



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Facultad de Biología

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de doctorado: Biotecnología

**Nuevos métodos de detección de metástasis en
corteza ovárica criopreservada de pacientes con
cáncer de mama**

Tesis Doctoral presentada por:

Beatriz Rodríguez Iglesias

Dirigida por:

Prof. Dr. Antonio Pellicer Martínez

Dra. Edurne Novella Maestre

Dra. Sonia Herraiz Raya

Valencia, 2014

Profesor Dr. Antonio Pellicer Martínez, Catedrático del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Dra. Edurne Novella Maestre, doctora por la Universidad de Valencia en el Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina.

Dra. Sonia Herraiz Raya, doctora por la Universidad de Valencia en el Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada "Nuevos métodos de detección de metástasis en corteza ovárica criopreservada de pacientes con cáncer de mama", ha sido realizada íntegramente por Dña. Beatriz Rodríguez Iglesias bajo nuestra supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia 4 de Diciembre, 2014



Prof. Dr. Antonio Pellicer Martínez Dra. Edurne Novella Maestre Dra. Sonia Herraiz Raya

A Santi, el mejor regalo
que me hicieron mis padres

Agradecimientos

Llega el momento de escribir la parte más emotiva de todo este trabajo, de agradecer a todas las personas que hicieron posible que esta gran etapa se culminase. Llegar al punto de escribir una tesis y todo el esfuerzo que esto conlleva, antes y durante este proceso, sería imposible sin el apoyo y la ayuda tanto profesional como personal de las personas que tienes a tu alrededor.

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis, el Profesor Antonio Pellicer, por darme la oportunidad de poder formar parte de su equipo, trabajar a su lado es un gran prestigio que me otorga, es un sueño profesional cumplido. Alavo su dedicación a la ciencia y a los pacientes, su perseverancia y su continua inquietud por la ciencia. Gracias por involucrarse en cada paso que hemos dado es esta investigación y por enseñarme todo lo que estuvo en sus manos para que todo saliese lo mejor posible. Me ha enseñado a ser profesional en el trabajo y despertar la curiosidad científica en muchas ocasiones. Es un ejemplo de que con trabajo, constancia y dedicación se puede conseguir todo lo que uno se proponga.

A Edurne Novella, co-directora de esta tesis doctoral. Gracias por hacer posible que este trabajo culminase. Fuimos un buen tándem de trabajo. Gracias por enseñarme tantas y tantas cosas. Por despertar mi inquietud científica y que cualquier tema que podamos abordar para estudiarlo, parezca fácil y posible. Eres un ejemplo de dedicación exhaustiva a la ciencia, inviertes tu tiempo libre en que la ciencia avance. Gracias por enseñarme todo lo que estuvo en tus manos y hacer que cada día me supere un poco más.

A Sonia Herraiz, co-directora de esta tesis doctoral, gracias por enseñarme cómo se trabaja en ciencia y por haberme transmitido todos los conocimientos necesarios para que los experimentos surgiesen con éxito. Gracias por tu ayuda inestimable para que hoy pueda estar escribiendo este texto. Por enseñarme a luchar por lo que queremos.

A las pacientes que participaron en este proyecto. Ellas sí que son el ejemplo de fuerza y lucha en la vida. Son el ejemplo de valorar lo realmente importante. Por ellas vale la pena todo el esfuerzo y todas las horas invertidas en investigación. A todas y cada una de ellas, que siempre están dispuestas a aportar su granito de arena para que la ciencia avance, aún cuando lo único que podrían pensar en esos momentos era en ser fuertes para ellas mismas.

A todo el equipo de Preservación de la Fertilidad del Hospital la Fe, un gran equipo que lucha por dar esperanza y posibilidades a cada paciente. Todos aportan sus medios y energía para que podamos hacer proyectos de investigación como éste. Especialmente me gustaría agradecer a los ginecólogos, Chema, César, Mónica y Patri, que llevan la parte quirúrgica de este proyecto, sin este primer paso no podríamos hacer nada. A César por involucrarse tan plenamente en la investigación y ayudarme en todo lo que hizo falta. En especial a María Sánchez, pionera de esta línea de investigación. A Sonia Lozano, por ayudarme en la recogida de las muestras y estar disponible para cualquier cosa que necesitase.

Me gustaría agradecer al Dr. Carlos Simón, por acogerme cuando lo necesité en los laboratorios de la fundación IVI para hacer cualquier experimento y consultar cualquier duda que me surgió por este camino de fondo. Gracias por creer en mí y darme una oportunidad tan prestigiosa como formar parte de su equipo.

Al laboratorio de Anatomía patológica del Clínico, Alejo, Bruno, María José Lauri... por enseñarme todo lo que sabéis sobre inmunohistoquímica, hacerme las tardes de inmunos más amenas y por todos los buenos momentos que nos llevamos.

A Ana y Viviana, las veterinarias que me ayudaron con todo el trabajo experimental con animales, ellas han conseguido que pueda trabajar con ratoncitos sin miedo, aunque siempre con respecto. Me habéis enseñado cada paso a seguir en la experimentación animal, que no es nada fácil. También me gustaría agradecer a todo el equipo del animalario de Centro de Investigación Príncipe Felipe, por hacer posible que realicemos nuestros experimentos en sus instalaciones con total seguridad de que los animales están bien cuidados y atendidos.

A todas mis compis y amigas de laboratorio, Carmen, Jessica, Horten, Mercedes, Arantxa y Lucía. Conoceros y coincidir con todas y cada una de vosotras ha sido una virtud del destino. Poco a poco se fue afianzando nuestra confianza y pasamos de ser compañeras de trabajo a ser mucho más que eso. Todas las horas que hemos pasado juntas entre las paredes de un laboratorio, con sus momentos de desesperación, de agobios, de lloros, pero con muchos y apreciados momentos de risas, cantos, alegría y buenos ratos que nunca se borrarán. Sin vosotras no sería lo mismo haber hecho una tesis. Vuestro apoyo en cada momento con cada experimento nuevo o técnica que queríamos aprender ha sido la base para que todo, finalmente, se consiguiera. Carmen, nos conocimos ya hace unos cuantos años, poco a poco nos hicimos grandes amigas, sé que estás ahí siempre para lo que necesite. Das ese punto de alegría y ternura que se necesita. Gracias por estar siempre pendiente de que esté bien, eres más que una amiga, los das todo por todos. Horten eres esa persona que da fuerza, eres ejemplo de lucha y continuidad por lo que uno quiere. Gracias por enseñarme y estar ahí para lo que necesitase. Mercedes, siempre dispuesta a ayudarme cuando lo necesité, buena compañera y profesional, espero que pronto consigas lo que te mereces y puedas trabajar en clínica, porque vales mucho. Jessi trajiste al laboratorio esa ternura y ganas de aprender cosas nuevas, nos das ese toque de niñez que todos necesitamos. Arantxa, la peque, eres una de las personas más cariñosas que conozco, siempre tienes un abrazo y un cariño para quien realmente te importa, gracias por hacerme sentir en ese grupo de personas, eres

la dulzura hecha persona. Eres una gran amiga, estaré para lo que me necesites siempre.

Lucía, mi gemela, uña y carne, inseparables. Te convertiste en el todo en poco tiempo de conocerte, la persona con la que más congenio. Eres esas personas que todo el mundo quiere tener cerca. Eres una de las cosas por las que ha merecido la pena mi aventura aquel día que decidí dejar mi tierra, lo mejor que me llevo, sin duda. Mi pilar valenciano.

A todos mis compañeros de la fundación IVI, siempre dispuestos a ayudar y sacar un hueco de donde fuera para explicarme lo que necesitara. Especialmente mis agradecimientos a Sebas que tanto me ayudó en la elaboración de algunos de los experimentos, siempre dispuesto a colaborar y enseñarme lo que hiciese falta. A Amparo, Ali, Paco e Irene, por vuestra ayuda cuando empecé en esta embergadura de la tesis y ayudarme en lo que estaba en vuestras manos.

A todos mis compis y amigos de Igenomix, en especial al “feliz CGT-PCR Team”, Julio, Ana, Pere, Jsn, Mje, Vicente, Mila, Lucía y Trini. Sin vuestros ánimos y apoyo tanto en el laboratorio como en lo personal no podría terminar con la tesis. Habéis hecho que coja energía y fuerzas para cerrar este capítulo. Sois increíbles, amigos, una gran familia!!. Por todos esos buenos momentos que compartimos y nuestras cenas que acaban cerrando bares, estos son las buenas sensaciones de la vida. Siempre estáis dispuestos a ayudar y hacer lo posible para que me pudiera marchar a ver a los ratoncitos o a terminar experimentos interminables tantas y tantas tardes. Es un gran privilegio poder formar parte de este equipo, un sueño cumplido. Somos un gran grupo inseparable! Julio, gracias por confiar en mí desde el primer momento y darme la flexibilidad y confianza necesaria para que hoy escriba estas líneas. Estar en tu equipo es un privilegio y espero poder trabajar a tu lado siempre.

A mis compis de mi antiguo laboratorio de Vigo, Andrés, Alejandro, Sandra, Javi y Basti, ellos me llevaron de la mano en mis primeros pasos por el laboratorio, hicieron que me interesase por la ciencia y que empezase a coger ilusión y ganas por ella. Sois el principio de esta aventura.

A mis amigos galeguíños Nuria, Vero, Jose, Moa, Lorenita, Fany, Moi, Noe y Julia. Aunque vivamos a kilómetros de distancia, nada cambia cuando nos vemos, todo sigue igual y cuando nos necesitamos sabemos que una llamada de teléfono es suficiente, y no hace falta explicar nada más, la complicidad de tantas cosas vividas en tanto tiempo no se diluye fácilmente. A July y Noe, mis “hermanas”, dos de los pilares de mi vida. Esas amigas que siempre te van a decir las cosas como las piensan y siempre con un consejo reconfortante para seguir luchando. Dando fuerzas para seguir con este trabajo de fondo y no abandonar en los momentos difíciles. Por mucha tierra y agua que nos separe nunca cambiará nada, las tres para todo siempre.

A todos mis amigos valencianos, a Carol, Roci, Jose, Soraya, Manu. Aunque no están relacionados con la ciencia, siempre aportan energía y una visión diferente para que no nos volvamos científicos locos, que solo piensan en genes y moléculas. Por aportar vuestro granito de arena en distraerme y dar fuerzas para seguir.

A Marcos, mi “compañero de batalla” tanto tiempo. Siempre me apoyaste en cualquier decisión, dándome la fuerza necesaria para seguir hacia delante y no abandonar, cómplice de tantas cosas. Luchamos juntos en el principio de esta andaina y parte de este trabajo también es gracias a ti.

A toda mi familia, a mis abuelos, mis tíos, mis primos, y en especial a mis padres y mi hermano, todos juntos sois el gran motor para que todo funcione y vaya hacia delante. Siempre todos para todos, una piña difícil de separar. Sois un gran tesoro, lo mejor que tengo. Cada uno de vosotros me enseñasteis lo que

realmente importa en la vida, me inculcasteis los valores que hoy son la base de mí. A mis abuelas, con su energía positiva para todo, me enseñasteis la humildad, a lo importante que es querernos y ser buenos con los demás. Que el esfuerzo es la base de que se pueda conseguir cualquier cosa. Siempre pendientes de todos y de que todos estemos bien. A mis abuelos que son esas estrellas que me cuidan y protegen allá donde estén. A mis padres, sin vuestra ayuda sería todo imposible, nos dáis la energía, fuerza y apoyo para que cualquier reto que nos propongamos se pueda hacer realidad y luchemos por lo que queremos. Somos como somos por vosotros. Este trabajo también es vuestro. Aunque sé que es duro para todos estar tan lejos, siempre sentí vuestro apoyo para que me fuera y luchase por lo que quería, un esfuerzo de todos que trae su recompensa. A Santi, no recuerdo mi vida sin él, apareció a mi lado un día y se convirtió en imprescindible desde el primer momento. Desde pequeños no podíamos estar el uno sin el otro, y hoy sigue siendo así. Sabemos que al más mínimo problema nos tenemos para todo. Cada vez que nos dicen “es que sois iguales” me llena un sentimiento de orgullo indescriptible.

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) y en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe gracias a la ayuda asignada por el Ministerio de Educación de Formación de profesorado Universitario (FPU) con referencia AP2010-0675.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	XVII
I.- INTRODUCCIÓN	1
1.- Cáncer de mama	3
1.1.- Definición.....	3
1.2.- Epidemiología.....	3
1.3.- Factores de riesgo en el desarrollo del CM.....	5
1.3.1.- Agregación familiar y predisposición familiar.....	5
1.3.2.- Factores hormonales.....	6
1.3.3.- Factores ambientales.....	6
1.4.- Clasificación.....	7
1.4.1.- Clasificación histopatológica.....	7
1.4.1.1- Carcinoma In Situ o Estadio 0.....	7
1.4.1.2- Carcinoma Infiltrante o Invasivo.....	8
1.4.2.- Clasificación molecular.....	8
2.- Biología del crecimiento y diseminación tumoral	9
2.1.- Cinética del crecimiento tumoral.....	10
2.2.- Angiogénesis tumoral.....	10
2.3.- Progresión tumoral.....	11
2.4.- Mecanismos de invasión y metástasis.....	11
3.- Efecto de los tratamientos oncológicos en la fertilidad	13
3.1.- Tratamientos gonadotóxicos.....	16
3.1.1.- Efecto de la quimioterapia.....	16
3.1.2.- Efecto de la radioterapia.....	18
3.2.- Fallo Ovárico Precoz.....	18
3.2.1.- Determinación de FSH y Estradiol.....	19
3.2.2.- Determinación de inhibinas.....	21

3.2.3.- Determinación de la Hormona Antimülleriana.....	21
4.- Preservación de la Fertilidad en pacientes oncológicas.....	23
4.1.- Análogos de hormona liberadora de gonadotropina.....	24
4.2.- Transposición quirúrgica de los ovarios.....	25
4.3.- Criopreservación de embriones.....	26
4.4.- Criopreservación de ovocitos inmaduros y maduros.....	28
4.5.- Criopreservación de tejido ovárico.....	29
5.- Riesgo de contaminación en el tejido ovárico con células malignas.....	33
6.- Métodos para excluir metástasis ovárica. Seguridad del trasplante de tejido ovárico.....	37
6.1.- Métodos moleculares.....	38
6.1.1.- "Gross Cystic Disease Fluid Protein-15" (<i>GCDFP15</i>).....	38
6.1.2.- Mamaglobina 1 (<i>MGB1</i>).....	40
6.1.3.- "Small Breast Epithelial Mucin-1 (<i>SBEM</i>).....	41
6.1.4.- Mucina 1 (<i>MUC1</i>).....	42
6.1.5.- "NY breast Cancer antigen -1 " (<i>NY-BR-01</i>).....	44
6.1.6.- Antígeno tumoral de Wilms (<i>WT-1</i>).....	45
II.- HIPÓTESIS.....	49
III.- OBJETIVOS.....	53
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
1.- Selección de pacientes y recogida de muestras.....	59
1.1.- Protocolo de extracción de tejido ovárico.....	60
2.- Estudios moleculares.....	64
2.1.- Extracción de ARNm.....	64
2.1.1.- Extracción de ARNm de muestras incluidas en parafina.	64

2.1.2.- Extracción de ARNm de tejido en fresco.....	65
2.2.- Análisis de la concentración e integridad del ARN.....	65
2.3.- Retrotranscripción.....	66
2.3.1.- Retrotranscripción de ARN obtenido de muestras en parafina.....	66
2.3.2.- Retrotranscripción de ARN obtenido de muestras en fresco.....	67
2.4.- PCR cuantitativa a tiempo real.....	68
3.- Estudios histopatológicos.....	73
3.1.- Fijación.....	73
3.2.- Lavado.....	73
3.3.- Aclaramiento o diafanización.....	74
3.4.- Inclusión.....	74
3.5.- Corte.....	75
3.6.- Tinción y Montaje.....	75
4.- Estudios inmunohistoquímicos.....	76
4.1.- Marcadores moleculares analizados.....	76
4.2.- Procesamiento de las muestras.....	78
4.3.- Inmunohistoquímica.....	78
4.4.- Observación y análisis.....	79
5.- Ensayo de invasión celular in vitro.....	80
5.1.-Preparación de las muestras de tejido ovárico.....	80
5.1.1.- Descongelación de tejido ovárico.....	80
5.1.2.- Disgregación de tejido ovárico.....	81
5.1.3.- Cultivo celular.....	81
5.2.- Cultivo de las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468....	82
5.2.1.- Congelación de células tumorales MDA-MB-231 y MDA-MB-468.....	83
5.3.- Ensayo de invasión celular.....	83

6.- Modelo experimental in vivo.....	86
5.1.-Preparación de las muestras de tejido ovárico.....	86
6.1.1.- Descongelación de tejido ovárico.....	86
6.1.2.- Disgregación del tejido ovárico.....	86
6.1.3.- Cultivo celular.....	87
6.1.4.- Marcaje celular.....	87
6.2.-Cultivo de la línea celular.....	91
6.3.- Modelo animal.....	91
6.3.1.- Cirugía.....	92
6.3.2.- Monitorización de las células inyectadas en los ratones..	94
6.3.3.- Análisis de la invasión metastática post-mortem.....	95
7.-Análisis estadístico.....	95
V.- RESULTADOS.....	99
1.- Desarrollo del test diagnóstico de marcadores moleculares.....	101
1.1.- Estudio de expresión génica en muestras de ovario sano.....	101
1.2.- Estudio de expresión génica en muestras de tumor primario de cáncer de mama.....	103
1.3.- Estudio de expresión génica en muestras de corteza ovárica con metástasis confirmada.....	106
1.4.- Estudio de expresión génica en muestras de metástasis confirmada en otros tejidos.....	109
1.5.- Selección de marcadores para el test diagnóstico.....	112
1.5.1.- Cálculo de la especificidad y sensibilidad de los marcadores seleccionados mediante curvas ROC.....	113
1.5.2.- Valoración de los marcadores moleculares seleccionados para el test diagnóstico.....	114
1.6.- Estudio inmunohistoquímico del test diagnóstico.....	115

1.6.1.- Estudio inmunohistoquímico de GCDFP15.....	115
1.6.2.- Estudio inmunohistoquímico de MGB1.....	116
1.6.3.- Estudio inmunohistoquímico de SBEM.....	116
1.6.4.- Estudio inmunohistoquímico de WT-1.....	117
1.7.- Estudio comparativo de la expresión génica y proteica de los marcadores seleccionados para el test diagnóstico.....	118
2.- Análisis de tejido ovárico de pacientes de Preservación de la Fertilidad.....	119
2.1.- Estudio de expresión génica mediante técnicas moleculares...	119
2.2.- Estudio morfológico e inmunohistoquímico de las muestras de tejido ovárico de pacientes de Preservación de la Fertilidad.....	121
3.- Ensayo de invasión celular in vitro.....	122
4.- Modelo in vivo.....	123
4.1.- Monitorización de las células inyectadas en los ratones.....	123
4.2.- Comprobación macroscópica del daño tisular post-mortem.....	126
4.3.- Estudio de expresión génica.....	127
4.4.- Estudio morfológico e inmunohistoquímico.....	127
4.4.1.- Controles de inmunohistoquímica.....	128
4.4.2.- Estudio inmunohistoquímico de ratones controles.....	129
4.4.3.- Estudio inmunohistoquímico de ratón con células de corteza y médula ovárica.....	132
VI.- DISCUSIÓN.....	137
VII.- CONCLUSIONES.....	153
VIII.- BIBLIOGRAFÍA.....	157

ABREVIATURAS

AC: Adriamicina (doxorubicina) y Ciclofosfamida

ACD: Adriamicina (doxorubicina), Ciclofosfamida y Docetaxel

AC-t/D: Adriamicina (doxorubicina), Ciclofosfamida y Taxol/Docetaxel

ACT: Adriamicina (doxorubicina), Ciclofosfamida y Taxol

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico Complementario

AMH: Hormona Antimülleriana (en inglés “Antimüllerian Hormone”)

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero

CDI: Carcinoma Ductal Infiltrante

CDIS: Carcinoma Ductal In Situ

CIS: Carcinoma In Situ

CLIS: Carcinoma Lobular In Situ

CM Cáncer de Mama

CMF: Ciclofosfamida, Metotrexato y Fluorouracilo

CO: Corteza Ovárica

CO₂: Dióxido de Carbono

Ct: Ciclo umbral (en inglés “*cycle threshold*”)

DEPC: Dietilpirocarbonato

DMEM/F-12: Medio Eagle Modificado Dulbecco (en inglés “Dulbecco's Modified Eagle's Medium”)

DMSO: Dimetilsulfóxido

dNTPs: Dioxinucleótidos Trifosfato

E: Estrógeno

E₂: Estradiol

EDTA: Etilendiamino Tetracético

F: Fungizona

FAC: Fluorouracilo, Adriamicina (doxorubicina), y Ciclofosfamida

FACT: Fluorouracilo, Adriamicina (doxorubicina), Ciclofosfamida y Taxol

FAM: Carboxi-Fluoresceina

FEC: Fluorouracilo, Epirubicino y Ciclofosfamida

FIV: Fecundación In Vitro

FOP: Fallo Ovárico Precoz

FSH: Hormona Folículo Estimulante (en inglés “Follicle-Stimulating Hormone”)

GCDFP15: (en inglés “Gross Cystic Disease Fluid Protein-15”)

GnRH: Hormona Liberadora de Gonadotropina (en inglés “Gonadotropin-Releasing Hormone”)

Gy: Gray

HSA: Suero Albúmina Humana (en inglés "Human Serum Albumin")

IHQ: Inmunohistoquímica

IVIS: Sistema de Imagen In Vivo (en inglés "In Vivo Imaging System")

LH: Hormona Luteinizante (en inglés "Luteinizing Hormone")

LL: Leucemia Linfoblástica

LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda

LM: Leucemia Mielode

LMC: Leucemia Mielode Crónica

M1: Metástasis

MGB1: Mamaglobina de tipo 1

MGB2: Mamaglobina de tipo 2

MIV: Maduración In Vitro

MMLV: Leucemia Murina de Moloney (en inglés "Moloney Murine Leukemia Virus")

MO: Médula Ovárica

MUC1: Mucina 1

N₂: Nitrógeno Líquido

NS: No Significativo

NY-BR-01: (en inglés "NY Breast Cancer Antigen -1")

O₂: Oxígeno

Ov. sano control: Ovario Sano Control

PBS: Tampón Fosfato Salino (en inglés "Phosphate Buffered Saline")

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (en inglés "Polymerase Chain Reaction")

PF: Preservación de la Fertilidad

P: Progesterona

P-S: Penicilina-Streptomycin (en inglés "Penicillin-Streptomycin")

QT: Quimioterapia

RE: Receptor de Estrógeno

r.p.m.: Revoluciones Por Minuto

RT: Radioterapia

RT-qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa a Tiempo Real (en inglés "Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction")

SBEM: (en inglés "Small Breast Epithelial Mucin-1")

SBF: Suero Bovino Fetal

SPF: Área de Bioseguridad Libre de Patógenos (en inglés "Specific Pathogen Free")

TA: Temperatura Ambiente

WT-1: Antígeno Tumoral de Wilms (en inglés "Wilms Tumor")

RESUMEN

En la actualidad, se está produciendo un aumento de las tasas de supervivencia en determinadas formas de cáncer que se considera que afectan principalmente a niños y personas jóvenes, como las neoplasias hematológicas y ciertos tipos de tumores sólidos. El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en mujeres en edad reproductiva y en muchos casos no han cumplido con su proyecto reproductivo.

El tratamiento con dosis altas de quimioterapia y/o radioterapia en pacientes de sexo femenino puede generar efectos deletéreos sobre el ovario. La dotación folicular puede ser destruida, lo que se asocia a un fallo ovárico precoz y la pérdida de la fertilidad. El grado de gonadotoxicidad varía entre los diferentes grupos de fármacos quimioterápicos, siendo los agentes alquilantes los que conllevan mayor riesgo de insuficiencia ovárica. Las mujeres que sobreviven buscan una mejor calidad de vida y evitar los efectos secundarios de la terapia antineoplásica. Uno de estos efectos es la gonatotoxicidad que cursa con esterilidad secundaria. Debido a ello, se han desarrollado los programas de preservación de la fertilidad en pacientes oncológicas. En la actualidad, existen varias opciones para la preservación de la fertilidad en estas pacientes, como la criopreservación de ovocitos, de embriones o de tejido ovárico. Aunque éste último todavía se considera en fase experimental, el número total de mujeres con fallo ovárico precoz inducido por el tratamiento en las que se ha llevado a cabo un ortotrasplante de su tejido ovárico criopreservado es cada vez mayor, superando los 60 casos publicados en Europa. Además, hasta la fecha, se han publicado un total de 30 recién nacidos vivos como resultado de un ortotrasplante de tejido ovárico. Sin embargo, el embarazo no es la única indicación para el ortotrasplante, la restauración de la secreción cíclica ovárica de esteroides y el retorno de la menstruación conlleva a un aumento de la calidad de vida, siempre y cuando el tejido ovárico criopreservado y trasplantado siga siendo funcional.

Uno de los inconvenientes del ortotrasplante de tejido ovárico es el riesgo de reintroducir células malignas con el tejido trasplantado. Por este motivo nuestro grupo realizó un trabajo pionero en la detección de metástasis ocultas en este tejido ovárico criopreservado en pacientes con cáncer de mama, con el objetivo de descartar la presencia de células malignas en el momento del trasplante mediante una metodología clásica. Sin embargo, estudios recientes en pacientes con leucemia han demostrado que la detección de células malignas es mucho más eficiente con técnicas de biología molecular, ya que se ha observado discrepancias entre los resultados obtenidos mediante histología y métodos moleculares. Es necesario su uso para comprobar si el cáncer de mama es metastásico en el ovario, tal y como ocurre con las leucemias y evaluar si el reimplante es un procedimiento seguro.

Por ello, nos hemos planteado incrementar la seguridad del ortotrasplante en pacientes con cáncer de mama, por ser la patología más frecuente en nuestro programa de preservación de la fertilidad, mediante métodos moleculares de expresión génica y modelo animal, además de los estudios inmunohistoquímicos clásicos.

En primer lugar hemos buscado un panel de marcadores moleculares lo suficientemente específico y sensible para detectar el mayor porcentaje de micrometástasis oculta en tejido ovárico. Para ello hemos utilizado 13 muestras de metástasis confirmada de pacientes con cáncer de mama y 10 muestras sanas. Se han analizado diferentes genes específicos de cáncer de mama y metástasis, de los cuales se ha establecido el panel diagnóstico que consistió en los marcadores moleculares *GCDFP15*, *MGB1* y *SBEM*, con los que se obtuvo una especificidad del 100% y una sensibilidad de más de 90%. Todas las pacientes de nuestro Programa de Preservación de la Fertilidad estudiadas (N=60) no expresaron ninguno de los genes incorporados en el test diagnóstico establecido ni en la corteza ovárica ni en su médula ovárica. Además 5 muestras celulares de corteza ovárica y 4 de médula ovárica fueron envaluadas mediante ensayos in vitro de

invasión, dando como resultado una ausencia de procesos invasivos in vitro. Por otro lado, 5 muestras celulares de corteza ovárica y 5 de médula ovárica de estas pacientes se inyectaron en ratones inmunodeprimidos y ninguno de ellos presentó signos tumorigénicos ni progresión celular. Por lo que se asume que el tejido está libre de enfermedad metastática y el ortotrasplante es seguro. Estos resultados corroboran los estudios previos mediante técnicas tradicionales histológicas de que el trasplante de tejido ovárico en pacientes con cáncer de mama es seguro.

I- INTRODUCCIÓN

1.- Cáncer de mama

1.1.- Definición

Cáncer es un término genérico para un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Se produce por modificaciones en la información genética de las células, las cuales proliferan sin control formando tumores malignos. Estas células pueden crecer de manera descontrolada invadiendo partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis (OMS, Febrero 2013).

El cáncer de mama (CM) consiste en la proliferación acelerada e incontrolada de células del epitelio glandular. Son células que han aumentado enormemente su capacidad reproductiva. Más del 99% de los casos ocurre en las mujeres, siendo una enfermedad heterogénea con distintas morfologías, desarrollo metastático y respuesta terapéutica.

1.2.- Epidemiología

El CM es el quinto tipo de cáncer al que se le atribuyen más defunciones, siendo éstas 458.000 en el 2008. Se prevé que el número de defunciones por cáncer siga aumentando en todo el mundo y supere los 13,1 millones en el 2030 (OMS, Febrero 2013).

En España se diagnostican alrededor de 22.000 nuevos casos de CM al año. En Estados Unidos, en el año 2013 se diagnosticaron 232.340 casos nuevos de CM, representando el 14,1% de todos los cánceres. Aproximadamente 10% de estas pacientes son menores de 40 años, el 1,8% tienen entre 20 y 34 años y el 9,6% entre 35 y 44 años (figura 1) (Instituto Nacional del Cáncer 2013).

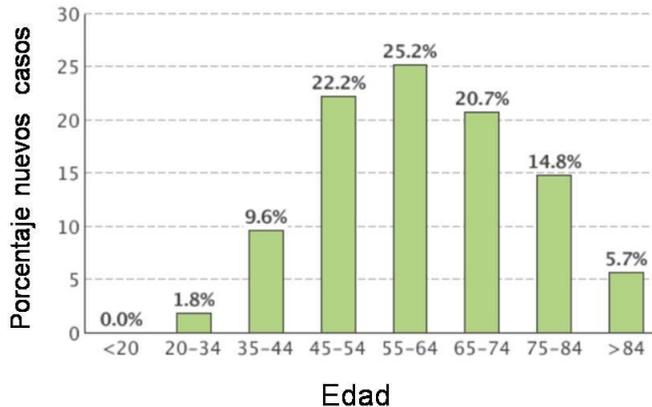


Figura 1.- Porcentaje de casos nuevos de CM por rango de edades en EEUU. Se muestra el porcentaje de casos nuevos de CM según el rango de edad de las pacientes. El 11,4% de los casos diagnosticados de CM tienen menos de 44 años. La edad media del diagnóstico de CM es de 61 años (Instituto Nacional del Cáncer 2013).

La supervivencia media relativa del CM tras 5 años es del 89,2%. El estadio en el que se ha diagnosticado el cáncer influye en la supervivencia. El 61% de los casos de CM son de estadio I o localizado y el índice de supervivencia de este tipo es del 98,6%. El 32% de los casos de CM se diagnostican en estadio regional o expandido a ganglios linfáticos y su supervivencia, tras 5 años, es del 84,4%. El 5% de los casos se diagnostican en estadio III o distante y el porcentaje de supervivencia es del 24,3%. El 2% no se conoce el estadio en el que se encuentra y su supervivencia es del 50% (figura 2) (Instituto Nacional del Cáncer 2013).



Figura 2.- Porcentaje de casos y de supervivencia por estadio del CM tras 5 años del diagnóstico. En la figura A se muestra el porcentaje de casos según el tipo de CM. En la figura B se muestra el porcentaje de supervivencia tras 5 años en los distintos tipos de CM (Instituto Nacional del Cáncer 2013).

1.3.- Factores de riesgo en el desarrollo del CM

La probabilidad de ser diagnosticado de CM aumenta con la edad, siendo el riesgo estimado de padecerlo a lo largo de la vida de un 13,3%. La probabilidad de fallecer de un CM es de un 3,4%.

1.3.1.- Agregación familiar y predisposición familiar

Globalmente, el riesgo de padecer un CM en aquellas personas con un familiar de primer grado que haya sufrido un CM aumenta entre 1,5 y 3 veces respecto a la población general (Ottman et al., 1983). La historia familiar es un factor de riesgo heterogéneo que depende del número de familiares afectados y no afectados, de la edad en la que se diagnosticaron y el grado de parentesco entre ellos.

La predisposición hereditaria se sospecha cuando una mujer padece CM con menos de 45 años y tiene una historia familiar con casos de CM y/o ovario. Las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* (herencia autosómica dominante), localizados en los cromosomas 17 y 13 respectivamente, se asocian con un riesgo del 85% de desarrollo de CM en edades tempranas. Asimismo, mutaciones en el gen *BRCA1* también aumentan la probabilidad de padecer cáncer de ovario (Ford et al., 1994; Easton et al., 1997; Struwing et al., 1997). Las proteínas sintetizadas mediante la transcripción de los genes *BRCA1* y *BRCA2* ejercen una función inhibitoria de las señales desencadenadas por las hormonas esteroideas en el epitelio mamario. Alteraciones en estas proteínas provocan una ausencia de control sobre las rutas de señalización celular derivadas de la activación estrogénica, predisponiendo a la carcinogénesis (Fan et al., 1999).

1.3.2.- Factores hormonales

Estudios epidemiológicos a gran escala han sugerido que una mayor exposición a estrógenos durante un tiempo prolongado provoca un mayor riesgo de padecer CM. Una menarquia temprana o una menopausia tardía, la nuliparidad o una edad tardía del primer embarazo se relacionan con un aumento en la incidencia de CM (Gail et al., 1989; Rosner and Colditz, 1996). Aunque el incremento de la incidencia de CM persiste tras la menopausia, ésta es 6 veces menor que antes de la menopausia. Esto sugiere la importancia de la función ovárica en cuanto a la síntesis de estrógenos en el riesgo de padecer CM.

1.3.3.- Factores ambientales

La exposición a radiaciones ionizantes incrementa el riesgo de padecer CM, con un periodo de latencia de hasta 40 años. En un estudio en el que se analizaron 427 mujeres que habían recibido irradiación supradiafragmática como

tratamiento para la enfermedad de Hodgkin, mostraron un riesgo relativo de 10,6 veces más respecto al esperado en la población general sin irradiación previa (Gervais-Fagnou et al., 1999).

1.4.- Clasificación

El CM es una enfermedad genética y clínicamente heterogénea. Se han desarrollado sistemas de clasificación que han evolucionado a lo largo de muchas décadas en función del grado nuclear, la cantidad y el tipo de necrosis, el patrón de crecimiento, el tamaño tumoral y la diferenciación arquitectónica (Fonseca et al., 1997). Sin embargo, con los avances en los últimos años en el conocimiento de la base molecular de esta patología, se han identificado cinco subtipos moleculares de CM que ayudan a realizar una clasificación más exhaustiva y clínicamente relevante de la heterogeneidad del CM (Malhotra et al., 2010).

Existen dos tipos de clasificaciones, la primera de ellas y más antigua hace referencia a sus características histopatológicas, la segunda clasificación hace referencia a la expresión molecular de diferentes marcadores génicos.

1.4.1.- Clasificación histopatológica

1.4.1.1- Carcinoma In Situ o Estadio 0: El carcinoma in situ (CIS) puede clasificarse como ductal o lobulillar, siguiendo patrones de crecimiento y características citológicas.

- Carcinoma Ductal In Situ (CDIS): Se trata de una afección no invasiva en la que se encuentran células cancerígenas en el revestimiento de un conducto de la mama sin diseminarse a otros tejidos (Instituto Nacional del Cáncer, 2013).

- Carcinoma Lobular In Situ (CLIS): Se trata de una lesión histológicamente única que se manifiesta por una proliferación, en uno o más conductos terminales, en acinos o ambos a la vez, de células laxamente cohesionadas, a veces algo mayores de lo normal. En muy raras ocasiones se vuelve invasiva (Fisher et al., 1990).

1.4.1.2- Carcinoma Infiltrante o Invasivo: Se trata de un grupo heterogéneo de tumores diferenciados por subtipos histológicos. El Carcinoma Ductal Infiltrante (CDI) es la forma más frecuente constituyendo un 80% de todos los casos y se caracteriza por ser una masa o tumoración con límites no bien delimitados. El CDI también se clasifica en bien diferenciado o grado I, moderadamente diferenciado o grado II y pobremente diferenciado o grado III (Malhotra et al., 2010).

1.4.2.- Clasificación molecular

Configurando una clasificación más precisa basada en el riesgo de recurrencia y progresión de la enfermedad, se ha creado una nueva clasificación del CM que incorpora marcadores moleculares como el Receptor de Estrógeno (RE), Progesterona (P), ErbB2 (Her2/neu) y p53, los cuales han demostrado tener una importancia pronóstica importante (Malhotra et al., 2010).

El CM se ha dividido en dos grandes grupos de acuerdo con los patrones de expresión génica, relacionados con el pronóstico, con el riesgo de metástasis y con la positividad para el RE. Así, se clasifican en neoplasias de bajo grado que expresan RE y P y en neoplasias de alto grado que no expresan ni RE ni P, y sí que expresan Her2/neu (Sorlie et al., 2003; Imigo F. G. et al., 2011) (tabla 1). La sub-clasificación de los tipos de tumores se realiza por el estado de RE y P, HER2/neu y el índice de proliferación determinado por ki67 (Cheang et al., 2009; MCCafferty M et al., 2009).

Tabla 1.- Clasificación molecular del CM.
Se muestran los dos grandes tipos moleculares de CM con sus subtipos (Imigo F. G. et al. 2011).

Receptor de Estrógeno Positivo	Luminal A Luminal B Luminal HER2/neu
Receptor de Estrógeno Negativo	Basal HER2/neu Como Normal (en inglés "Normal Like")

2.- Biología del crecimiento y diseminación tumoral

El objetivo de nuestro estudio es el análisis de la posible presencia de micrometástasis en el tejido ovárico que no son evidentes clínicamente. La biología de tumores malignos pueden dividirse en 4 fases: transformación, crecimiento, invasión local y metástasis a distancia. La transformación se refiere al cambio de una célula benigna a maligna mediante mecanismos genéticos. El crecimiento de la masa tumoral es un procedimiento complejo que viene determinado por la cinética del crecimiento de las células tumorales, la angiogénesis y progresión tumoral. El tiempo de duplicación de las células tumorales depende de ellas mismas, mientras que la angiogénesis representa respuestas del individuo suscitadas por las mismas células tumorales o por sus productos de secreción.

2.1.- Cinética del crecimiento tumoral

El ciclo celular de los tumores tiene las mismas 5 fases (G0, G1, S, G2 y M) que las células normales. La proporción de células tumorales que están en fase de replicación se denomina "fracción de crecimiento". En las fases primarias del tumor, la inmensa mayoría de las células presentan una replicación activa. A medida que el tumor crece, un mayor número de células abandona el estado replicativo, debido a la carencia de nutrientes, por desprendimientos o que permanecen en fase G0 (quiescente). Cuando el tumor es clínicamente detectable, la mayoría de las células no están en fase replicativa; en los tumores de crecimiento muy rápido la fracción en replicación es del 20%. El CM presenta una fracción de crecimiento baja, y la producción relativa de células tumorales es del 10%, por lo que se considera que presenta un crecimiento lento (Tannok, 1992).

Los agentes antitumorales actúan sobre las células que están sintetizando ADN, y por lo tanto dividiéndose, por lo que un tumor que solo contiene una fracción replicativa del 5% crecerá lentamente, pero será refractario al tratamiento ya que éste solo matará a las células en división. Tumores mucho más agresivos son más sensibles al tratamiento debido a su alta fracción replicativa (Norton, 1988; Norton and Day, 1991).

2.2.- Angiogénesis tumoral

El aporte sanguíneo es imprescindible para el crecimiento tumoral. Un tumor en crecimiento requiere unas necesidades metabólicas que se aportan mediante los vasos sanguíneos. Sin la presencia de vasos intratumorales, la metástasis no es posible. Estos vasos sanguíneos actúan como una ruta de movilización de células malignas a otros puntos del cuerpo del individuo. Una vez que las células tumorales están dentro del sistema circulatorio pueden invadir otros tejidos, saliendo del torrente sanguíneo al tejido circundante. En el tejido

nuevo, estas células empiezan a crecer y formar un núcleo de micrometástasis que debe ser sostenido por la formación de nuevos vasos sanguíneos que permitan el crecimiento de un tumor macroscópico (Ceballos and Ghersevich, 2008).

2.3.- Progresión tumoral

El potencial maligno de un tumor está relacionado con la aparición secuencial de subpoblaciones celulares que se diferencian en varios atributos fenotípicos, como en su capacidad invasora, su tasa de crecimiento, su capacidad de metastatizar, su respuesta a hormonas y su sensibilidad a los fármacos antineoplásicos. La causa de la progresión son las mutaciones acumuladas en las distintas células en la replicación progresiva, generando subclones de distintas características. Las células transformadas son genéticamente inestables y sus mecanismos de reparación están alterados, por lo que los errores en la replicación se acumulan generando los distintos fenotipos tumorales (Hill, 1990).

2.4.- Mecanismo de invasión y metástasis

La metástasis es la causa principal de mortalidad relacionada con el cáncer. Para que las células tumorales se escindan de la masa primaria, penetren en los vasos sanguíneos y linfáticos y crezcan secundariamente en un lugar distante deben seguir los pasos que se resumen en la figura 3.

Para que se produzca un foco de metástasis es necesario que se produzca una invasión de la matriz extracelular, diseminación vascular y alojamiento de las células tumorales. Los tejidos sanos están organizados en una serie de compartimentos separados por dos tipos de matriz extracelular: membranas basales y tejido conectivo intersticial. Una célula maligna primero tiene que romper la membrana basal, atravesar el tejido conectivo y, posteriormente

romper la membrana basal vascular y pasar a la circulación. La invasión de la matriz extravascular requiere que las células se unan a los componentes de la matriz y se degraden, para finalmente, migrar a posiciones distantes de la inicial.

Una vez en la circulación las células tumorales son susceptibles a los mecanismos de defensa del huésped. Dentro de la circulación las células tienden a agregarse formando acúmulos de células tumorales y elementos formes de la sangre (la adherencia a las plaquetas parece aumentar la probabilidad de supervivencia de las células y la adhesividad a los tejidos distantes). La detención y extravasación de las agregaciones celulares tumorales en lugares distantes implica la adherencia al endotelio y la salida a través de la membrana basal. En este proceso están implicadas moléculas de adhesión y enzimas proteolíticas. Se ha observado que las células tumorales expresan variantes de la molécula CD44 que les proporciona la capacidad de adherirse al endotelio y la diseminación extravascular (Kahn, 1992; Nabi et al., 1992; Albelda, 1993).

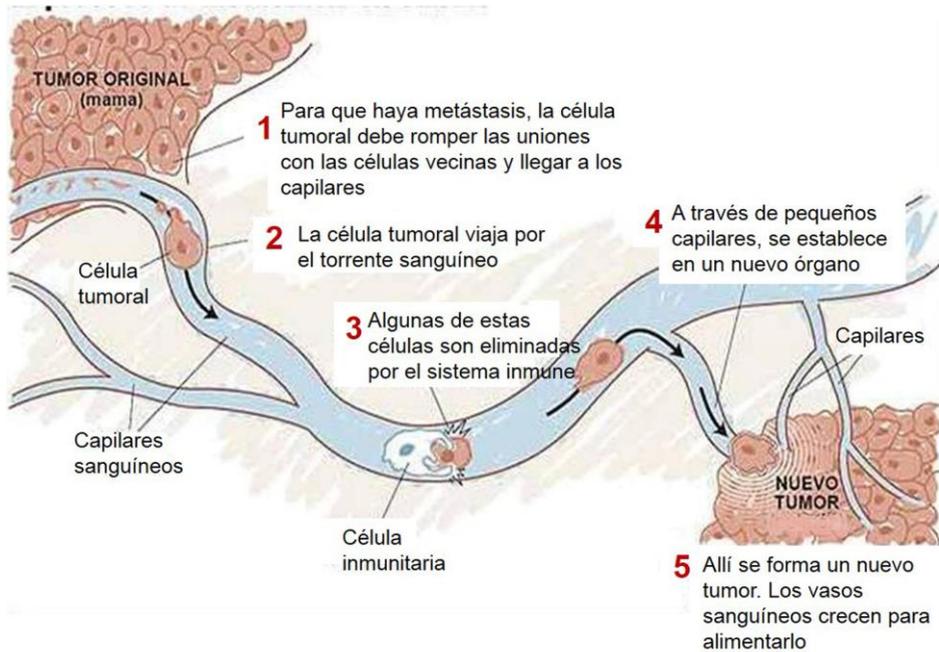


Figura 3.- Esquema de proceso de metástasis. Se muestra el tumor primario en mama, desde él, las células tumorales trasvasan al torrente sanguíneo e invaden nuevos órganos distantes al tumor primario. En este proceso algunas células tumorales pueden ser eliminadas gracias a la acción del sistema inmunitario.

3.- Efecto de los tratamientos oncológicos en la fertilidad

El CM es la patología oncológica más frecuente en mujeres en edad reproductiva. Aproximadamente, sobre el 13% de los CM diagnosticados ocurren en pacientes menores de 45 años (Maltaris et al., 2008). Debido a que la media de edad en la que las mujeres deciden quedar gestantes por primera vez es de 29,8 años, muchas pacientes con CM no completaron sus deseos reproductivos antes de la enfermedad, y desean tener descendencia después del diagnóstico de CM (Maltaris et al., 2008). Muchas mujeres sufren efectos secundarios de esterilidad a causa del tratamiento antineoplásico recibido (Colleoni et al., 2002; Oktay et al.,

2005; Sonmezer and Oktay, 2006). La radiación pélvica, abdominal y espinal y ciertos agentes quimioterápicos utilizados ampliamente en el tratamiento del CM han demostrado aumentar el Fallo Ovárico Precoz (FOP) (Byrne, 1999; Sklar, 1999; Bakker et al., 2004; Gatta et al., 2005).

El efecto tóxico de Radioterapia (RT) y/o Quimioterapia (QT) es reversible en los tejidos que presentan una división celular rápida como es el caso de la médula ósea, el tracto gastrointestinal o el timo. En el ovario provocan la destrucción irreversible de las células germinales produciendo FOP (Meirow and Nugent, 2001; Larsen et al., 2003a).

El impacto de los tratamientos oncológicos utilizados en CM sobre la fertilidad depende de tres variables, fundamentalmente: el agente quimioterápico, la dosis total administrada y la edad de la paciente. Se considera un riesgo elevado cuando la probabilidad de amenorrea permanente es $\geq 80\%$, intermedio cuando es entre 20 y 80% y bajo cuando es $< 20\%$ (Hudson et al., 2009).

Estos fármacos pueden disminuir la reserva folicular, causando una atrofia ovárica y un daño en la vascularización del ovario. El mecanismo exacto por el cual se produce esta toxicidad en el aparato reproductor femenino todavía no está claro, aunque se piensa que podrían dañar a las células de la pregranulosa de los folículos, produciendo una destrucción de los mismos. Este efecto se hace latente por la disminución de los niveles de la Hormona Antimülleriana (AMH) (en inglés "Antimüllerian Hormone") e inhibina B (Wallace and Kelsey, 2010). Mediante técnicas histológicas, se puede observar que la QT produce hinchazón y apoptosis (figura 4) de las células de la pregranulosa y del núcleo de las mismas, así como, una desorganización de la arquitectura de los folículos primordiales (Norwitz et al., 2001).

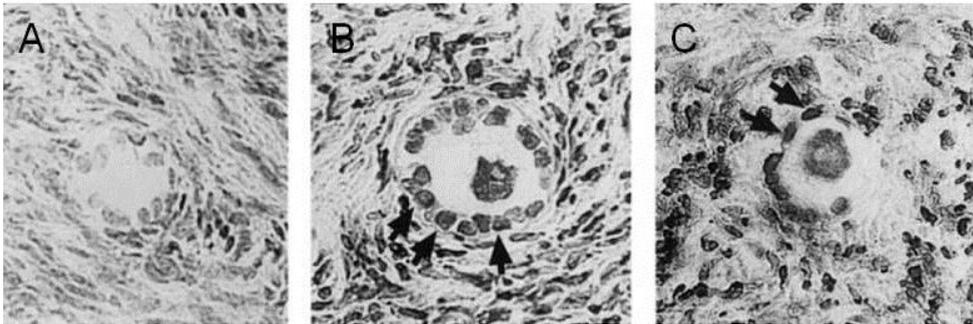


Figura 4.- Tinción inmunohistoquímica (IHQ) de apoptosis de CO humana. En la figura A se muestra un folículo primordial normal en el que no hay apoptosis después de cultivo durante 36 h sin quimioterápicos (tejido control). En las figuras B y C se muestra un folículo primordial con tinción positiva para marcadores de apoptosis en células de la pregranulosa y en el ovocito. Aumento 100X (Meirow, Nugent 2001).

Se han descrito otros mecanismos adicionales que estarían implicados en la pérdida folicular asociada a los agentes antineoplásicos, como las alteraciones en la vascularización y áreas de fibrosis en la Corteza Ovárica (CO) (Meirow et al., 2007a). Tras el tratamiento de QT, los vasos intra-ováricos se estrechan hasta su obstrucción. La vascularización del ovario es un sistema de arterias terminales, por lo que la obturación de los distintos vasos implica un cese del aporte vascular de las zonas afectadas y, como consecuencia, la aparición de áreas de fibrosis y de nuevos vasos sanguíneos de pequeño tamaño sin ningún patrón de organización que intenta suplir la carencia del aporte sanguíneo al ovario.

Una de las limitaciones en la valoración del impacto de los tratamientos antineoplásicos sobre la fertilidad es considerar la amenorrea tras el tratamiento como un marcador de esterilidad. Entre un 20 y 56% de las pacientes menores de 40 años recuperan la menstruación después de 6 meses de completar el tratamiento, mientras que las pacientes mayores de 40 años solamente en un 11% de los casos (Bines J. et al., 1996). Esto se debe a que los folículos en crecimiento, sufren daños durante el tratamiento y necesitan entre 3 y 6 meses

para que los folículos primordiales se recuperen y continúen con su desarrollo. Sin embargo, la amenorrea es el último evento que tiene lugar en la evaluación de un FOP, por lo que una restauración de la menstruación no implica fertilidad.

3.1.- Tratamientos gonadotóxicos

3.1.1.- Efecto de la quimioterapia

Los agentes quimioterápicos pueden causar daño en el ADN y anomalías cromosómicas en el ovocito incrementando el riesgo de abortos y malformaciones congénitas (Martinez et al., 2013). Estos agentes se utilizan frecuentemente en combinación ya que sus efectos antitumorales son adicionales, pero los efectos adversos también se incrementan. Se ha observado que los fármacos más gonadotóxicos son los agentes alquilantes, como la ciclofosfamida. Se ha descrito que una dosis acumulada de 20,4 g de ciclofosfamida en mujeres de 20-25 años provoca esterilidad (Meirow and Nugent, 2001). Estos agentes actúan uniéndose al ADN evitando su replicación y transcripción, siendo extremadamente gonadotóxicos porque actúan independientemente de la fase del ciclo celular dañando los folículos primordiales (Rosendahl et al., 2010).

Diferentes regímenes quimioterápicos producen distinto grado de amenorrea en pacientes con CM. En la tabla 2 se muestra un resumen de diferentes estudios en los que se analiza el índice de amenorrea según los fármacos administrados y la duración del tratamiento (Maltaris et al., 2008). Alrededor de un 40% de las mujeres menores de 40 años que reciben QT desarrollan un FOP, mientras que en mujeres mayores de 40 años este porcentaje se incrementa hasta un 76% (Blumenfeld, 2002).

Tabla 2.- Incidencia de amenorrea inducida por los tratamientos de QT más utilizados en CM. Se muestra diferentes estudios en los que se analiza el efecto de los agentes QT sobre la función ovárica. CMF Ciclofosfamida, Metotrexato y Fluorouracilo. FEC: Fluorouracilo, Epirubicino y Ciclofosfamida. ACD: Adriamicina (doxorubicina), Ciclofosfamida y Docetaxel. FAC: Fluorouracilo, Adriamicina (doxorubicina) y Ciclofosfamida. AC-t/D: Adriamicina (doxorubicina), Ciclofosfamida y Taxol/Docetaxel. AC: Adriamicina (doxorubicina) y Ciclofosfamida. ACT: Adriamicina (doxorubicina), Ciclofosfamida y Taxol. FACT: Fluorouracilo, Adriamicina (doxorubicina), Ciclofosfamida y Taxol (Maltaris et al. 2008).

N	Fármaco QT	Duración tratamiento (meses)	Amenorrea definitiva (meses)	Porcentaje de amenorrea	Referencia
541	CMF	1	9	14(<40 años) 34(>40 años)	Goldhirsch, 1990
387	CMF	6		33(<40 años) 81(>40 años)	Goldhirsch, 1990
3,628	CMF	3-24	12	40(<40 años) 76(>40 años)	Bines, 1996
359	CMF	6	ND	42,6	Levine, 1998
132	FEC	6			Levine, 1998
83	CMF	6	12	55,6	Goodwin, 1999
25	FEC	6		64,6	Goodwin, 1999
745	ACD	6	33	51,4	Nabholtz, 2002
746	FAC	6			Nabholtz, 2002
84	AC-T/D	6	12	13	Fornier, 2005
82	AC-T/D+tamoxifeno			17	Fornier, 2005
420	ACD	6	ND	61,7	Martin,2005
403	FAC			52,4	Martin,200
503	FEC	4	120	64	Venturini, 2005
120	AC	4	36	53	Petrek,2006
168	ACT	6		42	Petrek,2006
83	CMF	8		82	Petrek,2006
38	FAC	6		NA	Petrek,2006
34	FACT	6		NA	Petrek,2006
19	ACD	6		45	Petrek,2006
75	AC	4	12	44(<40 años) 81(>40 años)	Tham, 2007
116	AC+T/D	4+3		61(<40 años) 85(>40 años)	Tham, 2007

3.1.2.- Efecto de la radioterapia

Las radiaciones ionizantes producen efectos adversos en la función gonadal. El grado de gonadotoxicidad dependerá de la edad de la paciente, de la dosis del tratamiento y del campo de irradiación, siendo especialmente peligroso para la función reproductora la exposición de irradiación en la pelvis, ya que incrementa notablemente los riesgos obstétricos y neonatales (Norwitz et al., 2001) y es capaz de producir lesiones a nivel ovárico disminuyendo la reserva folicular (Meirow and Nugent, 2001).

La dosis estimada en que se produce una pérdida del 50% de la dotación folicular es 2 Gray (Gy) (Wallace et al., 2003). La irradiación abdominal en dosis de 20-30 Gy produce un fallo ovárico permanente en el 97% de las pacientes mayores de 40 años, y en un 72% de las pacientes en edad prepuberal, mientras que una única dosis de 10-15 Gy en todo el cuerpo es capaz de inducir un FOP (Meirow et al., 2007b). Dosis menores de 10 Gy son capaces de inducir un fallo ovárico agudo en pacientes que presentan otros factores de riesgo, como una exposición concomitante de agentes alquilantes y una edad avanzada, mientras que en pacientes puberales el riesgo es de 50-80% (Meirow et al., 2010).

3.2.- Fallo Ovárico Precoz

FOP implica un mal funcionamiento del ovario como órgano reproductor y un cese de la función hormonal del mismo, asociado a problemas vasomotores, esqueléticos, genitourinarios y cardiovasculares. Se diagnostica un fallo ovárico agudo cuando el cese de la función ovárica ocurre durante el tratamiento antineoplásico o en los siguientes 5 años después del cese del mismo.

La función ovárica de las pacientes con cáncer puede ser evaluada por medidas indirectas como presencia o ausencia de ciclos menstruales, niveles hormonales en sangre (Bath et al., 2002), exploraciones ecográficas en las que se

determina el número de folículos antrales, el volumen ovárico (Larsen et al., 2003b) y dosis y tratamientos recibidos (Wallace et al., 2005).

Los parámetros clínicos pre-tratamiento como la presencia de menstruación, ciclos regulares o embarazo previo no reflejan exactamente el estado de la reserva ovárica. En un estudio de 138 mujeres pre-menopáusicas con un CM localizado, la edad en el momento del diagnóstico y la QT sistémica eran los mejores predictores de menopausia un año más tarde (Chemaitilly et al., 2006).

La determinación de folículos antrales se realiza mediante ecografía transvaginal, pero la cuantificación de folículos primordiales es muy compleja. Por ello, se utilizan marcadores indirectos que reflejen ese pool folicular en desarrollo existente en el ovario. Los parámetros indirectos más utilizados son la determinación de los niveles hormonales de Hormona Folículo Estimulante (FSH) (en inglés "Follicle-Stimulating Hormone"), Inhibina B y AMH.

3.2.1.- Determinación de FSH y Estradiol

La FSH es una hormona gonadotrópica que se sintetiza y se secreta en la glándula pituitaria anterior. Regula el desarrollo, el crecimiento, la maduración puberal y los procesos de maduración ovocitaria en la mujer.

La determinación basal de FSH se considera un marcador indirecto de la reserva ovárica ampliamente utilizado, ya que depende de la integridad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (figura 5). Se ha observado que la capacidad predictiva de la FSH cambia según la edad de la paciente. Es importante marcar unas medidas como punto de corte, así, se diagnostica un fallo ovárico cuando al menos dos determinaciones de FSH se encuentran por encima de 40 UI/ml, independientemente de la presencia o ausencia de sangrado menstrual, ya que éste no es indicativo de función ovárica. Con niveles de FSH mayores a 20 UI/ml hay una correlación negativa con la tasa de gestación evolutiva,

independientemente de la edad de la paciente (van Rooij et al., 2004). Algunos autores han demostrado que elevaciones moderadas de FSH (definidas de 10-11,4 UI/ml) son difíciles de interpretar (Esposito et al., 2002). Una limitación de la determinación de la FSH es la variabilidad significativa entre los distintos ciclos (Scott et al., 1990). Además, se ha observado que pacientes con una reserva ovárica limitada presentan una mayor variabilidad en los niveles basales de FSH entre ciclos (Kwee et al., 2004).

Una fase folicular corta en mujeres de más edad puede ser debida a un mayor reclutamiento folicular por ciclo. La selección del folículo dominante se asocia con una alta concentración de Estradiol (E_2) en los primeros días del ciclo menstrual (Licciardi et al., 1995). En tratamientos de reproducción asistida, se ha observado que en las pacientes que presentan un valor elevado de E_2 en el tercer día de ciclo, se recogen menos ovocitos y presentan una menor tasa de gestación (Licciardi et al., 1995; Smotrich et al., 1995).

El valor predictivo de la determinación basal de E_2 conjuntamente con la FSH basal aumenta con la edad de las pacientes (Buyalos et al., 1997). Sin embargo, son necesarios más estudios al respecto para establecer un significado claro de los niveles de E_2 como marcadores de reserva ovárica.

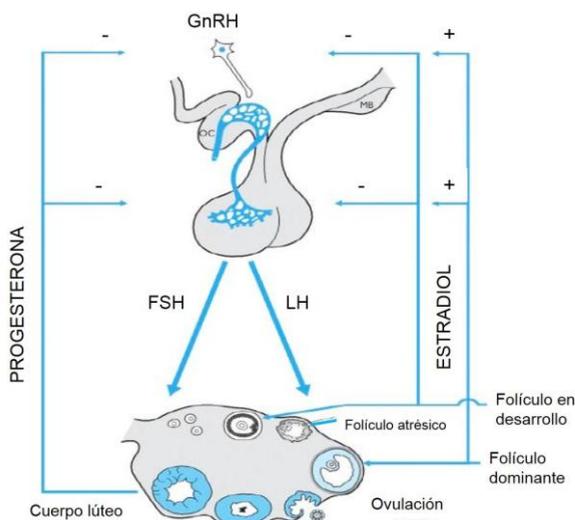


Figura 5.- Esquema del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. El hipotálamo libera la hormona GnRH que actúa sobre la hipófisis estimulando la liberación de las hormonas FSH y LH. FSH actúa sobre los ovarios estimulando el desarrollo de los folículos y la liberación de estrógenos. La hormona LH estimula la ovulación y el desarrollo del cuerpo lúteo.

3.2.- Determinación de inhibinas

Las inhibinas y activinas son glucoproteínas que pertenecen a la superfamilia de los factores de crecimiento y diferenciación. Las activinas actúan como antagonistas funcionales de las inhibinas, estimulando la síntesis y secreción de FSH (Muttukrishna and Knight, 1991). La inhibina suprime selectivamente la secreción de FSH, mientras que la activina la estimula (Muttukrishna and Knight, 1990).

Los niveles de inhibina A son bajos en la fase folicular mientras que aumentan de manera significativa en la fase lútea, ya que es producida fundamentalmente por los folículos maduros y por el cuerpo lúteo (Roberts et al., 1993). Por el contrario, la inhibina B se secreta fundamentalmente por los folículos preantrales en la fase folicular inicial, alcanza un pico en la mitad de la fase folicular media, coincidiendo con el descenso de los niveles de FSH (Groome et al., 1996; Klein et al., 1996; Blumenfeld, 2002).

En mujeres con FOP con algún ciclo ovulatorio, los niveles persistentemente elevados de FSH se acompañan de niveles bajos de inhibina A y B (Welt et al., 2005). En distintos estudios se ha demostrado que existe una correlación entre la inhibina B y otros marcadores de reserva ovárica. Hay evidencias de que los niveles basales de inhibina B se correlacionan con la cohorte folicular (Elting et al., 2001) y con el número de ovocitos (Eldar-Geva et al., 2002). Estudios realizados con la inhibina A también demuestran que existe correlación entre sus niveles y la respuesta ovárica (Casper et al., 2001).

3.3.- Determinación de la hormona Antimülleriana

AMH forma parte de la superfamilia de los factores de crecimiento y diferenciación. Se cree que es secretada por las células de la granulosa de los folículos preantrales y por los pequeños folículos antrales (figura 6). Las células de

la pregranulosa del pool de folículos primordiales no expresan AMH hasta que son reclutadas para iniciar el crecimiento y desarrollo, que empieza inmediatamente a producir AMH (figura 6) (Hirobe et al., 1992; Durlinger et al., 2002). Por otra parte, la producción de AMH cesa a medida que avanza el crecimiento y el desarrollo folicular. Así pues, parece que no se produce secreción de AMH en los folículos antrales de mayor tamaño, en los periovulatorios ni en el cuerpo lúteo, así como en los folículos que inician los fenómenos de atresia. Tampoco hay secreción en el ovocito y en las células intersticiales del ovario (Hirobe et al., 1992; Durlinger et al., 2002).

El pool folicular en crecimiento está relacionado con el pool del resto de folículos primordiales. La reserva ovárica, los folículos antrales observados mediante ecografía y los niveles de AMH en sangre disminuyen con la edad. Mujeres con muchos folículos pequeños o con ovarios poliquísticos presentan un valor sérico de AMH alto. Mientras que mujeres cerca de la menopausia presentan niveles bajos de dicha hormona. Un valor normal de AMH en sangre es $> 1\text{ ng/ml}$, valores altos se consideran $>3\text{ ng/ml}$ (síndrome ovario poliquístico). Valores del rango de $0,7\text{-}0,9\text{ ng/ml}$ se consideran bajos pero dentro de la normalidad y de $0,3\text{ a }0,6\text{ ng/ml}$ se consideran bajos y valores menores a $0,3$ muy bajos.

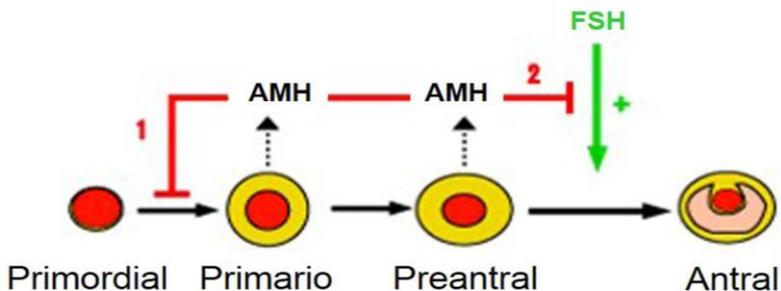


Figura 6.- Esquema de la producción de AHM en los folículos. La producción de AMH es mayor en las etapas preantrales del desarrollo folicular. AMH se produce en los folículos primarios y preantrales. Los folículos primordiales que no iniciaron su crecimiento no secretan hormona AMH, pero el número de folículos que comienzan su crecimiento está relacionado con el número de folículos primordiales del pool folicular, por lo que los niveles de AMH séricos son indicativos de la reserva ovárica (Zec et al. 2011).

La hormona AMH se puede considerar como un factor de crecimiento que actúa sobre los folículos primordiales en crecimiento, y como un indicador del pool de folículos independientes de la hormona FSH (Meirow et al., 2007a). Se ha demostrado una asociación entre los niveles basales bajos de AMH y una baja respuesta en los tratamientos de Fecundación In Vitro (FIV) (van Rooij et al., 2002). Además, los niveles iniciales de AMH están correlacionados con la respuesta ovárica en pacientes de FIV con niveles de FSH dentro del rango de normalidad (Seifer et al., 2002).

Aunque los niveles séricos de AMH no son el único marcador de la reserva ovárica, sus niveles a lo largo del ciclo menstrual fluctúan muy ligeramente (Cook et al., 2000), lo que la convierte en una ventaja añadida en la búsqueda del marcador ideal de la reserva ovárica. Sin embargo, la interpretación de los niveles circulantes de AMH ha abierto un campo de discusión y análisis que dista de haber obtenido respuestas concluyentes y genera cierta controversia.

4.- Preservación de la Fertilidad en pacientes oncológicas

En la actualidad, existen varias opciones para preservar la fertilidad y conservar la función ovárica en pacientes con riesgo de desarrollar FOP relacionado con el tratamiento antineoplásico (figura 7).



Figura 7.- Estrategias a seguir para la preservación de la fertilidad en pacientes con cáncer. Las opciones de las pacientes varían dependiendo del daño ovárico esperable a causa del tratamiento a recibir, el tipo de cáncer, el tiempo disponible, la edad y la sensibilidad del tumor a estrógenos. Imagen modificada de (Sonmezer, Oktay 2004).

4.1.- Análogos de hormona liberadora de gonadotropina

El uso de análogos de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (en inglés “Gonadotropin-Releasing Hormone”) como estrategia para preservar la fertilidad en pacientes oncológicas es controvertido. GnRH podría proteger frente a los efectos tóxicos de los tratamientos antineoplásicos creando un estado hipogonadotropo similar a la etapa puberal, siendo posible la protección de los folículos en crecimiento; pero éstos solo constituyen el 10% de la población

folicular, por lo que el uso de análogos de la GnRH supondría una protección a corto plazo (Oktay et al., 1997). Sin embargo, no existen evidencias de que haya receptores para GnRH en los folículos primordiales ni preantrales. Además, el tratamiento con GnRH podría provocar una disminución de la respuesta a la QT, ya que detiene las células en fase G0 del ciclo celular, convirtiéndolas en menos sensibles a la QT.

Se han llevado a cabo varios estudios en humanos que certifican el efecto protector de los agonistas de GnRH, pero son estudios de pequeño tamaño muestral y no aleatorizados. En un estudio en el que mujeres con CM recibieron GnRH junto con la QT versus pacientes que no recibieron GnRH, observaron que el FOP fue menor en el grupo en el que administraron GnRH (11,4% contra 66,6% respectivamente), demostrando que el tratamiento antineoplásico combinado con GnRH puede preservar la función ovárica en mujeres menores de 40 años. Sin embargo, el periodo de seguimiento de este estudio fue demasiado corto (Badawy et al., 2009). En un meta-análisis realizado a partir de 11 estudios prospectivos (3 aleatorios y 8 no-aleatorios), el co-tratamiento con GnRH durante la QT parece estar asociado con el incremento del mantenimiento de la función ovárica después del tratamiento (Kim et al., 2011). Sin embargo, el análisis individual de los 3 estudios aleatorizados no muestra diferencias significativas entre el grupo que se administra GnRH y el control (Kim et al., 2011). Por lo que se requiere un estudio prospectivo aleatorizado mayor para determinar la función de GnRH en la protección de la función ovárica.

4.2.- Transposición quirúrgica de los ovarios

La transposición quirúrgica de los ovarios fuera del campo de irradiación puede preservar la función ovárica y debe de ser una técnica a considerar en mujeres en edad reproductiva con enfermedades malignas pélvicas antes de recibir la radiación. Se trata de una técnica que se realiza desde hace más de 3

décadas para la preservación de la función ovárica en pacientes con enfermedad de Hodgkin antes de la irradiación de los ganglios (Ray et al., 1970).

La transposición ovárica puede realizarse por laparotomía durante el tratamiento quirúrgico propio de la enfermedad o mediante laparoscopia antes de recibir la radiación. Este procedimiento puede reducir el daño causado por la RT pero no protege contra el daño causado por la QT sistémica (Meirow and Nugent, 2001).

El mantenimiento de la función ovárica no se puede asegurar en todos los casos. A pesar de la transposición ovárica fuera del campo de irradiación, la dosis media de radiación que recibiría es 1,75 Gy. Se ha observado que en pacientes menores de 40 años en las que se ha aplicado esta técnica antes de la radiación pélvica no sufrieron FOP (Clough et al., 1996).

La transposición ovárica mediante laparoscopia es un procedimiento importante en mujeres en edad reproductiva antes de recibir la radiación pélvica. Esta operación es altamente efectiva, pero no se debe subestimar el procedimiento quirúrgico, que puede traer consigo complicaciones de vascularización, pérdida folicular y formación de quistes ováricos (Meirow and Nugent, 2001).

Si los ovarios son trasladados a una posición abdominal se puede lograr una gestación espontánea, sin necesidad de someterse a una segunda cirugía de reubicación de los ovarios a una zona pélvica. Además esta técnica puede practicarse sola o en combinación con otras técnicas de Preservación de la Fertilidad (PF) (Martin et al., 2007).

4.3.- Criopreservación de embriones

La criopreservación de embriones es una de las técnicas, junto a la criopreservación de ovocitos, clínicamente bien establecida y no experimental, con

una tasa de recién nacidos vivos elevada. Las tasas de supervivencia para embriones congelados son entre el 35 y 90%, el índice de implantación entre el 8 y 30% y el índice de embarazo acumulativo es mayor a 60% (Senn et al., 2000; Wang et al., 2001; Son et al., 2003).

Esta técnica es una de las primeras opciones para la PF pero requiere de una estimulación ovárica para la obtención de ovocitos, que supone una demora en el inicio del tratamiento antineoplásico de 2 a 5 semanas. Este tiempo puede considerarse excesivo para pacientes que deben iniciar su tratamiento inmediatamente. Además, el hecho de criopreservar embriones requiere que la paciente tenga una pareja estable. En niñas y adolescentes no sería posible, y en personas sin parejas, el uso de donantes de semen sería controvertido.

En el CM, en general, hay un periodo de 6 semanas entre la cirugía y el inicio de la QT, que sería el periodo idóneo para realizar la PF mediante esta técnica. Sin embargo, la hiperestimulación realizada en los ciclos de FIV conlleva un aumento de los niveles de E₂ 10 veces más altos que el pico obtenido en un ciclo natural y no es recomendado en algunos tipos de CM (Sonmezer and Oktay, 2004). La estimulación ovárica requiere del uso de gonadotropinas que están contraindicadas en neoplasias hormono-dependientes como es el caso del CM, debido a la elevación producida de los niveles de estrógenos.

En algunos casos, la estimulación ovárica en pacientes con CM se puede realizar con tamoxifeno, que es un estimulador selectivo de los RE, o letrozol, que es un inhibidor de la aromataasa, solo o combinados con FSH (Oktay et al., 2005).

Aunque el tamoxifeno incrementa los niveles de E₂, este fármaco puede bloquear los efectos de los niveles suprafisiológicos de los niveles de estrógenos en el tejido mamario e inhibe el crecimiento de los tumores mamarios debido a una competición antagonista del estrógeno por el receptor. De hecho, los niveles medios de E₂ son crónicamente elevados en pacientes con CM con un tratamiento de tamoxifeno durante largo tiempo y pueden llegar a ser mayores que los niveles

observados en pacientes sometidas a estimulación ovárica con tamoxifeno (Shushan et al., 1996; Klijn et al., 2000).

El letrozol es un inhibidor de la aromatasa de tercera generación que fue desarrollado a principios de los años 90. Inhibe de forma competitiva la actividad de la enzima aromatasa y tiene una vida media de 48 horas (Pfister et al., 2001). Suprime significativamente los niveles de E₂ en plasma. Recientemente se han testado a los inhibidores de la aromatasa como agentes inductores de la ovulación que presentan beneficio solo o en combinación con FSH. El letrozol es el fármaco de elección para bajas respondedoras (Mitwally and Casper, 2002).

Con todo ello hay que considerar una problemática ética y legal sobre la acumulación y destino final de embriones obtenidos de pacientes que se someterán a un tratamiento de QT o RT, ya que puede ocurrir que esas pacientes no sobrevivan a la enfermedad.

4.4.- Criopreservación de ovocitos inmaduros y maduros

La criopreservación de ovocitos es la técnica más común en PF. No es necesario tener pareja ni el uso de semen de donante evitando así problemas morales, religiosos y legales. En este caso se criopreservarían los ovocitos tanto en su forma inmadura como madura. El índice medio de supervivencia es de 68,4% y el índice de fecundación de 48,5% desde ovocitos vitrificados (Sonmezer and Oktay, 2004).

Los ovocitos inmaduros se encuentran en fase de diploteno de la profase I de la meiosis, lo que se denomina vesícula germinal. En este estadio son menos susceptibles al daño por congelación que el ovocito maduro por su menor tamaño, su baja tasa metabólica y el estadio del ciclo celular. La ausencia del huso meiótico y la presencia de una membrana nuclear que protege la cromatina, garantiza la ausencia de anomalías citogenéticas durante las divisiones celulares

posteriores (Hutt and Albertini, 2007). Además la criopreservación de vesículas germinales no requiere de estimulación ovárica, lo que supondría un gran beneficio para pacientes con CM que no pueden retrasar el tratamiento o que presentan un tumor RE+. Aunque existen ventajas teóricas para criopreservar estadios inmaduros de los ovocitos, en la actualidad existen dificultades para conseguir una Maduración In Vitro (MIV) coordinada del núcleo y del citoplasma (Goud et al., 2000; Wu et al., 2001). Después de un proceso de MIV de las vesículas germinales criopreservadas, se observa anomalías en el huso y una condensación prematura y parcial de los cromosomas (Park et al., 1997).

En la actualidad, gracias a la técnica de vitrificación de ovocitos, la tasa de supervivencia tras la desvitrificación es del alrededor del 95% y la tasa de fecundación es similar a la obtenida con ovocitos en fresco (Kuwayama, 2007).

La criopreservación de ovocitos es una estrategia atractiva y muy recurrida para la PF, ya que no requiere cirugía ni es necesario que la paciente tenga pareja, pero esta técnica implica que tenga que someterse a un ciclo de estimulación ovárica previa a la FIV. Muchas pacientes oncológicas no tienen tiempo para completar un ciclo de estimulación ovárica antes de iniciar el tratamiento frente al cáncer.

4.5.-Criopreservación de tejido ovárico

La criopreservación de CO es una técnica que puede realizarse muy rápidamente, sin retrasar el inicio de los tratamientos oncológicos. Es la única opción en pacientes prepuberales. No requiere de estimulación ovárica previa, por lo que pacientes con cáncer hormono-dependiente pueden beneficiarse de ella.

Esta técnica además, con su posterior ortotrasplante, permite restablecer la función ovárica, es decir, mantener la capacidad reproductiva o exocrina y la producción hormonal o endocrina en el 93% de los casos (Donnez et al., 2013). El

lugar de reimplante ortotópico puede ser en una ventana peritoneal creada cerca del hilio ovárico (Donnez et al., 2006; Demeestere et al., 2007; Roux et al., 2010; Donnez et al., 2011), o en la Médula Ovárica (MO) (Schmidt et al., 2005; Donnez et al., 2006; Donnez et al., 2008; Donnez et al., 2010; Silber et al., 2010; Donnez et al., 2013).

Con esta técnica se conservan muchos folículos primordiales in situ que contienen ovocitos arrestados en fase de diploteno de la primera división meiótica. Los folículos son de pequeño tamaño y quiescentes, y los ovocitos que contienen no tienen zona pelúcida ni gránulos corticales, lo que les confiere mayor tolerancia a los procesos de congelación-descongelación que los folículos maduros, por ello, se ha observado que el 70-80% de los folículos sobreviven a los procesos de congelación-descongelación (Newton et al., 1996). Hasta el momento, la maduración de estos folículos primordiales ha de realizarse in vivo, ya que los mecanismos de MIV todavía presentan muchas limitaciones. Por lo tanto, se debe reimplantar la CO como soporte, almacenamiento y transporte de esos folículos primordiales (Kim, 2006).

La extracción de tejido ovárico requiere de un procedimiento quirúrgico, realizado normalmente mediante laparoscopia (figura 8), en el cual se extrae el ovario entero o un fragmento de éste. Se realiza una ooforectomía completa cuando el riesgo de FOP es muy elevado. En ocasiones, por motivos de logística no se puede realizar la criopreservación del tejido inmediatamente posterior a su extracción, por lo que se realizaron estudios de viabilidad de ese tejido pasado un tiempo de su extracción. Se ha observado que el transporte de tejido ovárico a 4 °C durante 24 horas no parece influir negativamente en la viabilidad folicular (Parmegiani et al., 2010; Dittrich et al., 2012).

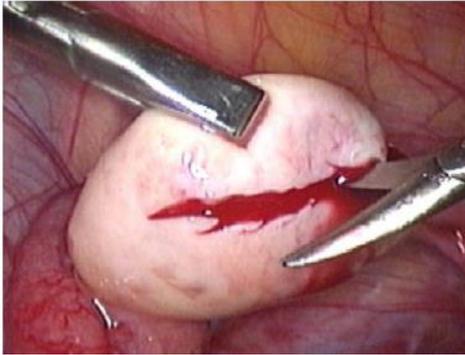


Figura 8.- Extracción de tejido ovárico mediante laparoscopia. En la fotografía se muestra una ovariotomía parcial. Si el riesgo de FOP es muy elevado se extrae el ovario completo (von Wolff et al. 2009).

El tejido ovárico se corta en fragmentos y puede criopreservarse mediante técnicas de congelación lenta o mediante vitrificación. El grupo de Parkers, en 1954, realizó los primeros intentos de conservación y posterior trasplante del tejido ovárico (Parkes and Smith, 1954). Esta técnica fue abandonada durante 30 años porque no suscitó demasiado interés. En 1994, el grupo de Gosden consiguió restaurar la fertilidad tras un autotrasplante de CO criopreservada de oveja, cuyo ovario es el más semejante a la estructura del ovario humano (Gosden et al., 1994; Salle et al., 2002). El descubrimiento de los actuales agentes crioprotectores y el avance en la tecnología de la criopreservación (Oktay et al., 2001) despertó el interés en esta técnica, especialmente como una estrategia para la PF.

La criopreservación de CO no es sencilla debido a su composición de diferentes tipos celulares (células del estroma, folículos formados por ovocitos, células de la granulosa y de la teca, vasos sanguíneos y nervios del tejido ovárico). La criopreservación mediante congelación lenta se realiza en una solución acuosa con diferentes solutos presentes. A medida que se produce un descenso de la temperatura se forman núcleos de hielo en el medio extracelular, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida. Las células en suspensión deben deshidratarse para mantener el equilibrio osmótico con un medio extracelular cada vez más hipertónico (Boiso, 2001). El agente crioprotector debe penetrar de manera uniforme a través del estroma, de las

células de la granulosa y de los ovocitos, pero al mismo tiempo, se debe evitar la toxicidad asociada al crioprotector (Fuller and Paynter, 2004; Hovatta, 2005). El método estándar para criopreservar CO es un programa de congelación lenta usando un medio con agentes penetrantes de bajo peso molecular que contenga albúmina humana sérica con propanodiol, Dimetilsulfóxido (DMSO) o etilenglicol como agente crioprotector combinado con sucrosa (Hovatta et al., 1996; Newton et al., 1996; Gook et al., 1999). Además, en los últimos años se está trabajando para mejorar las estrategias de vitrificación de tejido ovárico. Las principales diferencias entre la vitrificación y el protocolo de congelación lenta son el proceso de congelación y la concentración del crioprotector utilizado. La diversidad de tipos celulares y la alta densidad celular dificultan la técnica de vitrificación. Aunque recientemente se han publicado estudios en los que muestran que la vitrificación pudiera ser más efectiva (Hovatta, 2005), hasta el momento, todos los embarazos obtenidos mediante esta técnica provienen de CO criopreservada mediante congelación lenta, ya que este es el método estándar (Dittrich et al., 2012).

Hasta la fecha, se realizaron 60 reimplantes que dieron lugar a 30 recién nacidos vivos después de un trasplante de CO descongelada (Donnez et al., 2013). La edad de la paciente y la reserva ovárica inicial son factores cruciales para el éxito de la técnica. Pacientes mayores de 40 años no son buenas candidatas para la criopreservación de tejido ovárico ya que el índice de embarazo después del trasplante es extremadamente bajo (von Wolff et al., 2009). La valoración rutinaria de la reserva ovárica con test endocrinos así como una ecografía mediante ultrasonidos pélvicos (contaje de folículos antrales) son la guía para la decisión clínica. Pacientes con niveles menores de 0,3 ng/ml de AMH en suero no son buenas candidatas para la criopreservación de tejido ovárico (Kim et al., 2011).

La recuperación de la actividad ovárica se suele conseguir entre los tres meses y medio y los seis meses y medio después del reimplante, detectándose un

aumento de los niveles de E₂ y una disminución de FSH a una media de 4,5 meses (Donnez et al., 2013).

5.- Riesgo de contaminación en el tejido ovárico con células malignas

La criopreservación de CO en pacientes con cáncer se realiza con el fin de poder ser reimplantado cuando la paciente esté libre de enfermedad oncológica. La posibilidad de que existan células malignas en la CO criopreservada no detectadas constituye un riesgo a la hora del reimplante de tejido ovárico en la paciente, ya que podría ocasionar una reactivación de la enfermedad maligna.

La mayoría de los cánceres más frecuentes en mujeres en edad reproductiva (linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, tumor de Wilm's, sarcoma de Ewing) tienen un riesgo muy bajo de metastatizar en el ovario. Sin embargo, los tumores hematológicos como las leucemias o el linfoma de Burkitt y algunos tumores sólidos de mama y colon en estadio avanzado presentan un riesgo mayor (Chu et al., 1981; Wyld and Lilleyman, 1983; Yada-Hashimoto et al., 2003).

La incidencia de la aparición de metástasis en ovario a partir de un CM es de 4.5% (Ferlicot et al., 2004). Sin embargo, la ausencia de evidencias clínicas y radiológicas de metástasis distante (estadio II o menor) hace que la probabilidad de que el ovario esté afectado sea muy baja (Oktay and Sonmezer, 2004).

Recientemente, se han llevado a cabo varios estudios sobre la detección de metástasis mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHQs), reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) (en inglés "Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction") y modelos in vivo en CO criopreservada de pacientes oncológicas, especialmente en leucemias, ya que el riesgo de reintroducir células malignas con el reimplante de CO es muy elevado (Rosendahl et al., 2013). En la tabla 3 se muestra un resumen de los estudios más representativos en la búsqueda de células malignas en CO criopreservada.

Tabla 3.- Resumen de los estudios de detección de células malignas en CO criopreservada en pacientes con cáncer. En la primera columna se muestra el autor y año de cada trabajo. En la segunda columna se muestra la patología que presentan las pacientes que acuden a la PF (CM, leucemia o Sarcomas). Se presenta también el rango de edad de las pacientes bajo estudio. Respecto a la metodología utilizada en cada trabajo, se indica si se usaron marcadores moleculares (RT-PCR), marcadores IHQs y estudios in vivo en animales murinos (tipo de ratón inmunodeficiente, lugar del implante y semanas de experimento). Además se indican los marcadores utilizados en cada caso. En la última columna se muestra a modo de resumen el resultado obtenido respecto a la presencia/ausencia de células malignas en el tejido ovárico.

Autor	Patología	N	Media edad (rango)	Marcadores RT-PCR	Marcadores IHQ	Estudios In vivo	Resultados
Sanchez-Serrano 2009	CM	100	19-39	-	GCDFP15 MGB1 WT-1 CAM5.2	-	Ausencia de células tumorales en biopsia de tejido ovárico
Azem 2010	CM	13	5-40	-	H-E, histología	-	Ausencia de células tumorales en biopsia de tejido ovárico
Rosendhal 2011	CM	51	23,7–39,8	-	CK7, CK-aecam, CA125, WT1	-	Ausencia de células tumorales en biopsia de tejido ovárico
Luyckx 2013	CM	13	17-35	MGB2	MUC1, GCDFP15	Ratones SCID Abdomen y peritoneo 24 semanas	Ausencia de células tumorales por IHQ. Expresión positiva de MGB2 en 4 CO criopreservada y 1 después de xenotrasplante
Meirow, 2008	leucemia	8	19-29	BRA-ABL	-	-	Ausencia de células tumorales por histología. Resultado positivo para 1 paciente mediante RT-PCR (solo analizan 2 LMC)
Rosendhal F&S 2010	Leucemia	26	2-31	LLA: BCR-ABL CBFB-MYH11 LMC: CD34, CD117, MPO	CD3 CD10 CD20 CD79 TdT	-	Histología e inmunohistoquímica no revelan infiltración de células malignas PCR detecta células leucémicas en tejido ovárico
Dolmans 2010	Leucemia	18	2-31	E2A-PBX1	H-E	Ratones SCID peritoneo 24 semanas	Histología e inmunohistoquímica no revelan infiltración de células malignas PCR detecta células leucémicas en tejido ovárico
Greve 2012	Leucemia completa remisión	25	2-31	TEL-AML1 ETV6-RUNX1	CD34 TdT CD79a CD3 CD117 MPO CD163	Ratones NMRI-NUDE Subcutáneo 20 semanas	Ausencia de células tumorales en biopsia de tejido ovárico
Greve 2013	Sarcomas (Edwing)	16	7-30	EWS-FLI1	H-E	Ratones NMRI-NUDE Subcutáneo 20 semanas	Ausencia de células tumorales en biopsia de tejido ovárico

Un estudio de Meirou en el que se analizó mediante histología 8 muestras de CO de pacientes con Leucemia Mielode (LM) no revela infiltración neoplásica en el tejido. En este mismo estudio analizaron 2 muestras mediante RT-qPCR y una de ellas mostró la presencia de células malignas en el tejido analizado (Meirou et al., 2008).

Rosendahl y colaboradores, en el año 2010, analizaron la CO criopreservada de 26 pacientes con leucemia, mediante técnicas histológicas y moleculares. No encontraron células malignas mediante las técnicas histológicas, pero sí fueron detectadas mediante técnicas moleculares (Rosendahl et al., 2010). Los resultados obtenidos muestran que las técnicas moleculares son mucho más sensibles que las histológicas y es necesario un estudio molecular del tejido ovárico criopreservado para verificar la presencia o ausencia de células malignas.

Dolmans y colaboradores llevaron a cabo un estudio más exhaustivo incorporando experimentos in vivo para la comprobación de la existencia de células malignas en el tejido ovárico criopreservado. Analizaron la CO criopreservada de 18 pacientes leucémicas [6 con Leucemia Mielode Crónica (LMC) y 12 con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)]. Nueve de los casos estudiados (2 de LM y 7 de LL), con marcadores moleculares disponibles para esta patología, resultaron ser positivos indicando la presencia de células malignas en el tejido ovárico. Mediante técnicas tradicionales de detección de metástasis como es la IHQ no se detectaron células malignas en ninguno de los casos. Además observaron que la QT antes de la criopreservación de tejido ovárico no excluye de la contaminación con células malignas (Dolmans et al., 2010).

En un estudio realizado por Greve y colaboradores se ha observado que pacientes con leucemia en completa remisión no presentan aparentemente células malignas en el tejido ovárico. Se han realizado estudios in vivo de 25 pacientes con leucemia en remisión, tanto antes del xenotrasplante a ratones como pasadas 20 semanas, mediante técnicas histológicas, IHQs y moleculares. Ninguno de los

trasplantes reveló signos de enfermedad, ni en la pieza de tejido ovárico trasplantado ni en órganos murinos evaluados (Greve et al., 2012). Con estos resultados se sugiere que la criopreservación de tejido ovárico en pacientes con leucemia en remisión podría estar indicada. Más tarde el mismo grupo llevó a cabo el análisis de CO procedentes de 16 pacientes con sarcoma (9 con sarcoma de Edwing, 4 con osteosarcoma, 2 con sarcoma sinovial y 1 con condrosarcoma) mediante técnicas histológicas, IHQs y moleculares. En ninguno de los casos encontraron contaminación de células tumorales en el tejido ovárico criopreservado (Greve et al., 2013).

En el caso del CM se han publicado diversos artículos acerca del análisis de la seguridad en el trasplante de tejido ovárico (Sanchez-Serrano et al., 2009; Azem et al., 2010; Rosendahl et al., 2011b; Luyckx et al., 2013). En total, más de 177 biopsias de cortezas ováricas y seis biopsias enteras de CO, de 140 pacientes con CM, que tenían tejido ovárico criopreservado, han sido examinadas mediante histología, combinada o no con técnicas IHQs, sin evidencia de contaminación por células malignas. Aunque la histología sigue siendo la técnica estándar en el diagnóstico del CM, se ha demostrado en el caso de las CO procedentes de pacientes con leucemia que las técnicas histológicas e IHQs no son lo suficientemente sensibles para la detección de micrometástasis. Por lo que los nuevos métodos moleculares presentes actualmente en la medicina ofrecen enfoques nuevos y más precisos para el diagnóstico y tratamiento del CM.

6.- Métodos para excluir metástasis ovárica. Seguridad del trasplante de tejido ovárico

Para que el método de trasplante de CO criopreservada sea fiable y seguro es necesario el uso de técnicas sensibles para la detección de alguna célula maligna en ese tejido. Para ello, se han propuesto tres enfoques diferentes de análisis:

1.- Análisis mediante imágenes como la ecografía y escáner (TAC):

Este procedimiento debe realizarse en todas las pacientes antes de la extracción de tejido ovárico con el objetivo de excluir una patología ovárica macroscópica. Además, un fragmento pequeño de tejido ovárico fresco debe ser evaluado mediante técnicas histológicas para la determinación de la presencia de suficientes folículos primordiales y la presencia de células malignas en el tejido.

2.- Análisis mediante IHQ y RT-qPCR: el uso de estas técnicas es muy útil para excluir la presencia de células malignas individuales. La aplicación de técnicas moleculares ha demostrado una mayor sensibilidad en la detección de células malignas ocultas.

3.- Trasplante modelo in vivo: El xenotrasplante de pequeñas piezas de tejido ovárico congelado y descongelado en ratones inmunodeficientes es un método muy efectivo para la detección de residuos mínimos de células metastáticas. También contribuye a la evaluación del potencial de desarrollo del tejido ovárico almacenado antes de un posible trasplante, que bien puede ser analizado mediante cultivo celular (Isachenko et al., 2006) o por xenotrasplante (Maltaris et al., 2006). Sin embargo, el análisis mediante xenotrasplante de cada una de las pacientes que acuden al programa de PF no es viable, ya que requiere de instalaciones específicas que no se encuentran en los hospitales, personal cualificado y mucho

tiempo de análisis. Por lo que éste no es un método que se pueda implantar de forma rutinaria en la práctica clínica.

6.1.- Métodos moleculares

El uso de las técnicas de genómica y proteómica podrían ser la herramienta definitiva de diagnóstico de micrometástasis, tal y como describen los estudios de Roshendal (Rosendahl et al., 2010) y Dolmans (Dolmans et al., 2010). Ambos demuestran que en la CO de las mujeres afectadas por leucemia, donde la detección de células malignas mediante técnicas de IHQ y de morfología dieron resultado negativo, existían células malignas que solo eran detectadas cuando el análisis se realizaba por RT-qPCR.

Se conoce como marcadores de CM aquellos que nunca se expresan en tejido sano o en niveles muy residuales. Por todo lo expuesto anteriormente se plantea la necesidad de desarrollar un test diagnóstico en el que se analice la expresión génica de genes específicos de CM y metástasis para la detección de células malignas ocultas en el tejido ovárico criopreservado de estas pacientes.

Existen una serie de genes específicos de proliferación celular, de CM y/o cáncer de ovario, relacionados con procesos de apoptosis que podrían ayudar a diagnosticar con una mayor sensibilidad y especificidad la presencia de metástasis ocultas en tejido ovárico de CM.

6.1.1.- "Gross Cystic Disease Fluid Protein-15" (GCDFP15)

GCDFP15 se considera un marcador específico de CM. La proteína *GCDFP15* también denominada "PIP" es una glucoproteína secretora compuesta por 146 aminoácidos, monomérica, con 15 kDa. Se encuentra en el cromosoma 7, en la localización 7q32-q36. Este gen presenta una longitud de 7 kb y está

formado por 4 exones de una longitud desde 106 pares de bases (pb) a 223 pb (Myal et al., 1989; Myal et al., 1991).

Se trata de una proteína pequeña muy específica y sensible de diferenciación apocrina (Jones et al., 2001). Actúa como una proteasa de aspartato que tiene como sustrato a la fibronectina (Caputo et al., 2003). Es una proteína inducible a la prolactina que se sobre-expresa en CM y, en contraste, no se expresa en tejido mamario sano (Luo et al., 2013). También se expresa en algunos órganos exocrinos como las glándulas salivares y lagrimales. Se ha observado en tejido conectivo, en el ojo, laringe, faringe, tráquea, músculo, próstata, en tumores de cuello y cabeza, y en tumores de tejido muscular (Mazoujian et al., 1983; Haagensen et al., 1990; Clark et al., 1999; Liu et al., 2004; Tian et al., 2004; Genes-to-Systems Breast Cancer Database, 2013).

GCDFP15 se utiliza para la detección del CM y para el seguimiento de su progresión y de metástasis. Su expresión se ha identificado en la mayoría de las biopsias de CM (Myal et al., 1998; Clark et al., 1999). Mediante métodos inmunohistoquímicos se demostró que la expresión de GCDFP15 puede ser detectada en un 70-90% de los CM y en un 80% de sus metástasis. Además la presencia de GCDFP15 en tumores metastáticos de origen desconocido indica que provienen de una enfermedad mamaria (Wick et al., 1989). Se correlaciona con el estado de los receptores hormonales. Los andrógenos, estrógenos y glucocorticoides regulan la expresión de GCDFP15 (Murphy et al., 1987).

La expresión de *GCDFP15* se asocia con tumores de CM de buen pronóstico y de subtipos de grado bajo. No presenta una sensibilidad alta para la detección de tumores de peor pronóstico (Luo et al., 2013).

6.1.2.- Mamaglobina 1 (*MGB1*)

MGB1 es uno de los marcadores utilizados por excelencia en el diagnóstico de CM. La proteína *MGB1* pertenece a la superfamilia de secretoglobinas (Klug et al., 2000), que son un grupo de proteínas pequeñas, secretoras, raramente glucosiladas, y diméricas. Suelen expresarse en tejidos mucosos y están involucradas en procesos de señalización, respuesta inmune, quimiotaxis y actúan de mensajeros de hormonas esteroides humanas (Lacroix, 2006).

El gen *MGB1* se encuentra en el cromosoma 11 en la localización 11q12.3. Contiene 3 exones que codifican una proteína compuesta de 93 aminoácidos con un péptido señal de 19 aminoácidos y con una masa molecular total de 10,5 kDa (Watson et al., 1998).

La secuencia génica completa de *MGB1* se aisló por primera vez en 1996 por Watson y Fleming, mediante RT-qPCR. Observaron que se sobre-expresa en tumores de mama en relación con tejido sano (Watson and Fleming, 1994; Watson and Fleming, 1996).

La *MGB1* se considera el marcador por excelencia de detección de CM basado en métodos de expresión génica mediante RT-qPCR. La expresión de *MGB1* se ha detectado de forma muy rara y en niveles muy bajos en varios tejidos normales como en tejido conectivo, pulmón, glándula mamaria y ovario (Genes-to-Systems Breast Cancer Database, 2013). Además, se expresa abundantemente, en tracto genital femenino (cérvix, útero y ovario), en tumor de pulmón, ovárico y cáncer de tejido muscular (Genes-to-Systems Breast Cancer Database, 2013).

En los casos de CM, la *MGB1* se utiliza como un marcador diferencial de origen mamario. Se ha identificado la expresión de *MGB1* en el 61-93% de las biopsias de tumor primario de mama y de su metástasis (Watson et al., 1999;

Houghton et al., 2001; O'Brien et al., 2002; Han et al., 2003; Span et al., 2004; Minn et al., 2005; O'Brien et al., 2005).

La sobre-expresión de *MGB1* en tejido mamario con CM es independiente de la histología del tumor, el grado tumoral, el estadio del cáncer o el estado de los receptores hormonales (Watson and Fleming, 1996), mientras que la pérdida de su expresión se asocia con un grado alto del tipo de tumor (CM tipo III) (O'Brien et al., 2005). La expresión de *MGB1* se asocia con un grado bajo del tipo de tumor y con tumores positivos para los receptores de esteroides en pacientes postmenopáusicas (Miksicek et al., 2002; Guan et al., 2003; Span et al., 2004). Además se ha observado que presenta una mayor expresión en los subtipos Her2 positivos y una baja expresión en el subtipo basal (Luo et al., 2013).

Los tipos de tumores más agresivos o negativos para los receptores hormonales, pueden perder la expresión de *MGB1* y por lo tanto, si el diagnóstico solo se basase en este marcador darían falsos negativos.

6.1.3.- "Small Breast Epithelial Mucin-1" (SBEM)

SBEM también es conocido como BS106 (Colpitts et al., 2002). El gen que codifica la proteína *SBEM* se localiza en el cromosoma 12 en la posición 12q13.2. Se trata de una proteína de 90 aminoácidos con un péptido señal hidrofóbico, lo que sugiere que es una proteína secretada, sujeta al procesamiento proteolítico y glucosilada. Esta proteína contiene 3 copias contiguas de un núcleo de repetición octapeptídico. Estas características son similares a muchas sialomucinas, aunque *SBEM* carece de un dominio transmembrana y es más pequeña que la mayoría de las otras mucinas epiteliales conocidas.

SBEM se expresa en glándulas mamarias, en tejido conectivo, faringe, músculo, páncreas, piel, corazón, cerebro, placenta, en tumor de mama, tumor de

cuello y cabeza y tumor de tejido muscular (Miksicek et al., 2002; Genes-to-Systems Breast Cancer Database, 2013).

Está descrito que más del 90% de los CDI expresan *SBEM*, sin encontrarse una correlación completa entre la expresión de *SBEM* y las características del tumor (Miksicek et al., 2002). Se asocia con la detección histopatológica de metástasis en los ganglios linfáticos (Miksicek et al., 2002). Aunque la expresión de *SBEM* es independiente del estado del receptor y del grado del tumor (Colpitts et al., 2002; Miksicek et al., 2002; O'Brien et al., 2007), se ha observado que su expresión es mayor en tumores de CM de grado elevado y en tumores RE negativos (Skiris et al., 2008; Valladares-Ayerbes et al., 2009; Liu et al., 2013), sugiriendo que *SBEM* está altamente asociado con marcadores de peor pronóstico y puede ser útil como un marcador independiente para detectar pacientes diagnosticadas de CM con riesgo a metástasis o mayor índice de recurrencia (Liu et al., 2010). La expresión de *SBEM* puede servir como marcador para la detección de micrometástasis en médula ósea de pacientes con CM (Valladares-Ayerbes et al., 2009) y micrometástasis hematológicas (Liu et al., 2010).

6.1.4.- Mucina 1 (*MUC1*)

El gen que codifica la proteína MUC1 se localiza en el cromosoma 1 en la localización 1q21-q24 (Swallow et al., 1987) y está formado por 7 exones (Levitin et al., 2005). Gendler y Clan, independientemente, en 1990, clonaron *MUC1* en toda su longitud. La proteína MUC1 contiene un dominio N-terminal y C-terminal que albergan un péptido señal de repeticiones contiguas, y un dominio transmembrana junto con uno citoplasmático pequeño (Gendler et al., 1990; Lan et al., 1990).

MUC1 forma parte de la familia de las mucinas que son proteínas altamente glicosiladas que se localizan en la superficie apical del epitelio mamario. Las mucinas secretadas y transmembranas forman una barrera de mucosa protectora, y las transmembranas pueden funcionar como señalización de la presencia de condiciones adversas en el medio extracelular. MUC1 es una mucina transmembrana que en condiciones normales se expresa en las fronteras apicales de las células epiteliales secretoras (Yin et al., 2003).

MUC1 se expresa en abundantes tejidos sanos (cerebro, cérvix, tejido conectivo, tejido embrionario, esófago, ojo, intestino, riñón, hígado, pulmón, glándula mamaria, boca, músculo, nervios, ovario, páncreas, faringe, placenta, próstata, piel, estómago y útero) y en diferentes tipos de tumores (tumor de mama, tumor cervical, condrosarcoma, tumor colorrectal, tumor de esófago, tumor gastrointestinal, tumor de células germinales, glioma, tumor de cuello y cabeza, tumor de hígado, tumor de pulmón, tumor ovárico, tumor pancreático, tumor de próstata, tumor de tejido muscular y tumor uterino) (Genes-to-Systems Breast Cancer Database, 2013).

Se ha detectado una sobre-expresión de forma aberrante en el 90% de los casos de CM (Gendler, 2001; Raina et al., 2009). Existe una alta asociación entre la expresión de *MUC1* y la agresividad de algunos cánceres, ya que su sobre-expresión se ha asociado con inhibición de la adhesión celular y aumento de potencial metastásico e invasivo de las células tumorales (Ciborowski and Finn, 2002; Levi et al., 2004; O'Brien et al., 2007). Aunque *MUC1* se expresa en la mayoría de los tumores de mama, una sobre-expresión se asocia con los grados menores de CM y tumores RE positivos (Rakha et al., 2005).

La expresión de *MUC1* también se ha asociado con el receptor de estrógenos alfa, donde la interacción de ambos es estimulada por 17- β -estradiol en líneas celulares de CM humano. *MUC1* se une directamente al RE y lo estabiliza bloqueando su ubiquitinización y degradación, contribuyendo al

crecimiento y supervivencia de las células cancerígenas de mama (Wei et al., 2006).

6.1.5.- "NY breast Cancer antigen -1 " (NY-BR-01)

El gen que codifica la proteína NY-BR-01 se encuentra en el cromosoma 10, en la localización 10p11.21. Este gen contiene 37 exones que codifican una proteína de 1.341 aminoácidos (Hahn et al., 2006). Su identificación se realizó en base a la respuesta inmune espontánea humoral de pacientes con CM (Jager et al., 2001; Jager et al., 2002).

NY-BR-01 es un factor de transcripción putativo. Es considerado como un antígeno de diferenciación mamario y representa una buena diana para procesos de inmunoterapia (Jager and Knuth, 2005; Wang et al., 2006).

Presenta un patrón de expresión muy restrictivo. Solamente se ha observado expresión en tejido mamario normal, testículo y en CM (80% de los CM), mientras que no se expresa en ningún otro tipo de tumor (Jager et al., 2001; Jager et al., 2002). *NY-BR-01* fue encontrado en el 40-50% y 60-70% de tumor primario y metástasis de CM, respectivamente (Zehentner et al., 2002). Presenta una concordancia del 88% entre la expresión en CM y en su metástasis (Theurillat et al., 2007). En un estudio en el que analizaron mediante IHQ 124 carcinomas invasivos de mama, la expresión de *NY-BR-01* se detectó en el 60% de los casos siendo negativa en 23 tejidos sanos analizados, incluyendo próstata y testículos. También ha sido detectado en los nódulos linfáticos en el 43,3% de pacientes con CM (Nissan et al., 2006).

Sin embargo, aunque es un marcador muy específico y sensible, no se expresa en todos los CM. La expresión de *NY-BR-01* se asocia significativamente al grado de diferenciación de los tumores. Así, en lesiones invasivas de CM de grado I se expresa en el 77% de los casos, en lesiones de grado II en el 63% de

los casos, y en lesiones de grado III, solamente en el 50% de los casos. La expresión de NY-BR-01 está asociada de forma significativa con CM negativos para la invasión a nódulos linfáticos y RE negativos (Varga et al., 2006). Además este marcador se detecta en mayor proporción en tumores de mama bien diferenciados. Debido a la asociación con el grado tumoral y la expresión de NY-BR-01, la presencia de este marcador se asocia con buen pronóstico. La expresión de NY-BR-01 disminuye siguiendo el siguiente orden: carcinoma mamario in situ > carcinoma invasivo > metástasis en nódulos linfáticos > metástasis distantes (Theurillat et al., 2007).

6.1.6.- Antígeno tumoral de Wilms (*WT-1*)

El gen que codifica esta proteína se encuentra en el cromosoma 11 en la localización 11p13 (Rose et al., 1990). Este gen codifica una proteína en forma de dedos de zinc de unión al ADN y actúa como un activador o represor transcripcional dependiendo del contexto celular y cromosómico. WT-1 es requerido para la formación normal del sistema genitourinario y tejidos mesoteliales.

Se ha demostrado que el WT-1 reprime la transcripción de varios genes relacionados con el crecimiento, como la cadena A del factor de crecimiento pseudoinsulínico (Haber and Buckler, 1992; Coppes et al., 1993; Rauscher, 1993). Sin embargo, la actividad transcripcional de esta proteína puede modularse a través de interacciones físicas entre el WT-1 y p53.

WT-1 es un gen supresor tumoral, por lo tanto, cualquier mutación o deleción del gen que repercute en la actividad de WT-1 de unión al ADN produce el desarrollo del tumor de Wilms o neuroblastoma infantil y el síndrome de Denys-Drash. Este gen está inactivo en un 5-10% de los tumores de Wilms esporádicos y

en casi el 100% de los pacientes con Denys-Drash, un síndrome asociado con las anomalías genitourinarias.

WT-1 se expresa en testículo, útero, páncreas, cerebro, ovario, riñones, placenta, glándulas salivares, intestino, pulmones, huesos, próstata y sangre (NCBI-Unigene, 2013).

WT-1 es un factor de transcripción que está altamente expresado en el núcleo de las células epiteliales del tejido ovárico y en 100% de los carcinomas ováricos y extraováricos y en el 80% de carcinomas ováricos transicionales. En contraste el 100% de los carcinomas de mama son negativos para *WT-1* (Lerwill, 2004). Por ello permite la diferenciación entre metástasis de mama y tumores primarios en el ovario (Lerwill, 2004; Zhu and Michael, 2007).

En la actualidad, los marcadores moleculares ofrecen una oportunidad única para identificar metástasis ocultas en pacientes con estadios tempranos de CM que podrían pasar desapercibidas con el uso de las técnicas tradicionales. Hasta la fecha, la existencia de marcadores moleculares tumorales para detectar células malignas ocultas en la sangre es muy limitada (Taback et al., 2001). Por lo que es necesario desarrollar un nuevo enfoque técnico y el uso de múltiples marcadores para la detección de micrometástasis, con el fin de evitar reintroducir células malignas en los pacientes sometidos a ortotrasplante de ovario.

II- HIPÓTESIS

La criopreservación de corteza ovárica como método de preservación de la fertilidad en pacientes con cáncer de mama en estadios I a III se considera un método seguro debido a la ausencia de enfermedad metastática oculta en las muestras de corteza ovárica criopreservada.

III- OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es demostrar la ausencia de células metastáticas ocultas en tejido ovárico criopreservado de pacientes con cáncer de mama.

Los objetivos concretos son:

- Desarrollar un panel de marcadores moleculares de alta especificidad y sensibilidad para la detección de células metastáticas diseminadas.
- Validar el panel de marcadores moleculares desarrollado en la detección de micrometástasis en corteza y médula ovárica de las pacientes con cáncer de mama en estadios I a III.
- Comparar la especificidad y sensibilidad de los métodos moleculares desarrollados frente a los métodos histológicos e inmunohistoquímicos tradicionales en la detección de micrometástasis en tejido ovárico.
- Comprobar la ausencia de capacidad invasora de las células de tejido ovárico de pacientes con cáncer de mama mediante un modelo de invasión celular in vitro.
- Desarrollar un nuevo modelo in vivo capaz de detectar micrometástasis tras el xenotrasplante de tejido ovárico.
- Corroborar los resultados obtenidos del panel de marcadores moleculares desarrollado mediante el nuevo modelo in vivo de xenotrasplante.

IV- MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Selección de pacientes y recogida de muestras

Los estudios realizados en pacientes humanos y la recogida de muestras se llevó a cabo en conformidad con las normas sobre experimentación humana dimanantes del código de Nuremberg, declaraciones de Helsinki (1964), Tokio (1975), Venecia (1983), Hongkong (1989), Sydney y complementarias, directiva 91/507/CE, R.D. 561/1993, convenio de Bioética del Consejo de Europa (BOE 20-10-99), y código de Ética y Deontología médicas vigente.

En este proyecto se incluyeron un total de 88 pacientes que fueron divididas en los siguientes grupos de estudio:

- **Pacientes libres de enfermedad oncológica:** Se incluyeron 11 pacientes (edad media: $32\pm 3,26$ años; rango: 32-37 años) donantes voluntarias cuya indicación fue una cesárea electiva (no urgente). Se extrajo un fragmento de 10X40mm de CO que fue almacenado a -80°C hasta el momento de su análisis, 10 de ellas fueron destinadas a análisis moleculares y una de ellas se destinó como control de células ováricas sanas en los estudios in vivo.

- **Pacientes con metástasis confirmada:** Se incluyeron un total de 13 pacientes con CM, de las cuales 8 tenían metástasis confirmada en CO y 5 en otros tejidos (hígado, pleura, hueso, ojo y ligamento uterino). La elección de dichas pacientes se llevó a cabo de forma retrospectiva y siguiendo el criterio del diagnóstico médico. Por esta razón, las muestras seleccionadas se encontraban ya incluidas en bloques de parafina y se procedió a la extracción de ARN de las mismas como se detalla posteriormente. No se tuvieron en cuenta, a la hora de seleccionar estas

pacientes, parámetros como el tipo de CM, su estadio, administración previa de QT, la edad o la raza; debido a que el objetivo de este estudio fue seleccionar unos marcadores moleculares específicos que se expresen en metástasis de CM, independientemente de otros parámetros.

- **Pacientes de PF:** Se incluyeron un total de 60 pacientes (edad media: $32\pm 3,59$ años; rango: 22-39 años) a las que se les iba a someter al protocolo de preservación de CO por estar diagnosticadas de CM (estadios I-IIIa).

- **Tumor primario de CM:** Se incluyeron un total de 4 pacientes (edad media: $47\pm 16,37$ años; rango: 29-61 años) que presentaban un CDI en la mama izquierda de grado II, con nódulos en la mama, y una de ellas con un nódulo móvil. Todas ellas acudieron a quirófano con el motivo de una intervención de mastectomía.

1.1.- Protocolo de extracción de tejido ovárico

En el caso de las pacientes de PF, la extracción de tejido ovárico se realizó mediante cirugía laparoscópica siguiendo protocolos previamente publicados (Sanchez et al., 2007; Sanchez et al., 2008) (figura 9). Se extrajo un fragmento de CO que fue depositado en medio de cultivo M199 (Sigma, St Louis, Estados Unidos). La manipulación de las muestras fue realizada en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad y sobre un bloque de hielo, donde se procedió a separar la MO de la CO. Con la ayuda de un bisturí nº 22 se eliminó cualquier resto de tejido necrótico, cuerpo lúteo y sanguíneo y se procedió a su raspado hasta conseguir un espesor de 1 mm para su óptima criopreservación.

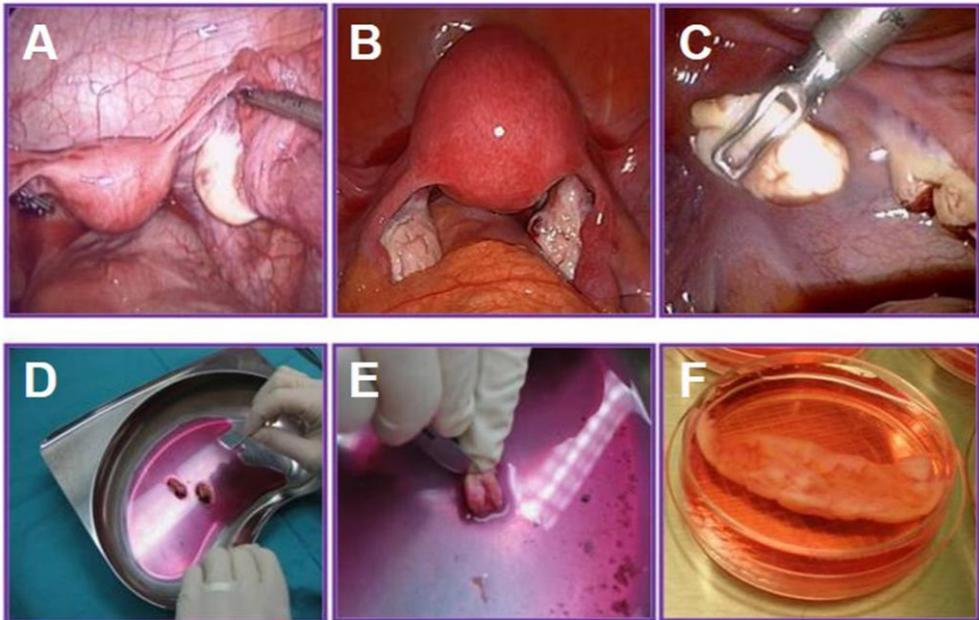


Figura 9.- Obtención de tejido ovárico mediante laparoscopia. En la fila superior se muestra la cirugía en la que se extrae el tejido ovárico (A, B, C). En la fila inferior se muestra la manipulación en el laboratorio del tejido ovárico extraído (D, E, F), en la cual se retira toda la MO mediante raspado (E), dejando solamente la CO del mismo (F). Posteriormente se corta en fragmentos de 10x40mm.

A continuación, se tomaron 3 fragmentos de CO y 3 de MO de localización aleatoria de 10x40mm cada uno (figura 10):

- Uno de los fragmentos de CO fue remitido al servicio de Anatomía Patológica para su estudio histológico, el cual fue posteriormente cedido para nuestro estudio IHQ. El fragmento de MO destinado a la evaluación de la expresión proteica mediante IHQ se depositó en un tubo estéril con formaldehído 4% (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido) para su posterior inclusión en parafina (figura 10).

- Un fragmento de CO y de MO de cada paciente se guardaron en un tubo estéril eppendorf libre de ARNsas y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su análisis mediante técnicas moleculares (figura 10).
- Un fragmento de CO y MO se depositaron en criotubos estériles con medio de congelación lenta: Medio M199, 5% Suero Albúmina Humana (HSA) (en inglés "Human Serum Albumin") y 12.5% DMSO (Sigma, St Louis, Estados Unidos). Estas muestras se almacenaron a -80°C durante 24h y posteriormente en tanques de Nitrógeno líquido (N_2) indefinidamente. Las muestras así almacenadas fueron utilizadas para el posterior cultivo celular, ensayos de invasión in vitro y para la inyección a ratones inmunodeprimidos para el estudio in vivo (figura 10).

El resto de la CO extraída para posterior auto-trasplante ortotópico a la paciente, fue criopreservada y conservada en bolsas a -196°C (figura 10), de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente (Sanchez et al., 2007; Sanchez et al., 2008).

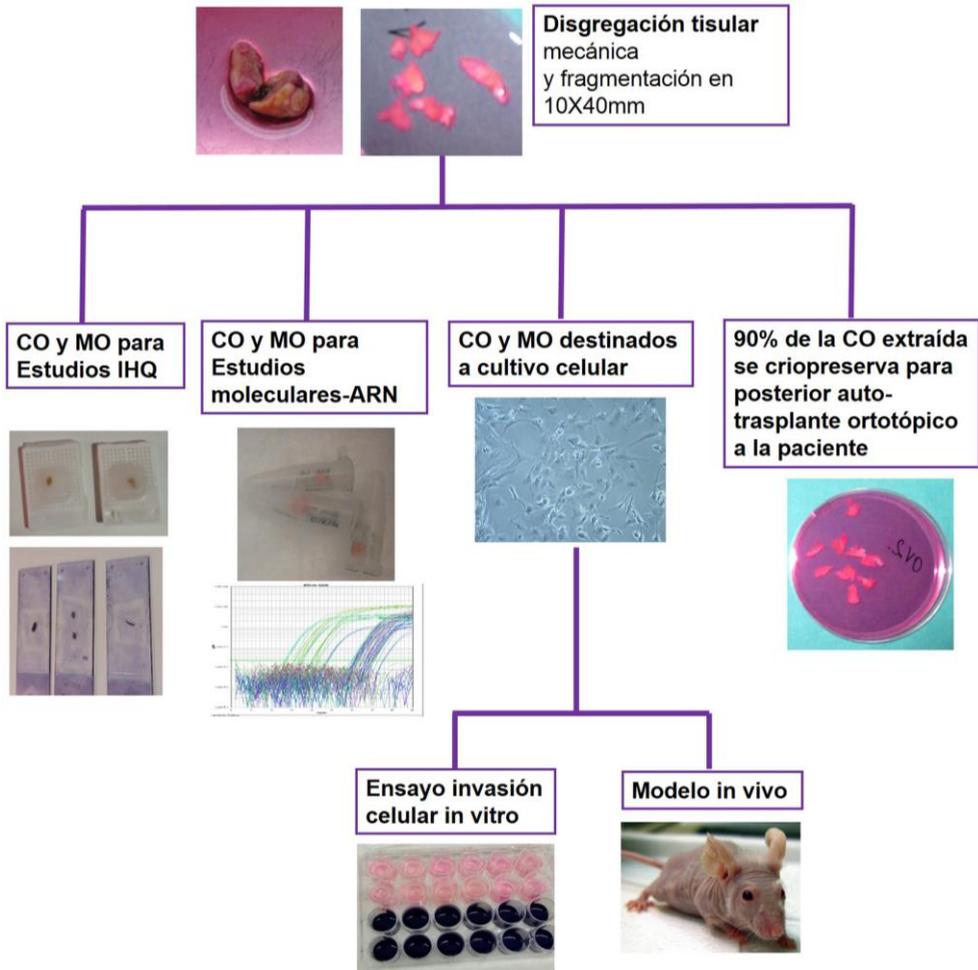


Figura 10.- Resumen del diseño experimental. Se muestra el uso de cada fragmento de CO y MO para el análisis de las distintas técnicas utilizadas en este trabajo. Cada fragmento presentó un tamaño de 10x40mm.

2.- Estudios moleculares

2.1.- Extracción de ARNm

2.1.1.- Extracción de ARNm de muestras incluidas en parafina

La extracción de ARN de muestras de parafina se llevó a cabo con el uso del kit "Recover all™ total nucleic acid isolation kit for FFPE ("Formalin Fixed Paraffin-Embedded") (Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Se realizaron 3 cortes de 20 µm de cada muestra que se introdujeron en un tubo estéril libre de ARNsas. Se añadió 1 ml de xilol (Panreac, Barcelona, España) y se incubaron durante 3 min a 50°C en agitación. A continuación, se centrifugaron durante 3 min a 13.400 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante. Este paso fue repetido para asegurarnos la eliminación de cualquier resto de parafina. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 1 ml de etanol absoluto y centrifugación a 13.400 r.p.m. durante 3 min. Para la eliminación total del etanol, los tubos se dejaron en una estufa a 37°C durante 30 min con la tapa abierta. Transcurrido este tiempo, se añadieron 200 µl de "Digestion Buffer" y 4 µl de proteasa. Esta mezcla se incubó durante 15 min a 50°C en agitación. Posteriormente, se incubaron otros 15 min a 80°C. A cada tubo se añadieron 240 µl de "Isolation Aditive" y 550 µl de etanol (a -20°C) y se centrifugó en una columna durante 1 min a 10.000 r.p.m. a Temperatura Ambiente (TA). A continuación se añadieron 700 µl de "Wash Buffer 1" y se volvió a centrifugar 1 min a 10.000 r.p.m. Tras la eliminación del líquido eluido, se añadieron 500 µl de "Wash Buffer 2/3" repitiéndose la centrifugación. Con una nueva centrifugación rápida de 30 segundos se secó el filtro que contenía el ARN. Seguidamente, se preparó una mezcla de "10X DNase Buffer", "DNase" y agua libre de nucleasas. Esta mezcla fue depositada en el filtro de la columna incubándose durante 30 min a TA. Transcurrido este tiempo, se añadieron 700 µl de "Wash Buffer 1" y se centrifugó durante 1 min a 10.000 r.p.m. A continuación se añadieron 500 µl de

“Wash Buffer 2/3” y se repitió la centrifugación. Se añadieron 35 µl de agua libre de ARN en el centro del filtro incubándose 10 min a TA. Posteriormente se añadieron otros 35 µl de agua, se incubó 5 min y se centrifugó durante 3 min a 10.000 r.p.m., Finalmente a cada muestra se le añadieron 20 U de Rnase Inhibitor (Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos) para evitar la degradación del ARN.

Las concentraciones de ARN de cada muestra fueron medidas mediante métodos espectrofotométricos (apartado 2.2) y las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso.

2.1.2.- Extracción de ARNm de tejido en fresco

El ARN total se aisló utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, California, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras añadir 500 µl de Trizol y disgregar el tejido con la ayuda de un bisturí estéril, se añadieron 100 µl de cloroformo (Sigma, St Louis, Estados Unidos). Después de una centrifugación a 13.000 r.p.m durante 15 min y a 4°C, se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se le añadieron 250 µl de isopropanol (Sigma, St Louis, Estados Unidos). Tras una incubación durante 10 min a TA, se centrifugó a 13.000 r.p.m durante 10 min a 4°C. El precipitado fue lavado con 500 µl de etanol al 75% en agua DEPC (Dietilpirocarbonato) filtrada y centrifugado a 7.500 r.p.m. durante 5 min. Finalmente tras secarse los “pellets” de ARN se resuspendieron en 12 µl de agua estéril libre de nucleasas.

2.2.- Análisis de la concentración e integridad del ARN

El análisis de la cantidad e integridad del ARN extraído de cada una de las muestras se llevó a cabo mediante métodos espectrofotométricos (Nanodrop™, Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Este equipo mide la

absorbancia de todas las moléculas de la muestra que absorben a la longitud de onda de interés, desde nucleótidos, ARN, ADN monocatenario, y ADN de doble cadena. Todas ellas absorben a 260 nm y contribuirán a la absorbancia total de la muestra.

Se utilizó un ratio de absorbancia de 260/280 nm para medir la pureza del ARN y del ADN. La muestra se considera pura si presenta un ratio alrededor de 1,8 si se trata de ADN y de 2,0 si se trata de de ARN. Si el ratio es menor indica la posible presencia de proteínas u otros contaminantes que absorben cercanos a la longitud de onda de 280 nm (figura 11).

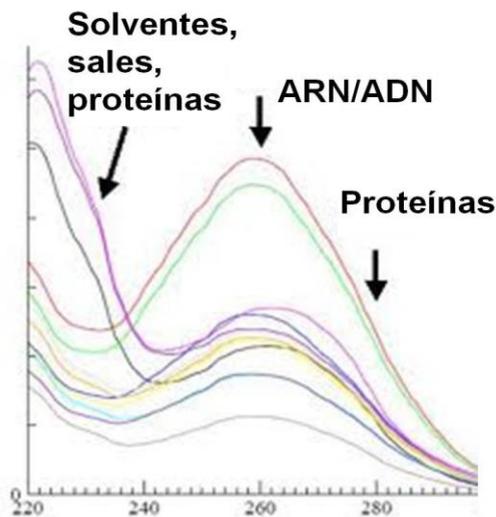


Figura 11.- Gráfica de absorbancias de muestras de ARN o ADN. Se muestra las absorbancias en las que absorben el ARN/ADN y los posibles contaminantes de las muestras, como proteínas, solventes y sales.

2.3.- Retrotranscripción

2.3.1.- Retrotranscripción de ARN obtenido de muestras en parafina

La retrotranscripción del ARN de las muestras incluidas en parafina se llevó a cabo con el kit "HIGH Capacity cDNA RT" (Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron

500 ng de ARN de cada muestra ajustando a un volumen final de 25 μ l con agua libre de nucleasas. La síntesis de ADNc se llevó a cabo con una mezcla de cebadores aleatorios y una enzima retrotranscriptasa (MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50U/ μ l). Esta mezcla estaba compuesta de: 5 μ l de 10X RT, 2 μ l de dNTPs, 5 μ l 10X cebadores aleatorios, 2,5 μ l de inhibidor de ARNasa, 2,5 μ l de retrotranscriptasa y 8 μ l de agua libre de ARN. La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador (T3000 Biometra, Göttingen, Alemania) con el siguiente protocolo: 25°C durante 10 min, 37°C durante 120 min, y 85°C durante 5 min. El producto se cuantificó mediante espectrofotometría, como se describe en el apartado anterior. La muestra se diluyó con agua libre de nucleasas a una concentración final de 100 ng/ μ l y se almacenó a -20°C hasta la realización de la RT-qPCR.

2.3.2.- Retrotranscripción de ARN obtenido de muestras en fresco

La retrotranscripción del ARN se llevó a cabo mediante el kit Advantage RT-for-PCR (Clontech, Palo Alto, California, Estados Unidos). Para cada muestra se añadió entre 0,2-1 μ g de ARN en un tubo estéril de 0,2 ml y 1 μ l de oligo (dT) a 20 μ M (oligonucleótidos de unión aleatoria a la cadena de ARNm y que sirven como molde para la enzima retrotranscriptasa). Se incubó durante 5 min a 72°C y posteriormente se añadió una mezcla de: 4 μ l 5x reacción tamponada, 1 μ l desoxiNTP (desoxinucleótidos) (10 mM), 0,5 μ l de inhibidor recombinante de la ribonucleasa (40 U/ μ l) y 1 μ l (200 U/ μ l) de la transcriptasa inversa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney (MMLV) (en inglés "Moloney Murine Leukemia Virus"). Tras mezclar todos los componentes, las muestras se incubaron durante 1 hora a 40°C, seguido de una segunda incubación a 72°C durante 10 minutos para detener la síntesis de ADNc y paralizar la actividad de la desoxirribonucleasa. Finalmente la cantidad de ADNc se cuantificó mediante métodos espectrofotométricos. La muestra se diluyó con agua libre de ARN a una

concentración final de 100 ng/μl y se almacenó a -20°C hasta la realización de la RT-qPCR.

2.4.- PCR cuantitativa a tiempo real

La metodología de RT-qPCR, a diferencia de la PCR competitiva, permite la automatización y además es rápida y no necesita el procesamiento posterior del producto de PCR, lo que reduce el riesgo de contaminación.

La RT-qPCR es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de ADN o de ARNm de una muestra. Es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o ARN utilizando cebadores específicos de secuencia. Cuando la PCR a tiempo real se combina con una reacción previa de retro-transcripción, puede determinarse la cantidad de ARNm de una muestra mediante una cuantificación relativa. Se dice que es una cuantificación relativa porque se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo (control endógeno). Es lo que se denomina normalización de la expresión del gen específico. Los genes más utilizados como controles endógenos son: *ARNr 18S*, *GAPDH*, *beta-actina*, *TBP*, *HPRT*, *beta-2- microglobulina*, entre otros.

La cuantificación del producto se produce mediante la adición de fluoróforos que se unen al amplicón de forma cuantitativa, a mayor producto se emitirá mayor fluorescencia. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARN/ADN iniciales, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen, el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores.

El principal método de análisis de RT-qPCR y el utilizado en nuestro experimento, es el que emplea sondas TaqMan (Heid et al., 1996) que garantiza la

obtención de ensayos de PCR altamente específicos, con una eficiencia de amplificación cercana al 100% que además permite evaluar numéricamente, la cantidad de moléculas de material genético presente en cada muestra.

Esta metodología se basa en la actividad 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa y en la amplificación mediante RT-qPCR de una determinada secuencia diana en presencia de una sonda fluorescente específica (sonda TaqMan) que hibrida con la secuencia diana que estamos amplificando (figura 12).

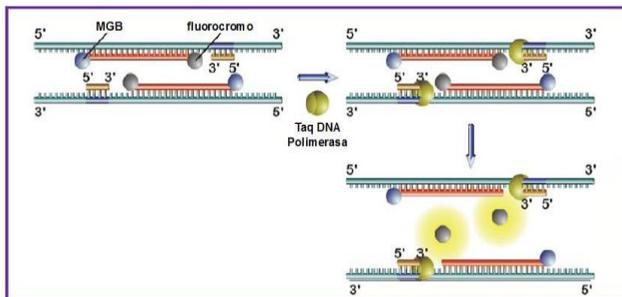


Figura 12.- RT-qPCR con tecnología TaqMan. Fundamentos de la estrategia empleando sondas TaqMan. Actividad 5'exonucleasa de la Taq polimerasa.

La sonda TaqMan tiene unido un fluorocromo en posición 5' y un amortiguador de fluorescencia en posición 3' que se une al surco menor del ADN protegiendo a la sonda de la actividad exonucleasa de la enzima Taq polimerasa (figura 13).

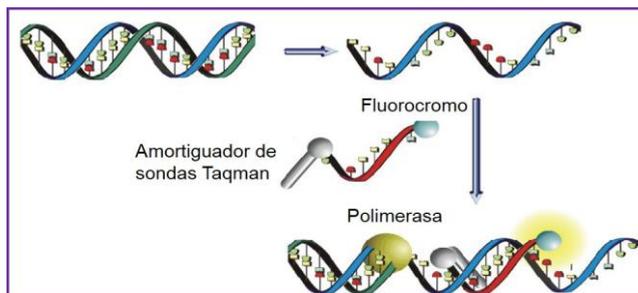


Figura 13.- RT-qPCR con tecnología TaqMan. Mecanismo de acción del amortiguador de fluorescencia en las sondas TaqMan.

Además, esta sonda está fosforilada en el extremo 3' para evitar su extensión durante la reacción de PCR. Si la secuencia diana está presente en la muestra, la sonda TaqMan hibridará específicamente con ella, situándose entre los dos cebadores. Cuando se produce la etapa de extensión en la reacción de PCR, la actividad 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa degradará la sonda TaqMan liberando el fluorocromo, que al estar fuera de la influencia del amortiguador emitirá una señal que puede ser captada por el sistema óptico del equipo. Este proceso de degradación de la sonda tiene lugar en cada ciclo y no interfiere con la acumulación del producto de la RT-qPCR, por lo que se produce un incremento exponencial de la señal de fluorescencia en cada ciclo de la reacción de RT-qPCR (figura 14). Otra de las ventajas es que la enzima Taq polimerasa no digiere la sonda libre sino únicamente la hibridada, por lo que la cantidad de señal fluorescente emitida es proporcional a la cantidad de producto acumulado. La medición de la intensidad de fluorescencia se realiza de forma continua, lo que nos proporciona una información dinámica en tiempo real (análisis cinético) del proceso. De esta forma podemos establecer el ciclo umbral (Ct) (en inglés "Cycle Threshold"), es decir, el número de ciclos necesarios para que la cantidad de producto producido alcance el nivel de detección que hayamos fijado, lo que a su vez se correlaciona directamente con la cantidad de ADNc de la secuencia diana (figura 14).

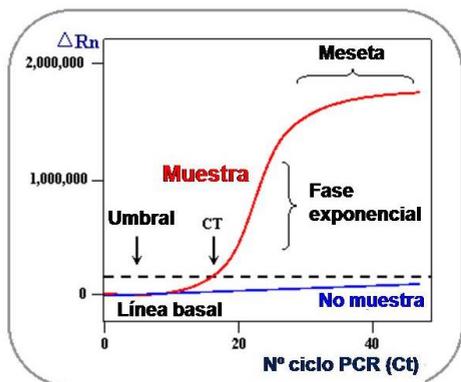


Figura 14.- Modelo de RT-qPCR. Se representa el nº de ciclo de la PCR (Ct) respecto al producto de PCR (ΔRn) de una muestra (línea roja) y de control negativo (línea azul). En la representación de la muestra, se observa el patrón típico esperado, en el que en los primeros ciclos de la PCR no hay producto, posteriormente presenta una fase exponencial llegando a alcanzar una meseta (Imagen modificada de <http://www.rt-pcr.com>).

El método utilizado para calcular la expresión relativa de un gen es el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Este método consiste en relativizar la expresión del gen en la muestra problema respecto a la muestra control, normalizando ambas con la expresión de un gen constitutivo. Para ello se sigue el siguiente procedimiento:

- Cálculo del valor de ΔCt . Consiste en normalizar el valor de Ct de cada muestra respecto al control endógeno:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{control endógeno}}$$

- Cálculo de $\Delta\Delta Ct$: Se normaliza respecto a la muestra control o calibrador.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra problema}} - \Delta Ct_{\text{muestra control}}$$

- Cálculo de la expresión relativa ("Fold change"): Representa cuántas veces más o cuántas veces menos se expresa el gen problema en la muestra bajo estudio respecto a la muestra control, relativizado a la expresión basal de un gen constitutivo. La muestra control tendrá un valor de 1, mientras que las muestras problema presentarán un valor mayor o menor de 1 dependiendo si la expresión del gen es mayor o menor, respectivamente.

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Debido a todas estas características, la metodología de la TaqMan RT-qPCR fue utilizada para el análisis de expresión génica de marcadores (*GCDFP15*, *MGB1*, *SBEM*, *MUC1*, *NY-BR-01*, *WT-1*) en las muestras de metástasis confirmada y de CO y MO de pacientes de PF. Como muestra control

se utilizó un pool de ovario sano comercial. Los experimentos de RT-qPCR se realizaron con el sistema ABI PRISM™ 7900 Sequence Detection (Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos). Los cebadores utilizados y los correspondientes controles se detallan en la tabla 4. Como fluorocromo de unión a ADN de doble cadena se usó FAM (carboxi-fluoresceína) cuya absorbancia es de 535 a 495 nm. Para cada 10 µl de reacción TaqMan, se mezclaron 1 µl de ADNc, 3,5 µl de agua destilada libre de ARN, 5 µl de “TaqMan Universal PCR Master Mix” (PE Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos) y 0,5 µl 20x “Assay on Demand” que contenían la sonda y los cebadores específicos para cada gen. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado. Las condiciones de RT-qPCR fueron las siguientes: 2 min a 50°C seguido de 10 min a 95°C para la activación enzimática, posteriormente ocurren 45 ciclos de dos pasos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. Los productos finales se analizaron con el software específico de sistema de detección de secuencias 7900HT versión 2.4 (PE Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos). Los datos se representaron mediante el valor medio relativo del gen analizado y normalizado con respecto al valor correspondiente del gen de la subunidad 18S del ARN ribosómico utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001; Fleming et al., 2010).

Tabla 4.- Cebadores (sondas Taqman) utilizados para cada uno de los genes analizados. El gen 18S fue utilizado como control de todos los demás genes.

Gen	Referencia secuencia	Exón	Longitud del amplicón
<i>18S</i>	Hs99999901_s1	1-1	187
<i>GCDFP15</i>	Hs00160082_m1	1-2	94
<i>MGB1</i>	Hs00935948_m1	1-2	107
<i>SBEM</i>	Hs00536495_m1	1-2	86
<i>MUC1</i>	Hs00159357_m1	7-8	84
<i>NY-BR-01</i>	Hs00369567_m1	8-9	86
<i>WT-1</i>	Hs01103751_m1	3-4	72

3.- Estudios histopatológicos

Cada una de las muestras se analizó mediante microscopía óptica siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

3.1.- Fijación

Este proceso se refiere al tratamiento del tejido con sustancias químicas, de manera que se mantienen las células estructuralmente intactas. Esto se logra al inactivar ciertas enzimas celulares que de otra manera iniciarían la autólisis y llevarían a la degeneración post-mortem. La fijación mantiene las estructuras al estimular la formación de enlaces cruzados entre las proteínas. Las muestras fueron fijadas en formaldehído al 4% (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido).

3.2.- Lavado

Es necesaria la eliminación del exceso del fijador para evitar una posterior interferencia química en el proceso de inclusión. Los medios de inclusión utilizados son hidrófobos y precisan de la eliminación del agua del tejido, por ello, se realizó una deshidratación del tejido con etanol. Debido a que una gran parte del tejido está constituido por agua, se aplicó una serie gradual de soluciones acuosas de menor a mayor grado del agente deshidratante. Este paso se realizó de forma gradual ya que si se somete directamente al tejido a soluciones de etanol absoluto, éste se deformaría debido a que el agua tisular saldría muy rápidamente de la muestra.

Por lo tanto, se procedió a la deshidratación de las muestras en alcohol de graduación decreciente (50, 70, 80, 90%) y finalmente se sumergieron en 3 pases de alcohol absoluto (Panreac, Barcelona, España).

3.3.- Aclaramiento o diafanización

Una vez deshidratado el tejido, se pasa a una solución de una sustancia que es miscible tanto con el alcohol como con el medio de inclusión a utilizar. La sustancia comúnmente utilizada es el xilol o xilol. Este proceso se llama aclaramiento ya que el tejido se torna transparente o claro en el xileno, esto se debe a que cambia su índice de refracción.

Una vez deshidratadas las muestras, se aclararon mediante pasos sucesivos en xilol (Panreac, Barcelona, España) para extraer el agente deshidratante.

3.4.- Inclusión

Por lo general, los tejidos son estructuras blandas y frágiles, incluso después de la fijación. Previo a la obtención de los cortes, es necesario incluirlos en un medio de soporte. En estado líquido, estos medios tienen la capacidad de penetrar y rodear el tejido, de esta forma se puede producir el endurecimiento (por enfriamiento o por polimerización), para formar un bloque sólido que pueda ser cortado fácilmente en el microtomo.

Las muestras fueron depositadas individualmente en recipientes con parafina fundida a 60°C y se dejaron en la estufa durante 1 h a 60°C para que el xilol se evaporase y los espacios anteriormente ocupados por éste fuesen ocupados por la parafina. Este paso se repitió una vez más para eliminar la mayor cantidad de xilol posible de cada muestra. Después se colocaron las piezas en parafina fundida en un molde de metal rectangular, orientadas de forma adecuada y se dejaron solidificar a TA.

3.5.- Corte

El bloque de parafina con el tejido se puede cortar en secciones lo suficientemente delgadas como para permitir el paso de la luz. La mayor parte de los preparados para microscopía óptica tienen un grosor de 4 μm .

Una vez obtenidos los bloques de parafina con cada una de las muestras, se realizaron cortes de 4 μm de espesor. Para la obtención de estos cortes se utilizó el microtomo (Microm GMBH, tipe HM310, Walldorf, Alemania) con cuchillas de acero. Estos cortes se depositaron en un baño termostatzado a 37°C para eliminar las arrugas y pliegues debidos al corte. A continuación fueron recogidos con portaobjetos SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) para mejorar la adherencia de los mismos. Finalmente los cortes fueron guardados en una estufa a 37°C durante 48-72 horas para mejorar su secado y adhesión final.

3.6.- Tinción y Montaje

La tinción de los elementos estructurales de los tejidos específica y de manera diferencial es indispensable para optimizar su visualización.

Las muestras fueron desparafinadas durante 1 hora en estufa a 60°C, a continuación los portaobjetos se colocaron en cestillas de tinción y fueron sumergidos en xilol durante 5 minutos para terminar de eliminar los restos de parafina, repitiendo este paso 4 veces. Posteriormente las muestras se rehidrataron con concentraciones decrecientes de alcohol (90, 80, 70, 50%) hasta llegar a agua destilada, procediéndose seguidamente a la tinción: Hematoxilina de Harris (Sigma, St Louis, Estados Unidos) previamente filtrada durante 15 minutos, lavado en agua corriente durante 5 minutos y Eosina alcohólica (Sigma, St Louis, Estados Unidos) previamente filtrada durante 5 minutos. Tras la tinción, las

muestras fueron deshidratadas con concentraciones crecientes de alcohol (50, 70, 80, 90, 100%) hasta llegar a xilol donde permanecieron durante 6 minutos.

Posteriormente las muestras fueron montadas de forma permanente con un cubreobjetos con una base de pegamento (Eukitt, Kinder GmbH & Co, Freiburg, Alemania) como soporte para el mismo. Las muestras fueron guardadas a TA hasta su posterior análisis mediante microscopía óptica.

4. -Estudios inmunohistoquímicos

El método de IHQ consiste en una inmunotinción con el método avidina-biotina. Esta técnica se basa en la determinación de la expresión de una proteína de superficie celular utilizando un anticuerpo específico contra esa proteína. A continuación, se utiliza un anticuerpo secundario contra el anticuerpo específico, que bien podrá estar biotilado o bien estar unido a un fluorocromo que permita su posterior detección. En el caso de utilizar un anticuerpo unido a biotina se añade posteriormente el complejo avidina-peroxidasa, que al reaccionar con su sustrato dará color, más o menos intenso en función de la expresión de la proteína.

4.1.- Marcadores moleculares analizados

- GCDFP15: Se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón que se suministra de forma líquida en un tampón que contiene proteína estabilizadora y 0,015 mol/L de azida de sodio. Se ha utilizado el clon 23A3 Isotipo IgG2a, kappa (DAKO Corp., Barcelona, España). Presenta un patrón de tinción celular citoplasmático y se puede observar un marcaje segregado en el espacio intercelular. GCDFP15 se expresa en células neoplásicas provenientes de tumores primarios y metastásicos de mama (tabla 5).

- **MGB1:** Se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón (clon: 304-1A5, isotipo IgG1, kappa) suministrado en forma líquida en un tampón que contiene proteína estabilizadora y 0,015 mol/L de azida de sodio (DAKO Corp., Barcelona, España). Presenta un patrón tinción celular citoplasmático o membranoso. MGB1 se expresa en carcinomas ductales invasivos y en carcinomas de mama metastáticos (tabla 5).

- **SBEM:** Se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo a una dilución 1/50 (Abcam, Cambridge, Reino Unido). SBEM se ha detectado en tumores primarios de CM y en metástasis de CM (tabla 5).

- **WT-1:** Se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón (clon 6F-H2, isotipo IgG1, kappa) suministrado de forma diluida en un tampón que contiene proteína estabilizadora y 0,015 mol/L de azida de sodio (DAKO Corp., Barcelona, España). Presenta un patrón de tinción celular citoplasmática o nuclear. Se expresa en la superficie de ovarios sanos y, en contraste, los carcinomas de mama son negativos para WT-1 (tabla 5).

Tabla 5.- Expresión en CM, metástasis o tejido ovárico sano de cada uno de los marcadores utilizados. Se indica la presencia o ausencia de los marcadores seleccionados en tumor 1º de CM, metástasis de CM, y en tejido ovárico sano.

Proteína	Expresión en tumor 1º de CM	Expresión en metástasis de CM	Expresión en tejido ovárico sano
GCDFP15	✓	✓	X
MGB1	✓	✓	X
SBEM	✓	✓	X
WT-1	X	X	✓

4.2.- Procesamiento de las muestras

Las muestras utilizadas para los estudios inmunohistoquímicos fueron las mismas que las manipuladas en los estudios histopatológicos. Por lo tanto, el procesamiento de las muestras es el mismo que el detallado anteriormente en el apartado de “estudios histopatológicos”.

Se hicieron cortes de 4 μm que se montaron sobre portas de vidrio tratados (Portaobjeto para adhesión, SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser, (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) para evitar la pérdida de muestra durante el protocolo de inmunohistoquímica.

4.3.- Inmunohistoquímica

De cada una de las muestras de estudio se obtuvieron 4 cortes seriados de 4 μm con el fin de analizar la expresión proteica de las 4 proteínas seleccionadas (GCDFP15, MGB1, SBEM y WT-1).

Los cortes fueron desparafinados mediante incubación a 60°C durante 1h y cuatro baños de xileno de 5 min cada uno. A continuación, los cortes fueron rehidratados mediante inversión en etanol a concentraciones decrecientes. Tras un lavado con agua para eliminar los restos de etanol, se llevó a cabo el desenmascaramiento antigénico en un autoclave, sometiendo los cortes durante 3 min a 120°C, 1,5 Atm en Tampón Citrato pH6 (en el caso del anticuerpo anti-SBEM) o pH 9 (anticuerpos anti-GCDFP15, anti-MGB1 y anti-WT-1) para romper los puentes disulfuro que se formaron al calentar a 60°C las muestras fijadas en formol y facilitar el paso del anticuerpo. Posteriormente, las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno (DAKO Corp., Barcelona, España) al 3% durante 10 minutos a TA para eliminar la actividad peroxidasa endógena. Seguidamente las muestras se incubaron, durante 1 hora y a TA en cámara húmeda, con los anticuerpos seleccionados para cada sección (GCDFP15, MGB1,

WT-1 (Dako Corp., Barcelona, España) y SBEM (Abcam, Cambridge, Reino Unido), éste último diluido en tampón de bloqueo hasta obtener la concentración de trabajo necesaria. Como control negativo se utilizó Tampón Fosfato Salino (PBS) (en inglés "Phosphate Buffered Saline") substituyendo así al anticuerpo primario. Como controles positivos de GCDFP15, MGB1 y SBEM se utilizaron cortes de tumor primario de mama, y como control de WT-1 ovario sano. Tras una incubación con el anticuerpo primario, las muestras se incubaron con el kit ENVISION (DAKO Corp., Barcelona, España) durante 30 minutos. Finalmente, se empleó una disolución con un sustrato cromógeno de peroxidasa durante 5 min. Entre cada incubación los tejidos fueron lavados tres veces con PBS. La contratinción se realizó con hematoxilina de Mayer y las secciones se montaron con un cubreobjetos con una base de pegamento (Eukitt, Kindler GmbH, Freiburg, Alemania) como soporte para el mismo, de este modo las muestras pudieron ser guardadas a TA hasta la toma de imágenes mediante microscopía.

4.4.- Observación y análisis

Las muestras fueron analizadas bajo microscopio óptico (LEICA DM4000B; Leica, Solms, Alemania) con sistema digital de captación de imágenes (LEICA DFC450C; Leica, Solms, Alemania). Se llevó a cabo un análisis morfológico considerando si las muestras presentaban ausencia o presencia de infiltración neoplásica. La observación de un marcaje específico de cada anticuerpo se consideró como positivo para la expresión proteica analizada, mientras que la ausencia de marcaje indica un resultado negativo para la expresión de dicha proteína.

5.- Ensayo de invasión celular in vitro

La principal característica de las células cancerígenas metastáticas es su capacidad invasora. En el organismo, antes de penetrar en el endotelio de los vasos para acceder al sistema sanguíneo, estas células deben invadir los tejidos locales mediante la degradación de las proteínas de la matriz extracelular (principalmente colágeno) para posteriormente atravesar la membrana basal. La capacidad de las células tumorales de degradar los componentes de esta matriz extracelular se correlaciona directamente con su poder invasivo.

Con el objetivo de cuantificar la capacidad invasora de las células obtenidas de CO y MO de pacientes con CM de nuestro programa de PF, se utilizó un sistema in vitro mediante un ensayo de invasión celular basado en el colágeno.

5.1.- Preparación de las muestras de tejido ovárico

Se analizaron 5 pacientes de PF con CM en estadios I y IIIa. Se obtuvieron 5 fragmentos de CO y 4 de MO de 10X40 mm de cada una de las pacientes que fueron previamente criopreservados tal y como se explicó en el apartado 1.1 de materiales y métodos.

5.1.1.- Descongelación de tejido ovárico

Para la descongelación de las muestras de CO y MO, los criotubos en los que estaban criopreservadas se introdujeron en un baño a 42°C en agitación continua hasta su descongelación. Seguidamente se añadió 1 ml de solución de descongelación a cada criotubo (Medio M199 con 5% HSA (Sigma, St Louis, Estados Unidos) y se incubó 10 min en hielo. A continuación, se retiró 1 ml y se añadió 1 ml de solución de descongelación y se incubó 5 min en hielo. Pasado este tiempo de incubación, se retiró todo el volumen del criotubo y se recuperó el tejido para su disgregación y posterior cultivo celular.

5.1.2.- Disgregación de tejido ovárico

La disgregación del tejido se realizó mediante acción mecánica y química. Con la ayuda de un bisturí se fragmentó todo el tejido hasta la obtención de fragmentos muy pequeños. Una vez recuperado todo este tejido, se añadió una solución de colagenasa I y DNAasa (Sigma, St Louis, Estados Unidos) a una concentración de 1 mg/ml y 1 µg/ml, respectivamente, en HBSS (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido) y se incubó a 37°C durante 3 h en agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 10 min a RT, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de medio DMEM/F-12 (Medio Eagle Modificado Dulbecco (en inglés "Dulbecco's Modified Eagle's Medium") + GlutaMAX-1 con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF) inactivado y 1% de Penicilina-Estreptomicina (P-S) (en inglés "Penicillin-Streptomycin") (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido) previamente filtrado.

5.1.3.- Cultivo celular

Una vez disgregada la CO y MO, la suspensión celular se cultivó en placas de 6 pocillos a 37°C y 5% de CO₂ en medio DMEM/F-12 + GlutaMAX-1 con 10% de SBF inactivado y 1% de P-S (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido). El cultivo celular de CO y MO (figura 15A y B) se mantuvo durante 20 días, hasta el momento del ensayo de invasión celular.

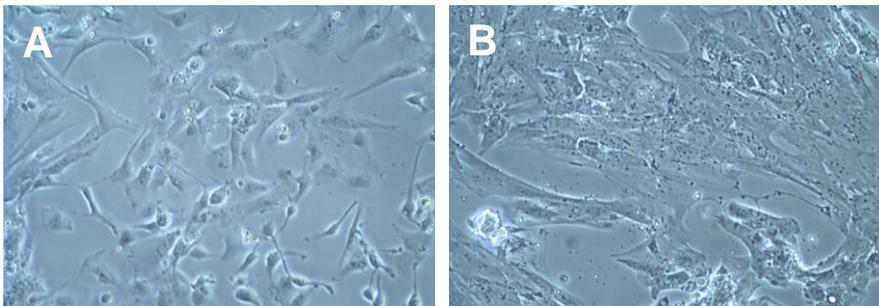


Figura 15.- Cultivo celular de CO y MO. Se muestra el cultivo celular de CO (A) y MO (B) 15 días después de su siembra. Aumento 10X.

5.2.- Cultivo de las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468

MDA-MB-231 y MDA-MB-468 son líneas celulares de CM con un potencial metastático elevado, siendo de las más utilizadas en los estudios de CM. Se aislaron por primera vez en 1974 y 1977, respectivamente, a partir de una muestra de derrame pleural de una paciente con CM que falleció de esta enfermedad (Cailleau et al., 1974; Cailleau et al., 1978). Ambas líneas presentan un crecimiento extraordinariamente rápido en cultivos poco enriquecidos, en parte por una regulación autocrina a partir de factores de crecimiento celular que ellas mismas secretan al medio.

Estas líneas celulares fueron utilizadas como control positivo de células metastáticas de CM. Unas alícuotas de estas células congeladas fueron proporcionadas por Sergio Bañuls, encargado del servicio de cultivo celular de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universitat de Valencia. Las células, fueron descongeladas y cultivadas en medio de cultivo DMEM/F-12 + GlutaMAX-1, suplementado con 10% de SBF inactivado y 1% de P-S (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido), previamente filtrado. A continuación se procedió a su siembra en un frasco de cultivo de 25 cm² (Orange Scientific, Bélgica) e incubación a 37°C y 5% de CO₂.

A las 48 horas se observó mediante microscopía óptica que parte de las células habían formado una monocapa y empezaban a adquirir la morfología característica de este tipo celular (figura 16). La monocapa formada fue lavada con PBS y disociada empleando la mezcla enzimática tripsina- ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 1X (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido) y se llevó a cabo su resiembra en medio de cultivo. La línea celular se sometió a no más de 4 pases mediante este procedimiento. Parte del cultivo celular se congeló y almacenó a -80°C y otra parte se empleó para la realización del ensayo de invasión celular.

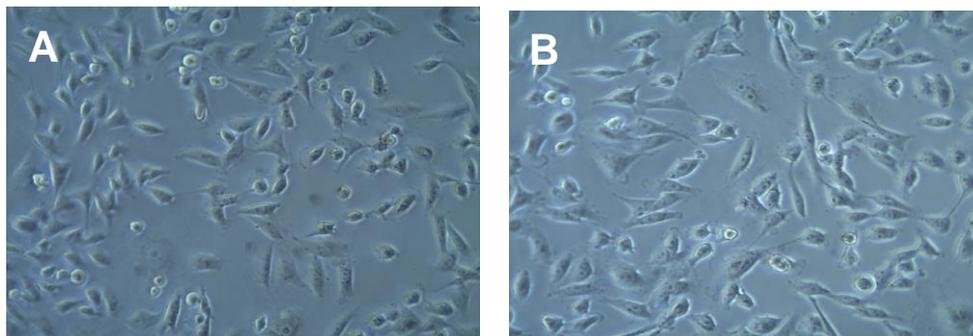


Figura 16.- Cultivo celular de las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468. Las fotografías muestran el aspecto de las células que constituyen la monocapa para las líneas MDA-MB-231 (A) y MDA-MB-468 (B). Aumento 10X.

5.2.1.- Congelación de células tumorales MDA-MB-231 y MDA-MB-468

Tras la disociación enzimática de los cultivos y su posterior inactivación con tripsina, las células fueron centrifugadas durante 5 min a 1500 r.p.m. a TA. A continuación, el sobrenadante fue retirado y el pellet fue resuspendido en el medio de congelación compuesto por DMEM/F-12 + GlutaMAX-1 y 10% de DMSO (Sigma, St Louis, Estados Unidos). Las células fueron trasvasadas a un criotubo que se introdujo en un sistema de congelación llamado “Mr. Frosty™ Freezing Containe” (Nalgene™, Nalge Nunc International, Dinamarca) con isopropanol (2-propanol, Panreac, Barcelona, España) la cual se depositó a -80°C durante 24 horas. Posteriormente los criotubos fueron traspasados a un tanque de N₂ líquido.

5.3.- Ensayo de invasión celular

Para el estudio in vitro de invasión celular se utilizó el kit “QCMTM 24-Well Collagen-Based Cell Invasion Assay” (Millipore, Darmstadt, Alemania). Este ensayo consiste en el cultivo de las células bajo estudio en una cámara de invasión. Las células se depositan sobre un inserto con un tamaño de poro de

8 μm y recubierto por una capa de colágeno polimerizado (figura 17). La capa de colágeno ocluye los poros, bloqueando la migración de las células no invasivas al pocillo inferior. Sin embargo, las células con capacidad invasora migran a través de la capa de colágeno polimerizado y se aferran a la parte inferior de la membrana de policarbonato. Las células que sean capaces de invadir y traspasar la membrana, se quedan en la parte inferior del inserto y serán cuantificadas mediante técnicas colorimétricas.

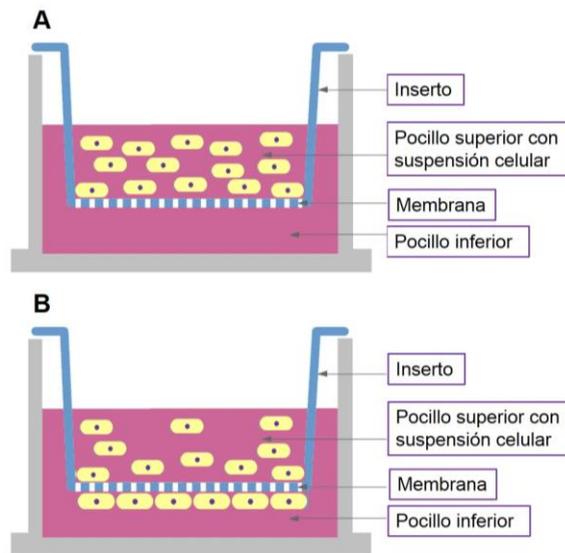


Figura 17.- Esquema del ensayo in vitro de invasión celular. Se representa el sistema de doble pocillo con el inserto. En el inserto se añade la suspensión celular y en el pocillo exterior se añade el mismo medio con el que se resuspendieron las células (A). Las células con capacidad invasora traspasarán la membrana del inserto y se quedarán adheridas a la parte inferior del mismo (B).

Una vez obtenida la monocapa celular de las 5 COs, las 4 MOs y de las líneas celulares cancerígenas utilizadas como controles positivos en el ensayo, éstas se mantuvieron durante 24 h con medio libre de SBF [DMEM/F-12 +

GlutaMAX-1 con 1% de P-S (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido)]. Transcurrido este tiempo, la monocapa celular formada fue lavada y disgregada siguiendo el protocolo previamente descrito en el punto 5.2. Posteriormente, se añadieron 800 µl de medio de cultivo en cada pocillo y se recuperó toda la suspensión celular, que fue centrifugada a 1.500 r.p.m. durante 5 min a TA. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de DMEM/F-12 + GlutaMAX-1 estéril (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido) con 1% S-P. La concentración celular obtenida se cuantificó en una cámara de Neubauer. Se prepararon las células de CO, MO, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 a una concentración de 500.000 células/ml.

El ensayo se realizó en placas de 24 pocillos. Como control positivo se utilizaron las líneas cancerígenas metastáticas de CM y como control negativo medio libre de suspensión celular. Cada una de las muestras se realizó por duplicado.

Se añadieron 300 µl de medio libre de SBF en el interior de cada inserto, permitiendo así la rehidratación de la capa de colágeno durante 30 minutos a TA. Transcurrido este tiempo, se eliminaron 250 µl del medio de los insertos y se añadió 250 µl de la suspensión celular preparada a 500.000 células/ml a cada inserto.

A continuación, se añadieron 500 µl de medio libre de SBF en la cámara inferior de la placa. Se incubaron durante 48 h a 37°C y 5% CO₂.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la cuantificación de las células invasoras en cada pocillo. Para ello, se eliminó todo el medio de la parte superior del inserto y se colocó el inserto en 400 µl de la solución de tinción proporcionada por el kit. Estos insertos se incubaron durante 20 min a TA para permitir la tinción de las células. Posteriormente se lavó cada inserto en agua destilada para eliminar el exceso de colorante y, con la ayuda de un bastoncillo, se eliminaron todas las células no invasoras que se encontraban en la parte interior del inserto. Una vez secados al aire, cada inserto teñido se transfirió a un pocillo

limpio con 200 µl de "Extraction Buffer" proporcionado por el kit, y se incubó durante 15 min a TA. Posteriormente, se transfirieron 100 µl de cada pocillo a una placa de 96 pocillos para cuantificar la densidad óptica a 560 nm.

Se calculó el valor medio y la desviación estándar de la absorbancia cuantificada en cada muestra. En el caso de las COs y MOs, posteriormente, se calculó la media y la desviación estándar de todas las COs y de las MOs del ensayo.

6.- Modelo experimental in vivo

La comprobación definitiva de que el tejido ovárico congelado de las pacientes de PF está libre de enfermedad metastática es el xenotrasplante a ratones inmunodeprimidos. Mediante el estudio in vivo se valora la ausencia o presencia de células metastáticas en la CO y MO criopreservada de las pacientes de PF.

6.1.- Preparación de las muestras de tejido ovárico

Se analizaron 5 pacientes de PF con CM en estadios I y IIIa. Se utilizaron 5 fragmentos de CO y 5 de MO de 10X40 mm de cada una de las pacientes que fueron congelados previamente como se explicó en el apartado 1.1 de materiales y métodos.

6.1.1.- Descongelación de tejido ovárico

La descongelación del tejido ovárico se realizó siguiendo el mismo protocolo que el detallado en el apartado 5.1.1 de materiales y métodos.

6.1.2.- Disgregación de tejido ovárico

La descongelación del tejido ovárico se realizó siguiendo el mismo protocolo que el detallado en el apartado 5.1.2 de materiales y métodos.

6.1.3.- Cultivo celular

El cultivo celular de las CO y MO utilizadas para este ensayo se realizó siguiendo el mismo protocolo detallado en el apartado 5.1.3 de materiales y métodos.

El cultivo celular de CO y MO se mantuvo durante 20 días, hasta el momento del marcaje celular y su posterior inyección en ratones inmunodeprimidos Nude.

6.1.4.- Marcaje celular

Las células en cultivo de CO y MO fueron marcadas mediante el uso de lentivirus para poder visualizarlas in vivo por fluorescencia.

Los lentivirus pertenecen a la familia *Retroviridae*, caracterizada por poseer un genoma de ARN y porque su ruta replicativa pasa por una fase en la que su información genética aparece en forma de ADN de doble cadena. La partícula viral lleva dos copias de ARN genómico, presenta una estructura Cap en el extremo 5' y una cola poli(A) de unos 20 restos de longitud en su extremo 3'. Además presenta genes necesarios para su replicación y para mantener su capacidad infectiva, *GAG*, *POL* y *ENV*. En el interior del virión también se encuentran varias copias de dos proteínas virales esenciales: la transcriptasa inversa e integrasa.

La infección y transmisión de estos virus a una célula hospedadora no necesita ningún vector, solamente del contacto directo entre los individuos. Tras la entrada del ARN genómico en la célula, la enzima transcriptasa inversa o retrotranscriptasa sintetiza una molécula de ADN de doble cadena que, con la ayuda de la integrasa, se inserta en el genoma de la célula infectada. Este ADN integrado se mantiene estable, siendo replicado como parte integrante de la célula hospedadora y transcrito por la maquinaria celular para producir todas las proteínas integradas en él (figura 18). Cualquier ADN incorporado en un retrovirus es expresado en la célula indefinidamente.

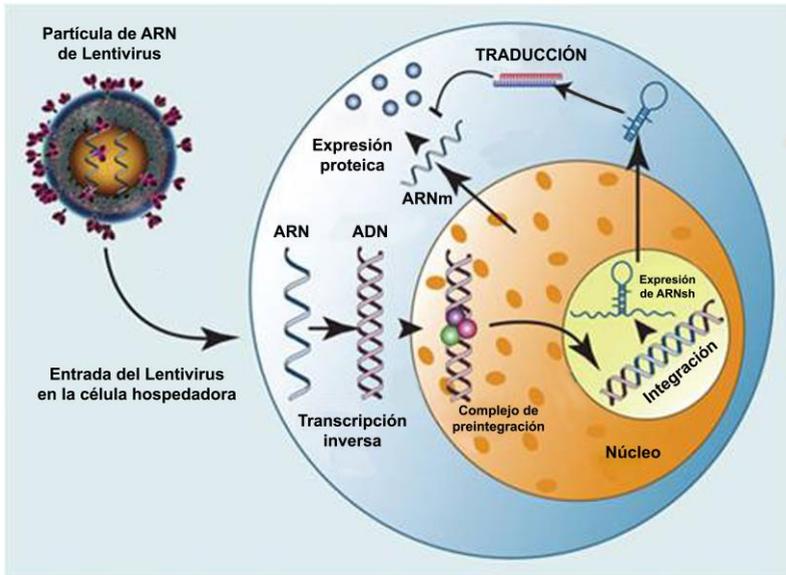


Figura 18.- Infección lentiviral a una célula hospedadora. Se representa la infección retroviral a una célula en la cual se retrotranscribe el ARN a ADN del virus y se integra en el ADN celular, en donde es transcrito y traducido por la maquinaria celular, expresando las proteínas contenidas en el ADN viral. Imagen modificada de <http://www.cultek.com>.

En nuestro caso, se utilizaron lentivirus que además de expresar los transcritos esenciales para su infección y transmisión, expresan la proteína “Cherry” y un gen de resistencia al antibiótico puromicina. “Cherry” se trata de una proteína fluorescente roja, que hace que las células que son infectadas por estos virus presenten dicha fluorescencia. La resistencia a puromicina hace que las células infectadas sean insensibles a este antibiótico, por lo que añadiendo puromicina al medio de cultivo se pueden seleccionar las células infectadas de las que no lo fueron.

El marcaje de las células de CO y MO en cultivo se realizó añadiendo a cada pocillo 500 µl de medio de infección vírica: DMEM/F-12 + GlutaMAX-1 (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido) con 10% de SBF (GIBCO, Paisley,

Strathclyde, Reino Unido), ¼ del sobrenadante viral (proporcionados por la Dra. Carmen María García-Pascual) y 8 µg/ml de Polybrene (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Transcurridas 24 h, se retiró el medio de la infección y se añadió medio de cultivo DMEM/F-12 + GlutaMAX-1 con 10% de SBF, 1% de P-S y 1% de fungizona (F) (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido). Cinco horas después se añadió el medio de cultivo con 1 µg/ml de puromicina (Sigma, St Louis, Estados Unidos), permitiendo la selección de las células infectadas, ya que solamente las células que incorporaron el virus presentan resistencia a puromicina. Además de por su supervivencia, las células infectadas se observaron de color rojo bajo el microscopio de fluorescencia (Nikon, Eclipse TS100) 48-72 h después de la infección (figura 19). El medio de cultivo fue cambiado cada dos días hasta el momento de la recogida celular para su inyección en los ratones.

Cuatro días después de la infección viral, la monocapa celular formada fue lavada con PBS y disociada empleando el método de dispersión enzimática utilizando 400 µl de tripsina-EDTA 1X (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido) incubándolas 5 min a 37°C. Posteriormente, se añadieron 800 µl de medio de cultivo en cada pocillo y se recuperó toda la suspensión celular, que fue centrifugada a 1.500 r.p.m. durante 5 min a TA. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de DMEM/F-12 + GlutaMAX-1 estéril (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido). La concentración celular obtenida se cuantificó en una cámara de Neubauer. Posteriormente se centrifugó nuevamente a 1.500 r.p.m. durante 5 min a TA y una vez eliminado el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 50 µl de medio DMEM/F-12 + GlutaMAX-1 estéril (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido) para ser inyectado en la cápsula renal de los ratones correspondientes.

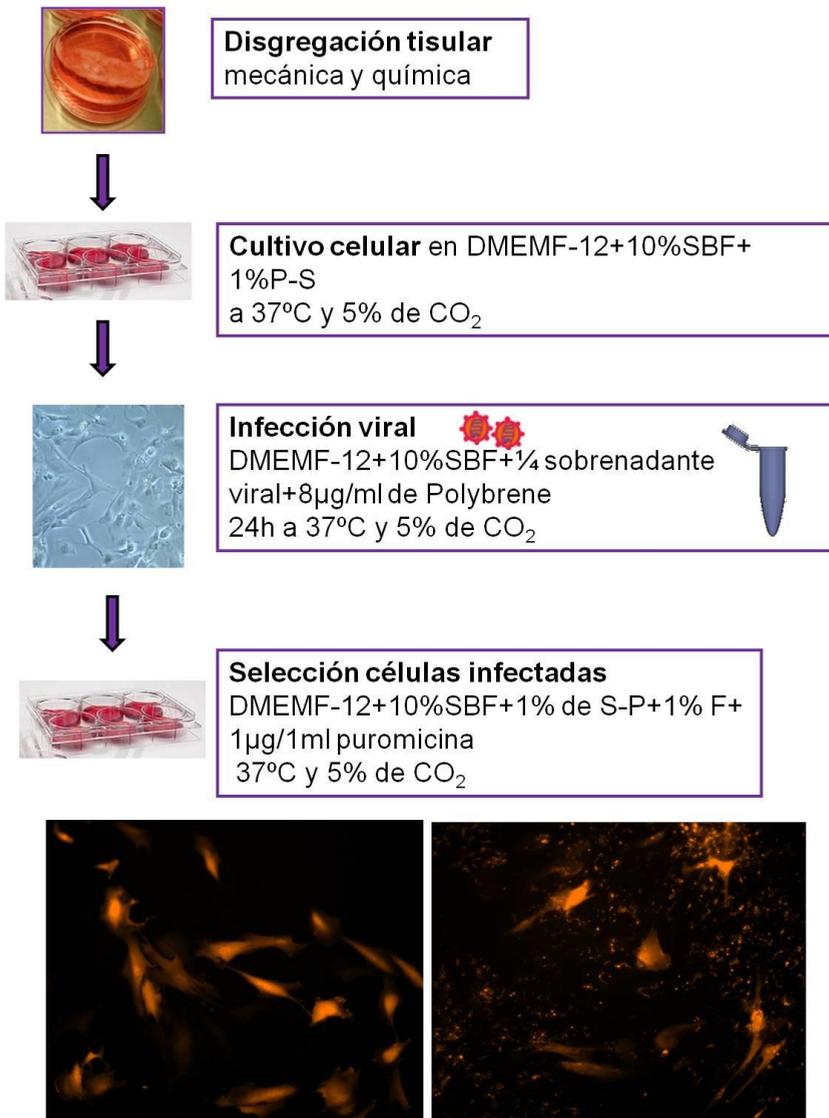


Figura 19.- Esquema de cultivo celular a partir de tejido ovárico e infección de las células. Se representa los pasos a seguir en el cultivo celular a partir de tejido ovárico (CO y MO) y el marcaje mediante lentivirus y su selección.

6.2.- Cultivo de la línea celular

El cultivo celular de la línea cancerígena metastática utilizada para el ensayo in vivo se realizó de la misma manera que se explicó en el apartado 5.2 de materiales y métodos.

El procedimiento de cultivo celular y marcaje mediante lentivirus se realizó siguiendo el mismo procedimiento que en las células de tejido ovárico, detallados anteriormente. En la figura 20 se muestra una imagen de las células MDA-MB-468 antes del marcaje mediante lentivirus (figura 20A) y después de dicho marcaje (figura 20B).

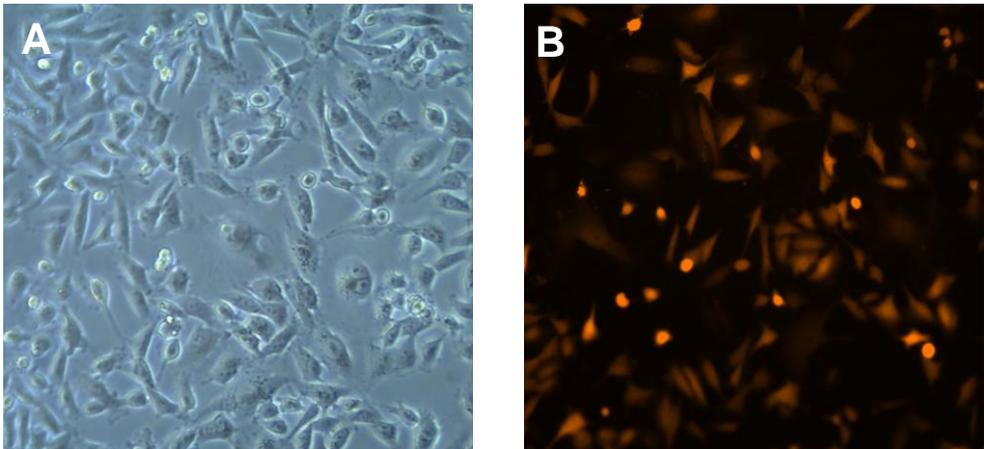


Figura 20.- Cultivo celular de la línea MDA-MB-468. Se muestra el cultivo celular antes de la infección (A) y el cultivo marcado (B). Aumentos a 10X.

6.3.- Modelo animal

Las células cultivadas y marcadas de CO, MO y MDA-MB-468 fueron inyectadas en la cápsula renal de ratones inmunodeprimidos.

Se utilizaron ratones hembra de 5 semanas (Hsd: Athymic Nude-nu, Charles River laboratories, Wilmington, MA, ESUU) libres de enfermedades patológicas específicas (figura 21). Se estabularon en jaulas con filtro, en el interior

de cabinas de protección, con una TA fijada de $21\pm 1^{\circ}$ C, con ciclo de luz/oscuridad de 12/12h y humedad relativa del $55\pm 10\%$ y en un área de bioseguridad libre de patógenos (SPF) (en inglés "Specific Pathogen Free"). Los ratones fueron mantenidos con alimentación ad libitum con pienso irradiado y agua autoclavada. La manipulación de animales se realizó siempre en el interior de campana de flujo laminar.

Todos los protocolos de experimentación animal que se utilizaron en este trabajo de investigación se atienen a lo dispuesto en la normativa legal vigente y en particular en el Real Decreto 1201/2005 de 21 de Octubre sobre protección de animales, utilizada para experimentación y otros fines científicos y de acuerdo con la directiva 86/609/CEE, de 14 de Noviembre de 1986 en relación a la toma de muestras de animales.



Figura 21.- Ratón transgénico utilizado. Ratón atímico Nude de 5 semanas de edad.

6.3.1.- Cirugía

Los animales fueron divididos en 5 grupos (tabla 6):

- **Grupo 1:** 1 animal al que solamente se le inyectó medio DMEM/F-12 + GlutaMAX-1, sin células, como control negativo.
- **Grupo 2:** 1 animal al que se le inyectó una dosis de 500.000 células de línea celular cancerígena MDA-MB-468.
- **Grupo 3:** 1 animal al que se le inyectó una suspensión celular de CO proveniente de una paciente sana.

- **Grupo 4:** 5 animales a los que se le inyectaron una suspensión celular proveniente de COs de pacientes con CM.
- **Grupo 5:** 5 animales a los que se le inyectaron una suspensión celular provenientes de MOs de pacientes con CM.

Tabla 6.- Muestras celulares inyectadas a ratones Nude. Se indica las muestras de CO, MO y MDA-MB-468 utilizadas para la inyección en cápsula renal a ratones. Se muestra la cantidad de células que fueron inyectadas de cada una de las muestras.

Muestra	Diagnóstico	Cantidad células inyectadas
Ctrl (medio)		---
CO-cesárea	SANA	3×10^6
P1-CO	CDI Estadio III	7×10^6
P2-CO	CDI Estadio IIIA	8×10^6
P3-CO	CDI Estadio IIA	6×10^6
P4-CO	CDI Estadio II	5×10^6
P5-CO	CDI Estadio I	6×10^6
P1-MO	CDI Estadio III	8×10^6
P2-MO	CDI Estadio IIIA	2×10^6
P3-MO	CDI Estadio IIA	8×10^6
P4-MO	CDI Estadio II	4×10^6
P5-MO	CDI Estadio I	6×10^6
MDA-MB-468	Línea celular CM metastásica	500.000

Los animales fueron sometidos a solamente un proceso invasivo para la inyección de las células de CO, MO, y línea celular en su cápsula renal. Para ello, todos los animales fueron sedados mediante la administración de cloruro mórfico al 2% (B.Braun, Melsungen, Alemania) y anestesiados durante la operación por inhalación con isofluorano al 4% (B.Braun, Melsungen, Alemania). Además, se utilizó el analgésico postquirúrgico Buprex (RB Pharmaceuticals, Richmond, EEUU). Estos procesos invasivos se llevaron a cabo con material estéril, bajo una

campana de flujo laminar y sobre una manta eléctrica para evitar la hipotermia. Todo el material fue previamente esterilizado por autoclave. Se aplicó una solución antiséptica (Povidona Iodada 10%) sobre la piel del animal y se procedió a la incisión de la piel en el lado dorsal izquierdo para acceder a la cápsula renal. Se realizó una inyección de 50 μ l de medio DMEM/F-12 + GlutaMAX-1 con la suspensión celular específica y la incisión fue cerrada mediante una sutura “Monosyn 6/0” (B.Braun, Melsungen, Alemania). Una solución antiséptica (povidona Iodada 10%) fue aplicada sobre la piel del animal antes y después de la intervención.

6.3.2.- Monitorización de las células inyectadas en los ratones

La monitorización de la evolución de las células inyectadas se realizó mediante un sistema de imagen in vivo (IVIS) (en inglés “In Vivo Imaging System”) (Xenogen-IVIS 100 cooled CCD Optical Macroscopic Imaging System, SC BioScience Corporation, Tokyo, Japan) realizando mediciones cada semana. Este sistema utiliza una tecnología de imagen óptica para facilitar el seguimiento longitudinal del tráfico celular en animales vivos. Presenta un conjunto de filtros de alta eficiencia y una mezcla de espectros con algoritmos que permite sacar el máximo provecho de la luminiscencia y fluorescencia entre la región de longitud de onda que abarca desde el azul al infrarrojo cercano. El instrumento está equipado con 10 filtros de excitación de banda de 30 nm y 18 filtros de emisión de banda de 20 nm, que ayudan a reducir significativamente la autofluorescencia.

El primer día de monitorización, después de la cirugía, se fijaron las longitudes de onda de emisión/excitación de mCherry, cuyo pico de absorción/emisión es de 587 nm y 610 nm, respectivamente. Se establecieron 3 longitudes de onda de excitación y emisión (570-620 nm, 605-660 nm, 640-680 nm) que fueron las utilizadas en cada medición. Dichas monitorizaciones se

realizaron bajo los efectos de la anestesia por vía inhalatoria mediante isofluorano al 3% (B.Braun, Melsungen, Alemania).

6.3.3.- Análisis de la invasión metastática post-mortem

Al cabo de 6 meses los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂. De cada uno de los ratones se realizó un análisis macroscópico morfológico con el fin de evaluar un posible daño tisular originado por la inyección de células cancerígenas. Además de cada uno de los ratones se extrajo la cápsula suprarrenal izquierda (en la cual se inyectaron las células), la cápsula suprarrenal derecha, el hígado, el bazo y el páncreas. De cada uno de estos órganos se extrajo un fragmento para su inclusión en parafina y su posterior análisis inmunohistoquímico, y el resto del órgano se guardó para su análisis molecular.

Los análisis moleculares e IHQs se realizaron siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente. Para el análisis molecular se utilizaron los cebadores *18S*, *GCDFP15*, *MGB1* y *SBEM* (tabla 4) y dos marcadores más para la identificación de células humanas y células murinas específicamente en los tejidos analizados, que son *HPRTh* (Hs02800695_m1) y *HPRTm* (Mm01545399_m1) (Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos). *HPRTh* y *HPRTm* son específicos de especie y amplifican una enzima que se expresa en todas las células del organismo de forma constitutiva, llamada hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa.

7.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa “SPSS statistics versión 19”. Para comprobar la distribución normal de los datos se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov. En función si las muestras presentaron una distribución normal o no, se realizó una comparación de medias mediante el test T para muestras independientes o la prueba de Mann-Whitney, respectivamente.

El test diagnóstico se analizó mediante curvas ROC, para el cálculo de su especificidad y sensibilidad. La media y desviación estándar también fueron calculados. Se consideró diferencias estadísticamente significativas si $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$. Se consideró no diferencias estadísticamente significativas (NS) si $p > 0,05$.

La representación gráfica de los resultados se llevó a cabo mediante el soporte informático GraphPad InStat V5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, Estados Unidos).

V- RESULTADOS

1.- Desarrollo del test diagnóstico de marcadores moleculares

Para establecer un panel de marcadores específico y sensible, se utilizaron 10 muestras de tejido ovárico sano y 13 muestras de metástasis confirmada (8 en ovario y 5 en otros tejidos). Se incluyeron además 4 muestras de tumor primario de CM. Como control se utilizó un pool comercial de ovario sano (ov. sano control).

Tal y como se explicó en el apartado de materiales y métodos, se extrajo el ARN de cada muestra y tras cuantificar y determinar su cantidad y calidad de ARN, se realizó la retrotranscripción a ADNc. Todas las muestras incluidas en este estudio presentaron una calidad y cantidad óptima de ARN y ADNc y se analizaron mediante RT-qPCR. Como muestra control para el cálculo de $-\Delta\Delta C_t$ se utilizó un pool comercial de ovario sano y como control endógeno se utilizó el gen ribosómico *18S*.

1.1.- Estudio de expresión génica en muestras de ovario sano

Todas las muestras de ovario sano expresaron el gen *18S* utilizado como control endógeno, indicando que el ADNc de cada muestra era óptimo y que la RT-qPCR había cursado con éxito. El valor promedio de C_t obtenido en estas 10 muestras fue de $24,07 \pm 4,37$ (figura 22).

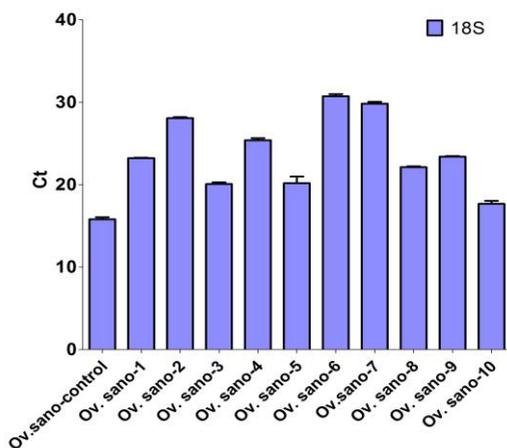


Figura 22.- Valor C_t obtenido del gen *18S* de las muestras de ovario sano. Se muestran los valores de C_t con su desviación estándar (obtenida de 3 réplicas) en el control y en las 10 muestras de ovario sano.

El gen *MUC1* se expresó en el 70% (7/10) de las muestras de ovario sano. Su expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) fue de $-43,36 \pm 61,83$ en un rango de -201,01 a 1 (figura 23); indicando que en las muestras de ovario sano la expresión de *MUC1* era hasta 201,01 veces menor que en la muestra utilizada como control.

El gen *WT-1* se expresó en el 70% (7/10) de las muestras analizadas, obteniendo un valor promedio de expresión relativa de $1,99 \pm 2,91$ (figura 23) en un rango de -1,2 a 9,8.

No se encontraron diferencias significativas (NS; $p > 0,05$) entre los valores de ΔCt de *MUC1* y *WT-1* entre las muestras de ovario sano y el control.

Los genes *GCDFP15*, *MGB1*, *SBEM* y *NY-BR-01* no se expresaron en ninguna de estas 10 muestras, siendo la expresión relativa igual a 1 en todas ellas (figura 23, 24).

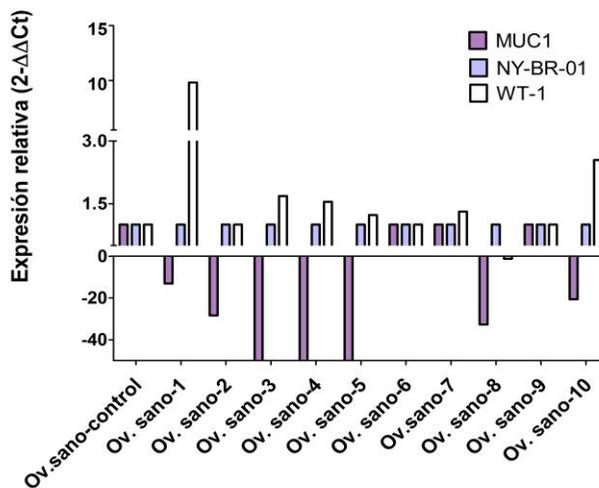


Figura 23.- Expresión génica de los marcadores de CM en muestras de ovario sano. Se muestran los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de los genes *MUC1* (morado), *NY-BR-01* (azul) y *WT-1* (blanco) de la muestra control de ovario sano y de las 10 muestras de ovario sano.

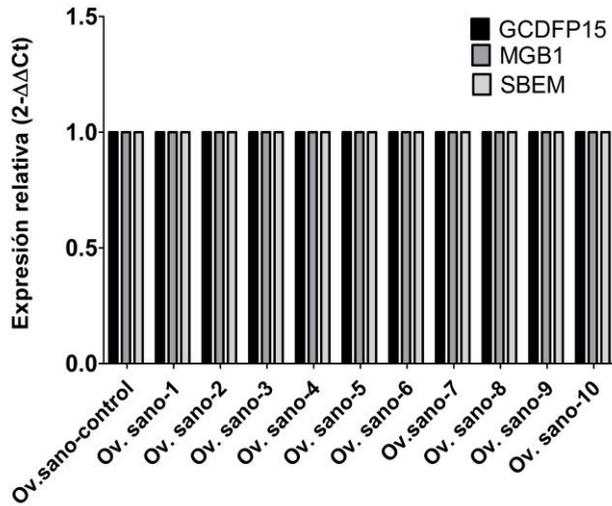


Figura 24.- Expresión génica de los marcadores de CM en muestras de ovario sano. Se muestran los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de los genes *GCDFP15* (negro), *MGB1* (gris oscuro) y *SBEM* (gris claro) de la muestra control y de las 10 muestras de ovario sano.

1.2.- Estudio de expresión génica en muestras de tumor primario de cáncer de mama

Se estudió la expresión génica de 4 muestras de tumor primario de pacientes con CM. Todas ellas expresaron el gen *18S* como control endógeno con un valor medio de Ct de $19,19 \pm 4,21$ (figura 25).

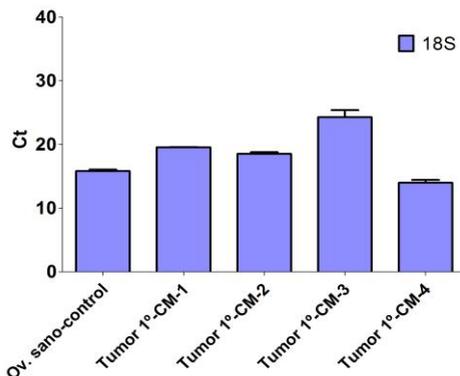


Figura 25.- Valor Ct del gen 18S obtenido de las muestras de tumor primario de CM. Se muestran los valores de Ct con su desviación estándar (obtenida de 3 réplicas) en el control y en las 4 muestras de tumor 1º de CM.

El gen *MUC1* se expresó en el 100% de las muestras obteniendo un valor medio de expresión relativa de $46,60 \pm 95,79$ en un rango de -11,16 y 189,86 (figura 26).

El gen *WT-1* se expresó en el 50% (2/4) de las muestras con unos valores de expresión relativa de -6,97 y -130,64 (figura 26), siendo menores que en la muestra control.

NY-BR-01 se expresó en el 50% (2/4) de las muestras con unos valores de expresión relativa de 13.650,82 y 189.849,94 (figura 26). La expresión de este gen es muy específica de muestras de CM y metástasis, observándose valores de expresión relativa muy altos, pero no en todas las muestras analizadas.

GCDFP15 se expresó en el 75% (3/4) de las muestras de CM presentando una expresión relativa promedio de $1.158.237,76 \pm 18,71$ y un rango de 18,71 y 1.158.237,76 (figura 27).

MGB1 se expresó en el 50% (2/4) de las muestras, obteniendo unos valores de expresión relativa de 55,26 y 3.618,01 (figura 27).

SBEM se expresó en 3 muestras, siendo la expresión relativa 12,12; 10,48 y 37,25 (figura 27).

En ninguno de los genes analizados en este grupo muestral se encontraron diferencias significativas (NS; $p > 0,05$) respecto al control de ovario sano en sus valores de ΔC_t obtenidos.

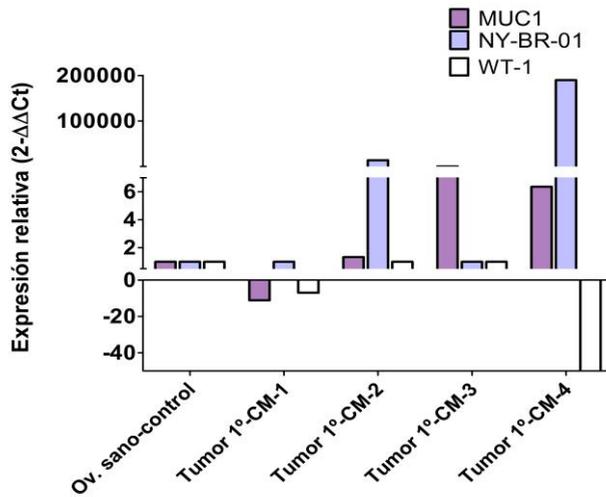


Figura 26.- Expresión génica de los marcadores en muestras de tumor 1º de CM. Se muestran los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de los genes *MUC1* (morado), *NY-BR-01* (azul) y *WT-1* (blanco) de la muestra control de ovario sano y de las 4 muestras tumor 1º de CM.

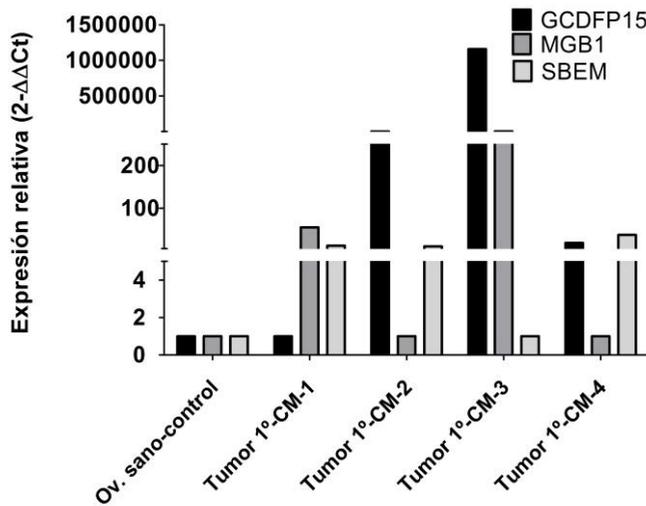
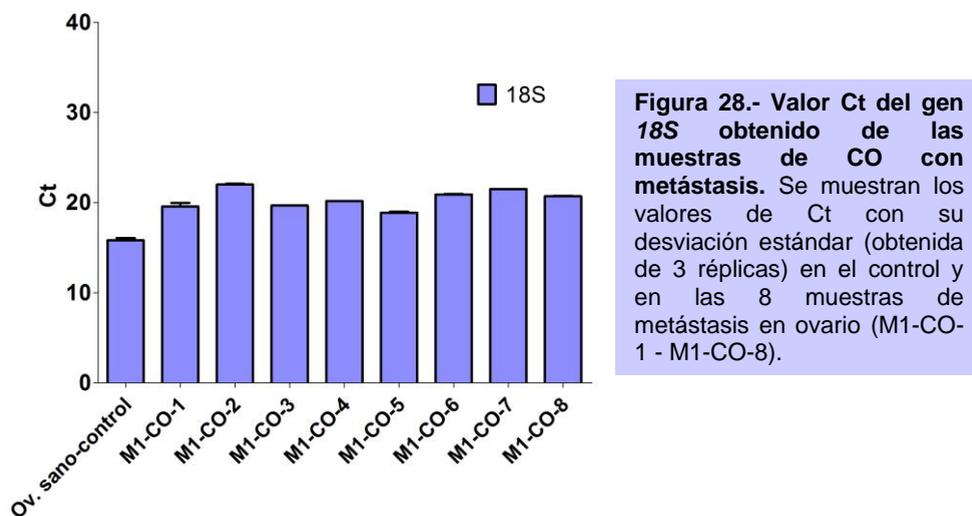


Figura 27.- Expresión génica de los marcadores en muestras de tumor 1º de CM. Se muestran los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de los genes *GCDFP15* (negro), *MGB1* (gris oscuro) y *SBEM* (gris claro) de la muestra control de ovario sano y de las 4 muestras tumor 1º de CM.

1.3.- Estudio de expresión génica en muestras de corteza ovárica con metástasis confirmada

Todas las muestras de CO expresaron el gen *18S* utilizado como control endógeno. El valor promedio de Ct obtenido en estas 8 muestras fue de $20,53 \pm 1,07$ (figura 28).



El gen *MUC1* se expresó en el 100% de las muestras (8/8). La expresión relativa media fue de $-0,41 \pm 16,67$, en un rango de $-18,75$ a $36,59$ (figura 29). No se encontraron diferencias significativas (NS; $p > 0,05$) entre los valores de ΔCt entre este grupo de muestras y el control. Estos valores indican que el gen *MUC1* no es un buen candidato para la detección de metástasis en ovario, ya que se expresa de igual manera tanto en CO sana como en CO con metástasis.

El gen *WT-1* se expresó en el 87,5% (7/8) de las muestras analizadas obteniendo un valor promedio de expresión relativa de $26,95 \pm 58,88$ en un rango de $-1,69$ a $171,62$ (figura 29). No se encontraron diferencias significativas (NS; $p > 0,05$) respecto a la muestra control.

El gen *NY-BR-01* se expresó en el 50% (4/8) de las muestras de metástasis en ovario, obteniendo un valor promedio de expresión relativa de $12.838,33 \pm 16.760,13$ (figura 29), en un rango de 99,75 a 36.122,27. Dada la ausencia de expresión de *NY-BR-01* en las muestras de ovario sano y en el control, estos valores muestran que la detección de la expresión del gen *NY-BR-01* es indicativo de la presencia de células malignas. Sin embargo, la ausencia de la expresión de *NY-BR-01* no indica que el tejido esté libre de enfermedad metastática y que a pesar de ser un gen muy específico, es poco sensible para la detección de micrometástasis de CM, ya que solo se expresó en el 50% de las muestras con metástasis confirmada en ovario, además, no se encontraron diferencias significativas (NS; $p > 0,05$) entre el ΔCt de este grupo de muestras y la muestra control.

El gen *GCDFP15* se expresó en el 75% (6/8) de los casos, obteniendo un valor promedio de expresión relativa de $10.425,18 \pm 27.565,85$, en un rango de 32,87 a 78.559,6 (figura 30). Estos elevados valores de expresión relativa para el gen *GCDFP15* hacen de él un buen candidato para su inclusión en el test diagnóstico. El ΔCt mostró diferencias significativas ($*p < 0,05$) respecto a la muestra control.

El gen *MGB1* se expresó en el 87,5% (7/8) de las metástasis en ovario. La expresión relativa media obtenida fue de $30.113,51 \pm 61.004,23$ en un rango de 15,75 y 177.849,82 (figura 30). Este marcador es altamente específico y sensible ya que solo se expresó en muestras con células malignas y se obtuvieron unos valores de $2^{-\Delta \Delta Ct}$ muy elevados y además, el ΔCt mostró diferencias muy significativas ($***p < 0,001$) respecto a la muestra control.

El gen *SBEM* se detectó en 87,5% (7/8) de las muestras con metástasis en ovario, obteniéndose un valor promedio de expresión relativa de $452.552,01 \pm 1.273.314,81$ (figura 30), en un rango de 3.603.831,18 y 17,81. Dada la elevada expresión relativa de *SBEM* y la ausencia de expresión del mismo en CO sana, se puede considerar un candidato óptimo para la inclusión en el test

diagnóstico de metástasis. El ΔCt mostró diferencias significativas (* $p < 0,05$) respecto a la muestra control.

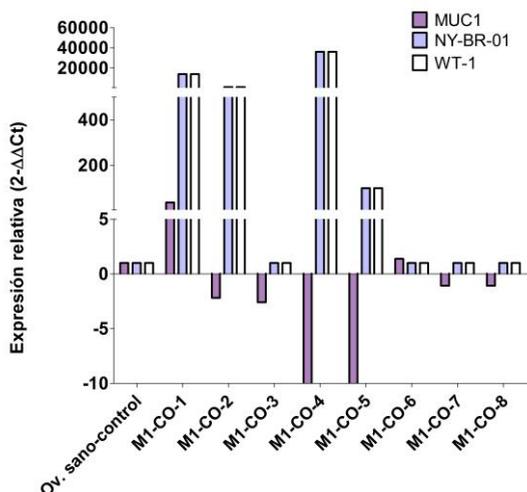


Figura 29.- Expresión génica de los marcadores en muestras de CO metastáticas de pacientes con CM. Se muestran los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de los genes *MUC1* (morado), *NY-BR-01* (azul) y *WT-1* (blanco) de la muestra control de ovario sano y de las 8 muestras de metástasis en ovario (M1-CO-1 - M1-CO-8).

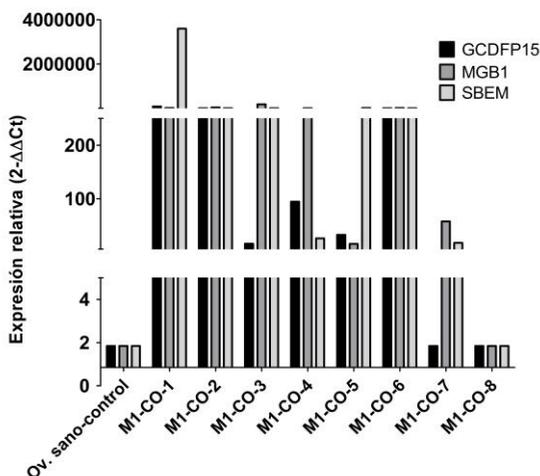


Figura 30.- Expresión génica de los marcadores en muestras de CO metastáticas de pacientes con CM. Se muestran los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de los genes *GCDFP15* (negro), *MGB1* (gris oscuro) y *SBEM* (gris claro) de la muestra control de ovario sano y de las 8 muestras de metástasis en ovario (M1-CO-1 - M1-CO-8).

1.4.- Estudio de expresión génica en muestras de metástasis confirmada en otros tejidos

Los genes candidatos se estudiaron también en 5 muestras con metástasis confirmada de hígado, pleura, hueso, ojo y ligamento uterino procedentes de pacientes con CM.

Todas estas muestras expresaron el gen *18S* utilizado como control endógeno. El valor promedio de Ct obtenido en estas 5 muestras fue de $19,68 \pm 3,79$ (figura 31).

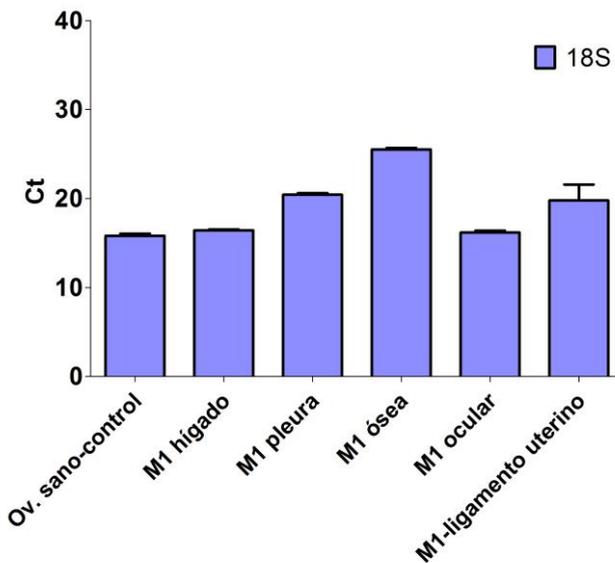


Figura 31.- Valor Ct del gen *18S* obtenido de las muestras de metástasis en otros tejidos. Se muestran los valores de Ct con su desviación estándar (obtenida de 3 réplicas) en el control y en las 5 muestras de metástasis (M1).

Los valores de expresión relativa de los genes candidatos obtenidos en estos tejidos se muestran en la tabla 7 y en la figura 32 y 33.

Tabla 7.- Expresión de las muestras de metástasis de pacientes con CM. Se muestra el valor de ΔCt obtenido para cada uno de los genes seleccionados en cada una de las muestras de metástasis (M1) en distintos tejidos de pacientes con CM.

MUESTRA	ΔCt <i>MUC1</i>	ΔCt <i>WT-1</i>	ΔCt <i>NY-BR-01</i>	ΔCt <i>GCDFP15</i>	ΔCt <i>MGB1</i>	ΔCt <i>SBEM</i>
Ctrl-Ovario sano	9,97±0,71	13,59±0,42	0	0	0	0
M1 hígado	10,83±0,22	14,99±0,51	18,37±0,31	11,64±0,22	20,39±0,67	16,43±0,1
M1 pleura	7,03±0,51	18,36±0,84	13,26±1,61	12,12±0,57	0	14,57±2,89
M1 ósea	10,03±0,18	0	0	12,64±0,19	0	0
M1 ocular	14,24±0,24	14,63±0,96	14,63±0,67	17,99±0,64	19,07±0,73	9,19±0,24
M1 ligamento uterino	13,41±0,44	10,83±0,56	0	19,78±0,26	0	0

El gen *MUC1* y *WT-1* no son buenos candidatos para la detección de metástasis ya que no existen diferencias significativas (NS; $p > 0,05$) en el valor de ΔCt entre muestras con metástasis y ovario sano.

El gen *NY-BR-01* presenta una especificidad del 100% ya que solo se expresó en muestras metastáticas, sin embargo es un marcador poco sensible ya que no se expresa en un porcentaje elevado y no se encontraron diferencias significativas (NS; $p > 0,05$) con el control en el valor de ΔCt .

Los genes *GCDFP15*, *MGB1* y *SBEM*, debido a su alta sensibilidad y especificidad en las muestras con metástasis confirmada respecto a los tejidos sanos, fueron incluidos en el test diagnóstico, aunque solamente se obtuvieron diferencias significativas ($*p < 0,05$) entre este grupo y el control en los genes *GCDFP15* y *SBEM*.

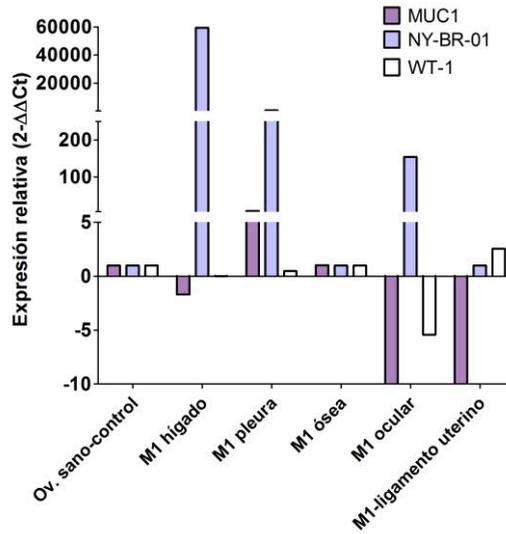


Figura 32.- Expresión génica de los marcadores en muestras de metástasis de CM. Se muestran los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de los genes *MUC1* (morado), *NY-BR-01* (azul) y *WT-1* (blanco) de la muestra control de ovario sano y de las 5 muestras de metástasis (M1) en hígado, pleura, hueso, ojo y ligamento uterino.

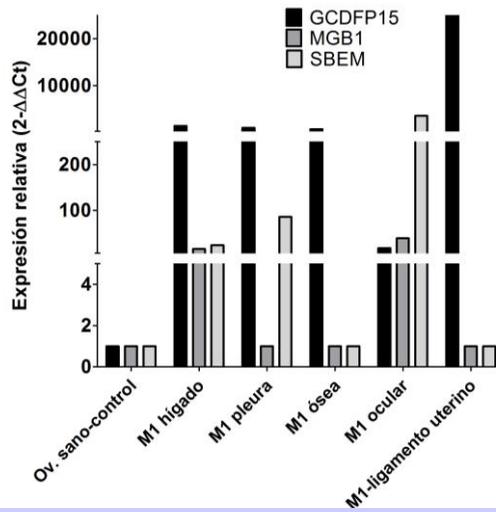


Figura 33.- Expresión génica de los marcadores en muestras de metástasis de CM. Se muestran los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de los genes *GCDFP15* (negro), *MGB1* (gris oscuro) y *SBEM* (gris claro) de la muestra control de ovario sano y de las 5 muestras de metástasis (M1) en hígado, pleura, hueso, ojo y ligamento uterino.

1.5.- Selección de marcadores para el test diagnóstico

- MUC1: Este marcador se expresó en todos los grupos de muestras analizadas. No se encontraron diferencias significativas (NS; $p > 0,05$) en la expresión génica de este gen entre muestras con metástasis confirmada y sanas. Debido a su baja especificidad para la detección de células malignas en tejido, fue descartado como candidato para su inclusión en el panel de marcadores del test diagnóstico.

- WT-1: Se expresó tanto en muestras con metástasis confirmada como en sanas, no encontrándose diferencias significativas (NS; $p > 0,05$) entre ambos grupos. Por lo tanto, tampoco fue incluido en nuestro panel de marcadores de detección de micrometástasis.

- NY-BR-01: Presentó una expresión específica en muestras con enfermedad metastática y no se expresó en ninguna de las muestras catalogadas como sanas, observándose diferencias significativas ($*p < 0,05$) entre ambos grupos. Sin embargo, dado que su expresión en muestras con metástasis confirmada fue solo en el 50% de los casos de CO y el 60% de los casos de metástasis en otros tejidos, este gen fue descartado como marcador para su inclusión en el test diagnóstico debido a su baja sensibilidad en la detección de células metastáticas. Un resultado positivo en la expresión relativa de este gen indicaría la presencia de células malignas, pero un resultado negativo no sería informativo.

- GCDFP15: La expresión de *GCDFP15* fue significativamente mayor ($***p < 0,001$) en las muestras con metástasis confirmada respecto a las muestras de ovario sano. Conjuntamente, *GCDFP15* se expresó en el 85% de las muestras afectas (6/8 COs y en hígado, pleura, hueso, ojo y ligamento uterino) mientras que su expresión fue nula en las muestras de ovario sano.

- MGB1: La expresión de *MGB1* fue significativamente mayor ($*p < 0,05$) en las muestras con metástasis confirmada respecto a las muestras de ovario sano. *MGB1* se expresó en 7/8 de COs y en metástasis de hígado y ojo.
- SBEM: La expresión de *SBEM* fue significativamente mayor ($***p < 0,001$) en las muestras con metástasis confirmada respecto a las muestras de ovario sano. *SBEM* se expresó en 7/8 CO afectas y en las muestras de metástasis de hígado, pleura y ojo.

1.5.1.- Cálculo de la especificidad y sensibilidad de los marcadores seleccionados mediante curvas ROC

Los genes seleccionados para ser incluidos en el test diagnóstico fueron sometidos a un análisis estadístico de curvas ROC para calcular su especificidad y sensibilidad.

- GCDFP15: El análisis de las curvas ROC de muestras sanas frente a muestras metastáticas mostró que con una especificidad de 1,0; la sensibilidad obtenida es de 0,85 (figura 34A). La comparación de muestras de ovario sano con muestras de ovario afecto, presentó una sensibilidad de 0,75 con una especificidad de 1 (figura 34B). Con estos resultados se estableció que *GCDFP15* es un buen candidato para su incorporación en el panel de marcadores del test diagnóstico.
- MGB1: El análisis estadístico mediante las curvas ROC de las muestras sanas contra las muestras metastáticas mostró que *MGB1* presenta una sensibilidad de 0,69 con una especificidad de 1,0 (figura 34A). La comparación de las muestras de ovario metastático con ovario sano mostró una sensibilidad de 0,87 con una especificidad de 1,0 (figura 34B). *MGB1* es un buen marcador para la detección de metástasis en ovario, no siendo tan sensible cuando se generaliza en las muestras metastáticas en todo el organismo. El estudio de la expresión de *MGB1* se considera un

buen candidato para el test diagnóstico, ya que presenta una alta especificidad y sensibilidad.

- **SBEM**: La comparación de todas las muestras sanas con todas las muestras afectas, mostró un valor estadístico de una sensibilidad de 0,77 con una especificidad de 1,0 (figura 34). Al realizar el mismo análisis comparando las muestras de CO sanas con afectas, la sensibilidad aumenta a 0,87, con una especificidad de 1,0 (figura 34), por tanto, es un buen candidato para su inclusión en nuestro test diagnóstico.

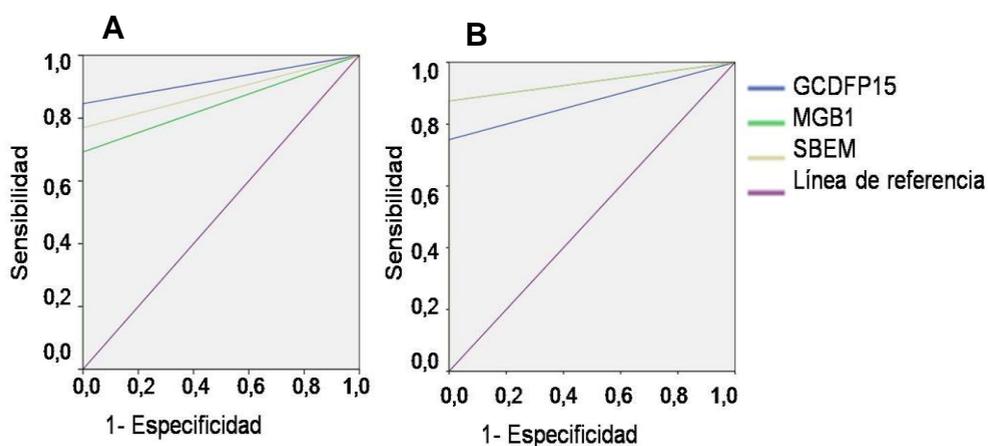


Figura 34.- Curvas ROC de la expresión relativa de los genes GCDFP15, MGB1 y SBEM. En la figura A se muestra la curva ROC obtenida de la comparación entre las muestras sanas y las afectas. En la figura B se muestra la curva ROC resultante de la comparación entre las muestras de CO sanas y las muestras de CO afectas.

1.5.2.- Valoración de los marcadores moleculares seleccionados para el test diagnóstico

Con los resultados obtenidos se estableció el panel de marcadores idóneo para el test diagnóstico en desarrollo. Este panel de marcadores consta de los genes *GCDFP15*, *MGB1* y *SBEM*, cuya expresión génica será estudiada en muestras con riesgo de presentar micrometástasis.

Este test diagnóstico se considerará positivo, es decir, que la muestra contiene células malignas, cuando 1 de los 3 marcadores presente un valor de expresión relativa mayor a 10. Siguiendo este criterio, la especificidad del test es de 1,0 y la sensibilidad de 0,92 con un valor predictivo positivo de 1 y un valor predictivo negativo de 0,91.

1.6.- Estudio inmunohistoquímico del test diagnóstico

Se estudió la expresión proteica de los genes incluidos en el test diagnóstico mediante técnicas IHQs (GCDFP15, MGB1, SBEM). Debido a que WT-1 es considerado a nivel histológico como un marcador de ovario sano, a pesar de no incluirlo en el test diagnóstico molecular, también se analizó desde el punto de vista proteico.

1.6.1.- Estudio inmunohistoquímico de GCDFP15

Las muestras de ovario sano no presentaron inmunotinción para esta proteína (figura 35A) al igual que las muestras de metástasis confirmada en hueso (figura 35B), ojo (figura 35C) y ligamento uterino (figura 35D). En las muestras de metástasis confirmada en ovario (figura 35E) y en hígado (figura 35F) se observó una clara expresión de GCDFP15.

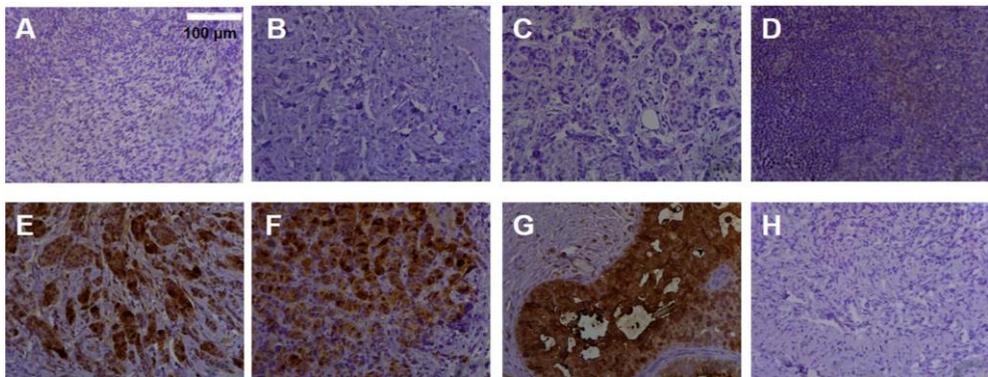


Figura 35.- IHQ de GCDFP15. Muestra de ovario sano (A). Metástasis ósea (B). Metástasis ocular (C). Metástasis en ligamento uterino (D). Metástasis en CO (E) Metástasis en hígado (F). Control positivo (tumor primario de CM) (G). Control negativo (H). Fotos tomadas con objetivo 20X. Escala a 100 µm en la figura A.

1.6.2.- Estudio inmunohistoquímico de MGB1

No se observó inmunotinción de MGB1 en las muestras de ovario sano (figura 36A), metástasis confirmada en hueso (figura 36B) y en ligamento uterino (figura 36C). Sin embargo, las muestras de metástasis confirmada en ovario (figura 36D), en hígado (figura 36E) y en ojo (figura 36F) presentaron una clara expresión proteica de MGB1.

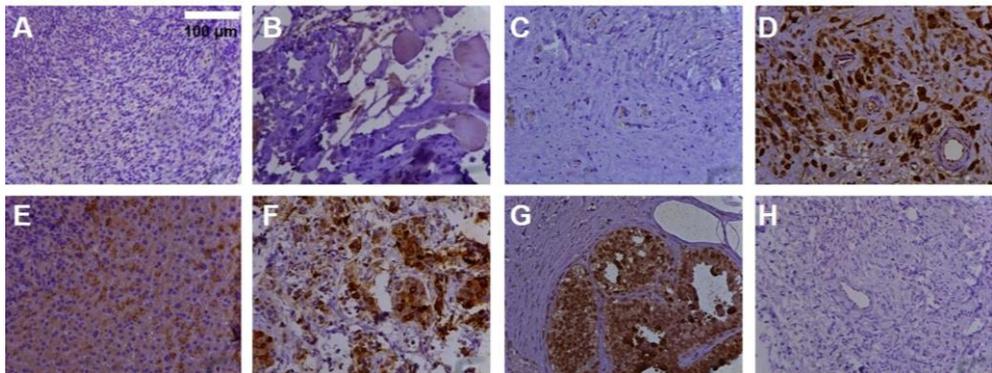


Figura 36.- IHQ de MGB1. Muestra de ovario sano (A). Metástasis ósea (B). Metástasis en ligamento uterino (C). Metástasis en CO (D). Metástasis en hígado (E). Metástasis ocular (F). Control positivo (G). Control negativo (H). Fotos tomadas con objetivo 20X. Escala a 100 µm en la figura A.

1.6.3.- Estudio inmunohistoquímico de SBEM

Las muestras de ovario sano (figura 37A), metástasis ósea (figura 37B) y ligamento uterino (figura 37C) fueron negativas para la expresión de SBEM a nivel proteico. Por el contrario, la expresión de SBEM fue evidente en muestras de metástasis en ovario (figura 37D) en hígado (figura 37E) y en ojo (figura 37F).

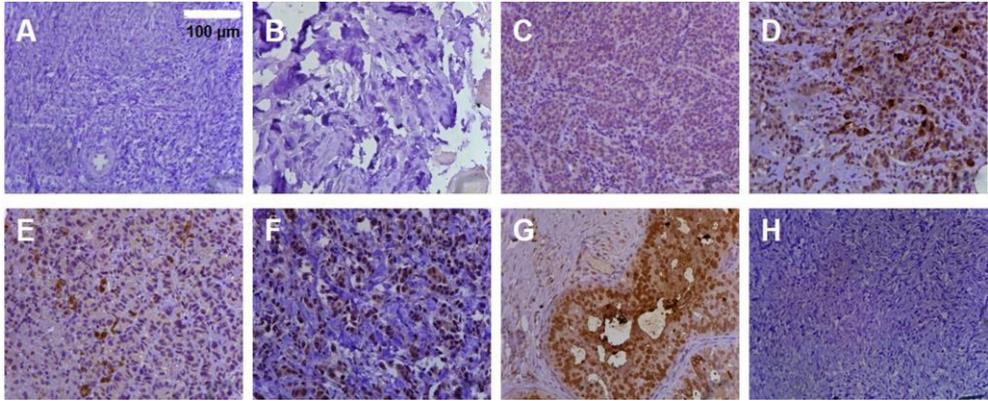


Figura 37.- IHQ de SBEM. Muestra de ovario sano (A). Metástasis ósea (B). Metástasis en ligamento uterino (C). Metástasis en CO (D). Metástasis en hígado (E) Metástasis ocular (F). Control positivo (G). Control negativo (H). Fotos tomadas con objetivo 20X. Escala a 100 µm en la figura A.

1.6.4.- Estudio inmunohistoquímico de WT-1

En las muestras de ovario sano (figura 38A), y en las muestras de metástasis ósea (figura 38B), ocular (figura 38C), en hígado (figura 38D) y ligamento uterino (figura 38E) se observó un marcaje positivo para la proteína WT-1. Sin embargo, este marcaje fue ausente en las muestras de metástasis de ovario de CM (figura 38F). La diferencia de marcaje entre las muestras de ovario sano y las de metástasis en ovario corrobora el estado sano o afecto de cada muestra, ya que está descrito que WT-1 es un marcador específico de tejido ovárico que está ausente en metástasis de CM (Sanchez-Serrano et al., 2009).

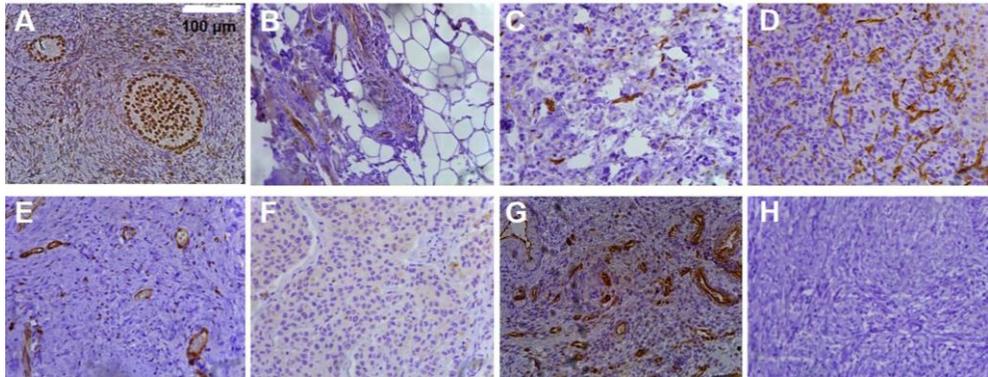


Figura 38.- IHQ de WT-1. Muestra de ovario sano (A). Metástasis ósea (B). Metástasis ocular (C). Metástasis en hígado (D). Metástasis en ligamento uterino (E). Metástasis en CO (F). Control positivo (G). Control negativo (H). Fotos tomadas con objetivo 20X. Escala a 100 µm en la figura A.

1.7.- Estudio comparativo de la expresión génica y proteica de los marcadores seleccionados para el test diagnóstico

Una vez presentados los resultados correspondientes a la expresión génica y proteica de los marcadores seleccionados para ser incluidos en el test diagnóstico de micrometástasis en tejido ovárico de pacientes de PF con CM, se llevó a cabo una valoración comparativa entre ambas técnicas (tabla 8).

Tabla 8.- Comparación RT-qPCR e IHQ. Se muestran los resultados obtenidos mediante RT-qPCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) e IHQ para las muestras de metástasis confirmada para los genes *GCDFP15*, *MGB1* y *SBEM*.

MUESTRA	GCDFP15		MGB1		SBEM	
	RT-qPCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	IHQ	RT-qPCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	IHQ	RT-qPCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	IHQ
Ovario sano	1	-	1	-	1	-
Metástasis CO	45.976,15	+	43.491,62	+	6.150.112,84	+
Metástasis hígado	1.435,11	+	16,46	+	24,08	+
Metástasis óseo	705,01	-	1	-	1	-
Metástasis ocular	17,2	-	40,34	+	3.567,9	+
Metástasis ligamento uterino	1	-	9.285.291.136,7	-	1	-

2.- Análisis de tejido ovárico de pacientes de Preservación de la Fertilidad

Se analizaron un total 60 muestras de CO y MO de pacientes con CM que acudieron a nuestro programa de PF mediante métodos moleculares y por IHQ.

2.1.- Estudio de expresión génica mediante técnicas moleculares

Se llevó a cabo el estudio de la expresión génica de los genes previamente seleccionados en el test diagnóstico: *GCDFP15*, *MGB1* y *SBEM*.

El control endógeno (gen *18S*) fue expresado en todas las muestras de CO ($Ct=20,66\pm4,19$) y de MO ($19,29\pm3,69$) (figura39).

GCDFP15 no se expresó en ninguna de las muestras analizadas excepto en una muestra de MO que presentó un Ct de 36,94, siendo su valor de expresión génica relativa de 1,19. El gen *MGB1* no se expresó en ninguna de las muestras analizadas. En el caso del gen *SBEM* se obtuvo una expresión negativa en 5 muestras de CO ($Ct=38,83\pm0,88$) y en 3 de MO ($35,96\pm1,41$) y una expresión positiva en 1 CO y 2 de MO (figura 39), resultando en una expresión génica relativa media de $0,26\pm2,68$ y $0,69\pm1,40$ respectivamente. Dado que estas muestras presentaron un valor de Ct cercano a 40, valor a partir del cual se considera ausencia de expresión, la expresión relativa de *SBEM* presentó un valor similar al control de ovario sano (NS; $p>0,05$). A esto debemos sumarle que en los parámetros establecidos en el test diagnóstico se considera positivo cuando la expresión génica relativa es mayor a 10, por lo tanto, podemos considerar que tanto en las muestras de CO como en las de MO la expresión de *SBEM* es negativa.

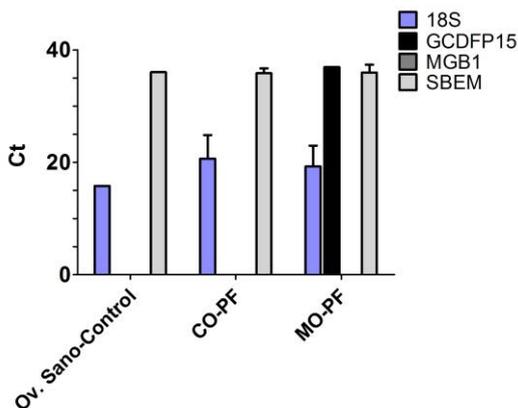


Figura 39.- Valor medio de Ct en muestras de CO y MO. Se muestran los valores de Ct promedios del control y de las muestras de CO y MO. Para *GCDFP15* solamente se obtuvo un valor de Ct en una muestra de MO. El gen *MGB1* no se expresó en ninguna de las muestras analizadas. Para *SBEM* obtuvo valor de Ct en 6 CO y 5 MO de un total de 60 y 50 respectivamente.

A continuación se comparó si las muestras de CO y MO que presentaron un valor de Ct menor a 40 pertenecían a la misma paciente (figura 40). De todas ellas solamente 2 pacientes presentaron una expresión relativa de *SBEM* tanto en CO como en MO.

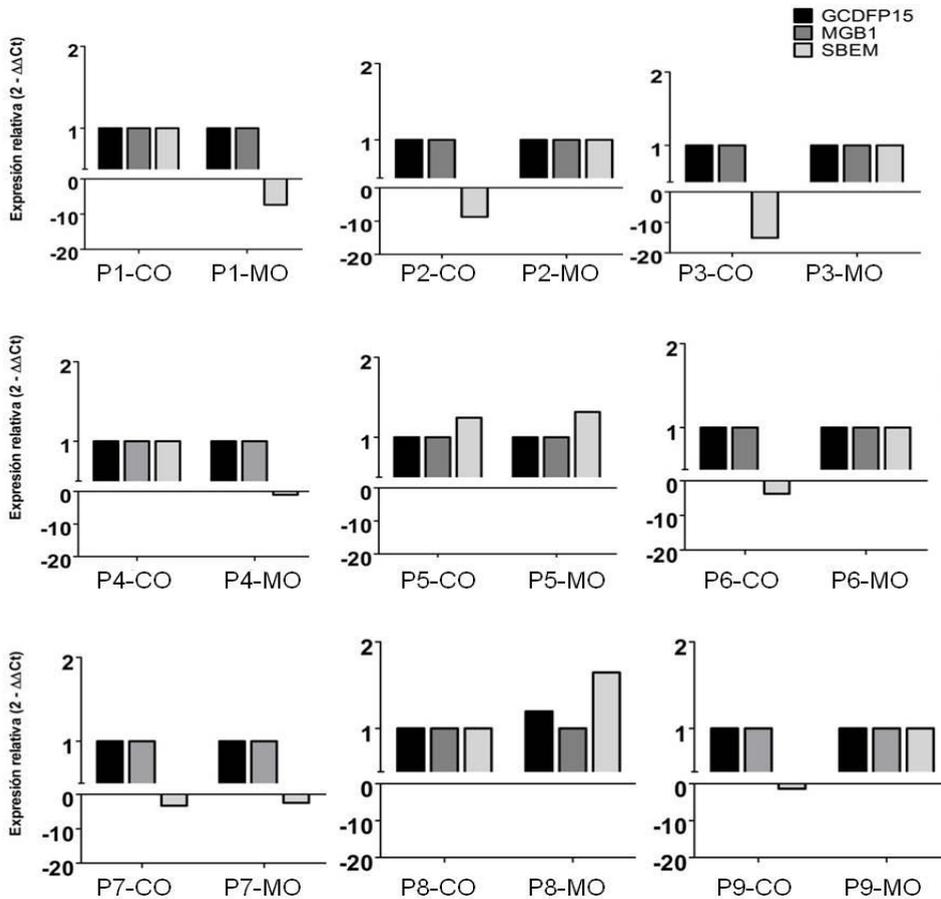


Figura 40.- Expresión relativa en las muestras de CO y MO con valor en algún gen diferente a 1. Se muestran los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ obtenidos para cada gen en las muestras de CO y MO de las pacientes que obtuvieron algún valor en alguno de los 3 genes diferente a 1.

2.2.- Estudio morfológico e inmunohistoquímico de las muestras de tejido ovárico de pacientes de Preservación de la Fertilidad

Todas las muestras obtenidas de cada paciente de PF fueron examinadas a nivel morfológico con Hematoxilina-Eosina para determinar si presentaban infiltración neoplásica evidente. Ninguna de ellas presentó dicha morfología.

Se llevó a cabo el análisis de la expresión proteica de los marcadores GCDFP15, MGB1 y SBEM en todas las muestras de CO y MO de las pacientes de PF con CM.

Ninguna de las muestras analizadas tanto de CO como de MO presentaron inmunotinción para los marcadores GCDFP15 (figura 41A y D), MGB1 (figura 41B y E) ni SBEM (figura 41G y F).

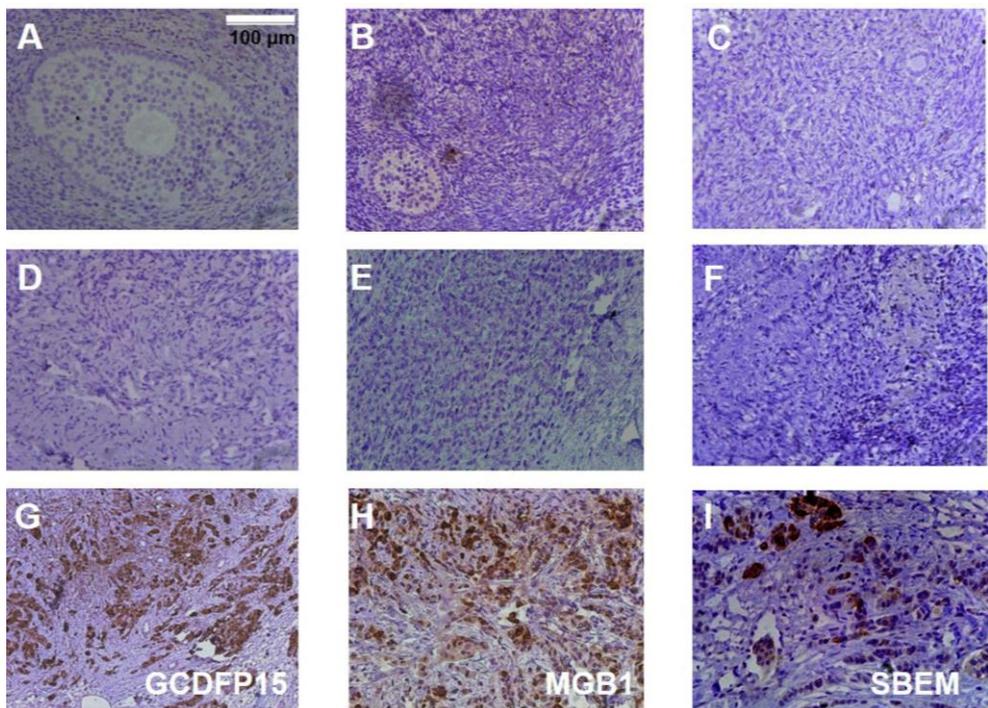


Figura 41.- IHQ de GCDFP15, MGB1 y SBEM. Inmunotinción de CO de pacientes de PF para GCDFP15, MGB1 y SBEM (A, B, C) de MO de pacientes de PF para GCDFP15, MGB1 y SBEM (D, E, F) y control positivo para los tres marcadores (G, H, I). Fotos tomadas con objetivo 20X. Escala a 100 µm en la figura A.

3.- Ensayo de invasión celular in vitro

La cuantificación de la invasión celular se analizó en 5 COs y 4 MOs procedentes de pacientes con CM del programa de PF. Como control positivo se utilizaron dos líneas celulares cancerígenas de CM con poder metastático: MDA-MB-231 y MDA-MB-468. Como control negativo del ensayo se utilizó medio libre de suspensión celular. Cada una de las muestras se realizó por duplicado. La invasión celular se midió mediante cuantificación colorimétrica de la densidad óptica a 560 nm.

Para cada muestra se obtuvo el valor medio de la absorbancia de las dos réplicas y posteriormente se realizó la media de todas las COs y de las MOs del ensayo (figura 42). La capacidad invasora de estas células fue similar a la encontrada en el control negativo. No se encontraron diferencias significativas entre la absorbancia en las muestras celulares de CO ($0,25\pm 0,06$) ni de la MO ($0,21\pm 0,06$) con la absorbancia en el control negativo ($0,11\pm 0,02$) (NS; $p>0,05$) (figura 42).

Como control positivo del ensayo, se utilizaron dos líneas celulares de CM con capacidad invasora. La absorbancia en los controles positivos fue mayor ($***p<0,001$) (MDA-MB-231: $0,83\pm 0,10$; MDA-MB-468: $0,61\pm 0,02$) que la encontrada en las muestras de CO ($0,25\pm 0,06$) y MO ($0,21\pm 0,06$), así como en el control negativo ($0,11\pm 0,02$), con diferencias estadísticamente significativas ($***p<0,001$) en todos los casos (figura 42).

Estos resultados muestran que las COs y MOs de pacientes con CM incluidas en el estudio no presentan características de células invasoras, y por lo tanto, indica que estos tejidos ováricos están libres de células malignas.

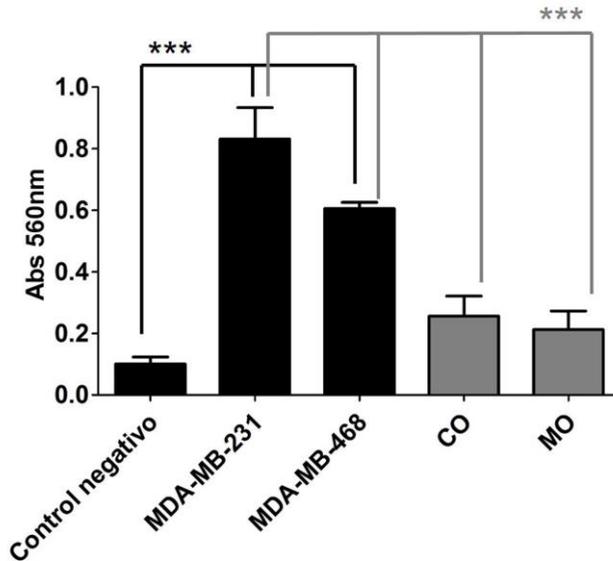


Figura 42.- Valores de Absorbancia a 560 nm de las muestras incluidas en el ensayo de invasión celular. Se muestra el valor medio y la desviación estándar de la absorbancia medida en las muestras de control negativo ($0,11 \pm 0,02$), en las líneas celulares cancerígenas MDA-MB-231 ($0,83 \pm 0,10$) y MDA-MB-468 ($0,61 \pm 0,02$) y en las muestras de CO ($0,25 \pm 0,06$) y MO ($0,21 \pm 0,06$) de pacientes con CM. En el caso de los valores representados de las muestras de COs y MOs, corresponden a la media de los valores encontrados en 5 COs y 4 MOs. Se encontraron diferencias significativas entre el control negativo y las dos líneas celulares de CM ($***p < 0,001$) y entre las COs y MOs con las dos líneas celulares de CM ($***p < 0,001$). No se encontraron diferencias significativas entre el control negativo y las COs y MOs (NS; $p > 0,05$).

4.- Modelo in vivo

4.1.- Monitorización de las células inyectadas en los ratones

La monitorización de la evolución de las células inyectadas se realizó mediante la técnica IVIS realizando mediciones una vez a la semana durante 6 meses.

En todos los ratones se visualizó la inyección celular localizada en la cápsula suprarrenal izquierda 3 días después de la cirugía, excepto en el control

negativo. Estas mediciones se realizaron cada semana durante 6 meses para monitorizar una posible expansión de las células inyectadas in situ o a otros órganos, fruto de una metástasis.

Como control negativo de la señal fluorescente se utilizó el ratón al que se le inyectó medio de cultivo libre de células. En éste no se observó marca fluorescente en ninguna de las mediciones realizadas (figura 43).

Como control positivo de este estudio, se utilizó un ratón al que se le inyectaron 500.000 células de línea celular metastática de CM. Se observó un aumento del tamaño de la señal a las 14 semanas post-cirugía. A la semana 16 la señal se expandió a todo el dorso del animal, cubriendo el lado derecho dorsal del mismo (figura 43, 44).

En el grupo experimental de ratones en los que se inyectaron las células de CO y MO procedentes de pacientes con CM que recurren a PF (N=5 CO y N=5 MO) o CO sana (procedente de cesárea, N=1), no se observó movimiento celular de las células inyectadas, ya que la marca fluorescente se localizaba siempre en la cápsula suprarrenal izquierda (figura 43).

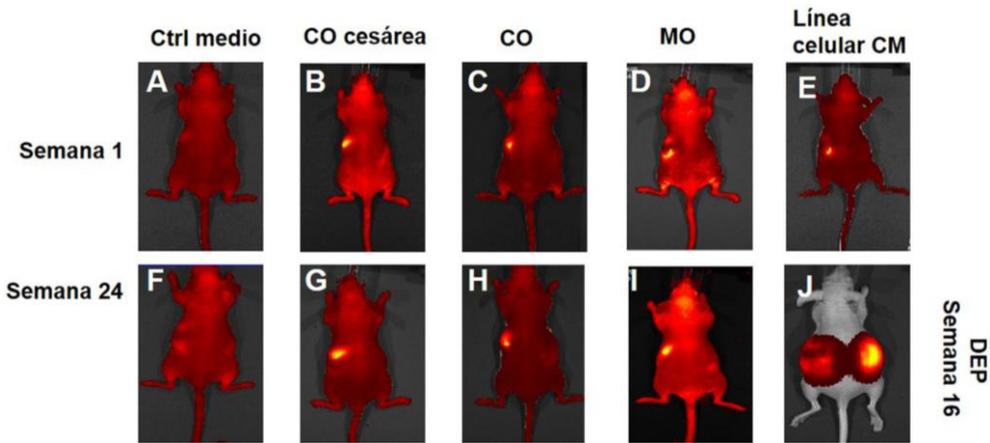


Figura 43.- Seguimiento de las células inyectadas en cápsula suprarrenal del ratón mediante IVIS. Día 1 de inyección celular de control medio (A), control CO sana (cesárea) (B), CO y MO de paciente con CM (C y D) y línea celular cancerígena (E). Seguimiento de las células inyectadas después de 24 semanas de la intervención en el ratón de control medio (F), control CO sana (cesárea) (G), CO y MO de paciente con CM (H y I) y línea celular cancerígena (J) (falleció a la semana 16). Fotos tomadas con una longitud de onda de emisión y de excitación de 605-660 nm.

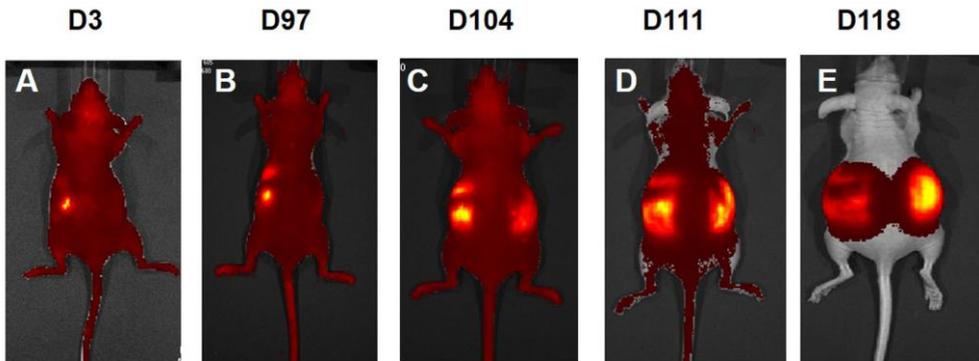


Figura 44.- Seguimiento de las células cancerígenas inyectadas en la cápsula suprarrenal del ratón mediante IVIS. Se muestra el seguimiento de las células marcadas e inyectadas en el ratón al día 3 post-cirugía (A), día 97 (B), día 104 (C), día 111 (D) y día 118 (E). Después de la última medición el ratón falleció. Fotos tomadas con una longitud de onda de emisión y de excitación de 605-660nm.

4.2.- Comprobación macroscópica del daño tisular post-mortem

Transcurridos 6 meses desde el día de la cirugía, cada ratón fue sacrificado mediante inhalación de CO₂. Se evaluó el posible daño tisular macroscópica y morfológicamente en cada uno de ellos. En el único ratón en el que se identificó claramente un daño tisular generalizado fue en el que se había inyectado 500.000 células de la línea celular metastática de CM (control positivo). En él se observó una inflamación abdominal prominente (figura 45A), causada por la presencia de un tumor de 2,5 cm (figura 45C). La glándula suprarrenal izquierda, en la que se habían inyectado las células, no se identificaba por la inclusión de la misma en el tumor. Además presentó alteraciones en hígado, bazo, páncreas y glándula suprarrenal derecha (figura 45B). El resto de los ratones no presentaron anomalías morfológicas ni presencia de masa tumoral (figura 45D, E).

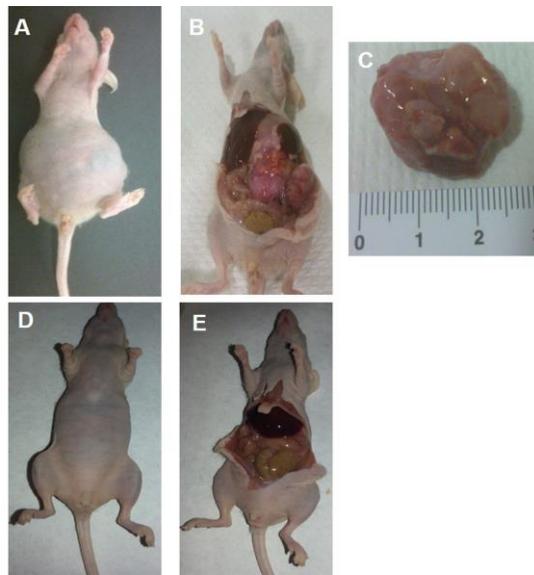


Figura 45.- Evaluación macroscópica de daño tisular. Las figuras A, B y C corresponden al ratón con inyección de 500.000 células metastáticas el día de la necropsia (A, B, C). Se observa la inflamación abdominal (A), presencia de tumor y daño en órganos internos (B, C). El tumor mide unos 2,5 cm (C). Las figuras D y E corresponden a uno de los ratones con inyección de células de CO procedentes de pacientes con CM. Presenta un aspecto normal, sin inflamación y sin ningún órgano afectado.

4.3.- Estudio de expresión génica

De las muestras extraídas de cada ratón (cápsula suprarrenal derecha, cápsula suprarrenal izquierda o tumor, hígado, páncreas y bazo) se analizó la expresión de: los tres marcadores seleccionados en el panel de detección de micrometástasis (*GCDFP15*, *MGB1* y *SBEM*). Como controles se emplearon el gen *18S*, *HPRT* específico de tejido ratón (*HPRTm*) y *HPRT* específico de tejido humano (*HPRTh*). Además todos estos genes se evaluaron en la línea celular metastática previa a la inyección en el ratón, expresando el gen *MGB1* ($\Delta\text{Ct}=20,74$) y el gen *SBEM* ($\Delta\text{Ct}=20,15$).

La expresión génica de los marcadores analizados en el ratón utilizado como control negativo (inyección de medio de cultivo) fue negativa para los 3 genes del panel de marcadores seleccionado: *GCDFP15*, *MGB1* y *SBEM*.

En el grupo experimental utilizado como control positivo de presencia de células metastáticas de CM, se detectó expresión del gen *SBEM* en la masa tumoral ($\text{Ct}=27,25$; $\Delta\text{Ct}=11,92$), en la glándula suprarrenal derecha ($\text{Ct}=28,57$; $\Delta\text{Ct}=11,98$), en el bazo ($\text{Ct}=24,47$; $\Delta\text{Ct}=4,21$), así como en el páncreas ($\text{Ct}=25,41$; $\Delta\text{Ct}=-7,5$) del ratón. En el caso de la glándula suprarrenal derecha del mismo ratón, también se detectó expresión del gen *MGB1* ($\text{Ct}=18,36$; $\Delta\text{Ct}=1,76$).

Todos los tejidos de los ratones en los que se inyectaron células procedentes de CO o MO de pacientes con CM o CO de pacientes sanas no expresaron ninguno de los marcadores de nuestro panel específico de detección de micrometástasis.

4.4.- Estudio morfológico e inmunohistoquímico

Se estudió la expresión proteica de los genes incluidos en el test diagnóstico (*GCDFP15*, *MGB1* y *SBEM*) mediante técnicas IHQs de los tejidos extraídos de cada ratón de los diferentes grupos estudiados.

4.4.1.- Controles de inmunohistoquímica

Para todas las muestras analizadas mediante IHQ para los tres marcadores, se utilizó como control de la técnica una muestra validada en la que existe una expresión proteica de los marcadores a analizar (muestra de CO con metástasis de CM). Como control negativo de la técnica se utilizaron cortes en los que no se añadió anticuerpo primario. En la figura 46A, 46B, 46C se muestran los controles positivos para los tres marcadores estudiados (GCDFP15, MGB1 y SBEM, respectivamente) y en la figura 46D, 46E, 46F se muestran los controles negativos de las IHQ que se detallan a continuación.

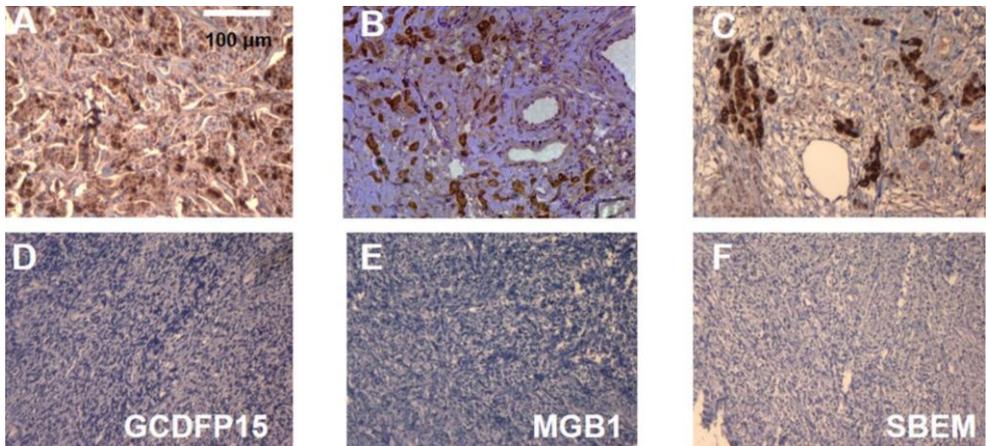


Figura 46.- IHQ de GCDFP15, MGB1 y SBEM control positivo y negativo de IHQ. Inmunotinción de GCDFP15, MGB1 Y SBEM para una CO con metástasis utilizada como control positivo de la IHQ (A, B, C) y control negativo de IHQ (no anticuerpo) (D, E, F). Fotos tomadas con objetivo 20X. Escala a 100 µm en la figura A.

4.4.2.- Estudio inmunohistoquímico de ratones controles

Se analizó la expresión proteica de los marcadores GCDFP15, MGB1 y SBEM en glándula suprarrenal derecha (figura 47A, B, C), glándula suprarrenal izquierda (figura 47D, E, F), hígado (figura 47G, H, I), páncreas (figura 47J, K, L), y bazo (figura 47M, N, O) del ratón en el que se había inyectado solamente medio de cultivo (control negativo). Ninguna de las muestras analizadas presentaron inmunotinción para GCDFP15, MGB1 y SBEM, excepto en el bazo donde se observó marcaje para los tres marcadores.

Se analizó la expresión proteica mediante IHQ de GCDFP15, MGB1 y SBEM de los órganos extraídos del ratón tratado como control positivo de invasión celular, en el que se habían inyectado 500.000 células de la línea celular metastática. En la glándula suprarrenal derecha se observó expresión proteica de MGB1 (tenue) y SBEM, siendo nula para la proteína GCDFP15 (figura 48A, B, C). En el tumor (glándula suprarrenal izquierda) se observó inmunotinción para los marcadores analizados MGB1 y SBEM, siendo ausente para el marcador GCDFP15 (figura 48D, E, F). En el hígado solamente se observó una tinción débil para el marcador SBEM (figura 48G, H, I). En el páncreas se observó inmunomarcaje para SBEM y no para GCDFP15 ni MGB1 (figura 48J, K, L). Por último, en el bazo se observó marcaje para los tres marcadores (figura 48M, N, O).

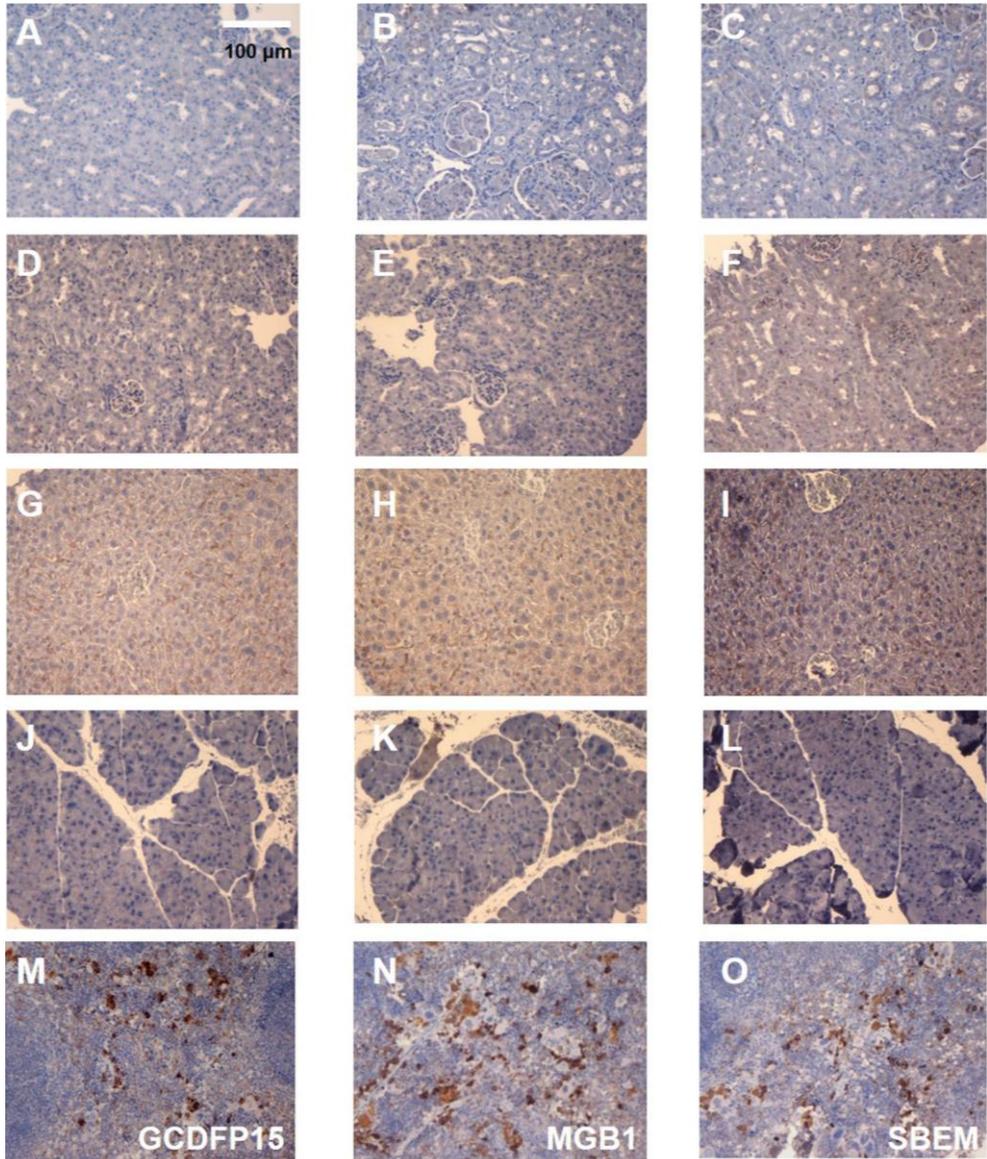


Figura 47.- IHQ de GCDFP15, MGB1 y SBEM ratón control negativo. Inmunotinción de GCDFP15, MGB1 Y SBEM para glándula suprarrenal derecha (A, B, C), glándula suprarrenal izquierda (D, E, F), hígado (G, H, I), páncreas (J, K, L) y bazo (M, N, O) del ratón control negativo (inyección medio de cultivo). Fotos tomadas con objetivo 20X. Escala a 100 µm en la figura A.

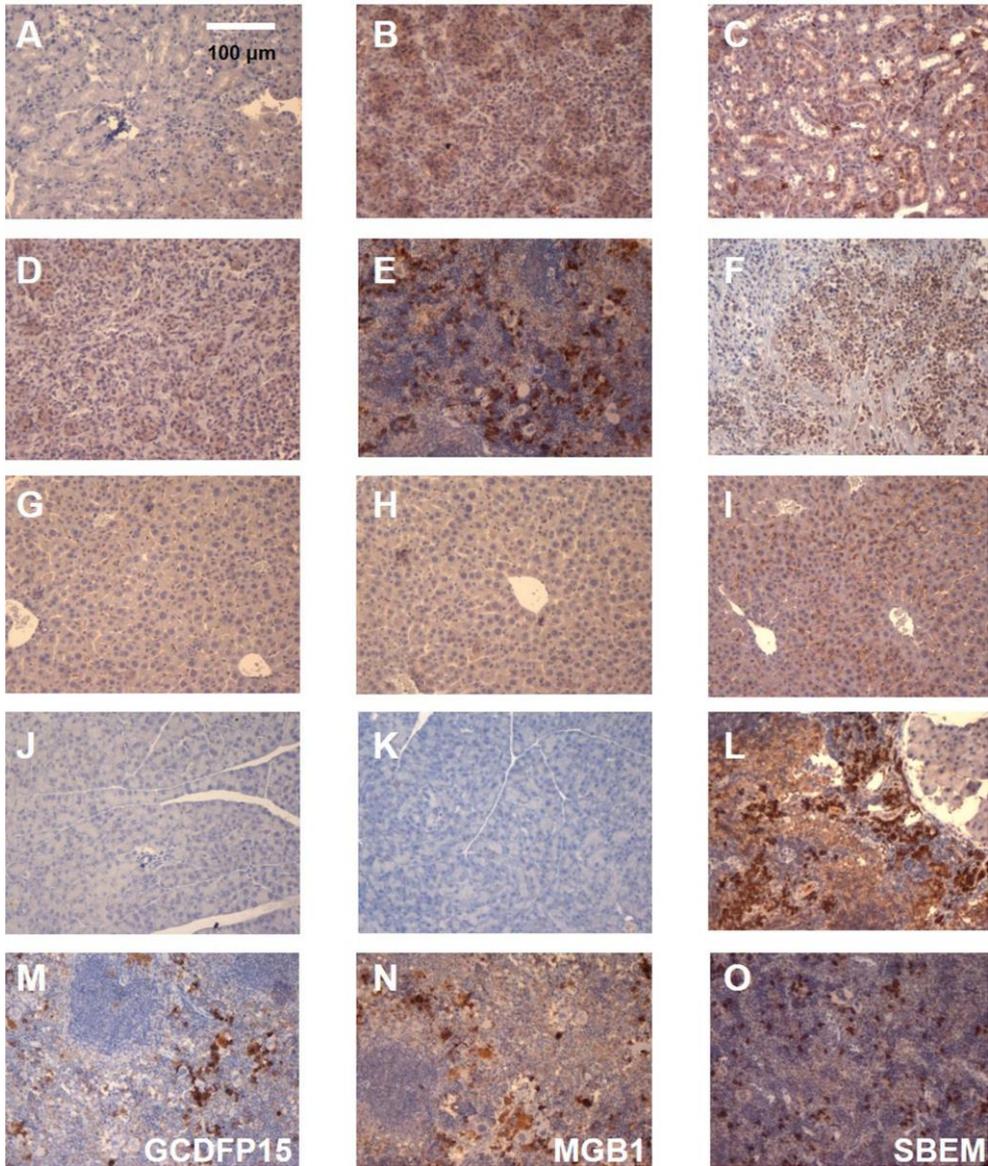


Figura 48.- IHQ de GCDFP15, MGB1 y SBEM ratón con células metastáticas de CM. Inmunotinción de GCDFP15, MGB1 Y SBEM para glándula suprarrenal derecha (A, B, C), tumor (D, E, F), hígado (G, H, I), páncreas (J, K, L) y bazo (M, N, O) del ratón control positivo (inyección 500.000 células cancerígenas de la línea celular). Fotos tomadas con objetivo 20X. Escala a 100 µm en la figura A.

4.4.3.-Estudio inmunohistoquímico de ratón con células de corteza y médula ovárica

Se analizó la expresión proteica de los marcadores GCDFP15, MGB1 y SBEM en la glándula suprarrenal derecha (figura 49A, B, C), glándula suprarrenal izquierda (figura 49D, E, F), hígado (figura 49G, H, I), páncreas (figura 49J, K, L) y bazo (figura 49M, N, O) del ratón con inyección de células procedentes de CO sana. No se observó inmunotinción para ninguno de los 3 marcadores analizados, excepto en el bazo donde se observó marcaje para los tres marcadores.

Se analizó la expresión proteica de los marcadores GCDFP15, MGB1 y SBEM en la glándula suprarrenal derecha (figura 50A, B, C), glándula suprarrenal izquierda (figura 50D, E, F), hígado (figura 50G, H, I), páncreas (figura 50J, K, L) y bazo (figura 50M, N, O) del ratón con inyección de células procedentes de CO de pacientes con CM. No se observó inmunotinción para ninguno de los 3 marcadores analizados, excepto en el bazo donde se observó marcaje para los tres marcadores.

Se analizó la expresión proteica de los marcadores GCDFP15, MGB1 y SBEM en la glándula suprarrenal derecha (figura 51A, B, C), glándula suprarrenal izquierda (figura 51D, E, F), hígado (figura 51G, H, I), páncreas (figura 51J, K, L) y bazo (figura 51M, N, O) del ratón con inyección de células procedentes de MO de pacientes con CM. No se observó inmunotinción para ninguno de los 3 marcadores analizados, excepto en el bazo donde se observó marcaje para los tres marcadores.

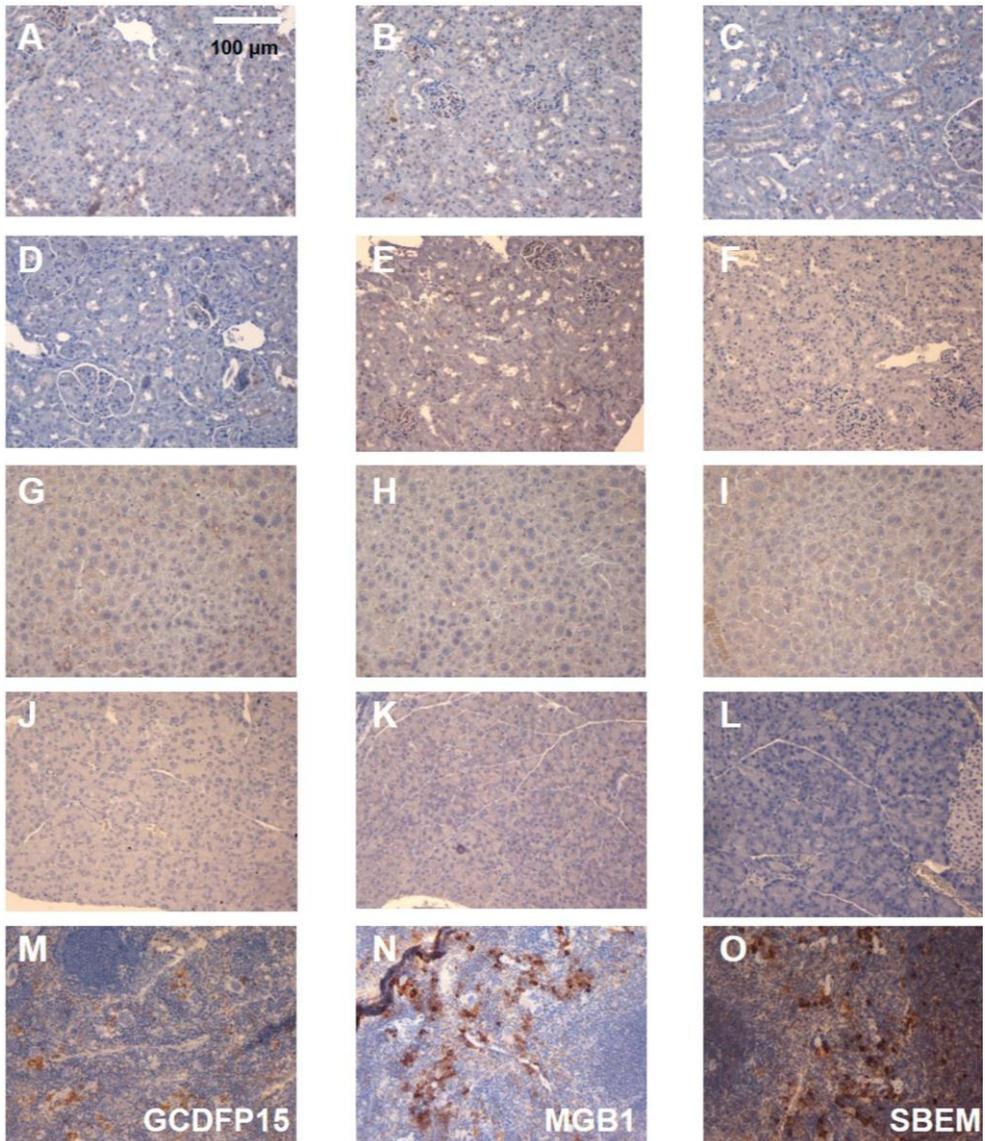


Figura 49.- IHQ de GCDFP15, MGB1 y SBEM del ratón con inyección de células de CO sana. Inmunotinción de GCDFP15, MGB1 Y SBEM para glándula suprarrenal derecha (A, B, C), glándula suprarrenal izquierda (D, E, F), hígado (G, H, I), páncreas (J, K, L) y bazo (M, N, O) del ratón con células de CO sana. Fotos tomadas con objetivo 20X. Escala a 100 µm en la figura A.

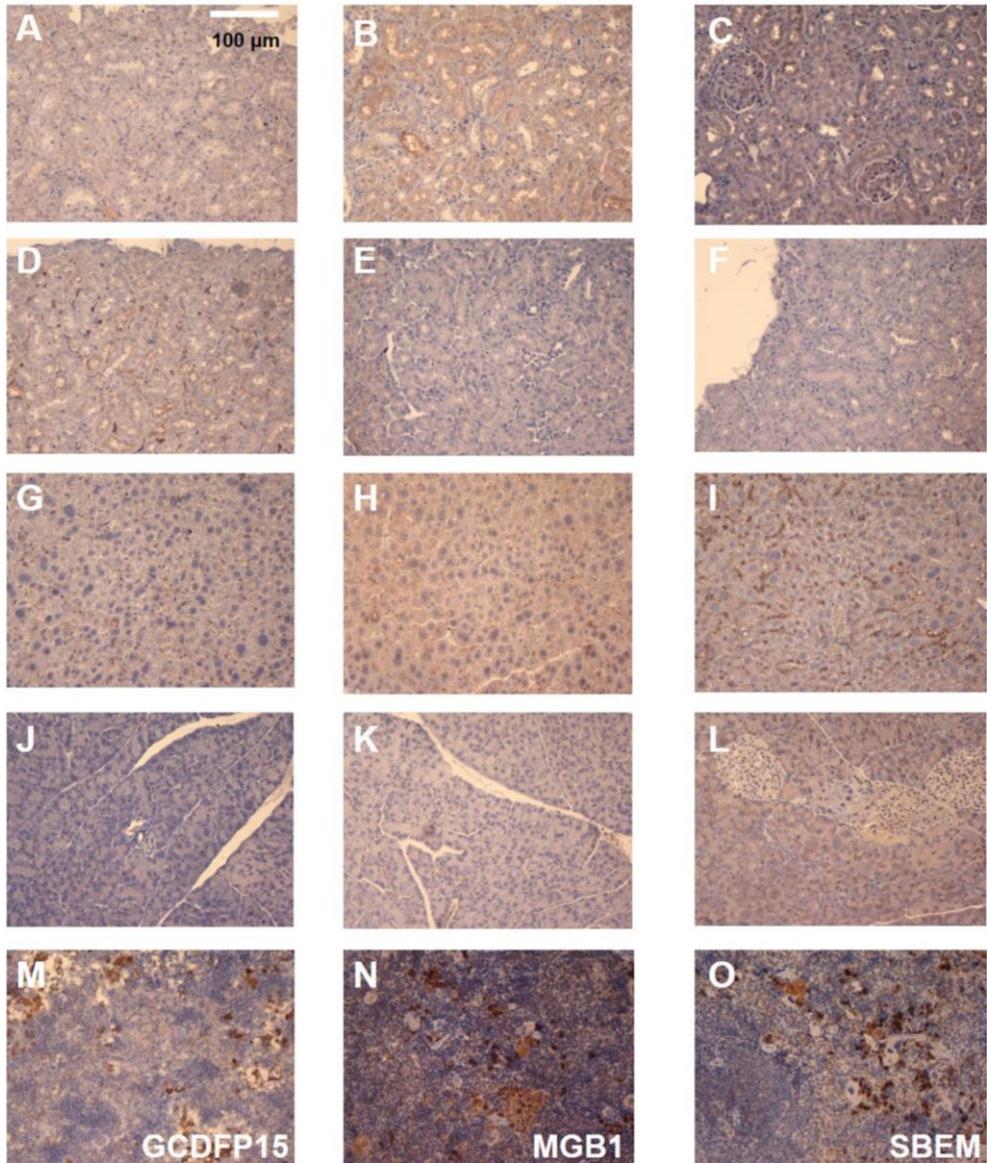


Figura 50.- IHQ de GCDFP15, MGB1 y SBEM del ratón con inyección de células de CO de pacientes con CM. Inmunotinción de GCDFP15, MGB1 Y SBEM para glándula suprarrenal derecha (A, B, C), glándula suprarrenal izquierda (D, E, F), hígado (G, H, I), páncreas (J, K, L) y bazo (M, N, O) del ratón con células de CO de pacientes con CM. Fotos tomadas con objetivo 20X. Escala a 100 μm en la figura A.

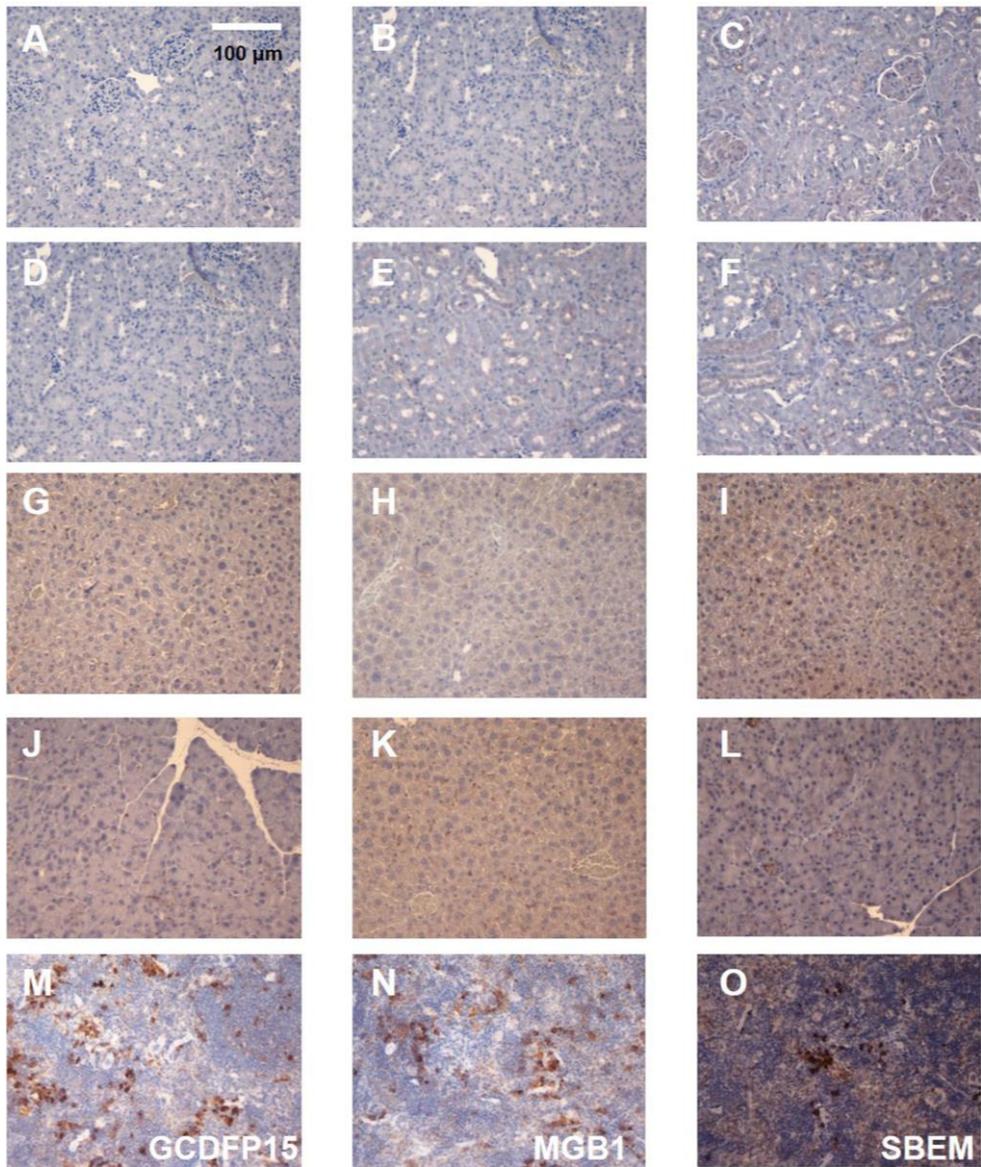


Figura 51.- IHQ de GCDFP15, MGB1 y SBEM del ratón con inyección de células de MO de pacientes con CM. Inmunotinción de GCDFP15, MGB1 Y SBEM para glándula suprarrenal derecha (A, B, C), glándula suprarrenal izquierda (D, E, F), hígado (G, H, I), páncreas (J, K, L) y bazo (M, N, O) del ratón con células de MO de pacientes con CM. Fotos tomadas con objetivo 20X. Escala a 100 µm en la figura A.

VI- DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue demostrar la seguridad en la criopreservación de CO como método para la PF en pacientes con CM en estadios I-IIIa. En este estudio se analiza por primera vez la MO de pacientes con CM. El hecho que nos llevó a plantearnos el análisis de la MO es que, a pesar de que el procesamiento de la CO para su posterior criopreservación implica la eliminación de la MO, en muchos casos, se hace imposible la retirada de todo el tejido medular quedando restos adheridos que son criopreservados junto a la CO. Se sabe que la MO a nivel estructural no presenta una delimitación bien establecida biológicamente con la CO, y además, que está formada por tejido conjuntivo laxo que contiene grandes vasos sanguíneos, vasos linfáticos y fibras nerviosas. Por lo tanto, no podemos tener una seguridad absoluta de la ausencia de una infiltración neoplásica a nivel medular que todavía no hubiese alcanzado la corteza de una forma detectable.

Para ello, desarrollamos un panel de marcadores moleculares de alta sensibilidad y especificidad capaz de detectar la posible presencia de células metastáticas en tejido ovárico criopreservado.

Un tercio de las pacientes con CM en las que se observa una pequeña masa tumoral operable sin afectación de nódulos linfáticos, presentan eventualmente recaídas, falleciendo como causa de esta enfermedad (Kissin et al., 1986; Giuliano et al., 1995; Nwariaku et al., 1998). Este hecho sugiere que una proporción de estas pacientes, a pesar de presentar nódulos linfáticos negativos, pueden haber sido mal diagnosticadas, lo que conlleva a un tratamiento menos agresivo del que le correspondería (Wallwiener et al., 2011) y un riesgo de reintroducir células malignas con el tejido ovárico trasplantado, en el caso de utilizar este procedimiento como método de la PF. Aunque la biopsia del ganglio centinela se considera una técnica segura para el diagnóstico correcto, no exime de controversia y limitaciones (Blanco et al., 2007; Riccio et al., 2007).

El ovario no es un sitio común de crecimiento metastásico, estimándose una frecuencia media de metástasis ovárica del 4.5% (Ferlicot et al., 2004), siendo improbable la existencia de células malignas en tejido ovárico en ausencia de evidencias clínicas y radiológicas de metástasis distante en los casos de CM en estadio I o II (Oktay and Buyuk, 2004). Sin embargo, se ha visto que dependiendo del tipo de CM la frecuencia media de metástasis ovárica puede incrementar desde 13,2% hasta el 37,8% (Perrotin et al., 2001; Kyono et al., 2010), por lo que es necesario estudiar en profundidad la seguridad del autotrasplante de tejido ovárico en pacientes con CM en estadios poco avanzados.

Se ha demostrado que la sobreexpresión de genes específicos epiteliales en pacientes con patología negativa para los nódulos linfáticos se correlaciona con los indicadores tradicionales de pronóstico de la enfermedad (Gillanders et al., 2004; Mikhitarian et al., 2005). Sin embargo, aunque la técnica de referencia para el análisis patológico del CM siguen siendo las técnicas IHQs, actualmente se están desarrollando el uso de nuevas herramientas diagnósticas a nivel molecular que permiten un mayor poder de detección y mejora de la sensibilidad.

Se ha sugerido que la combinación de la evaluación patológica mediante las técnicas histológicas tradicionales y el análisis molecular de los nódulos linfáticos, aumenta la sensibilidad en la predicción del estado patológico (Mikhitarian et al., 2005), permitiendo detectar un mayor índice de metástasis respecto a las detectadas mediante las tinciones histológicas (Abdul-Rasool et al., 2006; Nissan et al., 2006).

Se han llevado a cabo varios estudios para incrementar la sensibilidad y especificidad en la detección de enfermedad metastática oculta en CM en diferentes localizaciones (Koga et al., 2004; Schroder et al., 2004; Kreunin et al., 2007; Sasaki et al., 2007), sugiriéndose que la detección de la expresión de genes como la MGB1 mediante métodos moleculares es capaz de identificar pacientes

con alto riesgo de padecer micrometástasis en nódulos centinela (Ouellette et al., 2004).

En relación con la criopreservación de la CO como método de PF se demostró que en pacientes con leucemia, los métodos moleculares son capaces de detectar una infiltración neoplásica indetectable mediante técnicas IHQs (Dolmans et al., 2010; Rosendahl et al., 2010).

En un estudio previo, nuestro grupo llevó a cabo la detección de posibles micrometástasis en CO de pacientes con CM mediante las técnicas histológicas tradicionales, concluyendo que la criopreservación de CO en estas pacientes era un procedimiento seguro. Sin embargo, debido a los antecedentes descritos, sentimos la necesidad de ampliar nuestro estudio preliminar incluyendo las herramientas diagnósticas a nivel molecular para la detección de una posible micrometástasis en el tejido ovárico de estas pacientes.

La estrategia de búsqueda de marcadores moleculares de metástasis oculta en tejido ovárico la basamos en el concepto de ganglio centinela en combinación con diferentes marcadores que han demostrado ser buenos indicadores de la presencia de células malignas en CM (Sanchez-Serrano et al., 2009). Así, se analizó la expresión de los genes *MUC1*, *WT-1*, *NY-BR-01*, *GCDFP15*, *MGB1* y *SBEM* en 13 muestras de metástasis de CM (8 en CO y 5 en otros tejidos) y en 10 muestras de ovario sano.

Nuestros resultados demostraron que los genes *GCDFP15*, *MGB1*, *SBEM* y *NY-BR-01* no se expresan en ovario sano (figuras 23 y 24), mientras que los genes *MUC1* y *WT-1* se expresan tanto en ovario sano como en ovario con micrometástasis confirmada (figuras 23, 29 y 32). La expresión de *MUC1* es ampliamente encontrada en tejidos no mamarios (O'Brien et al., 2007) y es detectada tanto en sangre periférica y médula ósea de personas sanas como en pacientes con alguna enfermedad hematológica (Corradini et al., 2001). Por otro lado la expresión de *WT-1*, a pesar de ser negativa en el 100% de los carcinomas

de mama (Lerwill, 2004), se expresa en el núcleo de las células epiteliales del tejido ovárico, en el 100% de los carcinomas ováricos y extraováricos y en el 80% de carcinomas ováricos transicionales. Por lo tanto, dado que la utilización de este marcador podría llevarnos a un error de diagnóstico en el caso de que la paciente presentase un carcinoma ovárico de origen primario, y que al igual que el gen MUC1 se expresa en ovario sano además de en otros tipos celulares ya mencionados, estos dos transcritos no fueron incorporados en el test diagnóstico de detección de células malignas ocultas de CM en tejido ovárico por no considerarse unos marcadores específicos.

En el caso de muestras con metástasis confirmada de CM tanto en ovario como en otros tejidos presentaron una expresión exclusiva de *NY-BR-01*, *GCDFP15*, *MGB1* y *SBEM* (figura 29, 30, 32 y 33).

A pesar de que el gen *NY-BR-01* ha sido utilizado en estudios previos como marcador molecular para la detección de metástasis de CM debido a su alta especificidad (Nissan et al., 2006; Wallwiener et al., 2011), nuestros resultados muestran que el 45% de las muestras con metástasis confirmada no expresan este marcador. Por lo tanto, a pesar de su alta especificidad, su baja sensibilidad hizo que no se considerase como un buen candidato para la incorporación en nuestro test diagnóstico.

La expresión de *GCDFP15* es altamente específica de CM y se expresa en el 70-90% de los CM y en un 80% de sus metástasis. La expresión de este marcador en tumores metastáticos de origen desconocido indica que provienen de una enfermedad mamaria (Wick et al. 1989) y se asocia con tumores de CM de buen pronóstico y de subtipos de grado bajo (Luo et al., 2013). Nuestros resultados han demostrado una sensibilidad y especificidad de detección de células malignas en tejido ovárico mediante este marcador de 0,75 (75%) y 1 (100%) respectivamente, por lo que necesariamente *GCDFP15* fue incluido en nuestro panel diagnóstico.

El marcador individual más específico y más utilizado para la detección de metástasis, sobre todo en nódulos linfáticos, es la expresión del gen *MGB1*, ya que se sobre-expresa en el 90% de los casos de CM (Gillanders et al., 2004) y está raramente presente o en niveles muy bajos en tejido no mamario (Watson and Fleming, 1996; Watson et al., 1999; Houghton et al., 2001; O'Brien et al., 2002; Zehentner and Carter, 2004; Molina et al., 2005). Aunque la *MGB1* se detecta también en tejido mamario benigno, sus niveles de ARNm se encuentran entre 10 y 20 veces más elevados que en el tejido benigno (Watson and Fleming, 1996). Debido a esto y a que nuestros resultados demostraron una sensibilidad y especificidad para la expresión de *MGB1* de 0,87 (87,5%) y 1 (100%) respectivamente, este marcador fue incluido en nuestro panel diagnóstico.

La expresión de *SBEM* está mayoritariamente restringida a tejido mamario, siendo detectable en solo 1/26 tejidos no mamaros (Colpitts et al., 2002; Miksicek et al., 2002). Su expresión es independiente del estado de los RE y del grado del tumor (O'Brien et al., 2007). Nuestros resultados han demostrado una sensibilidad y especificidad de detección de células malignas en tejido ovárico mediante este marcador de 0,87 (87,5%) y 1 (100%) respectivamente, por lo que necesariamente *SBEM* fue incluido en nuestro panel diagnóstico.

El panel de marcadores óptimo se define como aquél que comprenda genes que se expresen en tejido afecto y no se expresen en tejido sano, mostrando una especificidad y sensibilidad elevada. En base a esto, los marcadores moleculares definitivos que fueron incluidos en nuestro panel diagnóstico fueron *GCDFP15*, *MGB1* y *SBEM*, presentando de forma conjunta una sensibilidad del 92% y una especificidad del 100%.

Estudios recientes han demostrado que combinaciones de varios marcadores moleculares presentan resultados más consistentes y mejores que un ensayo que solo se limite a la presencia o ausencia de la expresión de un único marcador. El grupo de Manzotti (Manzotti et al., 2001) evaluó la expresión de

ARNm de varios marcadores (*maspina*, *CK19* y *MGB1*) encontrando que la concordancia con los nódulos linfáticos centinela era mayor cuando se expresaban al menos dos de los marcadores estudiados. El grupo de Nissan (Nissan et al., 2006) llevó a cabo un estudio de elección de marcadores moleculares para la detección de restos residuales de células malignas (*CK19*, *NY-BR-01* y *MGB1*), concluyendo que el análisis conjunto de estos marcadores era más sensible en la detección de CM. Varios estudios demuestran que la combinación del análisis de al menos dos marcadores moleculares aumenta la sensibilidad y especificidad hasta un 97% (Hughes et al., 2006). Un estudio más reciente llevó a cabo la elaboración de un panel de 4 marcadores (*CK19*, *EPCAM*, *MGB1* y *NY-BR-01*) para el diagnóstico mediante RT-qPCR de micrometástasis en nódulos linfáticos, siendo un resultado positivo cuando se expresaban 2 o más de estos marcadores (Wallwiener et al., 2011). Todos estos marcadores descritos en estos estudios que no han sido incluidos en nuestro panel es debido a que a pesar de expresarse en CM, también son detectados en tejido sano, en sangre periférica y médula ósea de personas sanas, así como, en pacientes con alguna enfermedad hematológica (Corradini et al., 2001), por lo que no valoramos su inclusión.

El uso de una combinación de genes reduce considerablemente el número de falsos negativos encontrados debido a que el patrón de expresión génica de estos marcadores moleculares es tumor-específico (Wallwiener et al., 2011).

En el caso de *MGB1* los tumores más agresivos o negativos para los receptores hormonales pueden perder su expresión, por lo que si el diagnóstico solo se basase en este marcador darían falsos negativos. Los marcadores *GCDFP15* y *MGB1* son los más utilizados para el diagnóstico de CM y posibles micrometástasis, pero una falta de expresión tiene que ser interpretada con precaución, ya que una ausencia de expresión no indica que no existan células malignas. Sin embargo, el análisis de ambos marcadores aumenta significativamente la sensibilidad y especificidad del diagnóstico, ya que aunque la *MGB1* presenta una mayor sensibilidad que *GCDFP15* en carcinoma mamario,

este último es más específico (Bhargava et al., 2007). La expresión de *SBEM* se relaciona con la expresión de *MGB1*, siendo esta correlación significativamente mayor en los tumores con ganglios linfáticos afectados (Miksicek et al., 2002).

Los resultados de RT-qPCR pueden ser falsos negativos cuando existe una presencia de metástasis identificable mediante IHQ (Schroder et al., 2003; Gillanders et al., 2004) o falsos positivos si los resultados mediante histología no muestran dicha metástasis (Mitas et al., 2001; Inokuchi et al., 2003; Schroder et al., 2003; Gillanders et al., 2004). Estudios recientes encontraron que la mayoría de los falsos negativos de RT-qPCR pueden estar asociados con una expresión límite de los genes bajo estudio, que podrían corresponder a micrometástasis (Veys et al., 2010). Además en estos casos, existe también la posibilidad de que el resultado de IHQ sea un falso positivo y el de RT-qPCR sea el correcto. En el caso de falsos positivos de RT-qPCR, puede ser debido a razones técnicas (contaminación del tejido durante el procesamiento) o que existan mecanismos intermedios de silenciamiento génico que no permitan la traducción génica a la proteína funcional. Sin embargo, se ha demostrado que las muestras analizadas por RT-qPCR y catalogadas como falso positivo seguían siendo positivas cuando eran analizadas con otros métodos moleculares más precisos, sugiriendo que los fragmentos de tejido realmente contenían metástasis (Julian et al., 2008). Estas discrepancias también pueden ser atribuidas al procedimiento de recogida de muestras, ya que se analizan diferentes fragmentos del mismo tejido por ambas técnicas (Schroder et al., 2003; Gillanders et al., 2004). No obstante, debido a que la RT-qPCR se considera mucho más sensible que la IHQ, los resultados positivos para RT-qPCR y negativos por IHQ, se consideran falsos negativos de IHQ, y posiblemente la presencia de células metastáticas sea real. En el ensayo llevado a cabo por Gimbergues y colaboradores (Gimbergues et al., 2007), con 3 marcadores moleculares (*CEA*, *MGB1* y *CK19*) observaron que el 9,6% de las patologías negativas para los nódulos linfáticos centinela eran positivas mediante

IHQ y un 36,5% por RT-qPCR, mientras que las patologías positivas para nódulos linfáticos centinela eran todas positivas mediante RT-qPCR. Rosendahl y colaboradores (Rosendahl et al., 2010) observaron que 6 de 8 pacientes con leucemia analizados, tanto por técnicas moleculares como por histológicas, dieron un resultado positivo mediante RT-qPCR y negativo por IHQ. Lo que indica nuevamente la elevada sensibilidad de los métodos moleculares respecto a los tradicionales. En un estudio similar observaron que 2 de 6 pacientes con LMC y 7 de 10 con LLA presentaron un patrón molecular positivo para la detección de células malignas, mientras que por IHQs no pudieron ser detectadas (Dolmans et al., 2010).

En nuestro estudio los resultados obtenidos mediante ambas técnicas en las muestras de CO fueron concordantes para los 3 marcadores incluidos. Sin embargo, en las muestras de otros tejidos con metástasis confirmada el estudio molecular demostró ser más robusto que el estudio IHQ. Nuestro panel fue capaz de detectar la expresión molecular de *GCDFP15* en metástasis ósea y ocular y *MGB1* en metástasis de ligamento uterino, mientras que los resultados IHQs fueron negativos para estos marcadores en estos tejidos (tabla 8).

Hasta la fecha, a pesar de que la mayor indicación para la criopreservación de CO como método de la PF en nuestro programa es el CM (más del 50% de las pacientes), existen solamente cuatro publicaciones sobre la búsqueda de células metastáticas en CO en este tipo de pacientes (Sanchez-Serrano et al., 2009; Azem et al., 2010; Rosendahl et al., 2011b; Luyckx et al., 2013). En estas publicaciones se han analizado más de 177 biopsias de CO procedentes de 140 pacientes con CM sin evidencia de contaminación con células malignas (Sanchez-Serrano et al., 2009; Azem et al., 2010; Rosendahl et al., 2011b). Sin embargo, la detección de micrometástasis sigue siendo un reto ya que los resultados se basan únicamente en estudios morfológicos e IHQs, que como ya hemos comentado anteriormente y hemos demostrado en el presente estudio, no son lo suficientemente sensibles y específicos para poder identificar una

microinvasión maligna en el tejido ovárico. Sorprendentemente solo en el estudio publicado más reciente han sido utilizados por primera vez los métodos moleculares para la detección de micrometástasis en ovario, a pesar de ello este estudio concluye la seguridad del procedimiento de la criopreservación de tejido ovárico de pacientes con CM como método de PF basándose únicamente en solo un marcador molecular (Luyckx et al., 2013). Por lo tanto, el método idóneo para un diagnóstico seguro sería la combinación de los estudios morfológicos, IHQs y moleculares.

Una de las limitaciones que nos encontramos en este tipo de estudios es el reducido tamaño del tejido destinado al análisis, ya que la mayor parte de la CO debe ser congelada para el posible futuro autotrasplante. Este factor es especialmente limitante en el caso de detección de micrometástasis por técnicas morfológicas o IHQs ya que el fragmento analizado no es representativo de todo el tejido ovárico de la paciente.

Las técnicas moleculares tampoco están exentas de determinadas limitaciones, a pesar de ser técnicas altamente sensibles para la detección de ADN o ARN de células metastásicas. Solo algunos tipos de tumores presentan aberraciones cromosómicas específicas para dianas de las técnicas de RT-qPCR. Además la detección de ADN/ARN específico del tumor mediante RT-qPCR no significa necesariamente que haya células viables cancerígenas en el tejido ovárico (Rosendahl et al., 2010; Bastings et al., 2013) y al igual que ocurre con los métodos IHQs, los resultados pueden ser diferentes si se analizan distintos fragmentos de tejido.

Para solventar las limitaciones mencionadas, los fragmentos analizados en este estudio mediante técnicas histológicas y moleculares fueron obtenidos de diferentes localizaciones ováricas aleatorias. A pesar de que las técnicas moleculares son capaces de detectar en tejido ovárico trazas de contaminación por células malignas, el potencial biológico de estas células sigue siendo desconocido. Por lo tanto, en primer lugar llevamos a cabo estudios de invasión

celular in vitro para evaluar el posible potencial migratorio e invasivo de células de CO y MO de pacientes con CM y, posteriormente, desarrollamos estudios in vivo mediante xenotrasplante, para poder evaluar el posible potencial maligno en caso existencia de una micrometástasis.

El método previo a los estudios in vivo para corroborar la ausencia de células malignas en el tejido ovárico criopreservado es la evaluación in vitro de la capacidad invasora celular. Es la primera vez que esto se evalúa en células obtenidas de CO y MO de pacientes con CM. El ensayo de invasión celular in vitro, demostró que el tejido ovárico analizado de pacientes con CM que acudieron a PF está libre de células malignas invasoras, mientras que líneas celulares de CM con alto poder metastático, utilizadas como control positivo, mostraron elevada capacidad de invasión.

Sin embargo, el mejor método para evaluar el riesgo de recurrencia después del trasplante de CO criopreservada de mujeres con CM sigue siendo el modelo in vivo mediante xenotrasplante en ratones inmunodeprimidos (Rosendahl et al., 2011b). Este método fue validado en la búsqueda de células malignas en la CO de pacientes con leucemia (Dolmans et al., 2010).

Los estudios de xenotrasplante llevados a cabo en pacientes con leucemia demostraron la viabilidad y potencial maligno de las células de LLA presentes en el tejido ovárico criopreservado, confirmando así, los resultados obtenidos mediante RT-qPCR, ya que el tejido ovárico que dio resultados positivos para los marcadores de leucemia generó en los animales una invasión peritoneal masiva y una masa tumoral, mientras que el tejido ovárico con un resultado negativo para los marcadores moleculares, no produjo enfermedad leucémica en los ratones xenotrasplantados (Dolmans et al., 2010).

Un estudio similar fue llevado a cabo en pacientes con leucemia en completa remisión que no presentaron, aparentemente, células malignas en el tejido ovárico. Ninguno de los trasplantes generó signos de enfermedad, ni en la

pieza de tejido ovárico trasplantado ni en los órganos murinos evaluados (Greve et al., 2012), concluyendo así que la criopreservación de tejido ovárico en pacientes con leucemia en remisión podría no estar contraindicada.

Se han llevado a cabo estudios in vivo para evaluar la seguridad del tejido ovárico en pacientes con distintos tipos de sarcoma, sin encontrar contaminación de células tumorales en el tejido ovárico criopreservado y confirmando así, los estudios previos mediante técnicas histológicas, IHQs y moleculares (Greve et al., 2013).

En el caso de CM un único estudio in vivo de seguridad de trasplante de CO ha sido publicado recientemente (Luyckx et al., 2013), con el fin de corroborar el estudio molecular mediante el análisis de expresión de *MGB2*. Ninguno de los animales xenotrasplantados desarrolló masas tumorales macroscópicas. Sin embargo, la expresión molecular de *MGB2* fue detectada en 4 casos de tejido ovárico criopreservado antes del xenotrasplante y en 1 caso después de xenotrasplante. Esta discordancia de resultados es posible que se deba a la baja sensibilidad que implica el uso de un único marcador molecular, tal y como hemos comentado anteriormente.

Debido a la necesidad de corroborar la fiabilidad de nuestro panel molecular desarrollamos un estudio in vivo aplicando una nueva tecnología no invasiva con grandes ventajas respecto a los xenotrasplantes tradicionales, que nos permitió visualizar in vivo la progresión/crecimiento de una posible existencia de células malignas.

Además de la nueva aplicación de esta técnica para evaluar in vivo la seguridad del trasplante de CO, nuestro estudio incorpora una ventaja respecto a los modelos de xenotrasplante utilizados en este campo. Esta ventaja radica en que debido a que nuestro objetivo es la búsqueda de micrometástasis que pueden pasar desapercibidas mediante estudios convencionales, nuestro protocolo se

llevó a cabo mediante la disgregación de tejido ovárico de pacientes con CM, tanto medular como cortical, permitiéndonos así incluir un control positivo de línea celular metastásica de CM, ya que hasta la fecha ninguno de los estudios en animales incluyen control alguno. Como control positivo se utilizó una línea celular de CM inyectada en la cápsula suprarrenal del animal. El hecho de que las células metastásicas fuesen inyectadas a concentraciones muy inferiores a los estudios desarrollados hasta el momento en el campo de la oncología médica (Rowan et al., 2014), se debió a que nuestra intención fue recrear una situación clínica real, es decir, la existencia de una micrometástasis en tejido ovárico y no una elevada cantidad de células malignas, la cual podría ser detectada por los métodos tradicionales de diagnóstico. Los órganos analizados del ratón que sufrió una inyección de 500.000 células cancerígenas de CM presentaron expresión génica y proteica de SBEM, indicador de presencia de células tumorales. Además, el gen MGB1 fue positivo mediante técnicas IHQ en el tumor, glándula suprarrenal derecha y bazo. Asimismo, la expresión proteica de GCDFP15 fue negativa en todos los órganos.

Los ratones en los que se inyectó células de CO y MO de pacientes con CM no presentaron indicios de aparición tumoral. Además el análisis, tanto molecular como IHQ, mostró ausencia de expresión de los marcadores seleccionados en nuestro panel de detección de micrometástasis en todos los órganos analizados. Los estudios IHQs en el bazo dieron positivo para los tres marcadores (GCDFP15, MGB1 y SBEM) en todos los ratones, incluso en el que no se inyectó suspensión celular. Por lo que indica que es un falso positivo a nivel IHQ, posiblemente producido por el tejido murino. Es posible que este anticuerpo se unirá inespecíficamente a alguna proteína presente en el bazo del ratón. En cambio, las muestras de bazo utilizadas para el análisis molecular no presentan expresión génica de ninguno de los genes analizados exceptuando el ratón en el

que se produjo una invasión tumoral (control positivo de 500.000 células cancerígenas).

Con ello, concluimos que los estudios in vivo muestran una seguridad en el trasplante de tejido ovárico criopreservado de pacientes con CM cuando el análisis molecular previo muestra ausencia de expresión génica de *GCDFP15*, *MGB1* y *SBEM*.

Este trabajo presenta el análisis de 60 CO de pacientes con CM, así como el primer estudio llevado a cabo de búsqueda de micrometástasis en MO de estas pacientes, mediante el desarrollo de un panel de marcadores moleculares de alta sensibilidad y especificidad pionero en la detección de células malignas de CM. Además, hay que destacar el desarrollo de un nuevo modelo de xenotrasplante en este campo, así como la aplicación de nuevos sistemas de imagen para el análisis del mismo.

Tras este exhaustivo estudio podemos concluir que la criopreservación de CO para su posterior autotrasplante en pacientes con CM en estadios tempranos puede ser considerada como un método seguro para la PF.

VII- CONCLUSIONES

1. El panel de marcadores constituido por los genes *GCDFP15*, *MGB1* y *SBEM* es lo suficientemente sensible y específico para la detección de una posible micrometástasis en tejido ovárico criopreservado de pacientes con cáncer de mama.
2. Las técnicas moleculares son más sensibles y específicas que las tradicionalmente utilizadas para la detección de células malignas en corteza ovárica.
3. El estudio in vitro desarrollado para la evaluación de la capacidad invasora de las células del tejido ovárico muestra la ausencia de células malignas en el tejido ovárico analizado.
4. El modelo animal desarrollado, mediante la inyección de células marcadas, permite la detección inmediata in situ de una migración celular hacia los órganos adyacentes.
5. El modelo animal corrobora que el ortotrasplante de tejido ovárico criopreservado es seguro cuando el análisis molecular previo muestra ausencia de expresión génica de *GCDFP15*, *MGB1* y *SBEM*.
6. El tejido ovárico criopreservado en pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos está libre de células metastáticas.
7. La criopreservación de corteza ovárica para su posterior autotrasplante en pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos puede ser considerada como un método seguro para la preservación de la fertilidad.

VIII- BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Rasool, S., Kidson, S.H., Panieri, E., Dent, D., Pillay, K., and Hanekom, G.S., (2006). An evaluation of molecular markers for improved detection of breast cancer metastases in sentinel nodes. *J. Clin. Pathol.* 59 , 289-297.
- Albelda, S.M., (1993). Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab. Invest.* 68 , 4-17.
- Azem, F., Hasson, J., Ben-Yosef, D., Kossoy, N., Cohen, T., Almog, B., Amit, A., Lessing, J.B., and Lifschitz-Mercer, B., (2010). Histologic evaluation of fresh human ovarian tissue before cryopreservation. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 29 , 19-23.
- Badawy, A., Elnashar, A., El-Ashry, M., and Shahat, M., (2009). Gonadotropin-releasing hormone agonists for prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: prospective randomized study. *Fertil. Steril.* 91 , 694-697.
- Bakker, B., Oostdijk, W., Bresters, D., Walenkamp, M.J., Vossen, J.M., and Wit, J.M., (2004). Disturbances of growth and endocrine function after busulphan-based conditioning for haematopoietic stem cell transplantation during infancy and childhood. *Bone Marrow Transplant.* 33 , 1049-1056.
- Bastings, L., Beerendonk, C.C., Westphal, J.R., Massuger, L.F., Kaal, S.E., van Leeuwen, F.E., Braat, D.D., and Peek, R., (2013). Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in cancer survivors and the risk of reintroducing malignancy: a systematic review. *Hum. Reprod. Update* 19 , 483-506.
- Bath, L.E., Wallace, W.H., and Critchley, H.O., (2002). Late effects of the treatment of childhood cancer on the female reproductive system and the potential for fertility preservation. *BJOG* 109 , 107-114.

- Bhargava, R., Beriwal, S., and Dabbs, D.J., (2007). Mammaglobin vs GCDFP-15: an immunohistologic validation survey for sensitivity and specificity. *Am. J. Clin. Pathol.* 127, 103-113.
- Bines J., Oleske D.M., and Cobleigh M.A., (1996). Ovarian Function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 14, 1718-1729.
- Blanco, I., Moriyon, C., Santamaria, L., Carrocera, A., Diaz, D., Lezana, M., Alvarez, R., and Angulo, J., (2007). Our experience of the clinical application of sentinel node biopsy in breast cancer. *Cir. Esp.* 82, 352-357.
- Blumenfeld, Z., (2002). Preservation of fertility and ovarian function and minimalization of chemotherapy associated gonadotoxicity and premature ovarian failure: the role of inhibin-A and -B as markers. *Mol. Cell. Endocrinol.* 187, 93-105.
- Boiso, I., (2001). Principio básicos de criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 18, 20-22.
- Buyalos, R.P., Daneshmand, S., and Brzechffa, P.R., (1997). Basal estradiol and follicle-stimulating hormone predict fecundity in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction therapy. *Fertil. Steril.* 68, 272-277.
- Byrne, J., (1999). Infertility and premature menopause in childhood cancer survivors. *Med. Pediatr. Oncol.* 33, 24-28.
- Cailleau, R., Young, R., Olive, M., and Reeves, W.J., Jr, (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst.* 53, 661-674.

- Cailleau, R., Olive, M., and Cruciger, Q.V., (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. In. *Vitro.* 14 , 911-915.
- Caputo, E., Camarca, A., Moharram, R., Tornatore, P., Thatcher, B., Guardiola, J., and Martin, B.M., (2003). Structural study of GCDFP-15/gp17 in disease versus physiological conditions using a proteomic approach. *Biochemistry* 42 , 6169-6178.
- Casper, F.W., Seufert, R.J., Schaffrath, M., and Pollow, K., (2001). Concentrations of inhibins and activin in women undergoing stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone for in vitro fertilization treatment. *Fertil. Steril.* 75 , 32-37.
- Ceballos, P., Ghersevich, S., (2008). Perspectives in breast cancer: detection of circulating tumoral cells through mammaglobin A. *Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia* 35 , 207-214.
- Cheang, M.C., Chia, S.K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P.S., Parker, J.S., Perou, C.M., Ellis, M.J., and Nielsen, T.O., (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 101 , 736-750.
- Chemaitilly, W., Mertens, A.C., Mitby, P., Whitton, J., Stovall, M., Yasui, Y., Robison, L.L., and Sklar, C.A., (2006). Acute ovarian failure in the childhood cancer survivor study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91 , 1723-1728.
- Chu, J.Y., Craddock, T.V., Danis, R.K., and Tennant, N.E., (1981). Ovarian tumor as manifestation of relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 48 , 377-379.

- Ciborowski, P., Finn, O.J., (2002). Non-glycosylated tandem repeats of MUC1 facilitate attachment of breast tumor cells to normal human lung tissue and immobilized extracellular matrix proteins (ECM) in vitro: potential role in metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 19 , 339-345.
- Clark, J.W., Snell, L., Shiu, R.P., Orr, F.W., Maitre, N., Vary, C.P., Cole, D.J., and Watson, P.H., (1999). The potential role for prolactin-inducible protein (PIP) as a marker of human breast cancer micrometastasis. *Br. J. Cancer* 81 , 1002-1008.
- Clough, K.B., Goffinet, F., Labib, A., Renolleau, C., Campana, F., de la Rochefordiere, A., and Durand, J.C., (1996). Laparoscopic unilateral ovarian transposition prior to irradiation: prospective study of 20 cases. *Cancer* 77 , 2638-2645.
- Colleoni, M., Rotmensz, N., Robertson, C., Orlando, L., Viale, G., Renne, G., Luini, A., Veronesi, P., Intra, M., Orecchia, R., Catalano, G., Galimberti, V., Nole, F., Martinelli, G., and Goldhirsch, A., (2002). Very young women (<35 years) with operable breast cancer: features of disease at presentation. *Ann. Oncol.* 13 , 273-279.
- Colpitts, T.L., Billing, P., Granados, E., Hayden, M., Hodges, S., Roberts, L., Russell, J., Friedman, P., and Stroupe, S., (2002). Identification and immunohistochemical characterization of a mucin-like glycoprotein expressed in early stage breast carcinoma. *Tumour Biol.* 23 , 263-278.
- Cook, C.L., Siow, Y., Taylor, S., and Fallat, M.E., (2000). Serum mullerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil. Steril.* 73 , 859-861.

-
- Coppes, M.J., Campbell, C.E., and Williams, B.R., (1993). The role of WT1 in Wilms tumorigenesis. *FASEB J.* 7 , 886-895.
- Corradini, P., Voena, C., Astolfi, M., Delloro, S., Pilotti, S., Arrigoni, G., Bregni, M., Pileri, A., and Gianni, A.M., (2001). Maspin and mammaglobin genes are specific markers for RT-PCR detection of minimal residual disease in patients with breast cancer. *Ann. Oncol.* 12 , 1693-1698.
- Demeestere, I., Simon, P., Emiliani, S., Delbaere, A., and Englert, Y., (2007). Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist* 12 , 1437-1442.
- Dittrich, R., Lotz, L., Keck, G., Hoffmann, I., Mueller, A., Beckmann, M.W., van der Ven, H., and Montag, M., (2012). Live birth after ovarian tissue autotransplantation following overnight transportation before cryopreservation. *Fertil. Steril.* 97 , 387-390.
- Dolmans, M.M., Marinescu, C., Saussoy, P., Van Langendonck, A., Amorim, C., and Donnez, J., (2010). Reimplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with acute lymphoblastic leukemia is potentially unsafe. *Blood* 116 , 2908-2914.
- Donnez, J., Dolmans, M.M., Demylle, D., Jadoul, P., Pirard, C., Squifflet, J., Martinez-Madrid, B., and van Langendonck, A., (2004). Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 364 , 1405-1410.

- Donnez, J., Martinez-Madrid, B., Jadoul, P., Van Langendonckt, A., Demylle, D., and Dolmans, M.M., (2006). Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum. Reprod. Update* 12 , 519-535.
- Donnez, J., Squifflet, J., Van Eyck, A.S., Demylle, D., Jadoul, P., Van Langendonckt, A., and Dolmans, M.M., (2008). Restoration of ovarian function in orthotopically transplanted cryopreserved ovarian tissue: a pilot experience. *Reprod. Biomed. Online* 16 , 694-704.
- Donnez, J., Jadoul, P., Squifflet, J., Van Langendonckt, A., Donnez, O., Van Eyck, A.S., Marinescu, C., and Dolmans, M.M., (2010). Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in cancer patients. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 24 , 87-100.
- Donnez, J., Silber, S., Andersen, C.Y., Demeestere, I., Piver, P., Meirow, D., Pellicer, A., and Dolmans, M.M., (2011). Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. a review of 13 live births. *Ann. Med.* 43 , 437-450.
- Donnez, J., Dolmans, M.M., Pellicer, A., Diaz-Garcia, C., Sanchez Serrano, M., Schmidt, K.T., Ernst, E., Luyckx, V., and Andersen, C.Y., (2013). Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil. Steril.* 99 , 1503-1513.
- Durlinger, A.L., Gruijters, M.J., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H.A., Nachtigal, M.W., Uilenbroek, J.T., Grootegoed, J.A., and Themmen, A.P., (2002). Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 143 , 1076-1084.

-
- Easton, D.F., Steele, L., Fields, P., Ormiston, W., Averill, D., Daly, P.A., McManus, R., Neuhausen, S.L., Ford, D., Wooster, R., Cannon-Albright, L.A., Stratton, M.R., and Goldgar, D.E., (1997). Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome 13q12-13. *Am. J. Hum. Genet.* *61*, 120-128.
- Eldar-Geva, T., Margalioth, E.J., Ben-Chetrit, A., Gal, M., Robertson, D.M., Healy, D.L., Diamant, Y.Z., and Spitz, I.M., (2002). Serum inhibin B levels measured early during FSH administration for IVF may be of value in predicting the number of oocytes to be retrieved in normal and low responders. *Hum. Reprod.* *17*, 2331-2337.
- Elting, M.W., Kwee, J., Schats, R., Rekers-Mombarg, L.T., and Schoemaker, J., (2001). The rise of estradiol and inhibin B after acute stimulation with follicle-stimulating hormone predict the follicle cohort size in women with polycystic ovary syndrome, regularly menstruating women with polycystic ovaries, and regularly menstruating women with normal ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *86*, 1589-1595.
- Esposito, M.A., Coutifaris, C., and Barnhart, K.T., (2002). A moderately elevated day 3 FSH concentration has limited predictive value, especially in younger women. *Hum. Reprod.* *17*, 118-123.
- Fan, S., Wang, J., Yuan, R., Ma, Y., Meng, Q., Erdos, M.R., Pestell, R.G., Yuan, F., Auburn, K.J., Goldberg, I.D., and Rosen, E.M., (1999). BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. *Science* *284*, 1354-1356.
- Ferlicot, S., Vincent-Salomon, A., Medioni, J., Genin, P., Rosty, C., Sigal-Zafrani, B., Freneaux, P., Jouve, M., Thiery, J.P., and Sastre-Garau, X., (2004). Wide

- metastatic spreading in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Eur. J. Cancer* 40 , 336-341.
- Fisher, E.R., Redmond, C., Fisher, B., and Bass, G., (1990). Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (NSABP). Prognostic discriminants for 8-year survival for node-negative invasive breast cancer patients. *Cancer* 65 , 2121-2128.
- Fleming, J.M., Miller, T.C., Meyer, M.J., Ginsburg, E., and Vonderhaar, B.K., (2010). Local regulation of human breast xenograft models. *J. Cell. Physiol.* 224 , 795-806.
- Fonseca, R., Hartmann, L.C., Petersen, I.A., Donohue, J.H., Crotty, T.B., and Gisvold, J.J., (1997). Ductal carcinoma in situ of the breast. *Ann. Intern. Med.* 127 , 1013-1022.
- Ford, D., Easton, D.F., Bishop, D.T., Narod, S.A., and Goldgar, D.E., (1994). Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* 343 , 692-695.
- Fuller, B., Paynter, S., (2004). Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod. Biomed. Online* 9 , 680-691.
- Gail, M.H., Brinton, L.A., Byar, D.P., Corle, D.K., Green, S.B., Schairer, C., and Mulvihill, J.J., (1989). Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J. Natl. Cancer Inst.* 81 , 1879-1886.

-
- Gatta, G., Capocaccia, R., Stiller, C., Kaatsch, P., Berrino, F., Terenziani, M., and EUROCORE Working Group, (2005). Childhood cancer survival trends in Europe: a EUROCORE Working Group study. *J. Clin. Oncol.* 23 , 3742-3751.
- Gendler, S.J., Lancaster, C.A., Taylor-Papadimitriou, J., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Lalani, E.N., and Wilson, D., (1990). Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J. Biol. Chem.* 265 , 15286-15293.
- Gendler, S.J., (2001). MUC1, the renaissance molecule. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 6 , 339-353.
- Gervais-Fagnou, D.D., Girouard, C., Laperriere, N., Pintillie, M., and Goss, P.E., (1999). Breast cancer in women following supradiaphragmatic irradiation for Hodgkin's disease. *Oncology* 57 , 224-231.
- Gillanders, W.E., Mikhitarian, K., Hebert, R., Mauldin, P.D., Palesch, Y., Walters, C., Urist, M.M., Mann, G.B., Doherty, G., Herrmann, V.M., Hill, A.D., Eremin, O., El-Sheemy, M., Orr, R.K., Valle, A.A., Henderson, M.A., Dewitty, R.L., Sugg, S.L., Frykberg, E., Yeh, K., Bell, R.M., Metcalf, J.S., Elliott, B.M., Brothers, T., Robison, J., Mitas, M., and Cole, D.J., (2004). Molecular detection of micrometastatic breast cancer in histopathology-negative axillary lymph nodes correlates with traditional predictors of prognosis: an interim analysis of a prospective multi-institutional cohort study. *Ann. Surg.* 239 , 828-37; discussion 837-40.
- Gimbergues, P., Dauplat, M.M., Cayre, A., Durando, X., Le Bouedec, G., Finat-Duclos, F., Portefaix, G., Kwiatkowski, F., Dauplat, J., Penault-Llorca, F., and Tchirkov, A., (2007). Correlation between molecular metastases in

- sentinel lymph nodes of breast cancer patients and St Gallen risk category. *Eur. J. Surg. Oncol.* 33 , 16-22.
- Giuliano, A.E., Dale, P.S., Turner, R.R., Morton, D.L., Evans, S.W., and Krasne, D.L., (1995). Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Ann. Surg.* 222 , 394-9; discussion 399-401.
- Gook, D.A., Edgar, D.H., and Stern, C., (1999). Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1, 2-propanediol. *Hum. Reprod.* 14 , 2061-2068.
- Gosden, R.G., Baird, D.T., Wade, J.C., and Webb, R., (1994). Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Hum. Reprod.* 9 , 597-603.
- Goud, A., Goud, P., Qian, C., Van der Elst, J., Van Maele, G., and Dhont, M., (2000). Cryopreservation of human germinal vesicle stage and in vitro matured M II oocytes: influence of cryopreservation media on the survival, fertilization, and early cleavage divisions. *Fertil. Steril.* 74 , 487-494.
- Greve, T., Clasen-Linde, E., Andersen, M.T., Andersen, M.K., Sorensen, S.D., Rosendahl, M., Ralfkiaer, E., and Andersen, C.Y., (2012). Cryopreserved ovarian cortex from patients with leukemia in complete remission contains no apparent viable malignant cells. *Blood* 120 , 4311-4316.
- Greve, T., Wielenga, V.T., Grauslund, M., Sorensen, N., Christiansen, D.B., Rosendahl, M., and Yding Andersen, C., (2013). Ovarian tissue cryopreserved for fertility preservation from patients with Ewing or other

- sarcomas appear to have no tumour cell contamination. *Eur. J. Cancer* *49* , 1932-1938.
- Groome, N.P., Illingworth, P.J., O'Brien, M., Pai, R., Rodger, F.E., Mather, J.P., and McNeilly, A.S., (1996). Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *81* , 1401-1405.
- Guan, X.F., Hamedani, M.K., Adeyinka, A., Walker, C., Kemp, A., Murphy, L.C., Watson, P.H., and Leygue, E., (2003). Relationship between mammaglobin expression and estrogen receptor status in breast tumors. *Endocrine* *21* , 245-250.
- Haagensen, D.E., Jr, Dilley, W.G., Mazoujian, G., and Wells, S.A., Jr, (1990). Review of GCDFP-15. An apocrine marker protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *586* , 161-173.
- Haber, D.A., Buckler, A.J., (1992). WT1: a novel tumor suppressor gene inactivated in Wilms' tumor. *New Biol.* *4* , 97-106.
- Hahn, Y., Bera, T.K., Pastan, I.H., and Lee, B., (2006). Duplication and extensive remodeling shaped POTE family genes encoding proteins containing ankyrin repeat and coiled coil domains. *Gene* *366* , 238-245.
- Han, J.H., Kang, Y., Shin, H.C., Kim, H.S., Kang, Y.M., Kim, Y.B., and Oh, S.Y., (2003). Mammaglobin expression in lymph nodes is an important marker of metastatic breast carcinoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *127* , 1330-1334.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M., (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* *6* , 986-994.

- Hill, R.P., (1990). Tumor progression: potential role of unstable genomic changes. *Cancer Metastasis Rev.* 9 , 137-147.
- Hirobe, S., He, W.W., Lee, M.M., and Donahoe, P.K., (1992). Mullerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinology* 131 , 854-862.
- Houghton, R.L., Dillon, D.C., Molesh, D.A., Zehentner, B.K., Xu, J., Jiang, J., Schmidt, C., Frudakis, A., Repasky, E., Maltez Filho, A., Nolasco, M., Badaro, R., Zhang, X., Roche, P.C., Persing, D.H., and Reed, S.G., (2001). Transcriptional complementarity in breast cancer: application to detection of circulating tumor cells. *Mol. Diagn.* 6 , 79-91.
- Hovatta, O., Silye, R., Krausz, T., Abir, R., Margara, R., Trew, G., Lass, A., and Winston, R.M., (1996). Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum. Reprod.* 11 , 1268-1272.
- Hovatta, O., (2005). Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online* 10 , 729-734.
- Hudson, M.M., Mulrooney, D.A., Bowers, D.C., Sklar, C.A., Green, D.M., Donaldson, S.S., Oeffinger, K.C., Neglia, J.P., Meadows, A.T., and Robison, L.L., (2009). High-risk populations identified in Childhood Cancer Survivor Study investigations: implications for risk-based surveillance. *J. Clin. Oncol.* 27 , 2405-2414.
- Hughes, S.J., Xi, L., Raja, S., Gooding, W., Cole, D.J., Gillanders, W.E., Mikhitarian, K., McCarty, K., Silver, S., Ching, J., McMillan, W., Luketich, J.D., and Godfrey, T.E., (2006). A rapid, fully automated, molecular-based

-
- assay accurately analyzes sentinel lymph nodes for the presence of metastatic breast cancer. *Ann. Surg.* 243 , 389-398.
- Hutt, K.J., Albertini, D.F., (2007). An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod. Biomed. Online* 14 , 758-764.
- Imigo F. G., Mansilla E. S., Delama I, G., Poblete M.T. S., and Fonfach C. Z., (2011). Molecular classification of breast cancer. *Cuadernos de Cirugía* 25 , 67-74.
- Inokuchi, M., Ninomiya, I., Tsugawa, K., Terada, I., and Miwa, K., (2003). Quantitative evaluation of metastases in axillary lymph nodes of breast cancer. *Br. J. Cancer* 89 , 1750-1756.
- Isachenko, V., Montag, M., Isachenko, E., van der Ven, K., Dorn, C., Roesing, B., Braun, F., Sadek, F., and van der Ven, H., (2006). Effective method for in-vitro culture of cryopreserved human ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online* 13 , 228-234.
- Jager, D., Stockert, E., Gure, A.O., Scanlan, M.J., Karbach, J., Jager, E., Knuth, A., Old, L.J., and Chen, Y.T., (2001). Identification of a tissue-specific putative transcription factor in breast tissue by serological screening of a breast cancer library. *Cancer Res.* 61 , 2055-2061.
- Jager, D., Unkelbach, M., Frei, C., Bert, F., Scanlan, M.J., Jager, E., Old, L.J., Chen, Y.T., and Knuth, A., (2002). Identification of tumor-restricted antigens NY-BR-1, SCP-1, and a new cancer/testis-like antigen NW-BR-3 by serological screening of a testicular library with breast cancer serum. *Cancer. Immun.* 2 , 5.

- Jager, D., Knuth, A., (2005). Antibodies and vaccines--hope or illusion? *Breast* 14 , 631-635.
- Jones, C., Damiani, S., Wells, D., Chaggar, R., Lakhani, S.R., and Eusebi, V., (2001). Molecular cytogenetic comparison of apocrine hyperplasia and apocrine carcinoma of the breast. *Am. J. Pathol.* 158 , 207-214.
- Julian, T.B., Blumencranz, P., Deck, K., Whitworth, P., Berry, D.A., Berry, S.M., Rosenberg, A., Chaggar, A.B., Reintgen, D., Beitsch, P., Simmons, R., Saha, S., Mamounas, E.P., and Giuliano, A., (2008). Novel intraoperative molecular test for sentinel lymph node metastases in patients with early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 26 , 3338-3345.
- Kahn, P., (1992). Adhesion protein studies provide new clue to metastasis. *Science* 257 , 614.
- Kim, S.S., (2006). Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. *Fertil. Steril.* 85 , 1-11.
- Kim, S.S., Klemp, J., and Fabian, C., (2011). Breast cancer and fertility preservation. *Fertil. Steril.* 95 , 1535-1543.
- Kissin, M.W., Querci della Rovere, G., Easton, D., and Westbury, G., (1986). Risk of lymphoedema following the treatment of breast cancer. *Br. J. Surg.* 73 , 580-584.
- Klein, N.A., Illingworth, P.J., Groome, N.P., McNeilly, A.S., Battaglia, D.E., and Soules, M.R., (1996). Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and

-
- follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *81*, 2742-2745.
- Klijn, J.G., Beex, L.V., Mauriac, L., van Zijl, J.A., Veyret, C., Wildiers, J., Jassem, J., Piccart, M., Burghouts, J., Becquart, D., Seynaeve, C., Mignolet, F., and Duchateau, L., (2000). Combined treatment with buserelin and tamoxifen in premenopausal metastatic breast cancer: a randomized study. *J. Natl. Cancer Inst.* *92*, 903-911.
- Klug, J., Beier, H.M., Bernard, A., Chilton, B.S., Fleming, T.P., Lehrer, R.I., Miele, L., Pattabiraman, N., and Singh, G., (2000). Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *923*, 348-354.
- Koga, T., Horio, Y., Mitsudomi, T., Takahashi, T., and Yatabe, Y., (2004). Identification of MGB1 as a marker in the differential diagnosis of lung tumors in patients with a history of breast cancer by analysis of publicly available SAGE data. *J. Mol. Diagn.* *6*, 90-95.
- Kreunin, P., Yoo, C., Urquidi, V., Lubman, D.M., and Goodison, S., (2007). Proteomic profiling identifies breast tumor metastasis-associated factors in an isogenic model. *Proteomics* *7*, 299-312.
- Kuwayama, M., (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* *67*, 73-80.
- Kwee, J., Schats, R., McDonnell, J., Lambalk, C.B., and Schoemaker, J., (2004). Intercycle variability of ovarian reserve tests: results of a prospective randomized study. *Hum. Reprod.* *19*, 590-595.

- Kyono, K., Doshida, M., Toya, M., Sato, Y., Akahira, J., and Sasano, H., (2010). Potential indications for ovarian autotransplantation based on the analysis of 5,571 autopsy findings of females under the age of 40 in Japan. *Fertil. Steril.* *93* , 2429-2430.
- Lacroix, M., (2006). Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* *13* , 1033-1067.
- Lan, M.S., Batra, S.K., Qi, W.N., Metzgar, R.S., and Hollingsworth, M.A., (1990). Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *J. Biol. Chem.* *265* , 15294-15299.
- Larsen, E.C., Muller, J., Schmiegelow, K., Rechnitzer, C., and Andersen, A.N., (2003a). Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88* , 5307-5314.
- Larsen, E.C., Muller, J., Rechnitzer, C., Schmiegelow, K., and Andersen, A.N., (2003b). Diminished ovarian reserve in female childhood cancer survivors with regular menstrual cycles and basal FSH <10 IU/l. *Hum. Reprod.* *18* , 417-422.
- Lerwill, M.F., (2004). Current practical applications of diagnostic immunohistochemistry in breast pathology. *Am. J. Surg. Pathol.* *28* , 1076-1091.
- Levi, E., Klimstra, D.S., Andea, A., Basturk, O., and Adsay, N.V., (2004). MUC1 and MUC2 in pancreatic neoplasia. *J. Clin. Pathol.* *57* , 456-462.

-
- Levitin, F., Baruch, A., Weiss, M., Stiegman, K., Hartmann, M.L., Yoeli-Lerner, M., Ziv, R., Zrihan-Licht, S., Shina, S., Gat, A., Lifschitz, B., Simha, M., Stadler, Y., Cholostoy, A., Gil, B., Greaves, D., Keydar, I., Zaretsky, J., Smorodinsky, N., and Wreschner, D.H., (2005). A novel protein derived from the MUC1 gene by alternative splicing and frameshifting. *J. Biol. Chem.* *280* , 10655-10663.
- Licciardi, F.L., Liu, H.C., and Rosenwaks, Z., (1995). Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* *64* , 991-994.
- Liu, Z., Kim, J., Sypek, J.P., Wang, I.M., Horton, H., Oppenheim, F.G., and Bochner, B.S., (2004). Gene expression profiles in human nasal polyp tissues studied by means of DNA microarray. *J. Allergy Clin. Immunol.* *114* , 783-790.
- Liu, Z.Z., Xie, X.D., Qu, S.X., Zheng, Z.D., and Wang, Y.K., (2010). Small breast epithelial mucin (SBEM) has the potential to be a marker for predicting hematogenous micrometastasis and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Clin. Exp. Metastasis* *27* , 251-259.
- Liu, L., Liu, Z., Qu, S., Zheng, Z., Liu, Y., Xie, X., and Song, F., (2013). Small breast epithelial mucin tumor tissue expression is associated with increased risk of recurrence and death in triple-negative breast cancer patients. *Diagn. Pathol.* *8* , 71-1596-8-71.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* *25* , 402-408.

- Luo, M.H., Huang, Y.H., Ni, Y.B., Tsang, J.Y., Chan, S.K., Shao, M.M., and Tse, G.M., (2013). Expression of mammaglobin and gross cystic disease fluid protein-15 in breast carcinomas. *Hum. Pathol.* *44*, 1241-1250.
- Luyckx, V., Durant, J.F., Camboni, A., Gilliaux, S., Amorim, C.A., Van Langendonck, A., Ireng, L.M., Gala, J.L., Donnez, J., and Dolmans, M.M., (2013). Is transplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with advanced-stage breast cancer safe? A pilot study. *J. Assist. Reprod. Genet.* *30*, 1289-1299.
- Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., and Band, V., (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer. Biol. Ther.* *10*, 955-960.
- Maltaris, T., Kaya, H., Hoffmann, I., Mueller, A., Beckmann, M.W., and Dittrich, R., (2006). Comparison of xenografting in SCID mice and LIVE/DEAD assay as a predictor of the developmental potential of cryopreserved ovarian tissue. *In Vivo* *20*, 11-16.
- Maltaris, T., Weigel, M., Mueller, A., Schmidt, M., Seufert, R., Fischl, F., Koelbl, H., and Dittrich, R., (2008). Cancer and fertility preservation: fertility preservation in breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* *10*, 206.
- Manzotti, M., Dell'Orto, P., Maisonneuve, P., Zurrida, S., Mazzarol, G., and Viale, G., (2001). Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for multiple mRNA markers in the detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. *Int. J. Cancer* *95*, 307-312.
- Martin, J.R., Kodaman, P., Oktay, K., and Taylor, H.S., (2007). Ovarian cryopreservation with transposition of a contralateral ovary: a combined

- approach for fertility preservation in women receiving pelvic radiation. *Fertil. Steril.* 87 , 189.e5-189.e7.
- Martinez, F., Devesa, M., Coroleu, B., Tur, R., Gonzalez, C., Boada, M., Sole, M., Veiga, A., and Barri, P.N., (2013). Cancer and fertility preservation: Barcelona consensus meeting. *Gynecol. Endocrinol.* 29 , 285-291.
- Mazoujian, G., Pinkus, G.S., Davis, S., and Haagensen, D.E., Jr, (1983). Immunohistochemistry of a gross cystic disease fluid protein (GCDFP-15) of the breast. A marker of apocrine epithelium and breast carcinomas with apocrine features. *Am. J. Pathol.* 110 , 105-112.
- MCCafferty M, Healy N, and Kerin M., (2009). Breast cancer subtypes and molecular biomarkers. *Diagnostic Histopathologic* 15 , 489-490.
- Meirow, D., Nugent, D., (2001). The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum. Reprod. Update* 7 , 535-543.
- Meirow, D., Levron, J., Eldar-Geva, T., Hardan, I., Fridman, E., Yemini, Z., and Dor, J., (2007a). Monitoring the ovaries after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue: endocrine studies, in vitro fertilization cycles, and live birth. *Fertil. Steril.* 87 , 418.e7-418.e15.
- Meirow, D., Baum, M., Yaron, R., Levron, J., Hardan, I., Schiff, E., Nagler, A., Yehuda, D.B., Raanani, H., Hourvitz, A., and Dor, J., (2007b). Ovarian tissue cryopreservation in hematologic malignancy: ten years' experience. *Leuk. Lymphoma* 48 , 1569-1576.
- Meirow, D., Hardan, I., Dor, J., Fridman, E., Elizur, S., Ra'anani, H., Slyusarevsky, E., Amariglio, N., Schiff, E., Rechavi, G., Nagler, A., and Ben Yehuda, D.,

- (2008). Searching for evidence of disease and malignant cell contamination in ovarian tissue stored from hematologic cancer patients. *Hum. Reprod.* 23 , 1007-1013.
- Meirow, D., Biederman, H., Anderson, R.A., and Wallace, W.H., (2010). Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. *Clin. Obstet. Gynecol.* 53 , 727-739.
- Mikhitarian, K., Martin, R.H., Mitas, M., Mauldin, P.D., Palesch, Y., Metcalf, J.S., Cole, D.J., Gillanders, W.E., and Mims Study Group, (2005). Molecular analysis improves sensitivity of breast sentinel lymph node biopsy: results of a multi-institutional prospective cohort study. *Surgery* 138 , 474-481.
- Miksicek, R.J., Myal, Y., Watson, P.H., Walker, C., Murphy, L.C., and Leygue, E., (2002). Identification of a novel breast- and salivary gland-specific, mucin-like gene strongly expressed in normal and tumor human mammary epithelium. *Cancer Res.* 62 , 2736-2740.
- Minn, A.J., Kang, Y., Serganova, I., Gupta, G.P., Giri, D.D., Doubrovin, M., Ponomarev, V., Gerald, W.L., Blasberg, R., and Massague, J., (2005). Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J. Clin. Invest.* 115 , 44-55.
- Mitas, M., Mikhitarian, K., Walters, C., Baron, P.L., Elliott, B.M., Brothers, T.E., Robison, J.G., Metcalf, J.S., Palesch, Y.Y., Zhang, Z., Gillanders, W.E., and Cole, D.J., (2001). Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. *Int. J. Cancer* 93 , 162-171.

-
- Mitwally, M.F., Casper, R.F., (2002). Aromatase inhibition for ovarian stimulation: future avenues for infertility management. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* *14* , 255-263.
- Molina, R., Barak, V., van Dalen, A., Duffy, M.J., Einarsson, R., Gion, M., Goike, H., Lamerz, R., Nap, M., Soletormos, G., and Stieber, P., (2005). Tumor markers in breast cancer- European Group on Tumor Markers recommendations. *Tumour Biol.* *26* , 281-293.
- Murphy, L.C., Lee-Wing, M., Goldenberg, G.J., and Shiu, R.P., (1987). Expression of the gene encoding a prolactin-inducible protein by human breast cancers in vivo: correlation with steroid receptor status. *Cancer Res.* *47* , 4160-4164.
- Muttukrishna, S., Knight, P.G., (1990). Effects of crude and highly purified bovine inhibin (Mr 32,000 form) on gonadotrophin production by ovine pituitary cells in vitro: inhibin enhances gonadotrophin-releasing hormone-induced release of LH. *J. Endocrinol.* *127* , 149-159.
- Muttukrishna, S., Knight, P.G., (1991). Inverse effects of activin and inhibin on the synthesis and secretion of FSH and LH by ovine pituitary cells in vitro. *J. Mol. Endocrinol.* *6* , 171-178.
- Myal, Y., Gregory, C., Wang, H., Hamerton, J.L., and Shiu, R.P., (1989). The gene for prolactin-inducible protein (PIP), uniquely expressed in exocrine organs, maps to chromosome 7. *Somat. Cell Mol. Genet.* *15* , 265-270.
- Myal, Y., Robinson, D.B., Iwaszow, B., Tsuyuki, D., Wong, P., and Shiu, R.P., (1991). The prolactin-inducible protein (PIP/GCDFP-15) gene: cloning, structure and regulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* *80* , 165-175.

- Myal, Y., Iwasiow, B., Cosby, H., Yarmill, A., Blanchard, A., Tsuyuki, D., Fresnoza, A., Duckworth, M.L., and Shiu, R.P., (1998). Analysis of tissue- and hormone-specific regulation of the human prolactin-inducible protein/gross cystic disease fluid protein-15 gene in transgenic mice. *J. Mol. Endocrinol.* *21* , 217-223.
- Nabi, I.R., Watanabe, H., and Raz, A., (1992). Autocrine motility factor and its receptor: role in cell locomotion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* *11* , 5-20.
- Newton, H., Aubard, Y., Rutherford, A., Sharma, V., and Gosden, R., (1996). Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum. Reprod.* *11* , 1487-1491.
- Nissan, A., Jager, D., Roystacher, M., Prus, D., Peretz, T., Eisenberg, I., Freund, H.R., Scanlan, M., Ritter, G., Old, L.J., and Mitrani-Rosenbaum, S., (2006). Multimarker RT-PCR assay for the detection of minimal residual disease in sentinel lymph nodes of breast cancer patients. *Br. J. Cancer* *94* , 681-685.
- Norton, L., (1988). A Gompertzian model of human breast cancer growth. *Cancer Res.* *48* , 7067-7071.
- Norton, L., Day, R., (1991). Potential innovations in scheduling of cancer chemotherapy. *Important Adv. Oncol.* , 57-72.
- Norwitz, E.R., Stern, H.M., Grier, H., and Lee-Parritz, A., (2001). Placenta percreta and uterine rupture associated with prior whole body radiation therapy. *Obstet. Gynecol.* *98* , 929-931.

-
- Nwariaku, F.E., Euhus, D.M., Beitsch, P.D., Clifford, E., Erdman, W., Mathews, D., Albores-Saavedra, J., Leitch, M.A., and Peters, G.N., (1998). Sentinel lymph node biopsy, an alternative to elective axillary dissection for breast cancer. *Am. J. Surg.* 176 , 529-531.
- O'Brien, N., Maguire, T.M., O'Donovan, N., Lynch, N., Hill, A.D., McDermott, E., O'Higgins, N., and Duffy, M.J., (2002). Mammaglobin a: a promising marker for breast cancer. *Clin. Chem.* 48 , 1362-1364.
- O'Brien, N.A., O'Donovan, N., Ryan, B., Hill, A.D., McDermott, E., O'Higgins, N., and Duffy, M.J., (2005). Mammaglobin a in breast cancer: existence of multiple molecular forms. *Int. J. Cancer* 114 , 623-627.
- O'Brien, N., O'Donovan, N., Foley, D., Hill, A.D., McDermott, E., O'Higgins, N., and Duffy, M.J., (2007). Use of a panel of novel genes for differentiating breast cancer from non-breast tissues. *Tumour Biol.* 28 , 312-317.
- Oktay, K., Nugent, D., Newton, H., Salha, O., Chatterjee, P., and Gosden, R.G., (1997). Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil. Steril.* 67 , 481-486.
- Oktay, K., Economos, K., Kan, M., Rucinski, J., Veeck, L., and Rosenwaks, Z., (2001). Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *JAMA* 286 , 1490-1493.
- Oktay, K., Buyuk, E., (2004). Ovarian transplantation in humans: indications, techniques and the risk of reseeding cancer. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 113 *Suppl* 1 , S45-7.

- Oktaý, K., Sonmezer, M., (2004). Ovarian tissue banking for cancer patients: fertility preservation, not just ovarian cryopreservation. *Hum. Reprod.* 19 , 477-480.
- Oktaý, K., Buyuk, E., Libertella, N., Akar, M., and Rosenwaks, Z., (2005). Fertility preservation in breast cancer patients: a prospective controlled comparison of ovarian stimulation with tamoxifen and letrozole for embryo cryopreservation. *J. Clin. Oncol.* 23 , 4347-4353.
- Ottman, R., Pike, M.C., King, M.C., and Henderson, B.E., (1983). Practical guide for estimating risk for familial breast cancer. *Lancet* 2 , 556-558.
- Ouellette, R.J., Richard, D., and Maicas, E., (2004). RT-PCR for mammaglobin genes, MGB1 and MGB2, identifies breast cancer micrometastases in sentinel lymph nodes. *Am. J. Clin. Pathol.* 121 , 637-643.
- Park, S.E., Son, W.Y., Lee, S.H., Lee, K.A., Ko, J.J., and Cha, K.Y., (1997). Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Fertil. Steril.* 68 , 920-926.
- Parkers, A.S., Smith, A.U., (1954). Preservation of ovarian tissue at -79 degrees C. for transplantation. *Acta Endocrinol.* 17 , 313-320.
- Parmegiani, L., Accorsi, A., Cognigni, G.E., Bernardi, S., Troilo, E., and Filicori, M., (2010). Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. *Fertil. Steril.* 94 , 1525-1528.

-
- Perrotin, F., Marret, H., Bouquin, R., Fischer-Perrotin, N., Lansac, J., and Body, G., (2001). Incidence, diagnosis and prognosis of ovarian metastasis in breast cancer. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 29 , 308-315.
- Pfister, C.U., Martoni, A., Zamagni, C., Lelli, G., De Braud, F., Souppart, C., Duval, M., and Hornberger, U., (2001). Effect of age and single versus multiple dose pharmacokinetics of letrozole (Femara) in breast cancer patients. *Biopharm. Drug Dispos.* 22 , 191-197.
- Raina, D., Ahmad, R., Joshi, M.D., Yin, L., Wu, Z., Kawano, T., Vasir, B., Avigan, D., Kharbada, S., and Kufe, D., (2009). Direct targeting of the mucin 1 oncoprotein blocks survival and tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 69 , 5133-5141.
- Rakha, E.A., Boyce, R.W., Abd El-Rehim, D., Kurien, T., Green, A.R., Paish, E.C., Robertson, J.F., and Ellis, I.O., (2005). Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC and MUC6) and their prognostic significance in human breast cancer. *Mod. Pathol.* 18 , 1295-1304.
- Rauscher, F.J.,3rd, (1993). The WT1 Wilms tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. *FASEB J.* 7 , 896-903.
- Ray, G.R., Trueblood, H.W., Enright, L.P., Kaplan, H.S., and Nelsen, T.S., (1970). Oophoropexy: a means of preserving ovarian function following pelvic megavoltage radiotherapy for Hodgkin's disease. *Radiology* 96 , 175-180.
- Riccio, P.A., Marabini, P., Seracchioli, S., Mingolla, G.P., Pavanello, P.M., Andreini, L., Nannini, R., Severi, S., Monti, G., and Ferrari, G., (2007). The

- sentinel lymph node biopsy. Evolution and convalidation of the technique. *Ann. Ital. Chir.* 78 , 413-7; discussion 417-8.
- Roberts, V.J., Barth, S., el-Roeiy, A., and Yen, S.S., (1993). Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77 , 1402-1410.
- Rose, E.A., Glaser, T., Jones, C., Smith, C.L., Lewis, W.H., Call, K.M., Minden, M., Champagne, E., Bonetta, L., and Yeger, H., (1990). Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilms' tumor gene. *Cell* 60 , 495-508.
- Rosendahl, M., Andersen, M.T., Ralfkiaer, E., Kjeldsen, L., Andersen, M.K., and Andersen, C.Y., (2010). Evidence of residual disease in cryopreserved ovarian cortex from female patients with leukemia. *Fertil. Steril.* 94 , 2186-2190.
- Rosendahl, M., Schmidt, K.T., Ernst, E., Rasmussen, P.E., Loft, A., Byskov, A.G., Andersen, A.N., and Andersen, C.Y., (2011a). Cryopreservation of ovarian tissue for a decade in Denmark: a view of the technique. *Reprod. Biomed. Online* 22 , 162-171.
- Rosendahl, M., Timmermans Wielenga, V., Nedergaard, L., Kristensen, S.G., Ernst, E., Rasmussen, P.E., Anderson, M., Schmidt, K.T., and Andersen, C.Y., (2011b). Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation: no evidence of malignant cell contamination in ovarian tissue from patients with breast cancer. *Fertil. Steril.* 95 , 2158-2161.

- Rosendahl, M., Greve, T., and Andersen, C.Y., (2013). The safety of transplanting cryopreserved ovarian tissue in cancer patients: a review of the literature. *J. Assist. Reprod. Genet.* 30 , 11-24.
- Rosner, B., Colditz, G.A., (1996). Nurses' health study: log-incidence mathematical model of breast cancer incidence. *J. Natl. Cancer Inst.* 88 , 359-364.
- Roux, C., Amiot, C., Agnani, G., Aubard, Y., Rohrlich, P.S., and Piver, P., (2010). Live birth after ovarian tissue autograft in a patient with sickle cell disease treated by allogeneic bone marrow transplantation. *Fertil. Steril.* 93 , 2413.e15-2413.e19.
- Rowan, B.G., Gimble, J.M., Sheng, M., Anbalagan, M., Jones, R.K., Frazier, T.P., Asher, M., Lacayo, E.A., Friedlander, P.L., Kutner, R., and Chiu, E.S., (2014). Human adipose tissue-derived stromal/stem cells promote migration and early metastasis of triple negative breast cancer xenografts. *PLoS One* 9 , e89595.
- Salle, B., Demirci, B., Franck, M., Rudigoz, R.C., Guerin, J.F., and Lornage, J., (2002). Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil. Steril.* 77 , 403-408.
- Sanchez, M., Alama, P., Gadea, B., Soares, S.R., Simon, C., and Pellicer, A., (2007). Fresh human orthotopic ovarian cortex transplantation: long-term results. *Hum. Reprod.* 22 , 786-791.
- Sanchez, M., Novella-Maestre, E., Teruel, J., Ortiz, E., and Pellicer, A., (2008). The Valencia Programme for Fertility Preservation. *Clin. Transl. Oncol.* 10 , 433-438.

- Sanchez-Serrano, M., Novella-Maestre, E., Rosello-Sastre, E., Camarasa, N., Teruel, J., and Pellicer, A., (2009). Malignant cells are not found in ovarian cortex from breast cancer patients undergoing ovarian cortex cryopreservation. *Hum. Reprod.* *24* , 2238-2243.
- Sasaki, E., Tsunoda, N., Hatanaka, Y., Mori, N., Iwata, H., and Yatabe, Y., (2007). Breast-specific expression of MGB1/mammaglobin: an examination of 480 tumors from various organs and clinicopathological analysis of MGB1-positive breast cancers. *Mod. Pathol.* *20* , 208-214.
- Schmidt, K.L., Andersen, C.Y., Loft, A., Byskov, A.G., Ernst, E., and Andersen, A.N., (2005). Follow-up of ovarian function post-chemotherapy following ovarian cryopreservation and transplantation. *Hum. Reprod.* *20* , 3539-3546.
- Schroder, C.P., Ruiters, M.H., de Jong, S., Tiebosch, A.T., Wesseling, J., Veenstra, R., de Vries, J., Hoekstra, H.J., de Leij, L.F., and de Vries, E.G., (2003). Detection of micrometastatic breast cancer by means of real time quantitative RT-PCR and immunostaining in perioperative blood samples and sentinel nodes. *Int. J. Cancer* *106* , 611-618.
- Schroder, C.P., Timmer-Bosscha, H., Wijchman, J.G., de Leij, L.F., Hollema, H., Heineman, M.J., and de Vries, E.G., (2004). An in vitro model for purging of tumour cells from ovarian tissue. *Hum. Reprod.* *19* , 1069-1075.
- Scott, R.T., Jr, Hofmann, G.E., Oehninger, S., and Muasher, S.J., (1990). Intercycle variability of day 3 follicle-stimulating hormone levels and its effect on stimulation quality in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* *54* , 297-302.
- Seifer, D.B., MacLaughlin, D.T., Christian, B.P., Feng, B., and Shelden, R.M., (2002). Early follicular serum mullerian-inhibiting substance levels are

- associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil. Steril.* 77 , 468-471.
- Senn, A., Vozzi, C., Chanson, A., De Grandi, P., and Germond, M., (2000). Prospective randomized study of two cryopreservation policies avoiding embryo selection: the pronucleate stage leads to a higher cumulative delivery rate than the early cleavage stage. *Fertil. Steril.* 74 , 946-952.
- Shushan, A., Peretz, T., and Mor-Yosef, S., (1996). Therapeutic approach to ovarian cysts in tamoxifen-treated women with breast cancer. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 52 , 249-253.
- Silber, S., Kagawa, N., Kuwayama, M., and Gosden, R., (2010). Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. *Fertil. Steril.* 94 , 2191-2196.
- Sklar, C.A., (1999). Overview of the effects of cancer therapies: the nature, scale and breadth of the problem. *Acta Paediatr. Suppl.* 88 , 1-4.
- Skliris, G.P., Hube, F., Gheorghiu, I., Mutawe, M.M., Penner, C., Watson, P.H., Murphy, L.C., Leygue, E., and Myal, Y., (2008). Expression of small breast epithelial mucin (SBEM) protein in tissue microarrays (TMAs) of primary invasive breast cancers. *Histopathology* 52 , 355-369.
- Smotrich, D.B., Widra, E.A., Gindoff, P.R., Levy, M.J., Hall, J.L., and Stillman, R.J., (1995). Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil. Steril.* 64 , 1136-1140.
- Son, W.Y., Yoon, S.H., Yoon, H.J., Lee, S.M., and Lim, J.H., (2003). Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron

- microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. *Hum. Reprod.* 18 , 137-139.
- Sonmezer, M., Oktay, K., (2004). Fertility preservation in female patients. *Hum. Reprod. Update* 10 , 251-266.
- Sonmezer, M., Oktay, K., (2006). Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy. *Oncologist* 11 , 422-434.
- Sorlie, 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., Lonning, P.E., Brown, P.O., Borresen-Dale, A.L., and Botstein, D., (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 , 8418-8423.
- Span, P.N., Waanders, E., Manders, P., Heuvel, J.J., Foekens, J.A., Watson, M.A., Beex, L.V., and Sweep, F.C., (2004). Mammaglobin is associated with low-grade, steroid receptor-positive breast tumors from postmenopausal patients, and has independent prognostic value for relapse-free survival time. *J. Clin. Oncol.* 22 , 691-698.
- Struewing, J.P., Hartge, P., Wacholder, S., Baker, S.M., Berlin, M., McAdams, M., Timmerman, M.M., Brody, L.C., and Tucker, M.A., (1997). The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N. Engl. J. Med.* 336 , 1401-1408.
- Swallow, D.M., Gendler, S., Griffiths, B., Kearney, A., Povey, S., Sheer, D., Palmer, R.W., and Taylor-Papadimitriou, J., (1987). The hypervariable gene locus PUM, which codes for the tumour associated epithelial mucins, is located on chromosome 1, within the region 1q21-24. *Ann. Hum. Genet.* 51 , 289-294.

-
- Taback, B., Chan, A.D., Kuo, C.T., Bostick, P.J., Wang, H.J., Giuliano, A.E., and Hoon, D.S., (2001). Detection of occult metastatic breast cancer cells in blood by a multimolecular marker assay: correlation with clinical stage of disease. *Cancer Res.* 61 , 8845-8850.
- Tannok, I., (1992). Cell proliferation En: The basis science of Oncology. Tannock IF, Hill RP (eds). New York, NY, McGraw-Hill .
- Theurillat, J.P., Zurrer-Hardi, U., Varga, Z., Storz, M., Probst-Hensch, N.M., Seifert, B., Fehr, M.K., Fink, D., Ferrone, S., Pestalozzi, B., Jungbluth, A.A., Chen, Y.T., Jager, D., Knuth, A., and Moch, H., (2007). NY-BR-1 protein expression in breast carcinoma: a mammary gland differentiation antigen as target for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 56 , 1723-1731.
- Tian, W., Osawa, M., Horiuchi, H., and Tomita, Y., (2004). Expression of the prolactin-inducible protein (PIP/GCDFP15) gene in benign epithelium and adenocarcinoma of the prostate. *Cancer. Sci.* 95 , 491-495.
- Valladares-Ayerbes, M., Iglesias-Diaz, P., Diaz-Prado, S., Ayude, D., Medina, V., Haz, M., Reboredo, M., Antolin, S., Calvo, L., and Anton-Aparicio, L.M., (2009). Diagnostic accuracy of small breast epithelial mucin mRNA as a marker for bone marrow micrometastasis in breast cancer: a pilot study. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 135 , 1185-1195.
- van Rooij, I.A., Broekmans, F.J., te Velde, E.R., Fauser, B.C., Bancsi, L.F., de Jong, F.H., and Themmen, A.P., (2002). Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum. Reprod.* 17 , 3065-3071.

- van Rooij, I.A., de Jong, E., Broekmans, F.J., Looman, C.W., Habbema, J.D., and te Velde, E.R., (2004). High follicle-stimulating hormone levels should not necessarily lead to the exclusion of subfertile patients from treatment. *Fertil. Steril.* *81* , 1478-1485.
- Varga, Z., Theurillat, J.P., Filonenko, V., Sasse, B., Odermatt, B., Jungbluth, A.A., Chen, Y.T., Old, L.J., Knuth, A., Jager, D., and Moch, H., (2006). Preferential nuclear and cytoplasmic NY-BR-1 protein expression in primary breast cancer and lymph node metastases. *Clin. Cancer Res.* *12* , 2745-2751.
- Veys, I., Majjaj, S., Salgado, R., Noterman, D., Schobbens, J.C., Manouach, F., Bourgeois, P., Nogaret, J.M., Larsimont, D., and Durbecq, V., (2010). Evaluation of the histological size of the sentinel lymph node metastases using RT-PCR assay: a rapid tool to estimate the risk of non-sentinel lymph node invasion in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *124* , 599-605.
- von Wolff, M., Donnez, J., Hovatta, O., Keros, V., Maltaris, T., Montag, M., Salle, B., Sonmezer, M., and Andersen, C.Y., (2009). Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy--a technique in its infancy but already successful in fertility preservation. *Eur. J. Cancer* *45* , 1547-1553.
- Wallace, W.H., Thomson, A.B., and Kelsey, T.W., (2003). The radiosensitivity of the human oocyte. *Hum. Reprod.* *18* , 117-121.
- Wallace, W.H., Thomson, A.B., Saran, F., and Kelsey, T.W., (2005). Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *62* , 738-744.

-
- Wallace, W.H., Kelsey, T.W., (2010). Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One* 5 , e8772.
- Wallwiener, C.W., Wallwiener, M., Kurth, R.R., Rohm, C., Neubauer, H., Banys, M.J., Staebler, A., Schonfisch, B., Meuer, S.C., Giese, T., and Fehm, T.N., (2011). Molecular detection of breast cancer metastasis in sentinel lymph nodes by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR): identifying, evaluating and establishing multi-marker panels. *Breast Cancer Res. Treat.* 130 , 833-844.
- Wang, J.X., Yap, Y.Y., and Matthews, C.D., (2001). Frozen-thawed embryo transfer: influence of clinical factors on implantation rate and risk of multiple conception. *Hum. Reprod.* 16 , 2316-2319.
- Wang, W., Epler, J., Salazar, L.G., and Riddell, S.R., (2006). Recognition of breast cancer cells by CD8+ cytotoxic T-cell clones specific for NY-BR-1. *Cancer Res.* 66 , 6826-6833.
- Watson, M.A., Fleming, T.P., (1994). Isolation of differentially expressed sequence tags from human breast cancer. *Cancer Res.* 54 , 4598-4602.
- Watson, M.A., Fleming, T.P., (1996). Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res.* 56 , 860-865.
- Watson, M.A., Darrow, C., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., and Fleming, T.P., (1998). Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13. *Oncogene* 16 , 817-824.

- Watson, M.A., Dintzis, S., Darrow, C.M., Voss, L.E., DiPersio, J., Jensen, R., and Fleming, T.P., (1999). Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Res.* *59* , 3028-3031.
- Wei, X., Xu, H., and Kufe, D., (2006). MUC1 oncoprotein stabilizes and activates estrogen receptor alpha. *Mol. Cell* *21* , 295-305.
- Welt, C.K., Hall, J.E., Adams, J.M., and Taylor, A.E., (2005). Relationship of estradiol and inhibin to the follicle-stimulating hormone variability in hypergonadotropic hypogonadism or premature ovarian failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *90* , 826-830.
- Wick, M.R., Lillemoe, T.J., Copland, G.T., Swanson, P.E., Manivel, J.C., and Kiang, D.T., (1989). Gross cystic disease fluid protein-15 as a marker for breast cancer: immunohistochemical analysis of 690 human neoplasms and comparison with alpha-lactalbumin. *Hum. Pathol.* *20* , 281-287.
- Wu, J., Zhang, L., and Wang, X., (2001). In vitro maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction* *121* , 389-393.
- Wyld, P.J., Lilleyman, J.S., (1983). Ovarian disease in childhood lymphoblastic leukaemia. *Acta Haematol.* *69* , 278-280.
- Yada-Hashimoto, N., Yamamoto, T., Kamiura, S., Seino, H., Ohira, H., Sawai, K., Kimura, T., and Saji, F., (2003). Metastatic ovarian tumors: a review of 64 cases. *Gynecol. Oncol.* *89* , 314-317.

- Yin, L., Li, Y., Ren, J., Kuwahara, H., and Kufe, D., (2003). Human MUC1 carcinoma antigen regulates intracellular oxidant levels and the apoptotic response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* *278* , 35458-35464.
- Zec, I., Tislaric-Medenjak, D., Megla, Z.B., and Kucak, I., (2011). Anti-Mullerian hormone: a unique biochemical marker of gonadal development and fertility in humans. *Biochem. Med.* *21* , 219-230.
- Zehentner, B.K., Dillon, D.C., Jiang, Y., Xu, J., Bennington, A., Molesh, D.A., Zhang, X., Reed, S.G., Persing, D., and Houghton, R.L., (2002). Application of a multigene reverse transcription-PCR assay for detection of mammaglobin and complementary transcribed genes in breast cancer lymph nodes. *Clin. Chem.* *48* , 1225-1231.
- Zehentner, B.K., Carter, D., (2004). Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast cancer. *Clin. Biochem.* *37* , 249-257.
- Zhu, W., Michael, C.W., (2007). WT1, monoclonal CEA, TTF1, and CA125 antibodies in the differential diagnosis of lung, breast, and ovarian adenocarcinomas in serous effusions. *Diagn. Cytopathol.* *35* , 370-375.

BIBLIOGRAFÍA WEB:

Genes-to-Systems Breast Cancer Database, (2013).

<http://www.itb.cnr.it/breastcancer/>

Instituto Nacional del Cáncer, (2013).

<http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/seno/HealthProfessional>

NCBI-Unigene, (2013).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?ORG=Hs&CID=591980>

OMS, (Febrero 2013). Centro de Prensa. Nota descriptiva N° 297.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>