. The CXC chemokines IP-10 and Mig are necessary for IL-12-mediated regression of the mouse RENCA tumor. *J Immunol* 1998;161: 927-32.
- 193.Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, *et al.* CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000;68: 1-8.
- 194.Strieter RM, Belperio JA, Phillips RJ, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Semin Cancer Biol* 2004;14: 195-200.
- 195.Wolf MJ, Seleznik GM, Heikenwalder M. Lymphotoxin's link to carcinogenesis: friend or foe? from lymphoid neogenesis to hepatocellular carcinoma and prostate cancer. *Adv Exp Med Biol* 2011;691: 231-49.
- 196.Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Hoffman RM. Chemotherapy targets the hair-follicle vascular network but not the stem cells. *J Invest Dermatol* 2007;127: 11-5.
- 197.Huang C, Zhang X, Ramil JM, *et al.* Juvenile exposure to anthracyclines impairs cardiac progenitor cell function and vascularization resulting in greater susceptibility to stress-induced myocardial injury in adult mice. *Circulation* 2010;121: 675-83.
- 198.Maragoudakis ME, Peristeris P, Missirlis E, Aletras A, Andriopoulou P, Haralabopoulos G. Inhibition of angiogenesis by anthracyclines and titanocene dichloride. *Ann N Y Acad Sci* 1994;732: 280-93.
- 199.Zhang L, Yu D, Hicklin DJ, Hannay JA, Ellis LM, Pollock RE. Combined anti-fetal liver kinase 1 monoclonal antibody and continuous low-dose doxorubicin inhibits angiogenesis and growth of human soft tissue sarcoma xenografts by induction of endothelial cell apoptosis. *Cancer Res* 2002;62: 2034-42.
- 200.Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5: 341-54.
- 201.Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001;37 Suppl 4: S9-15.
- 202.Grassilli E, Ballabeni A, Maellaro E, Del Bello B, Helin K. Loss of MYC confers resistance to doxorubicin-induced apoptosis by preventing the activation of multiple serine protease- and caspase-mediated pathways. *J Biol Chem* 2004;279: 21318-26.
- 203.Fornari FA, Jr., Jarvis WD, Grant S, *et al.* Induction of differentiation and growth arrest associated with nascent (nonoligosomal) DNA fragmentation and reduced c-myc expression in MCF-7 human breast tumor cells after continuous exposure to a sublethal concentration of doxorubicin. *Cell Growth Differ* 1994;5: 723-33.
- 204.Marone M, Scambia G, Mozzetti S, *et al.* bcl-2, bax, bcl-XL, and bcl-XS expression in normal and neoplastic ovarian tissues. *Clin Cancer Res* 1998;4: 517-24.
- 205.O'Connor S, Shumway S, Miyamoto S. Inhibition of IkappaBalpha nuclear export as an approach to abrogate nuclear factor-kappaB-dependent cancer cell survival. *Mol Cancer Res* 2005;3: 42-9.

- 206.Sanjmyatav J, Steiner T, Wunderlich H, Diegmann J, Gajda M, Junker K. A specific gene expression signature characterizes metastatic potential in clear cell renal cell carcinoma. *J Urol*;186: 289-94.
- 207.Nakasone ES, Askautrud HA, Kees T, *et al.* Imaging tumor-stroma interactions during chemotherapy reveals contributions of the microenvironment to resistance. *Cancer Cell* 2012;21: 488-503.
- 208.Ma XJ, Dahiya S, Richardson E, Erlander M, Sgroi DC. Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 2009;11: R7.
- 209.Gout S, Huot J. Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer Microenviron* 2008;1: 69-83.
- 210.Finak G, Sadekova S, Pepin F, *et al.* Gene expression signatures of morphologically normal breast tissue identify basal-like tumors. *Breast Cancer Res* 2006;8: R58.
- 211.Kondo T, Ito F, Nakazawa H, Horita S, Osaka Y, Toma H. High expression of chemokine gene as a favorable prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol* 2004;171: 2171-5.
- 212.Specht K, Harbeck N, Smida J, *et al.* Expression profiling identifies genes that predict recurrence of breast cancer after adjuvant CMF-based chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2009;118: 45-56.
- 213.Bronger H, Kraeft S, Schwarz-Boeger U, *et al.* Modulation of CXCR3 ligand secretion by prostaglandin E2 and cyclooxygenase inhibitors in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 2012;14: R30.
- 214.Datta D, Flaxenburg JA, Laxmanan S, *et al.* Ras-induced modulation of CXCL10 and its receptor splice variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 cells: relevance for the development of human breast cancer. *Cancer Res* 2006;66: 9509-18.
- 215.Lu R, Dou X, Gao X, Zhang J, Ni J, Guo L. A functional polymorphism of lymphotoxin-alpha (LTA) gene rs909253 is associated with gastric cancer risk in an Asian population. *Cancer Epidemiol* 2012.
- 216.Suzuki G, Cullings H, Fujiwara S, *et al.* LTA 252GG and GA genotypes are associated with diffuse-type noncardia gastric cancer risk in the Japanese population. *Helicobacter* 2009;14: 571-9.
- 217.Kamali-Sarvestani E, Gharesi-Fard B, Sarvari J, Talei AA. Association of TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphism with steroid receptor expression in breast cancer patients. *Pathol Oncol Res* 2005;11: 99-102.
- 218.Ware CF. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu Rev Immunol* 2005;23: 787-819.
- 219.Schneider K, Potter KG, Ware CF. Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes. *Immunol Rev* 2004;202: 49-66.
- 220.Danforth DN, Jr., Sgagias MK. Tumour necrosis factor-alpha modulates oestradiol responsiveness of MCF-7 breast cancer cells in vitro. *J Endocrinol* 1993;138: 517-28.
- 221.Chabottaux V, Noel A. Breast cancer progression: insights into multifaceted matrix metalloproteinases. *Clin Exp Metastasis* 2007;24: 647-56.
- 222.Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004;10: 7621-8.
- 223.Somiari SB, Somiari RI, Heckman CM, *et al.* Circulating MMP2 and MMP9 in breast cancer -- potential role in classification of patients into low risk, high risk, benign disease and breast cancer categories. *Int J Cancer* 2006;119: 1403-11.
- 224.Albihn A, Johnsen JI, Henriksson MA. MYC in oncogenesis and as a target for

- cancer therapies. *Adv Cancer Res* 2010;107: 163-224.
- 225.Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999;19: 1-11.
- 226.Dang CV, Resar LM, Emison E, *et al.* Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp Cell Res* 1999;253: 63-77.
- 227.Lonn U, Lonn S, Nilsson B, Stenkvist B. Prognostic value of erb-B2 and myc amplification in breast cancer imprints. *Cancer* 1995;75: 2681-7.
- 228.Whitfield JR, Soucek L. Tumor microenvironment: becoming sick of Myc. *Cell Mol Life Sci* 2012;69: 931-4.
- 229.Yasojima H, Shimomura A, Naoi Y, *et al.* Association between c-myc amplification and pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Eur J Cancer* 2011;47: 1779-88.
- 230.Foley J, Nickerson NK, Nam S, *et al.* EGFR signaling in breast cancer: bad to the bone. *Semin Cell Dev Biol* 2010;21: 951-60.
- 231.Bradham C, McClay DR. p38 MAPK in development and cancer. *Cell Cycle* 2006;5: 824-8.
- 232.Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, *et al.* Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev* 2003;17: 1969-78.
- 233.Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 2009;9: 537-49.
- 234.Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009;30: 1073-81.
- 235.Reuter S, Charlet J, Juncker T, Teiten MH, Dicato M, Diederich M. Effect of curcumin on nuclear factor kappaB signaling pathways in human chronic myelogenous K562 leukemia cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1171: 436-47.

VIII. ANEXOS

Anexo I. Hoja de información al paciente.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado:

“ESTUDIO DEL VALOR PREDICTIVO DE NF-KappaB EN CÁNCER DE MAMA TRATADO CON ANTRACICLINAS Y DE LA SENSIBILIZACIÓN A ANTRACICLINAS MEDIANTE INHIBICIÓN DE NF-Kappa B” que está siendo realizado por la Dra. Ana Lluch Hernández, en el Servicio de Hematología y Oncología Médica y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Antecedentes:

El tratamiento con antraciclinas en cáncer de mama es uno de los más habituales. A pesar de su eficacia todavía hay casos donde se presentan resistencias.

El factor de transcripción NF-Kappa B puede estar relacionado con estas resistencias al tratamiento. Estudiar este factor puede ayudarnos a conocer mejor los mecanismos de actuación del fármaco y predecir la respuesta de la paciente tras el tratamiento, de tal forma que se puedan buscar alternativas terapéuticas para aquellas que presentan una respuesta desfavorable.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

El objetivo del estudio intenta conocer previo al tratamiento cómo las pacientes responderán, para buscar en el futuro alternativas terapéuticas más adecuadas para aquellas pacientes que presentan una respuesta desfavorable.

¿Por qué se le ha pedido que participe?

Se le pide su participación en este estudio ya que ha sido diagnosticada de cáncer de mama y tiene que ser sometida a cirugía.

¿En qué consiste su participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se le realizarán?

Se le solicita permiso para utilizar con fines científicos parte del material biológico que se le extraerá durante la intervención quirúrgica a la que se la va a someter.

La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del tratamiento que este llevando (si lo tiene) y todo tratamiento que se le pueda poner a partir de los estudios clínico-bioquímicos que se le realicen será siempre bajo criterio médico.

¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio?

No se provee ningún riesgo adicional para usted ya que utilizaremos para el estudio una pequeña parte del tejido que le fue extraído durante el procedimiento quirúrgico.

¿Cuáles son los beneficios de la participación en este estudio?

Es muy posible que los resultados obtenidos en esta investigación tengan poco valor diagnóstico o predictivo para usted, pero podrá ayudar a conocer mejor su enfermedad y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

¿Qué pasará si decido no participar en este estudio?

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decida no participar en el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de su enfermedad realicen ni su médico ni el resto del personal sanitario que se ocupa de su enfermedad. Así mismo, podrá retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

Si hay extracción de sangre hay que indicar: El riesgo previsible de su participación únicamente será el mínimo riesgo que conlleva la extracción de una muestra de sangre, que incluye molestias, dolor, enrojecimiento e hinchazón y/o pequeños hematomas en el lugar del brazo donde se ha producido la extracción.

¿A quién puedo preguntar en caso de duda?

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para su participación.

Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, el Dra. Ana Lluch Hernández en el teléfono 963862600 extensión 61993.

Confidencialidad:

Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con su enfermedad serán tratados con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Así mismo, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los pacientes que han colaborado en esta investigación.

Tal y como contempla la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal, podrá ejercer su derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio.

¿Qué pasará con las muestras biológicas obtenidas durante la investigación?

Durante su participación en este estudio, se le extraerá una muestra de tejido tumoral. Esta muestra será siempre utilizada con fines científicos, pudiéndose utilizar si usted así lo autoriza en el marco de otros proyectos de investigación que tengan como objetivo el estudio de su enfermedad y que previamente hayan sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital.

Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto:

“ESTUDIO DEL VALOR PREDICTIVO DE NF-KappaB EN CÁNCER DE MAMA TRATADO CON ANTRACICLINAS Y DE LA SENSIBILIZACIÓN A ANTRACICLINAS MEDIANTE INHIBICIÓN DE NF-Kappa B”

Investigador Principal: Dra. Ana Lluch Hernández

Servicio de Hematología y Oncología Médica/ Fundación para la Investigación Hospital Clínico Valencia

Yo, _____, he sido informado por el Dr. _____, colaborador del proyecto de investigación arriba mencionado, y declaro que:

- He leído la Hoja de Información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas
- He recibido suficiente información sobre el estudio

Comprendo que mi participación es voluntaria

Comprendo que todos mis datos serán tratados confidencialmente

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Autorizo a que las muestras obtenidas durante el proyecto de investigación sean utilizadas con fines científicos en otros proyectos de investigación que tengan por objeto el estudio de mi enfermedad y que hayan sido aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia Sí No

Quiero que se me pida autorización previa para utilizar mis muestras biológicas para futuros proyectos de investigación Sí No

Con esto doy mi conformidad para participar en este estudio,

Firma del paciente:Firma del Investigador:

Fecha:Fecha

Anexo 2. Tabla genes del “Human NF- κ B signaling Targets RT² Profiler PCR Array”

Posición	Unigene	GeneBank	Símbolo	Descripción
A01	Hs.441047	NM_001124	ADM	Adrenomedullin
A02	Hs.19383	NM_000029	AGT	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
A03	Hs.525622	NM_005163	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
A04	Hs.499886	NM_000382	ALDH3A2	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2
A05	Hs.227817	NM_004049	BCL2A1	BCL2-related protein A1
A06	Hs.516966	NM_138578	BCL2L1	BCL2-like 1
A07	Hs.696238	NM_001166	BIRC2	Baculoviral IAP repeat containing 2
A08	Hs.127799	NM_001165	BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3
A09	Hs.529053	NM_000064	C3	Complement component 3
A10	Hs.54460	NM_002986	CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11
A11	Hs.303649	NM_002982	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
A12	Hs.534347	NM_002990	CCL22	Chemokine (C-C motif) ligand 22
B01	Hs.514821	NM_002985	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
B02	Hs.523852	NM_053056	CCND1	Cyclin D1
B03	Hs.450802	NM_000579	CCR5	Chemokine (C-C motif) receptor 5
B04	Hs.472860	NM_001250	CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
B05	Hs.208854	NM_001781	CD69	CD69 molecule
B06	Hs.838	NM_005191	CD80	CD80 molecule
B07	Hs.595133	NM_004233	CD83	CD83 molecule
B08	Hs.370771	NM_000389	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
B09	Hs.69771	NM_001710	CFB	Complement factor B
B10	Hs.591402	NM_000757	CSF1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)
B11	Hs.1349	NM_000758	CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
B12	Hs.592192	NM_000395	CSF2RB	Colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)
C01	Hs.2233	NM_000759	CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
C02	Hs.789	NM_001511	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
C03	Hs.632586	NM_001565	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
C04	Hs.590921	NM_002089	CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
C05	Hs.77367	NM_002416	CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
C06	Hs.488293	NM_005228	EGFR	Epidermal growth factor receptor
C07	Hs.1395	NM_000399	EGR2	Early growth response 2
C08	Hs.62192	NM_001993	F3	Coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)
C09	Hs.654450	NM_000132	F8	Coagulation factor VIII, procoagulant component
C10	Hs.244139	NM_000043	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
C11	Hs.2007	NM_000639	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
C12	Hs.110571	NM_015675	GADD45B	Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
D01	Hs.643447	NM_000201	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
D02	Hs.93177	NM_002176	IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast
D03	Hs.856	NM_000619	IFNG	Interferon, gamma
D04	Hs.674	NM_002187	IL12B	Interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)
D05	Hs.654378	NM_000585	IL15	Interleukin 15
D06	Hs.1722	NM_000575	IL1A	Interleukin 1, alpha
D07	Hs.126256	NM_000576	IL1B	Interleukin 1, beta
D08	Hs.25333	NM_004633	IL1R2	Interleukin 1 receptor, type II
D09	Hs.81134	NM_000577	IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonist
D10	Hs.89679	NM_000586	IL2	Interleukin 2
D11	Hs.231367	NM_000417	IL2RA	Interleukin 2 receptor, alpha
D12	Hs.73917	NM_000589	IL4	Interleukin 4
E01	Hs.654458	NM_000600	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
E02	Hs.624	NM_000584	IL8	Interleukin 8
E03	Hs.654579	NM_000207	INS	Insulin
E04	Hs.436061	NM_002198	IRF1	Interferon regulatory factor 1
E05	Hs.36	NM_000595	LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)

Posición	Unigene	GeneBank	Símbolo	Descripción
E06	Hs.376208	NM_002341	LTB	Lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
E07	Hs.463978	NM_002758	MAP2K6	Mitogen-activated protein kinase kinase 6
E08	Hs.297413	NM_004994	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
E09	Hs.202453	NM_002467	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
E10	Hs.82116	NM_002468	MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
E11	Hs.592142	NM_181659	NCOA3	Nuclear receptor coactivator 3
E12	Hs.654408	NM_003998	NF-KB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
F01	Hs.73090	NM_002502	NF-KB2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)
F02	Hs.81328	NM_020529	NF-KBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
F03	Hs.406515	NM_000903	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
F04	Hs.563344	NM_006186	NR4A2	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2
F05	Hs.1976	NM_002608	PDGFB	Platelet-derived growth factor beta polypeptide
F06	Hs.77274	NM_002658	PLAU	Plasminogen activator, urokinase
F07	Hs.196384	NM_000963	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
F08	Hs.631886	NM_002908	REL	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)
F09	Hs.502875	NM_021975	RELA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
F10	Hs.654402	NM_006509	RELB	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B
F11	Hs.89546	NM_000450	SELE	Selectin E
F12	Hs.73800	NM_003005	SELP	Selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)
G01	Hs.167317	NM_003081	SNAP25	Synaptosomal-associated protein, 25kDa
G02	Hs.487046	NM_000636	SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial
G03	Hs.642990	NM_007315	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
G04	Hs.463059	NM_003150	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
G05	Hs.595276	NM_012448	STAT5B	Signal transducer and activator of transcription 5B
G06	Hs.241570	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor
G07	Hs.256278	NM_001066	TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
G08	Hs.478275	NM_003810	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
G09	Hs.654481	NM_000546	TP53	Tumor protein p53
G10	Hs.522506	NM_021138	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
G11	Hs.109225	NM_001078	VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1
G12	Hs.356076	NM_001167	XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
H01	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta
H02	Hs.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	Hs.592355	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	Hs.546285	NM_001002	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	N/A	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control