



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR E
INMUNOLOGÍA

TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE DOCTOR POR
LA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA:

EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA CLUSTERINA SOBRE LA SENSIBILIDAD
A LOS INHIBIDORES DE PROTEINAS QUINASAS EN CÉLULAS TUMORALES
DE MAMA.

DIRECTORES: Dr. MAXIMINO REDONDO BAUTISTA - Dra. TERESA TÉLLEZ SANTANA

AUTORA: MARILINA GARCÍA ARANDA


FECHA: Octubre 2015





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Marilina García Aranda

 <http://orcid.org/0000-0003-3759-4044>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Bioquímica, Biología Molecular
e Inmunología

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN

Don **Maximino Redondo Bautista**, Doctor en Medicina, especialista en análisis clínicos del Hospital Costa del Sol de Marbella y profesor asociado del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga y Doña **Teresa Téllez Santana**, Doctora en Medicina y Cirugía, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Málaga y colaboradora honoraria del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga,

CERTIFICAN QUE:

Doña **Marilina García Aranda** ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación de Tesis Doctoral titulado "*Efecto de la inhibición de la clusterina sobre la sensibilidad a los inhibidores de las proteínas quinasas en células tumorales de mama*" para optar al grado de Doctor.

El trabajo reúne, a nuestro juicio, las condiciones de rigor y originalidad metodológica necesarios para que pueda ser leído y defendido públicamente ante el Tribunal correspondiente.

Y, para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Málaga, a 17 de octubre de 2015.

Fdo. Maximino Redondo Bautista

Fdo. Teresa Téllez Santana



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar mi más sincero agradecimiento a los directores de esta tesis doctoral, el Dr. Maximino Redondo Bautista y la Dra. Teresa Téllez Santana, ya que sin su orientación y ayuda esta tesis nunca habría llegado a buen fin.

También quisiera agradecer a mi familia el apoyo incondicional que siempre me han demostrado. Os quiero.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A mi padre Juan. A mi madre Lina



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

La presente Tesis Doctoral forma parte de los estudios realizados bajo el soporte económico del Fondo de Investigaciones Sanitarias y la Fundación Rey Fahd de España. Parte de estos estudios se encuentran recogidos en las siguientes publicaciones:

Redondo M, Téllez T, Roldan MJ, Serrano A, García-Aranda M, Gleave ME, et al. Anticlusterin treatment of breast cancer cells increases the sensitivities of chemotherapy and tamoxifen and counteracts the inhibitory action of dexamethasone on chemotherapy-induced cytotoxicity. Breast Cancer Res 2007;9:R86.

Maximino Redondo, Marilina García-Aranda, María J. Roldán, Gonzalo Callejón, Alfonso Serrano, Eugenio Jiménez and Teresa Téllez. Downregulation of clusterin mediates sensitivity to protein kinase inhibitors in breast cancer cells. Anti-Cancer Drugs Jan 2015 - vol.26 – Issue 1 – p 85 -89. Doi: 10.1097.



INDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. EL CÁNCER DE MAMA	8
1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DEMAMA	8
1.1.2. FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA	11
1.1.3. DIAGNÓSTICO.....	14
1.1.4. CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA	16
1.1.5. ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA SEGÚN EL INSTITUTO NACIONAL DE CÁNCER NCI.....	18
1.1.6. ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA SEGÚN EL SISTEMA TNM	19
1.1.7. FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS DEL CANCER DE MAMA.....	21
1.1.8. FACTORES PREDICTIVOS DEL CÁNCER DE MAMA	23
1.2. LAS PROTEÍNAS QUINASAS Y SU PAPEL EN LAS CÉLULAS TUMORALES	26
1.2.1. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS	27
1.2.2. LAS MAPK	28
1.2.3. IMPORTANCIA DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS EN EL DESARROLLO TUMORAL ..	30
1.3. LA PROTEÍNA CLUSTERINA	32
1.3.1. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA CLUSTERINA.....	34
1.3.2. CLUSTERINA, APOPTOSIS Y CÁNCER	35
1.3.3. LA CLUSTERINA Y EL CÁNCER DE MAMA.....	38
1.4. TERAPIAS GÉNICAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.....	40
1.4.1. LA TERAPIA GÉNICA.....	40
1.4.2. OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO (ODN).....	40
1.4.3. siRNA - SMALL INTERFERING RNA.....	43
1.5. NUEVAS TERAPIAS BASADAS EN LA INHIBICIÓN DE LA CLUSTERINA Y DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS	45
1.5.1. INHIBIDORES DE LA CLUSTERINA	45
1.5.2. INHIBIDORES DE LAS PROTEINAS QUINASAS	46
2. OBJETIVOS.....	50
2.1. OBJETIVO GENERAL E HIPÓTESIS INICIAL.....	50
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50

2.2.1.	EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASAS SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR	50
2.2.2.	EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE CLUSTERINA SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR	50
2.2.3.	EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASAS SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA	50
2.2.4.	EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS COMBINADOS DE INHIBIDORES DE CLUSTERINA E INHIBIDORES DE PROTEINAS QUINASA	51
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	54
3.1.	MODELOS CELULARES	54
3.2.	PROCEDIMIENTO DE CULTIVO	55
3.3.	ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA	56
3.3.1.	INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CLUSTERINA MEDIANTE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO (ODN).....	56
3.3.2.	INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CLUSTERINA MEDIANTE EL PLÁSMIDO PARA CLUSTERINA O siRNA.....	57
3.4.	ENSAYOS COMBINADOS CON INHIBIDORES DE PROTEINAS QUINASA	58
3.5.	COMPROBACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE CONTAJE POR EXCLUSIÓN ...	60
3.5.1.	LA CÁMARA DE NEUBAUER.....	60
3.6.	COMPROBACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA CLUSTERINA.....	61
3.6.1.	TÉCNICA RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTION-POLIMERASE CHAIN REACTION) ..	61
3.6.2.	TÉCNICA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	63
3.6.3.	TÉCNICA WESTERN BLOT.....	64
3.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	66
4.	RESULTADOS	68
4.1.	RECUENTOS AL FINAL DE CADA ENSAYO REALIZADO	68
4.2.	EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEINAS QUINASAS SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR	69
4.3.	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON ODN CLUSTERINA SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR	71
4.4.	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON siRNA CLUSTERINA SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR	72
4.5.	EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEINAS QUINASAS SOBRE LA EXPRESIÓN LA CLUSTERINA.....	73
4.6.	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA	74
4.7.	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON siRNA SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA.....	75

4.8.	EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS COMBINADOS DE INHIBIDORES DE CLUSTERINA JUNTO CON INHIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASAS.....	76
5.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	84
5.1.	EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEINAS QUINASAS SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR	84
5.3.	EFFECTO DE LOS INHIBIDORES LA CLUSTERINA SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR .	87
5.4.	EFFECTO DE INHIBIDORES DE PROTEINAS QUINASAS SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA.....	89
5.5.	EFFECTO DE LOS ODN Y siRNA SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA	90
5.6.	EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS PREVIOS CON ODN O siRNA	91
6.	CONCLUSIONES	94
6.1.	CONCLUSIONES	94
6.1.1.	EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASAS SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR	94
6.1.2.	EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA CLUSTERINA SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR	94
6.1.3.	EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEINA QUINASA SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA.....	94
6.1.4.	EFFECTO DEL TRATAMIENTO PREVIO CON INHIBIDORES CLUSTERINA SOBRE LA SENSIBILIDAD A INHIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASAS	94
6.2.	CONCLUSIÓN FINAL.....	94
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	96



1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CÁNCER DE MAMA

1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

SEGÚN LA OMS, cada año se diagnostican más de diez millones de nuevos casos de cáncer, lo que unido su alto índice de mortalidad cercano al 25%, sitúa al cáncer como la segunda causa de muerte en el mundo.

SEGÚN LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA CONTRA EL CÁNCER (AECC) el cáncer de mama es la neoplasia maligna sólida más frecuentemente diagnosticada en las mujeres occidentales, esto es Norteamérica y Europa, y la que tiene mayor prevalencia mundial a 5 años en ambos sexos.

AUNQUE LA MORTALIDAD por cáncer de mama ha tenido una evolución llamativa, con un importante aumento desde los años 50 hasta la década de los 80 [Botha y cols, 2003], durante las dos últimas décadas en la mayor parte de los países desarrollados se ha observado una disminución de la misma, debido sobre todo al éxito de los nuevos tratamientos y a la implantación de los programas de cribado.

AÚN ASÍ, EL CÁNCER DE MAMA, se coloca como la quinta causa de muerte entre los enfermos oncológicos, siendo la responsable de 522.000 muertes en el año 2012. De hecho, sólo en el año 2012 se diagnosticaron 1,67 millones de nuevos casos en todo el mundo, lo que supone el 25% de todos los casos diagnosticados en mujeres y menos del 1% en los hombres.

DESPUÉS DEL CÁNCER DE PULMÓN, el cáncer de mama es en la actualidad la causa de muerte más frecuente entre las mujeres de zonas menos desarrolladas (324.000

muertes, 14,3% del total) y la segunda causa de muerte en zonas más desarrolladas (198.000 muertes, 15,4%), suponiendo la primera causa de muerte en mujeres entre 40 y 55 años.

APROXIMADAMENTE EL 25% con diagnóstico de cáncer de mama en estadio precoz desarrollará la enfermedad metastásica que sigue siendo incurable, por lo que la investigación, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de mama deben ser aspectos prioritarios dentro de la política sanitaria. Es por tanto necesario continuar con los programas de diagnóstico precoz, evitar los retrasos en los diagnósticos y asegurar a los pacientes la mejor estrategia terapéutica.

LA AGENCIA INTERNACIONAL PARA LA INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER (IARC) es el organismo especializado para el cáncer de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la responsable de publicar periódicamente el informe GLOBOCAN, con los datos más actualizados a nivel mundial sobre la incidencia, prevalencia y mortalidad por cáncer de los 28 tipos más frecuentes de 184 países. Éste informe, disponible en la página <http://globocan.iarc.fr>, supone una valiosa visión de lo que representa la carga del cáncer en el mundo, con información de población adulta, mayor de 15 años, con datos globales de la población pero también por países y regiones del mundo, según su sexo, y con predicciones hasta dentro de 20 años.

EN EL INFORME GLOBOCAN 2012 para España, la estimación de la incidencia global de cáncer de mama en el año 2012 fue de 27.182, con un aumento gradual respecto al año 2006, que fue de 26.493. Este porcentaje supone casi el 30% de todos los tumores detectados en la población femenina española. Así mismo, fue el tumor con mayor prevalencia a 5 años (17.9%), el quinto en incidencia (11,7%) y el cuarto en mortalidad (5,9%) en ambos sexos. En las mujeres, la mayor incidencia, mortalidad y prevalencia a 5 años es para el cáncer de mama (29%, 15,5% y 40,5%, respectivamente), provocando la muerte de 6.000 mujeres cada año.

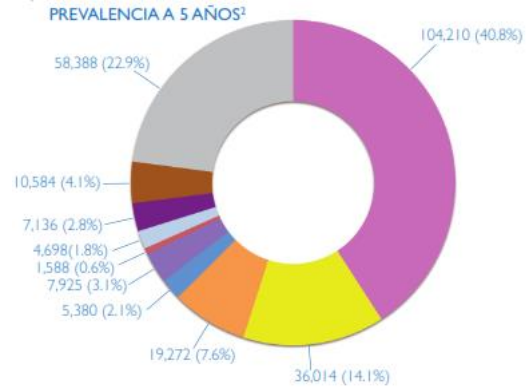


FIG. 1.3 Prevalencia a 5 años en mujeres en los tumores más frecuentes. GLOBOCAN 2012

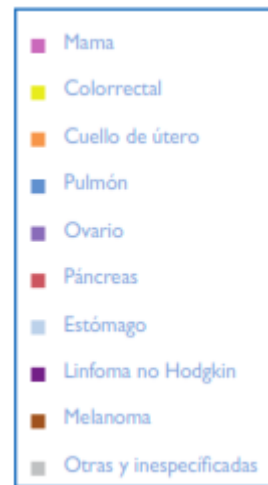


FIG. 1.4 Leyenda figuras 1-3. GLOBOCAN 2012



FIG. 1.1 Incidencia en mujeres en los tumores más frecuentes. GLOBOCAN 2012

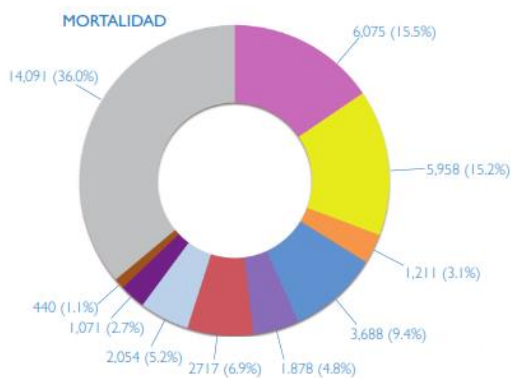


FIG. 1.2 Mortalidad en mujeres en los tumores más frecuentes. GLOBOCAN 2012

EN LOS PAISES DE LA CUENCA EUROPEA (España, Centroeuropa, Portugal e Irlanda), la incidencia de este tumor es inferior a la de países como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Países Bajos, Alemania, Francia y Suiza. La tasa de supervivencia en los países mediterráneos también es mayor, lo que se ha relacionado con el efecto protector de la dieta mediterránea.

A PARTIR DE 1.992, la tasa de mortalidad de este cáncer en España empezó a descender a un ritmo del 2% anual, mientras que la tasa de supervivencia se incrementó por encima del 75% a los cinco años del diagnóstico. Estas tendencias, se deben principalmente a los programas de detección precoz y a los avances en el tratamiento sistémico, lo que explica las

1. INTRODUCCIÓN

tasas de supervivencia mayores en países desarrollados como Estados Unidos, Canadá, Japón y Europa Occidental.

LAS ESTADÍSTICAS también nos muestran que la mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años. De este modo, podemos ver como todos los estudios poblacionales coinciden en que la incidencia de una forma gráfica es de un 25% en las mujeres menores a 50 años, de un 50% entre las mujeres con edades comprendidas entre los 50 y los 69 años y de un 25% para las mayores de 70 años.

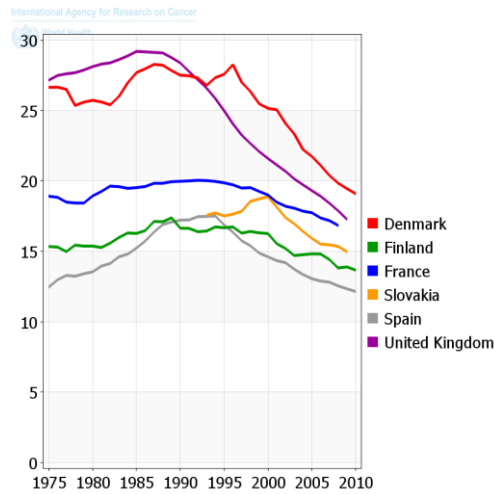


FIG. 1.5 Tendencia en la mortalidad del cáncer de mama por grupos de edad (tasa por 100.000). GLOBOCAN 2012

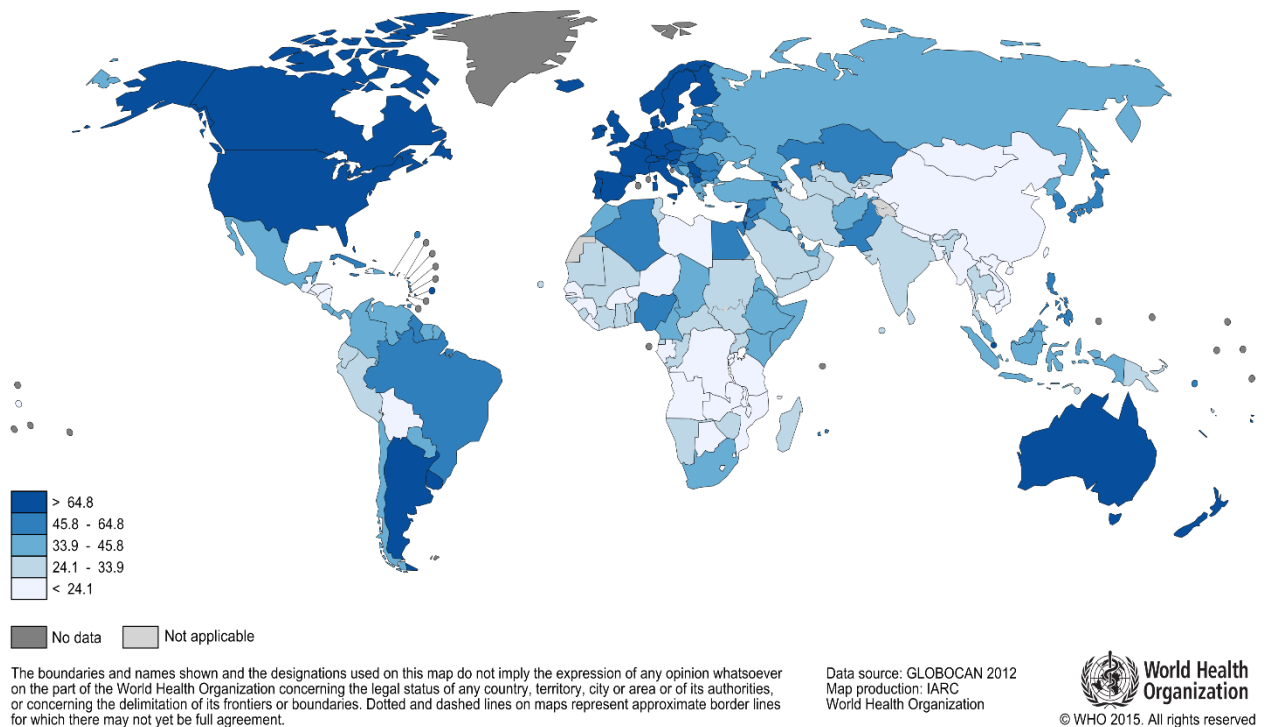


FIG. 1.6 Estimación de la incidencia de cáncer de mama. GLOBOCAN 2012

1.1.2. FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA

LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD OMS ha establecido la existencia de múltiples y diversos factores de riesgo del cáncer de mama, siendo los de mayor importancia los que tienen una base hormonal. También aclara que en la mayoría de las mujeres afectadas no es posible identificar los factores de riesgo específicos.

EL CDL (*Center of Disease Control*) y el **NCI** (*National Cancer Institute*) clasifican los factores de riesgo de cáncer de mama con base hormonal en dos grupos, reproductivos y no reproductivos:

FACTORES DE RIESGO REPRODUCTIVOS

EMBARAZO: Diversos estudios muestran que el riesgo que tiene una mujer para desarrollar cáncer de mama está relacionado con la exposición a sus hormonas ováricas (estrógenos endógenos y progesterona) ya que estimulan el crecimiento celular. Así, los factores reproductivos que aumentan la duración y/o el nivel de exposición a las hormonas ováricas, tales como aquéllos que aumentan el número de ciclos menstruales: menarquia temprana, menopausia tardía, embarazo después de cumplir 30 años, no haberse quedado embarazada, etc. se han asociado a un mayor riesgo de cáncer de mama. [1-3]

LACTANCIA: Al igual que el embarazo, la lactancia prolongada reduce el número de ciclos menstruales en la mujer. Además, también produce cambios directos en las células mamarias, provocando su diferenciación y maduración para producir leche. Esta diferenciación parece estar relacionada con una mayor resistencia de éstas células a mutar en células cancerígenas. [4-7]

CONTROL DE LA NATALIDAD: Otros estudios sugieren que el uso de píldoras contraceptivas basadas en el uso de

estrógenos y progesterona, en especial entre mujeres jóvenes, incrementan ligeramente el riesgo de cáncer de mama mientras que disminuyen el riesgo de cáncer de útero y ovario. [8-9]

TERAPIA HORMONAL DESPUÉS DE LA MENOPAUSIA/REEMPLAZO HORMONAL:

La terapia hormonal con estrógeno (a menudo combinada con progesterona) ha sido usada durante muchos años para ayudar a paliar los síntomas de la menopausia y la osteoporosis. Este tipo de tratamiento se realiza bien con estrógenos únicamente (en mujeres que han sufrido una histerectomía) o combinando estrógenos con progesterona (en mujeres que conservan el útero) ya que se ha visto que la terapia basada únicamente en el uso de estrógenos incrementa el riesgo de cáncer de útero. La terapia hormonal combinada después de la menopausia incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama con tumores de mayor tamaño y con mayor riesgo de dispersión a los nódulos linfáticos. [10] La mortalidad en las mujeres que toman este tratamiento también es mayor (2,6/1000) comparada con el grupo de control (1,3/1000). [11]

ENVEJECIMIENTO: Además de pertenecer al sexo femenino, el envejecimiento es el factor de mayor riesgo para el cáncer de mama [12]. El riesgo de padecer cáncer de mama se incrementa conforme la edad aumenta. Aproximadamente uno de ocho cánceres de mama (12,5%) se detecta en mujeres menores de 45 años de edad, mientras que aproximadamente dos de tres cánceres de tipo invasivos (66,66%), se encuentran en mujeres de 55 años o más. A partir de los 80 años esta tendencia se estabiliza. [22]

EL CONSUMO FRECUENTE DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS: Numerosos estudios epidemiológicos han evidenciado la relación entre el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer de mama en mujeres. [13-15]

SOBREPESO U OBESIDAD DESPUÉS DE LA MENOPAUSIA: Tras la menopausia, los estrógenos, en vez de producirse principalmente en los ovarios, se producen en el tejido adiposo. Un exceso de tejido adiposo después de la menopausia puede aumentar la probabilidad de padecer cáncer de mama al aumentar los niveles de estrógenos. Además, los niveles elevados de insulina asociados al sobrepeso también están asociados a algunos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama. No obstante, la relación entre el peso y el riesgo de cáncer de mama es compleja: Parece que el riesgo aumenta en mujeres que suben de peso en su vida adulta, pero es posible que no aumente en aquellas mujeres que han tenido exceso de peso desde la infancia. Un exceso de grasa en el área de la cintura también supone un mayor riesgo que la misma cantidad de grasa en las caderas y los muslos. [16-18]

ACTIVIDAD FÍSICA: La evidencia indica que la actividad física reduce el riesgo de cáncer de mama. Caminar a paso ligero de 1,25 a 2,5 horas por semana reduce al 18% el riesgo de padecer cáncer de mama. Con diez horas de caminata a la semana el riesgo se reduce aún más. [19-20]

INCIDENCIA SEGÚN EL SEXO: Ser mujer es el principal riesgo de padecer cáncer de mama. Aunque los hombres también pueden padecer esta enfermedad, es aproximadamente 100 veces más común en las mujeres que en los hombres, debido probablemente a que los hombres tienen menos hormonas femeninas, estrógenos y progesterona. Entre los factores de riesgo para el cáncer de mama masculino se encuentran la obesidad (con un exceso de tejido mamario y elevados niveles de estrógenos), el síndrome de Klinefelter y la ginecomastia. [21]

FACTORES DE RIESGO GENÉTICOS: Se estima que entre el 5 y el 10% de los casos de cáncer de mama son hereditarios. Las mujeres con alteraciones en alguno de los dos principales genes de susceptibilidad (BRCA1 y BRCA2) tienen una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida. En las células normales, estos genes ayudan a prevenir el cáncer al producir proteínas que evitan el crecimiento anormal de las células. Aunque en algunas familias con mutaciones *BRCA1* el riesgo de padecer cáncer de mama durante la vida es tan alto como 80%, en promedio este riesgo parece estar entre 55 y el 65%. Para las mutaciones *BRCA2*, el riesgo es menor, alrededor del 45%. Otros genes cuyas mutaciones están relacionadas con el cáncer de mama son el p53 (Síndrome de Lifraumeni), presente en el 17% de los

casos, PTEN (Síndrome de Cowden) y ATM (Síndrome ataxia-teleangiectasia). En el caso de los hombres, mutaciones en el gen RAD51B es un factor de riesgo para esta enfermedad. [23-24]

ANTECEDENTES FAMILIARES DE CÁNCER DE MAMA: El riesgo de cáncer de mama es casi el doble en las mujeres cuyos familiares directos o consanguíneos tienen esta enfermedad, pudiendo triplicarse si tienen dos familiares de primer grado con cáncer de mama. Se desconoce el riesgo exacto, aunque se sabe que las mujeres con antecedentes familiares de cáncer de seno en el padre o un hermano también tienen un riesgo aumentado de padecer esta enfermedad. En total, alrededor del 15 por ciento de las mujeres con cáncer de mama tiene un familiar con esta enfermedad. Esto significa que la mayoría (más de 85 por ciento) de las mujeres que padecen cáncer de mama *no* tienen antecedentes familiares de esta enfermedad. [25]

ANTECEDENTES PERSONALES DE CÁNCER DE MAMA. Una mujer con cáncer en una mama tiene un riesgo de tres a cuatro veces mayor de padecer un nuevo cáncer en la otra mama o en otra parte de la misma mama (segundo cáncer de mama primario). Esto es diferente a la recurrencia o regreso del primer cáncer, puesto que se trata de un nuevo cáncer primario sin relación alguna con el anterior. Este riesgo es de hasta el 2% en mujeres pre-menopáusicas y del 0,5% en mujeres postmenopáusicas. En caso del carcinoma *in situ*, el riesgo a 10 años de padecer cáncer contralateral es del 5%. [26]

RAZA Y ORIGEN ÉTNICO: En general, las mujeres de raza blanca tienen una probabilidad ligeramente mayor de padecer cáncer de mama que las mujeres de raza negra, aunque éstas últimas tienen una mayor probabilidad de morir de este cáncer. Sin embargo, en las mujeres menores de 45 años de edad, el cáncer de mama es más común en las mujeres de raza negra. Las mujeres asiáticas, hispanas e indias americanas tienen un menor riesgo de padecer y morir de cáncer de mama. [27-28]

TEJIDO MAMARIO DENSO: Las mamas están formadas por tejido adiposo, tejido fibroso y tejido glandular. Se dice que una mujer tiene el tejido mamario denso cuando tiene más tejido glandular y fibroso y menos tejido adiposo. Las mujeres con senos densos, además de presentar unas mamografías menos precisas, tienen un mayor riesgo de cáncer de mama que las mujeres con senos menos densos. La densidad de las mamas puede verse afectada por factores como la edad, la condición menopáusica, el uso de medicamentos (como terapia hormonal en la menopausia), embarazo y genética. [29]

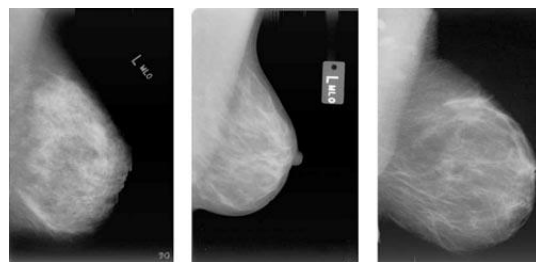


FIG. 1.7 Tipos de tejido mamario en mamografía. De izquierda a derecha: Denso, Normal y Graso

1. INTRODUCCIÓN

1.1.3. DIAGNÓSTICO

DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO

LA DETECCIÓN CLÍNICA Se basa en la inspección y palpación de la mama con el objeto de localizar cambios cutáneos (edema, eritema, piel de naranja, inflamación), cambios en la morfología de la mama y en su convexidad normal, cambios en el pezón (retracción, aplanamiento o inversión, desviación de su orientación normal, eritema, pérdida de elasticidad, persistencia de lesión eccematosa) o lesiones malignas (nódulos únicos, irregulares o estrellados, consistencia dura, fijos a piel o tejidos adyacentes, generalmente no dolorosos).

PARA EL DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO de las lesiones sospechosas tumorales de mama se llevan a cabo procedimientos de Punción Aspiración con Aguja Fina (PAAF) o Biopsias con Aguja Gruesa (BAG) con el fin de obtener cilindros de tejido tumoral sobre los que realizar las diferentes técnicas de inmunohistoquímica y evaluar así el estado de los receptores de

estradiol/progesterona o la valoración de proteínas tumor-supresoras.

EN ALGUNAS OCASIONES es necesario realizar una biopsia escisional.

EL GÁNGLIO CENTINELA es el primer ganglio que recibe el drenaje linfático de un tumor primario y cuya localización se suele realizar mediante la inyección de isótopos radiactivos y posterior gammagrafía de control.

LA BIOPSIA SELECTIVA DEL GÁNGLIO CENTINELA (BSGC) es una técnica poco invasiva que se realiza mediante una pequeña escisión a nivel axilar y permite el estudio de la adenopatía con el fin de estudiar si existe metástasis y, si es el caso, determinar el estadio en el que se encuentra el tumor con el fin de obtener un valor pronóstico de cáncer de mama.

DIAGNÓSTICO RADIOLÓGICO

MAMOGRAFÍAS

LA MAMOGRAFÍA es el método más importante en el diagnóstico precoz del cáncer de mama. Al permitir la visualización del 90% de los tumores, su uso en los procesos de cribado está ampliamente extendido y ha conseguido reducir la mortalidad por cáncer de mama entre un 15-20% en mujeres de 40 a 75 años. [30]

LA AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY (ACR, 2003), propone la *Breast Imaging and Reporting and Data Base System-BI-RADS*, categorización diagnóstica en la que los hallazgos mamográficos se clasifican en 7

grupos (0 al 6), con inclusión de las recomendaciones de manejo.

LAS MAMOGRAFÍAS ESTÁN INDICADAS en todas las mujeres sintomáticas, aun estando embarazadas, con sospecha clínica de cáncer de mama así como en las mujeres asintomáticas incluidas en los programas de cribado para cáncer de mama. También están indicadas en las mujeres con lesiones clasificadas como probablemente benignas y en aquéllas con riesgo aumentado de cáncer.

LA PERIODICIDAD DE LAS MAMOGRAFÍAS

se recomienda anual o bianual para las mujeres de entre 40-50 años y bianual para las que tengan una edad de entre 50-70 años. Las mamografías realizadas a partir de los 70 años de edad no muestran ningún beneficio probado.

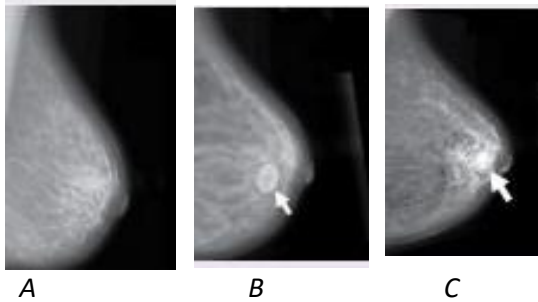


FIG. 1.8 Imagen comparativa de una mamografía normal (A), con evidencia de un quiste benigno (B) y con masa tumoral (C).

ECOGRAFÍAS MAMARIAS

LAS ECOGRAFÍAS MAMARIAS no se recomiendan como técnica de screening y su uso se limita a la identificación de lesiones quísticas, visualización de nódulos axilares, biopsia y marcaje previo al tratamiento y a la evaluación de mamas densas en mujeres jóvenes.

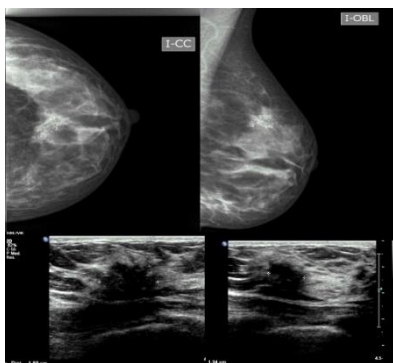


FIG. 1.9 Imagen comparativa una mamografía (Imagen superior) y una ecografía mamaria (imagen inferior).

LA RESONANCIA NUCLEAR MAGNÉTICA

LA RMN es una técnica de imagen con mayor sensibilidad aunque con menor especificidad que las mamografías. Su uso está indicado en los programas de cribado en aquellas mujeres con riesgo acumulativo de cáncer de mama mayor del 20%, como es el caso de las que presentan mutaciones en el gen BRCA.

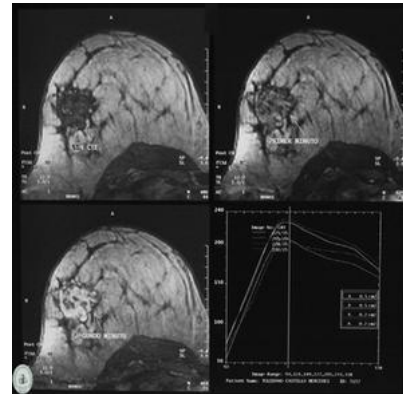


FIG. 1.10 Imagen de una RMN de mama con evidencia de masa tumoral.

LA GALACTOGRAFÍA

O DUCTOGRAFÍA es una técnica que utiliza una baja dosis de rayos X para examinar las mamas, y un medio de contraste para obtener imágenes o galactogramas del interior de los conductos lácteos de las mamas. Esta técnica está indicada en los casos que la mujer presenta un derrame claro o con sangre del pezón de la mama acompañada de una mamografía normal.



FIG. 1.11 Imagen de galactografía normal.

1. INTRODUCCIÓN

OTROS PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO

SE SUELEN REALIZAR una vez se diagnostica la presencia o sospecha de una masa tumoral.

ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE SANGRE con estudio de hemograma, función hepática y renal, nivel de calcio, glucemia para comprobar el correcto funcionamiento de otros órganos, así como marcadores tumorales CEA, CA

RADIOGRAFÍA DE TÓRAX, para comprobar si existe diseminación del tumor por la mama o hacia los pulmones.

GAMMAGRAFÍA ÓSEA para investigar la +diseminación del tumor hacia los huesos.

TOMOGRFÍA COMPUTERIZADA O TAC cuando existe sintomatología respiratoria y en los estadios más avanzados, con el fin de detectar si existe diseminación del tumor hacia otros órganos como pulmón, hígado, huesos, ganglios linfáticos, etc.

ECOGRAFÍA HEPÁTICA O TAC ABDOMINAL cuando existe alteración de la función hepática, sintomatología abdominal y en los casos más avanzados.

LA TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES O PET/TAC no es una técnica indicada para el diagnóstico del cáncer de mama aunque puede utilizarse para comprobar si el tumor se ha diseminado hacia otros órganos.

1.1.4. CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA

EL CÁNCER es un conjunto de enfermedades que se caracteriza por una proliferación anormal de células con capacidad para diseminarse e invadir diversos órganos y tejidos, siendo el cáncer de mama aquél que se desarrolla en el tejido mamario.

DESDE EL TUMOR PRIMARIO las células cancerígenas se pueden desprender y diseminar a través de los tejidos, sistema linfático o la sangre, originando un tumor de mama metastásico.

LA MAYORÍA DE LOS CÁNCERES DE MAMA son carcinomas de las células epiteliales procedentes de los ductos mamarios y de los lobulillos, siendo menos frecuentes los carcinomas procedentes del estroma que rodea a las glándulas mamarias, como el Tumor Filodes Benigno, el Cistosarcoma Filodes y los Angiosarcomas.

CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES MAMARIOS SEGÚN LA AFECTACIÓN HISTOPATOLÓGICA OMS

1. CARCINOMA DUCTAL IN SITU	Se trata de un tumor no invasivo que comienza en el revestimiento de los conductos lactíferos. En este caso, las células malignas quedan confinadas en la membrana basal del ducto sin atravesarla. En la mayoría de los casos, estas lesiones no se convertirán en cáncer invasivo.
2. CARCINOMA LOBULILLAR IN SITU	En este tipo de tumor, las células acinares, que son las que se encuentran en la unidad terminal lobulillar, presentan una proliferación homogénea, caracterizada por un núcleo redondeado y citoplasma escaso con membrana basal íntegra. Suele presentarse con mayor frecuencia en mujeres de entre 40 y 50 años y suele ser bilateral.
3. CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE	Se trata del tumor invasivo más frecuente, suponiendo entre el 70-80% de los casos. La masa tumoral presenta un patrón de crecimiento no específico, con células malignas que infiltran el estroma en forma de cordones celulares. Hasta en un 80% de los casos, puede encontrarse un componente de carcinoma in situ, habitualmente de alto grado.
4. CARCINOMA LOBULILLAR INFILTRANTE	Representa entre el 5-15% de los carcinomas invasivos, caracterizándose por un crecimiento circunferencial que suele ser multicéntrico y bilateral. Entre sus variantes, se incluyen los de tipo alveolar y tipo sólido, así como los de rasgo pleomórfico. Dentro de los subgrupos mixtos, el más importante es el carcinoma túbulo-lobulillar.
5. CARCINOMA TUBULAR	Los cribados mamográficos han permitido un aumento de su diagnóstico de un 20% frente a un 2%. Este tumor se caracteriza por presentar un patrón de crecimiento en estructuras tubulares bien diferenciadas, soliendo asociarse a un buen pronóstico.
6. CARCINOMA CRIBIFORME	Su incidencia es baja, en torno al 0,8-3,5%. Se caracteriza porque aunque su grado de diferenciación histológica es bajo, en todos los casos se expresan receptores hormonales.
7. CARCINOMA MEDULAR	Representa entre el 1-10% de los tumores invasivos. Se considera como de buen pronóstico, a pesar de ser un tumor de alto grado de diferenciación histológica.
8. CARCINOMA MUCINOSO	El carcinoma mucinoso o coloide supone el 1-2% de los casos y se suele dar en mujeres de mayor edad.
9. CARCINOMA METAPLÁSICO	Suele ser un tumor agresivo, con alto índice de recaída y mortalidad, que se suele asociar con carcinomas ductales.
10. CARCINOMA PAPILAR	Suponen un 1% de los casos, y suponen un elevado riesgo de afectación linfática y axilar.
11. CARCINOMA ADENOIDE QUÍSTICO	Es un tumor idéntico al que se desarrolla en las glándulas salivares asociado a un buen pronóstico.
12. CARCINOMA INFLAMATORIO	Es un subtipo especial de tumor dentro de los tumores invasivos, pero con un comportamiento clínico diferente, más agresivo y caracterizado por una frecuente afectación precoz de los ganglios linfáticos, edema, eritema dérmico y piel de naranja.
13. ENFERMEDAD DE PAGET	Son cambios en el pezón en forma de lesión eczematososa persistente. Suele asociarse a un carcinoma introductor difuso debajo de la areola y un posible componente invasivo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.5. ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA SEGÚN EL INSTITUTO NACIONAL DE CÁNCER NCI

ESTADÍO	TIPO	CARACTERÍSTICAS	Fuente: Instituto Nacional Cáncer NCI
ESTADÍO 0	ESTADIO	Células tumorales localizadas y no invasivas: Carcinoma ductal <i>in situ</i> (CDIS). Carcinoma lobulillar <i>in situ</i> (CLIS). Enfermedad de Paget del Pezón.	
ESTADÍO I	ESTADÍO IA ESTADIO IB	Tumor de menos de 2cm, que no se ha diseminado fuera de la mama. Aparecen pequeños racimos de células de cáncer de mama, con un tamaño comprendido entre 0,2 y 2mm, en los ganglios linfáticos. En este caso, no se detecta un tumor en la mama o éste mide menos de 2cm.	
ESTADIO II	ESTADIO IIA ESTADIO IIB:	Se produce cuando no se encuentra el tumor en la mama o cuando éste mide menos de 2cm. Además, el cáncer, que mide más de 2mm, se detecta en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares o en los ganglios linfáticos cerca del esternón. Este estadio también se corresponde cuando el tumor mide entre 2 y 5cm y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos. Se corresponde cuando el tumor mide entre 2 y 5cm y se detectan pequeños racimos de células de cáncer de mama en los ganglios linfáticos con un tamaño entre 0,2 y 2mm. Este estadio también se corresponde cuando el tumor mide entre 2 y 5cm y además se ha dispersado a entre 1 y 3 ganglios linfáticos axilares o a los ganglios linfáticos cerca del esternón. El estadio IIB también se diagnostica cuando el tumor mide más de 5cm pero no se ha dispersado a los ganglios.	
ESTADIO III	ESTADIO IIIA ESTADIO IIIB ESTADIO IIIC	Se diagnostica cuando el tumor no se encuentra en la mama y se detecta en entre 4 a 9 ganglios linfáticos o en los ganglios linfáticos cerca del esternón. También cuando el tumor mide más de 5cm y se ha dispersado formando pequeños racimos de entre 0,2 y 2mm en los ganglios linfáticos. Este estadio también se corresponde cuando el tumor mide más de 5cm y se ha diseminado a entre 1 y 3 ganglios linfáticos auxiliares o a los ganglios linfáticos cerca del esternón. El tumor puede tener cualquier tamaño y se ha diseminado a la pared torácica o a la piel de la mama, produciendo inflamación o una úlcera. Este estadio también se corresponde cuando las células tumorales se han diseminado a un máximo de 9 ganglios linfáticos auxiliares o a los ganglios cercanos al esternón. En este estadio el tumor, que puede detectarse en la mama o no, ha invadido la piel de la mama, causando su inflamación o ulceración. También es posible que invada la caja torácica, a un mínimo de 10 ganglios linfáticos, a los ganglios linfáticos por encima o debajo de la clavícula o a los ganglios linfáticos auxiliares y cercanos al esternón.	
ESTADIO IV	ESTADIO IV	En el estadio IV, el cáncer se ha diseminado a otros órganos del cuerpo (principalmente huesos, pulmones, hígado y cerebro).	

1.1.6. ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA SEGÚN EL SISTEMA TNM

LA CLASIFICACIÓN TNM es la más utilizada en la actualidad y aún la estadificación de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) y la del Comité Americano del Cáncer (AJCC). Se espera que la edición número 9 de éste sistema vea la luz en 2016. [31]

EL SISTEMA TNM está basado en la extensión del tumor (T), el grado de diseminación a los ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis (M) a partir de los datos clínicos (cTNM) y patológicos (pTNM).

TUMOR PRIMARIO (T)	
TX	El Tumor Primario no se puede evaluar
T0	No evidencia de Tumor Primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
Tis (DCIS)	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
Tis (LCIS)	Carcinoma lobulillar <i>in situ</i>
Tis (Paget)	Enfermedad de Paget del pezón sin tumor

LA ENFERMEDAD DE PAGET ASOCIADA A TUMOR SE CLASIFICA DE ACUERDO CON EL TAMAÑO DEL TUMOR	
T1	Tumor <2cm en su mayor dimensión
T1mic	Micro invasión <0,1cm en su mayor dimensión
T1a	Tumor >0,1cm pero no >0,5cm en su mayor dimensión
T1b	Tumor > 0.5 cm. pero no > 1 cm. en su mayor dimensión
T1c	Tumor > 1 cm. pero no > 2 cm. en su mayor dimensión
T2	Tumor > 2 cm. pero no > 5 cm. en su mayor dimensión
T3	Tumor > 5 cm. en su mayor dimensión
T4*	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a pared torácica y/o piel
T4a	Extensión a pared torácica sin incluir el músculo pectoral mayor
T4b	Edema (incluyendo piel de naranja) o ulceración de la piel de la mama, o nódulos cutáneos satélites confinados a la misma mama
T4c	Ambos T4a y T4b
T4d	Carcinoma inflamatorio**

GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N)***	
NX	Cuando no se pueden evaluar (p.e. Cirugía previa)
N0	No metástasis en los Ganglios Linfáticos Regionales
N1	Metástasis en Ganglios homolaterales móviles
N2	Metástasis en ganglios axilares homolaterales fijos o agrupados, o en ganglios de la cadena mamaria interna clínicamente aparentes* en ausencia de afectación clínica axilar
N2a	Metástasis en ganglios axilares homolaterales fijos entre sí o a otras estructuras
N2b	Metástasis sólo en ganglios homolaterales de la cadena mamaria interna clínicamente aparentes* y en ausencia de afectación clínica evidente axilar
N3	Metástasis en ganglios infra claviculares homolaterales, o en cadena mamaria interna homolateral clínicamente aparentes en presencia de afectación axilar clínicamente evidente; o metástasis en ganglios supraclaviculares homolaterales con o sin afectación axilar o de la mamaria interna
N3a	Metástasis en ganglios infra claviculares y axilares homolaterales
N3b	Metástasis en cadena mamaria interna y axilar homolateral
N3c	Metástasis en ganglios supraclaviculares homolaterales

1. INTRODUCCIÓN

GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (pN)****	
Pnx	Cuando no son evaluables (no extirpados o por cirugía previa)
pN0	No afectación histológica, sin estudios adicionales para células tumorales aisladas**
pN0(i-)	No afectación ganglionar histológica, H&E y IHC negativas
pN0(i+)	Presencia de células tumorales aisladas por H&E o IHC , ninguna agrupación > 0.2 mm
pN0(mol-)	No afectación ganglionar histológica, estudio molecular negativo (RT-PCR)
pN0(mol+)	No afectación ganglionar histológica, estudio molecular positivo(RT-PCR)
pN1mi	Micro metástasis (> 0.2 mm, ninguna > 2.0 mm)
pN1	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares linfáticos y/o en la mamaria interna con afectación microscópica detectada por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparente.
pN1a	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares linfáticos.
pN1b	Metástasis en la mamaria interna con afectación microscópica detectada por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparente
pN1c	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares linfáticos y en la mamaria interna con afectación microscópica detectada por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparente.
pN2	Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares linfáticos, o afectación clínicamente aparente de la mamaria interna en ausencia de afectación axilar.
pN2a	Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares linfáticos (al menos un depósito tumoral > 2.0 mm)
pN2b	Metástasis clínicamente aparente en ganglios de la mamaria interna en ausencia de afectación axilar.
pN3	Metástasis en > 10 ganglios axilares, o en ganglios infra claviculares, o en ganglios de la mamaria interna ipsilaterales clínicamente aparentes en presencia de 1 o más ganglios axilares positivos; o en más de 3 ganglios axilares con metástasis microscópicas clínicamente negativas de la mamaria interna; o en ganglios supraclaviculares ipsilaterales
pN3a	Metástasis en > 10 ganglios axilares (al menos un depósito tumoral > 2,0 mm), o metástasis en ganglios linfáticos infra claviculares
pN3b	Metástasis en ganglios de la mamaria interna ipsilaterales clínicamente aparentes en presencia de 1 o más ganglios axilares positivos; o en más de 3 ganglios axilares con metástasis microscópicas de la mamaria interna detectadas por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparentes.
pN3c	Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales
ypN postratamiento	La ypN postratamiento debe ser evaluada como para el N clínico (pretratamiento). El sufijo SN se ha de usar solo si se realiza la técnica de ganglio centinela postratamiento, si no le asume que es por linfadenectomía axilar. Si no se hace estudio del ganglio centinela post se debe poner Nx. Las categorías post son iguales que en el caso sin terapia neoadyuvante

METÁSTASIS A DISTANCIA (M)	
MX	No se pueden evaluar
M0	No metástasis a distancia
cM0(i+)	No evidencia clínica ni radiológica de metástasis pero presencia de depósitos de células tumorales detectadas en sangre circulante, médula ósea u otro tejido ganglionar no regional que es < 0,2mm en un paciente sin signos ni síntomas de metástasis.
M1	Metástasis a distancia presentes

* La invasión de la dermis sólo no clasifica al tumor como T4.

** La definición de Carcinoma Inflamatorio es fundamentalmente clínica. Implica la presencia de eritema y edema (piel de naranja) difuso de la mama asociado o no a una masa palpable subyacente. Estos cambios deben afectar a la mayor parte de la piel de la mama (la presencia de estos cambios asociados de forma limitada a un tumor localmente avanzado no implica el diagnóstico de carcinoma inflamatorio). La presencia de linfáticos dérmicos infiltrados sin los cambios clínicos descritos no implica por si solo el diagnóstico de carcinoma inflamatorio.

*** Detectado clínicamente se define como detectado por estudios de imagen (excluyendo la linfogammagrafía) o por exploración física con características de alta sospecha o posible macro metástasis basado en PAAF. La confirmación de una metástasis clínica por PAAF sin biopsia escisión se designa con el sufijo "f" (p.e. cN3a(f)). La biopsia escisión de un ganglio linfático en ausencia de pT se clasifica como N clinic. pN se usa solo para la escisión/biopsia de un ganglio centinela solo en conjunción con una valoración patológica de la T.

**** La clasificación pN está basada en la disección axilar con o sin estudio del ganglio centinela. Cuando está basada en el Ganglio centinela solo se debe poner en el estadiaje (sn).

1.1.7. FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS DEL CANCER DE MAMA

EL CÁNCER DE MAMA SE TRATA, por lo general, con la combinación de cirugía, radioterapia, quimioterapia y hormonoterapia.

LOS FACTORES PRONÓSTICOS son aquellas medidas disponibles en el momento de la cirugía o del diagnóstico que se correlaciona con la evolución de la enfermedad en ausencia de tratamiento adyuvante sistémico, por lo que son una herramienta básica para seleccionar el tratamiento más adecuado a cada paciente, en función de diversos factores.

LOS FACTORES PREDICTIVOS son las medidas que predicen la respuesta a un tratamiento específico, por lo que permiten identificar mejor el tratamiento para una paciente concreta. Existen factores que pueden ser al mismo tiempo factores pronóstico y predictivos. [35]

LOS PRINCIPALES FACTORES PRONÓSTICO en el cáncer de mama se obtienen a partir de las biopsias, aunque algunos también dependen de factores propios de la paciente, como pueden ser la edad y el estado hormonal. [32][33][34]

PRINCIPALES FACTORES PRONÓSTICO

TAMAÑO TUMORAL	El riesgo de recaída es más alto cuanto más grande es el tumor.
AFECTACIÓN DE GANGLIOS AXILARES	El número de ganglios afectados es el factor pronóstico más importante de forma que cuanto mayor es el número de ganglios afectados, mayor es el riesgo de padecer una recaída.
GRADO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR	Cuanto menos diferenciado es el tumor, peor es el pronóstico, siendo el de grado 3 el que peor pronóstico tiene.
EXPRESIÓN DE RECEPTORES HORMONALES	La expresión de receptores hormonales, Receptor de Estrógeno (RE) y Receptor de Progesterona (RP) fundamentalmente, son un factor de buen pronóstico y a la vez, son un factor que predice la respuesta al tratamiento hormonal.

1. INTRODUCCIÓN

EXPRESIÓN O AMPLIFICACIÓN DE ONCOGENES	Entre un 15-30% de los casos presenta una expresión amplificada del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2/neu), responsable de la codificación de un receptor transmembrana con actividad tirosina-quinasa y que estimula la proliferación celular. Este factor se asocia con una peor supervivencia libre de la enfermedad y una peor supervivencia específica a los 10 años. La expresión amplificada del gen HER2+ es un factor de mal pronóstico, pero predice la respuesta a tratamientos dirigidos contra HER2 como Trastuzumab, ya que la respuesta de las pacientes HER2- tratadas con éste quimioterápico es peor. La utilización de tratamiento anti-HER2 ha revertido el mal pronóstico de éstos tumores.
FRACCIÓN DE PROLIFERACIÓN ALTA Ki67	Ki67 es una proteína codificada por el gen Ki67 que se asocia con la regulación del ciclo celular y que muestra buena correlación con la tasa de crecimiento, así cuanto mayor es el índice Ki67, mayor es la velocidad de división de las células tumorales y mayor es el riesgo de metástasis. La determinación de éste índice se corresponde con el porcentaje de células que están activas en el ciclo de una división celular a la siguiente y se suele determinar mediante técnicas de inmunohistoquímica. La determinación del índice de proliferación celular Ki67, usando el anticuerpo monoclonal MIB-1 es para algunos autores más segura que el conteo del número de mitosis por campo. Ki67 \geq 20 se asocia a un mal pronóstico.
TIPO HISTOLÓGICO	Algunos tipos histológicos del cáncer de mama tienen importancia pronóstica. El carcinoma ductal in situ tiene peor pronóstico que el lobulillar in situ. Los tipos mucinosos, cribiformes y lobulares tienen mejor pronóstico que los ductales. Los tumores medulares, a pesar de rasgos patológicos desfavorables, son atribuibles a segundos tumores de peor pronóstico.
SUBTIPO DE CÁNCER DE MAMA	El subtipo luminal A es el de mejor pronóstico y el triple negativo, el de peor pronóstico.
MULTICENTRICIDAD	El pronóstico viene determinado por el diámetro del conjunto de los nódulos y no por el del nódulo de mayor tamaño.
EDAD	La presentación antes de los 30 años de edad es un factor de mal pronóstico.

1.1.8. FACTORES PREDICTIVOS DEL CÁNCER DE MAMA

PRUEBA DEL ESTADO DE RECEPTORES HORMONALES (ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA)

RECEPTORES DE ESTRÓGENOS (RE)

LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS (RE) receptores pertenecen a la súper-familia de los receptores nucleares, ya que actúan y se encuentran preferentemente en el núcleo celular. Se han descrito tres tipos de RE: RE- α , RE- β y RE-m (membrana).

RE- α y RE- β , tras su activación, mediada por la unión a la hormona 17 β -estradiol, forman un dímero en el núcleo y activan de forma directa o indirecta la transcripción de genes diversos genes fuertemente relacionados con la carcinogénesis.

ER-m no actúa directamente sobre el ADN, sino que se activa como una respuesta rápida de la célula al estradiol activando a su vez diversas vías de señalización como las mediadas por las proteínas quinasas A (PKA), que tienen un papel importante en la regulación del ciclo celular.

LA DETERMINACIÓN DE LOS RE tiene gran utilidad como marcador tumoral ya que, además de estar presentes en aproximadamente 70-80% de los cánceres de mama, se ha descrito que los tumores mamarios positivos al RE (RE+), se caracterizan por ser bien diferenciados, por tener baja proliferación, tiempo prolongado de supervivencia libre de enfermedad y una buena respuesta a terapia dirigida a RE. Por otro lado, los tumores negativos al RE (RE-) son poco diferenciados, aneuploides, altamente proliferativos y presentan una baja respuesta a los tratamientos anti-RE.

LOS RECEPTORES RE- α y RE- β son los más estudiados en cáncer de mama ya que activan al ER-m y además, a través de ellos, el estrógeno de las mujeres puede promover el desarrollo de un fenotipo

maligno en las células, originando un descontrol del ciclo celular y apoptosis.

DEBIDO A LA IMPORTANCIA de los estrógenos y sus receptores en la carcinogénesis mamaria, el desarrollo de una terapia dirigida contra los RE ha permitido ofrecer un mejor pronóstico a los pacientes con cáncer de mama RE+ revelado por inmunohistoquímica.

EL TRATAMIENTO MÁS COMÚN en éstos pacientes es el uso de tamoxifeno, un inhibidor altamente selectivo de los receptores de estrógenos que permite bloquear el efecto de los estrógenos en las células neoplásicas de mama, sin alterar los efectos beneficiosos que tiene sobre el hueso, sistema cardiovascular y nervioso.

LAS ESTADÍSTICAS MUESTRAN que el 70% de las pacientes RE+ responde de forma satisfactoria al tratamiento con tamoxifeno, dando como resultado una mejoría del paciente, una disminución del 50% en la recidiva y de un 28% en la mortalidad.

UN GRAN PROBLEMA es que también se ha observado el desarrollo de resistencia a tamoxifeno por parte de las células neoplásicas de mama, mediada, al parecer, por coactivadores de RE así como por la acción intracelular de otras hormonas como la leptina. Además, el tamoxifeno eleva los niveles de leptina en mujeres posmenopáusicas.

RECEPTORES DE PROGESTERONA (RP)

LOS RECEPTORES DE PROGESTERONA (RP) son sintetizados en mayor cantidad en los tejidos sensibles a estrógenos, como es el caso del tejido mamario, y su expresión se asocia a la acción biológica de los

1. INTRODUCCIÓN

estrógenos, lo que explica una mayor *expresión del RP en mujeres premenopáusicas.

LA EXPRESIÓN DE LOS RP está regulada por los RE y se expresa en la gran mayoría de los carcinomas RE+. En función de la relación del estado de estos dos receptores hormonales, los factores predictivos son los siguientes:

- **RE+/RP+:** Este perfil se da en el 65% de los casos y normalmente se corresponde con carcinomas bien o moderadamente diferenciados.
- **RE+/RP-:** Se presenta en el 15% de los casos, y se corresponde con carcinomas moderados o pobremente diferenciados.
- **RE-/RP+:** Se presenta el 5% de los casos, sobre todo en mujeres jóvenes en estadios avanzados. Su base biológica no está bien explicada.
- **RE-/RP-:** Afecta al 15% de los casos, correspondiéndose con carcinomas pobremente diferenciados. Es más frecuente en mujeres jóvenes, afroamericanas y latinas.

PRUEBA DEL ESTADO DEL RECEPTOR HER2/neu

EXISTEN 4 MIEMBROS DE RECEPTORES del factor de crecimiento epidérmico: EGFR-HER1, HER2, HER3 y HER4, que participan en los procesos de la célula que regulan la diferenciación, proliferación y supervivencia de la célula.

HER2 ES LA QUE MAYOR IMPORTANCIA TIENE en cáncer de mama, codificada por el gen *HER2/neu* ya que se ha visto que se sobreexpresa en aproximadamente el 25% de las pacientes con éste tipo de cáncer, facilitando la tumorigénesis y metástasis mediante la activación de diversas vías de señalización intracelular.

ACTUALMENTE EXISTE UNA TERAPIA específica para las pacientes con cáncer de mama HER2 positivo (HER2+): El

Trastuzumab (Herceptin), que inhibe la formación de la forma activada de HER2 en la membrana celular, y el Lapatinib (Tyker), que actúa a nivel del dominio tirosina quinasa del receptor HER2. Ambos tratamientos han venido a mejorar el pronóstico y la recuperación de las pacientes con cáncer de mama HER+.

LOS RP SE INHIBEN POR HER2. De hecho, aproximadamente el 25% de los tumores RP- muestran una expresión amplificada de HER2.

EN BASE A LOS RESULTADOS de las pruebas del estado de los receptores hormonales (RE y RP) y del receptor HER2/neu, los tumores mamarios se clasifican en tres grupos: RE/RP+, HER+ y TRIPLE NEGATIVO.

CLASIFICACIÓN TUMORAL EN FUNCIÓN DEL ESTADO DE LOS RECEPTORES

- RECEPTOR HORMONAL POSITIVO: RE+/RP+:** Responden bien a la hormonoterapia o a los tratamientos anti-estrógenos, que reducen la concentración de estrógeno en el cuerpo o impiden que el estrógeno se una a las células del cáncer de mama.
- HER2 POSITIVO:** Responden bien a las terapias dirigidas al HER2, basadas en el uso de medicamentos que se unen a los receptores HER2 de las células tumorales, impidiendo que reciban las señales de crecimiento y, por tanto, desacelerando o interrumpiendo el crecimiento de las células. Así mismo, estos medicamentos pueden contribuir a la destrucción de las células tumorales marcadas por parte del sistema inmunitario. Hay que tener en cuenta que, con el tiempo, un tumor HER2+ puede volverse HER2-.
- TRIPLE NEGATIVO (RE, RP y HER2/neu NEGATIVOS):** Alrededor del 10-20% de los casos de cáncer de mama arrojan resultados negativos para ambos receptores de hormonas y HER2 en el laboratorio. Este tipo de tumor es poco probable que responda a las hormonoterapias ni a los medicamentos que atacan a HER2. Este tipo de tumor debe tratarse con quimioterapia, radioterapia así como con otros nuevos tratamientos como los inhibidores de proteínas quinasas. En la actualidad, las investigaciones se están centrando en los tumores triple negativo con el fin de descubrir nuevas y mejores formas de tratamiento. Además, los tumores triple negativos suelen ser más agresivos que otros tipos de cáncer de mama y tienen mayor probabilidad de recurrencia y propagación fuera de la mama.

1.2. LAS PROTEÍNAS QUINASAS Y SU PAPEL EN LAS CÉLULAS TUMORALES

EN LAS CÉLULAS NORMALES, determinadas señales externas pueden ser transmitidas y amplificadas a través del citoplasma hacia el núcleo de la célula, donde se regulan procesos vitales tales como el crecimiento celular, la diferenciación, supervivencia y la muerte programada o apoptosis.

EN LAS CÉLULAS TUMORALES, muchos de los componentes de las vías de transducción de las señales se encuentran desregulados, lo que descontrola el crecimiento celular y contribuye a la aparición de una neoplasia.

DISTINTOS TIPOS DE NEOPLASIA presentan alteraciones similares en estas vías de transducción de la señal, lo que convierte su estudio en un blanco muy prometedor para la intervención terapéutica.

ENTRE LOS TRANSDUCTORES DE SEÑAL CONOCIDOS, el grupo de las proteínas quinasa (PK's) es de los más estudiados y para el que durante los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de fármacos específicos.

ESTAS ENZIMAS, a partir de una molécula de ATP fosforilan de forma reversible a otras proteínas, llamadas diana en residuos de serina, treonina y/o tirosina, para lo cual, disponen en su estructura de tres sitios específicos; un sitio de unión al ATP, otro de catálisis de la unión del grupo fosfato y un sitio de unión del sustrato.

ESTA FOSFORILACIÓN, reversible por acción de las proteínas fosfatasas, conlleva la adquisición de dos nuevas cargas negativas que alteran la conformación espacial de la proteína diana, lo que implica un cambio en su actividad (generalmente, una activación-desactivación).

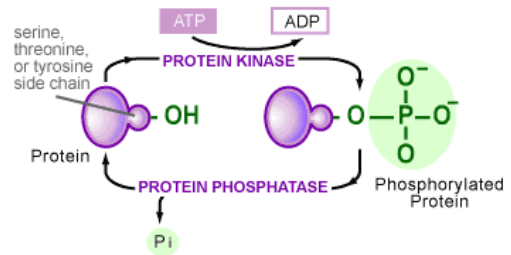


FIG. 1.12 Proceso de fosforilación. *The Science Creative Quaterly*. 2003

LA IMPORTANCIA DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS a nivel metabólico se pone en evidencia si tenemos en cuenta que se estima que hasta el 30% del proteoma celular es susceptible de variar su actividad por acción de una proteína quinasa y que aproximadamente el 2% del genoma humano codifica proteínas quinasa.

HASTA EL MOMENTO, y gracias al proyecto genoma humano, se han identificado al menos 520 proteína quinasa, en cuyo conjunto constituyen el denominado *kinoma humano*.

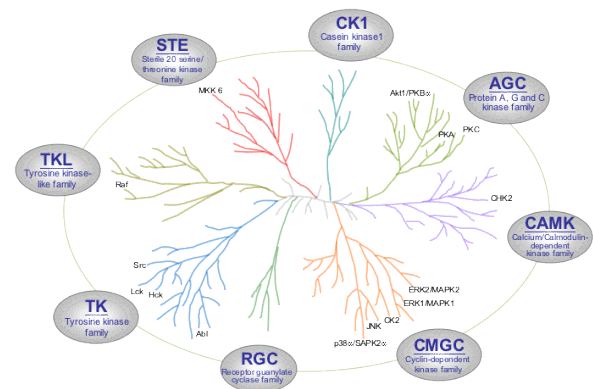
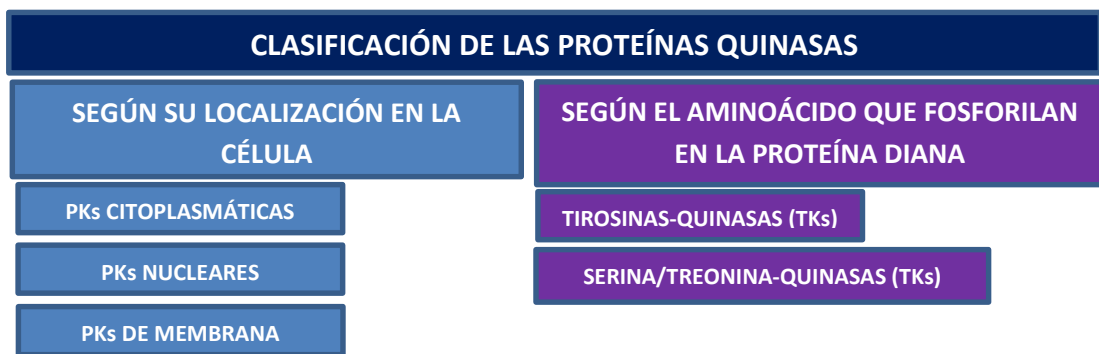


FIG. 1.13 El kinoma humano. *Science* 298:1912.

1.2.1. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS



LAS TIROSINAS-QUINASAS Constituyen el grupo más numeroso de la familia de las proteínas quinasas y se suelen clasificar a su vez en dos grupos:

TIROSINAS-QUINASAS QUE FUNCIONAN COMO RECEPTORES (RTKs): Son proteínas transmembrana con un dominio extracelular que puede interactuar con diferentes ligandos o señales, y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa. Tras la unión con el ligando, el dominio intracelular se autofosforila en residuos de tirosina, formando sitios de unión para proteínas con dominio SH2.

TIROSINAS-QUINASAS NO-RECEPTORES (no-RTKs): Son proteínas intracelulares que funcionan por debajo de las RTK y forman parte activa de las rutas de transducción de la señal, resultando ésta en la amplificación y transmisión de la señal en el interior de la célula.

PRINCIPALES PROTEÍNAS QUINASAS

LA PROTEÍNA QUINASA A (PKA, del inglés *proteína kinase A*) es el miembro de la superfamilia de las serin-treonina-quinatas que mejor se conoce. Su actividad, dependiente del cAMP, se basa en la transferencia del fosfato terminal del ATP a residuos de serina o treonina de determinadas proteínas diana. La PKA interviene en diversas funciones celulares, entre las que se encuentran la regulación del metabolismo del glucógeno, glucosa y

lípidos así como en la regulación del ciclo celular. Tras su activación, la PKA puede viajar al núcleo y fosforilar al CREB (del inglés *cAMP Response Element-Binding*). El CREB es un factor de transcripción que, tras unirse al CRE (*cAMP Response Element*) regula la transcripción de genes relacionados con el metabolismo y ciclo celular. Desde que se la relacionó con el inicio y progresión de muchos tumores, son consideradas como un buen objetivo molecular en la terapia contra el cáncer.

LAS PROTEÍNA QUINASAS B (PKB) constituyen una familia de serina/treonina quinasas que en humanos están codificadas por los genes AKT1, AKT2 y AKT3. Estas proteínas juegan un importante papel en la inducción de la ruta de síntesis de proteínas, supervivencia celular e inhibición de procesos apoptóticos (AKT1) así como en la señalización celular de insulina y transporte de glucosa en mamíferos (AKT2).

LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC) son un grupo de proteínas que generalmente se activan a través de la ruta de transcripción de la fosfolipasa C, a partir del diacilglicerol (DAG) y/o Ca^{+2} . Este grupo de proteínas, además de controlar diversas proteínas diana que regulan el crecimiento y la diferenciación celular, son las responsables

1. INTRODUCCIÓN

de transmitir las señales celulares que promueven la lipólisis.

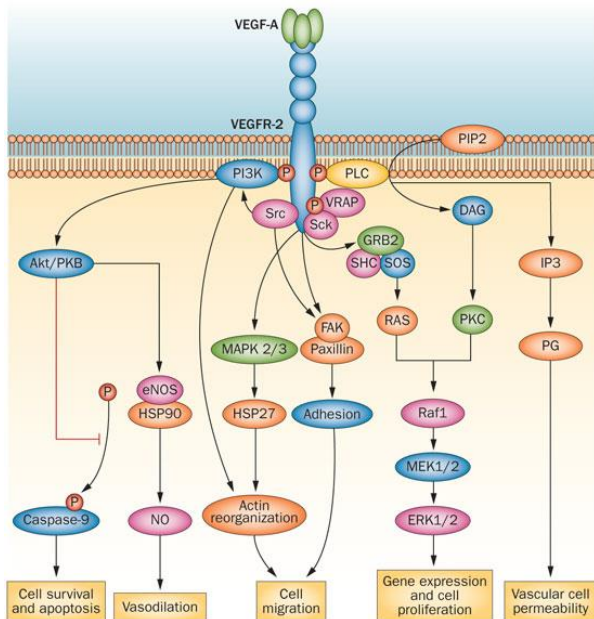


FIG. 1.14 Cascadas de proteínas quinasas. Nature Publishing Group – Nature Reviews

LA PROTEÍNA QUINASA M (PKM) cataliza la transferencia de un grupo fosforilo desde el fosfoenol-piruvato (PEP) al ADP, generando ATP. Esta proteína también estimula la activación transcripcional mediada por POU5F-1 y el control de la glicólisis, jugando un papel de gran importancia en la proliferación y supervivencia de las células tumorales.

LA PROTEÍNA QUINASA R (PKR) está codificada en humanos por el gen EIF2AK2 y está relacionada con la protección de la célula frente a infecciones virales. La unión con moléculas dsRNA (*double-stranded RNA*) con origen viral inducen su activación mediante autofosforilación. Una vez activa, fosforila al factor de iniciación de la traslación eucariótica, lo que conlleva la inhibición de los procesos de traducción del PLK-Lsis de proteínas virales. Mediante otros complejos mecanismos celulares, la PKR activa también es capaz de inducir la apoptosis celular y, por tanto, prevenir la dispersión viral.

1.2.2. LAS MAPK

LAS MAPK (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases* o Proteínas quinasas Activadas por Mitógenos) constituyen una familia de serina/treonina quinasas que pueden activarse por factores de crecimiento y estrés y controlan procesos implicados en el correcto desarrollo del organismo y su homeostasis, lo que las relaciona directamente con el cáncer y su terapia.

LAS MAPK regulan procesos como la mitosis, cambios en los patrones de expresión génica, movimiento, metabolismo o muerte celular programada, permitiéndole a las células sobrevivir, proliferar, inducir apoptosis, etc. [51]

LA FIDELIDAD de la transmisión de la señal viene determinada por la activación secuencial de distintas proteínas MAPK que, junto con la participación de proteínas adaptadoras específicas, organizan a las proteínas de la ruta permitiendo una activación coordinada en forma de cascada.

LA DURACIÓN y la intensidad con la que se activa la ruta dependen de la compartimentalización subcelular de las moléculas implicadas en la ruta así como de la activación de fosfatasa que silencian la ruta cuando es necesario.

LAS CASCADAS DE MAPK, que incluyen a tres subfamilias de proteínas MAPK (ERK,

SAPK/JNK y P38 MAPK), son un componente de gran importancia en la transducción de señales de células eucariotas, siendo responsables de la dar respuesta a distintos estímulos extracelulares, desde los receptores de membrana hacia un gran número de moléculas diana que, en relevo, integran respuestas intracelulares altamente específicas al estímulo inicial. [51]

CADA SUB-FAMILIA DE MAPK está compuesta por un módulo de señalización de tres quinasas, evolutivamente muy conservadas, que se activan por fosforilación de forma secuencial: La MAPKKK (quinasa de la quinasa de la MAP quinasa) activa a la MAPKK (quinasa de la MAP quinasa), que a su vez activa a la MAPK (MAP quinasa). [53]

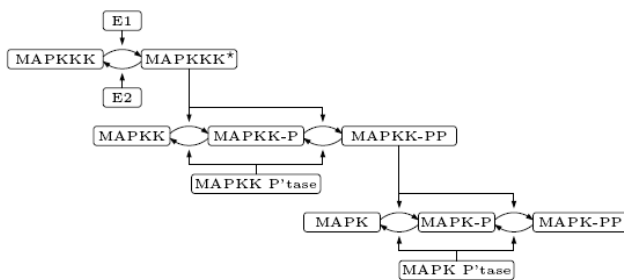


FIG. 1.15. Cascada MAPK. Proc. Natl. Acad. Sci., 93, 10078-10083. 1996

LAS MAPKKK no están asociadas directamente con el receptor de membrana, y necesitan activarse por otros elementos intermediarios que sí lo estén. Suelen activarse por fosforilación directa mediada por proteína quinasas C (PKC) o por interacción directa con proteínas de unión a GTP (como la familia Ras/Rho) en respuesta a estímulos extracelulares. Estos intermediarios fosforilan residuos localizados en los sitios catalíticos de la MAP diana y que pueden corresponder a

dominios homólogos de pleckstrina (secuencias con estructuras típicas que facilitan la interacción proteína-proteína o proteína-lípido), secuencias ricas en prolina relacionadas con la unión a SH3, motivos de dedos de Zinc, cierres de leucina, secuencias de unión a proteínas G o los residuos de fosforilación Serina/Treonina. Una vez activadas, las MAPKKK pueden fosforilar los residuos catalíticos, también muy conservados, de Serina/Treonina de las MAPKK.

LAS MAPKK activan al último miembro de la cascada, mediante fosforilación dual en residuos de Tirosina y Treonina localizados en la secuencia característica TxR (donde x representa cualquier residuo), localizados en el *loop* de activación del subdominio quinasa VIII. [53]

LA MAPK, una vez activa puede fosforilar a sus dianas directamente en el motivo fosfo-receptor que contiene residuos de serina o treonina adyacentes a prolina (Ser/Thr-Pro). La fosforilación del sustrato puede efectuarse tanto en el citoplasma como en el núcleo. [55]

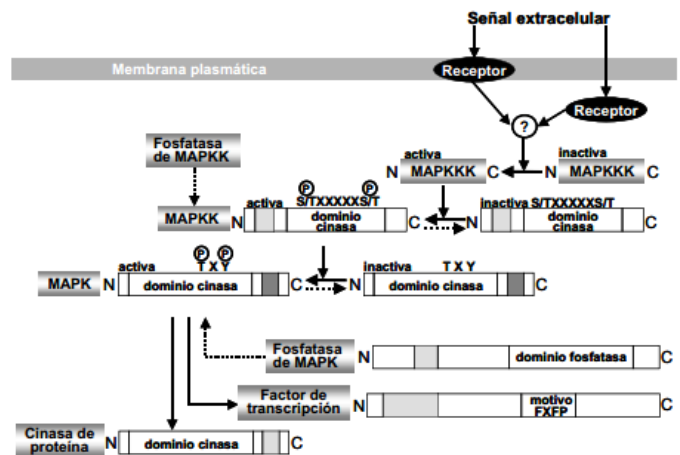


FIG. 1.16. Cascada MAPK. REB24(1):4-11, 2005.

1. INTRODUCCIÓN

1.2.3. IMPORTANCIA DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS EN EL DESARROLLO TUMORAL

LOS PROCESOS DE FOSFORILACIÓN-DEFOSFORILACIÓN permiten el control regulatorio de la actividad de las proteínas mediante su “encendido” o “apagado” en respuesta a señales extracelulares que inducen procesos tales como el crecimiento y la diferenciación celular.

UNA VEZ INICIADA LA SEÑAL en la membrana celular, las proteína-quinasas citoplasmáticas conducen la señal hasta el núcleo, pudiendo modular la transcripción génica y la actividad de otras proteínas que, como las ciclinas, controlan el ciclo celular. Las ciclinas forman complejos con otras proteínas quinasas dependientes de ciclinas (Cdk), dando lugar a su activación.

DENTRO DE LAS SEÑALES EXTRACELULARES encontramos ejemplos como el receptor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el receptor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el receptor de crecimiento derivado de

plaquetas (PDGF), el receptor de crecimiento de células epidérmicas (EGF) o el receptor de células madre (c-kit) entre otros.

LOS RECEPTORES VEGF y PDGF (regulados por las PK's) al favorecer la angiogénesis, son sumamente importantes durante el desarrollo del cáncer, ya que el aporte de nutrientes a partir de estos nuevos vasos sanguíneos le permiten crecer más allá de los 2mm.

LAS PROTEÍNAS QUINASAS son reguladores clave de todos los aspectos relacionados con la aparición y desarrollo de los tumores, al controlar procesos tales como la angiogénesis, migración celular, apoptosis, etc.

AL IGUAL QUE LAS MUTACIONES EN LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN, las mutaciones en los genes que codifican a las proteínas quinasas están directamente relacionadas con la oncogénesis.

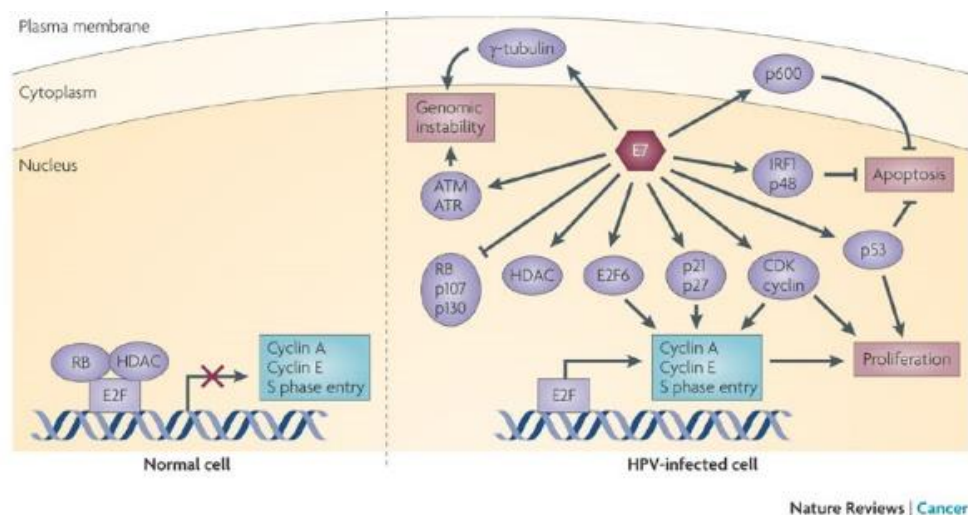


FIG. 1.17. Desregulación del ciclo celular por el virus HPV. Nature Publishing Group – Nature Reviews

LA DISFUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS ha sido demostrada en diversos tipos de cáncer humanos [36-38] y pueden tener distintas causas:

LAS REORDENACIONES GENÉTICAS suelen originar una proteína híbrida donde, el dominio catalítico de la proteína quinasa está unido a otra proteína, como es el caso de la fusión de la tirosina quinasa c-Abl a la región *breakpoint cluster BCR* en la leucemia mieloide crónica. [39]

LAS MUTACIONES suelen tener como resultado la autofibrilación, es decir, en la autoactivación en ausencia de una señal apropiada (factor de crecimiento) y por tanto, un mayor riesgo de recurrencia y metástasis, tal y como ocurre con el oncogen c-Kit en tumores gastrointestinales. [40-41]

OTRA ALTERACIÓN que puede darse es la expresión aumentada de una proteína quinasa o del ligando para la tirosina-quinasa receptor (RTK), como es el caso de la expresión aberrante HER2/ErbB2/EGFR2 en el cáncer de mama.

LAS ONCOPROTEÍNAS son factores de transcripción cuyo gen (oncogen) ha sufrido una mutación, de forma que permanecen continuamente activos o se sobreexpresan sin necesidad de señales externas. De este modo, al estimular sin control la síntesis de las proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, pueden inducir el crecimiento incontrolado de las células y, por tanto, dar lugar a un tumor.

LA DESREGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS debido a la activación de oncogenes o la pérdida de genes supresores también se relaciona con la oncogénesis. Este es el caso de la mutación de la GTPasa Ras, que conlleva la desregulación de Raf. [42]

SON NUMEROSOS los factores de transcripción cuya importancia ha sido demostrada en el cáncer, sin embargo, son pocos los oncogenes que se relacionan directamente con el cáncer de mama. Entre éstos, cabe destacar el gen FAM83B [35], el HER2/neu (*Human Epidermal growth factor receptor 2*) [43-45], el HCCR-1 (*Human Cervical Cancer Receptor*) [47-48] y Pokemon [49-50].

1.3. LA PROTEÍNA CLUSTERINA

LA PROTEÍNA CLUSTERINA (CLU) O APOLIPOPROTEÍNA J es una glicoproteína heterodimérica de 449 aminoácidos y 75-80kDa unida por puente disulfuro cuya parte glicosilada, procedente del retículo endoplasmático, tiene cerca de un 30% de residuos N-Linked ricos en ácido siálico.

SE TRATA DE UNA PROTEÍNA MULTIFUNCIONAL, altamente conservada en distintas especies, presentando homologías de entre el 70 y el 80%, especialmente en las secuencias CLE y AP1, encargadas de la regulación génica de su expresión. [56]

CADA DÍMERO de la proteína madura procede de un polipéptido precursor común de 60kDa que, tras perder por proteólisis un péptido señal de 22 aminoácidos entre los residuos 227 y 228, genera las cadenas alfa y beta. Ambas cadenas se ensamblan de forma antiparalela para originar la molécula heterodimérica unida por 5 puentes disulfuro entre los centros ricos en cisteína.

EN HUMANOS la proteína clusterina está codificada por el gen CLU situado en el cromosoma 8, brazo p12 y p21 (8p21.3-p12), en la banda negativa entre los pares de bases 27510369 y 27528244. El gen CLU está ubicado en la hebra *minus* y se transcribe en sentido reverso (desde el centrómero hasta el p-telómero).

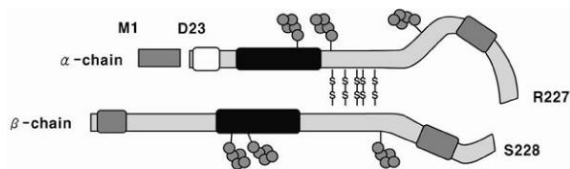


FIG. 1.18 Modelo de la molécula de clusterina. BioScientifica Ltd. Copyright © 2010, Society for Endocrinology [63].

EL GEN CLU tiene diez exones en total y puede ser transcrito en dos isoformas de ARNm (NM-001831, 2859bp; y NM-203339,2979bp) que resultan del uso alternativo de los dos primeros exones, 1 y 1'. Los otros exones, 2-9, están compartidos por ambas isoformas. Su expresión puede ser constitutiva o inducible, en función del tejido en el que se encuentre y de la función que realice. [56]

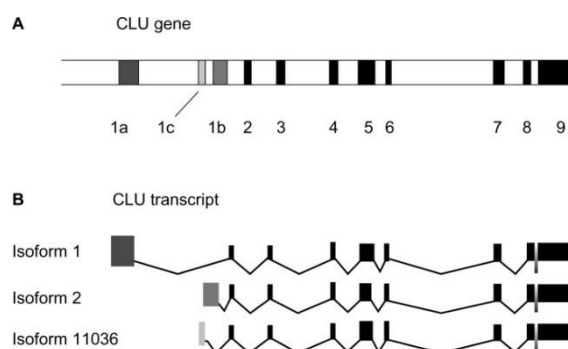


FIG. 1.19 Estructura del gen de la clusterina y sus productos de transcripción. BioScientifica Ltd. Copyright © 2010, Society for Endocrinology [57].

LA FIGURA MUESTRA la estructura del gen CLU y sus productos de transcripción:

(A) refleja el mapa del gen *CLU* en el cromosoma 8 y muestra la posición de los exones (bandas negras) e intrones (bandas blancas).

(B) muestra la estructura de los exones de las variantes del ARNm del gen *CLU*. Las bandas oscuras representan los exones 1a de la isoforma 1; las grises intermedias representan al exón 1b de la isoforma 2 y las bandas gris claro representan al exón 1c de la isoforma 1136.

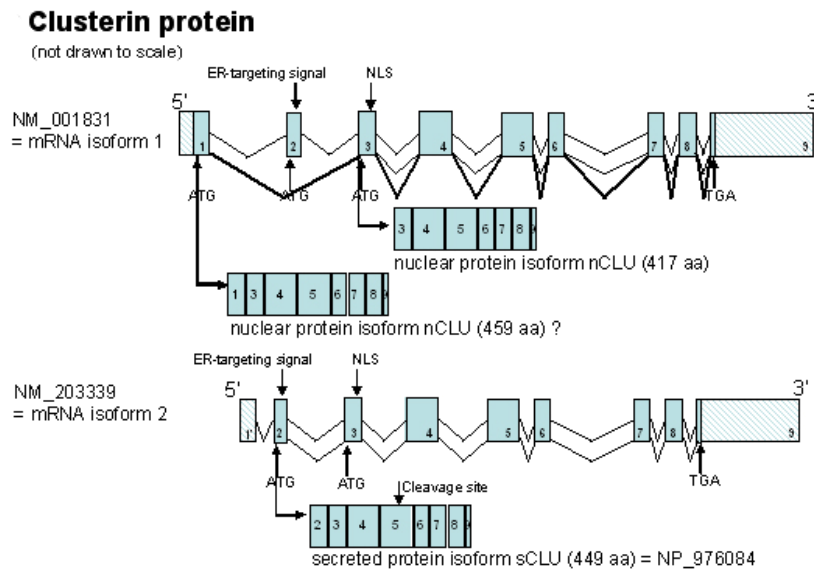


FIG. 1.20 Resultados de la transcripción del gen de la clusterina. www.atlasgeneticsoncology.org

A PARTIR DEL GEN CLU pueden originarse tres isoformas de la proteína clusterina con diferentes localizaciones y funciones celulares:

La ISOFORMA 1, clusterina nuclear o CLUn.

La ISOFORMA 2, clusterina secretora o CLUs.

La ISOFORMA 11036 o clusterina citoplasmática.

La cadena del ARNm de la CLUn es ligeramente más larga y, mediante *splice* o empalme alternativo, da lugar a las otras dos isoformas. [58][64-65]

EL RESULTADO DE LA TRANSCRIPCIÓN del gen de la clusterina tiene 3 sitios de inicio de la traducción (ATG) en banda. El proceso de traducción de la isoforma 1 aún se está estudiando, aunque parece que puede originar a dos isoformas nucleares, una con inicio de la traducción en la secuencia ATG del exón 3 (417 aminoácidos) y otra, comenzando en el sitio ATG del exón 1 (459 aminoácidos).

LA ISOFORMA 2, que resulta en una proteína de 449 aminoácidos (NP-976084) y cuya transcripción comienza en el segundo

ATG del exón 2, justo antes de la señal de localización para el retículo endoplasmático, es la que mejor se ha caracterizado.

LA CLUSTERINA SECRETORA se produce a partir de la transcripción de la isoforma 2, originando una proteína precursora inicial presecretora de unos 60kDa. Ésta proteína es fuertemente glicosilada y posteriormente escindida en el retículo endoplasmático, para dar lugar a las cadenas α y β , que serán ensambladas mediante 5 puentes disulfuro en la proteína madura final de 75-80kDa.

LA CLUSTERINA NUCLEAR también es traducida en un primer momento en forma de un precursor no glicosilado de unos 49kDa, antes de ser traslocada dentro del núcleo. Allí, *Pajak et al.* en 2007 puso en evidencia de la existencia de dos formas de clusterina nuclear, una de 50kDa y otra de 60kDa, que podrían resultar de la transducción desde el codón ATG presente en el exón 3 o en el exón 1, respectivamente.

1. INTRODUCCIÓN

LOS ESTUDIOS MUESTRAN que esta proteína puede expresarse de forma inducida, en respuesta a estímulos de diversa índole como pueden ser una infección por enterovirus 71 (EV71) u agentes que inducen la apoptosis. [57,64-68]

LA REPRESENTACIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL de la clusterina se basa en modelos computacionales ya que hasta la fecha, no ha sido cristalizada.

1.3.1. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA CLUSTERINA

TRAS SU PRIMER AISLAMIENTO en el año 1983 por Fritz et al. en el líquido seminal de carneros, han sido diversos los estudios que han localizado a ésta proteína en la mayoría de los tejidos animales, incluyendo el plasma sanguíneo, líquido cefalorraquídeo, leche, plasma seminal, mucosa del colon, cerebro, ovarios, hígado, páncreas, riñones, corazón y pulmón. [69-79]

ESTA AMPLIA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN hizo pensar que el papel que esta proteína juega en la biología de la célula debía ser importante, lo que provocó que fuese ampliamente estudiada en los años siguientes a su descubrimiento.

LA FUNCIÓN CELULAR DE LA CLUSTERINA depende en gran medida del tipo de célula en el que se exprese y del tipo concreto de mediador de la señal celular, habiéndose detectado en procesos tales como la protección frente a lesiones celulares, sistema del complemento, transporte lipídico, renovación de membranas, adhesión celular e incluso la muerte celular programada o apoptosis, [59-62]

EN LOS ÚLTIMOS AÑOS han sido diversos los estudios que han evidenciado la importancia de la clusterina tanto en la tumorigénesis como en la progresión del cáncer en humanos, proponiéndose como una novedosa herramienta para el

desarrollo de nuevas terapias de tratamiento del cáncer. [52-53]

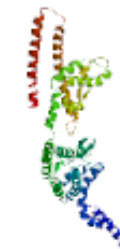


FIG. 1.21 Modelo de la estructura tridimensional de la proteína clusterina.

CLUn puede unirse al complejo Ku70 encargado de la reparación del ADN y ha sido relacionada con la protección celular en patologías como la isquemia ocular, obstrucción uretral, pancreatitis o mioblastos cardíacos fetales afectados por el etanol. [63]

SU INTERACCIÓN con el complejo del complemento C5b-7, C5b-8 y C5b-9, puede inhibir la acción lítica de éste en los periodos hormonales del ciclo estral, durante la implantación del feto en el útero o activando los mediadores IL-8 y MCP-1 de la cascada del complemento previniendo la aparición de aterosclerosis. En pacientes con lupus eritematoso sistémico, interacciona con la vitronectina, inhibiendo la acción citolítica del complemento. [72]

DURANTE LA SENESCENCIA, unos niveles elevados de clusterina se relacionan con la aparición de enfermedades como el cáncer, diabetes tipo II, enfermedades coronarias,

infarto de miocardio y degeneración de células retinales. [64]

TAMBIÉN ESTÁ POTENCIALMENTE implicada en la espermatogénesis, la calidad del fluido seminal y la interacción del acrosoma del espermatozoide con la membrana del oocito. [70]

DURANTE EL CICLO CELULAR bloquea a las metaloproteinasas MT6-MMP implicadas en la degradación de varios componentes de la matriz extracelular necesarios para la invasión y la migración celular. También está relacionada con la degradación del citoesqueleto en células PNT1 de próstata tras su unión a la subunidad de β -actina, induciendo la apoptosis. [64]

COMO CHAPERONA, la clusterina facilita el plegado de las proteínas secretadas por el aparato de Golgi así como la agregación y marcado de proteínas para su destrucción en los lisosomas. Cuando se combina con la proteína β -amiloide, atenúa la formación de placas y reduce la aparición de

Alzheimer, aunque otros estudios relacionan su sobreexpresión con la formación de placas β -amiloideas en hipocampo y córtex frontal cerebral en estos pacientes. Al unirse con la elastina de los tejidos dañados por la radiación ultravioleta inhibe su precipitación y el daño celular. [77-78]

SU SOBREENPRESIÓN se relaciona con los procesos de diferenciación y transformación celular, identificándose como un marcador de madurez celular. También se relaciona con los procesos neurodegenerativos tras una isquemia cerebral.

LA CLUSTERINA CITOPASMÁTICA se ha asociado con cáncer de colon, mama, próstata, laringe, faringe, pulmón, vejiga, renal, páncreas, células escamosas del esófago, riñón, rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, melanoma, linfoma, leucemia, cáncer cervical y cáncer de ovario.

1.3.2. CLUSTERINA, APOPTOSIS Y CÁNCER

LA IMPORTANCIA de la proteína Clusterina en las terapias actuales contra el cáncer estriba en su actividad como reguladora del ciclo y la vida celular: Mientras la clusterina nuclear (**CLUn**) tiene una función que favorece la apoptosis, la clusterina secretora (**CLUs**) tiene una función citoprotectora que aumenta la resistencia de las células tumorales. [58][80]

LA APOPTOSIS o muerte programada, es el principal mecanismo de control del número y de la proliferación normal de las células. De forma contraria que la necrosis, que produce la muerte de la célula debido a un daño externo, la apoptosis es un proceso programado y regulado por el cual una

célula puede “suicidarse” tras recibir una serie de estímulos internos y/o externos.

EN EL CUERPO HUMANO ADULTO, el mantenimiento de la población celular se mantiene gracias a la producción de varios cientos de miles de células cada segundo por mitosis y la muerte de un número similar mediante apoptosis.

GRACIAS A LA APOPTOSIS, las células mueren cuando los daños en su ADN no son reparados, siendo también la responsable de la eliminación de los linfocitos auto-reactivos o que no se activan tras la unión del antígeno correspondiente con el receptor.

1. INTRODUCCIÓN

ÉSTE ES UN PROCESO en el que intervienen múltiples proteínas complejas que controlan los procesos en forma de cascada bioquímica y que puede inhibirse por la acción de determinadas moléculas reguladoras con actividad antiapoptótica (factores de crecimiento, hormonas, nutrientes, etc.).

SEGÚN LO DICHO, defectos en el proceso de apoptosis pueden inducir un crecimiento descontrolado de células, tal y como se ha visto en algunos tipos de cáncer, enfermedades autoinmunes y enfermedades neurodegenerativas.

JUNTO CON LA ACTIVACIÓN DE ONCOGENES, la desregulación de los puntos clave de la apoptosis, mediante la activación, la expresión inadecuada de las proteínas antiapoptóticas (oncogenes) o la inactivación de los factores proapoptóticos (tumor-supresores), está estrechamente relacionada con la tumorigénesis.

SE HAN DESCRITO dos rutas principales de apoptosis: La primera, se desencadena por estímulos extrínsecos o citoplasmáticos, que activan al receptor de muerte Fas, perteneciente a la superfamilia de receptores de los factores de necrosis tumoral (TNF). La segunda es la intrínseca o mitocondrial, mediada por proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2.

LA FAMILIA BCL-2 comprende alrededor de 25 proteínas que regulan los procesos de permeabilización de la membrana mitocondrial mediante el control de la apertura de los canales de intercambio iónico VDAC, lo que constituye un punto clave para el inicio de la apoptosis mediante la vía mitocondrial intrínseca.

ALGUNOS MIEMBROS de esta familia tienen una actividad antiapoptótica (BCL-2, BCL-X, MCL1, BCLW), mientras que otros son proapoptóticos (BAX, BAK, BOK, BH3) al inducir la liberación de citocromo-c desde la mitocondria al citoplasma.

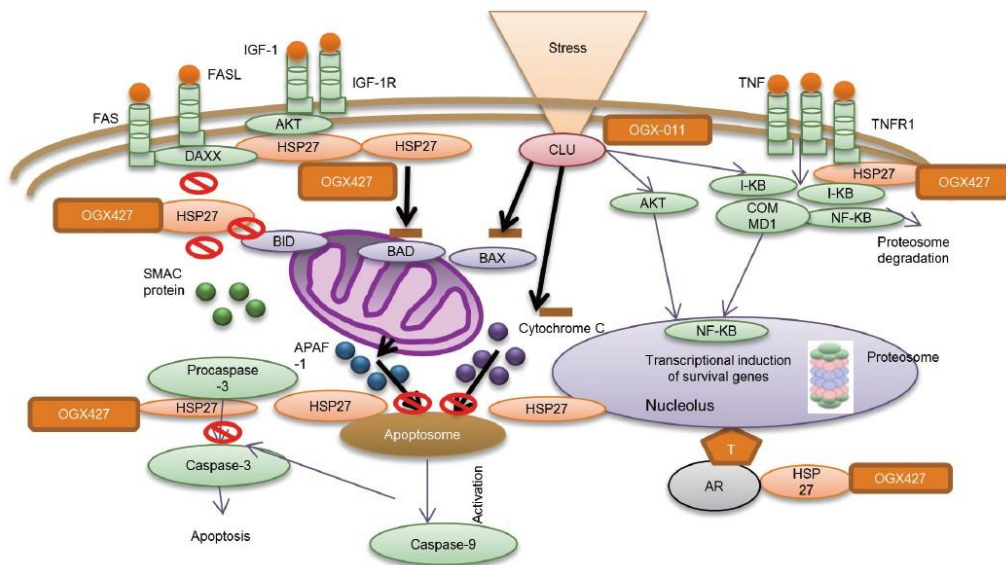


FIG. 1.22 Proteínas relacionadas con la apoptosis tras estrés celular (choque térmico). Constantine Albany, Noah M Hahn. *Asian Journal of Andrology* 2014. Vol 16.3:359-363

TANTO LA RUTA INTRÍNSECA COMO LA EXTRÍNSECA desencadenan la cascada de activación de las caspasas, proteasas que

degradan moléculas reguladoras y también estructurales y que inducen finalmente la muerte de la célula.

ASÍ, AUNQUE LAS DOS RUTAS están conectadas cabe recalcar que la sobreexpresión de Bcl-2 en la ruta intrínseca conlleva la inhibición de la apoptosis mediada por factores extrínsecos, mientras que TNF α puede aumentar la expresión de NF κ B y estimular a los miembros antiapoptosis de la familia Bcl-2 (la expresión de este gen está regulada por el factor de supresión tumoral p53).

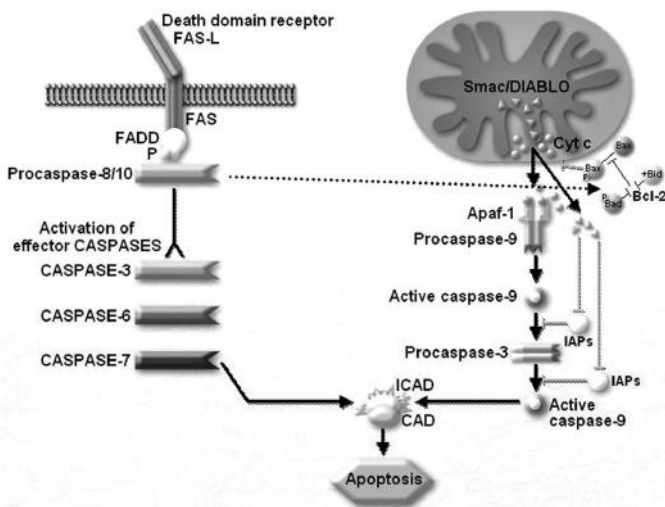


FIG. 1.23 Rutas de apoptosis mediadas por caspasas (independientes de p53). *Cancer Journal for Clinicians*. Vol. 55,3:178-194. May-Jun 2005

EL PAPEL PROAPOPTÓTICO DE LA CLUSTERINA NUCLEAR CLUn está relacionado con su capacidad para unirse al bucle BH-3 de la proteína BCL-XL, promoviendo la liberación de BAX. Esta liberación está acompañada por la activación de la caspasa-3 y la liberación de citocromo-c al citoplasma. [81]

LA FUNCIÓN CITOPROTECTORA de la CLUs aparece como una respuesta no específica frente a una variedad de agresiones a la célula que podrían inducir a la apoptosis (quimioterapia citotóxica, radiación, exceso de radicales de oxígeno libre, carencia de estrógenos o andrógenos, etc.), situación que se ha visto en diversos estudios al comprobar que, mientras que en la mayoría de las células normales la clusterina se

detecta en bajas concentraciones, su expresión se ve aumentada bajo condiciones de estrés celular, aumentando la resistencia de la célula. Así, expresión de la clusterina está bajo control genético y epigenético, ésta última, via metilación de su promotor. [83]

POR OTRO LADO, una reducción de la expresión de la CLUs conlleva normalmente la apoptosis de la célula, proceso que puede ocurrir por medio de dos vías: Una, dependiente de p53 y otra, independiente de p53.

LA DEPLECIÓN DE CLUs activa al p53 y altera la proporción en la que se encuentran las proteínas de la familia Bcl-2, cambiando la tendencia de pro-apoptosis a anti-apoptosis. Esto ocasiona la disfunción de la mitocondria y su apoptosis. Sin embargo, la supresión de Bcl-2 es un efecto que no depende de p-53, sino de proteínas caspasas. [58][86]

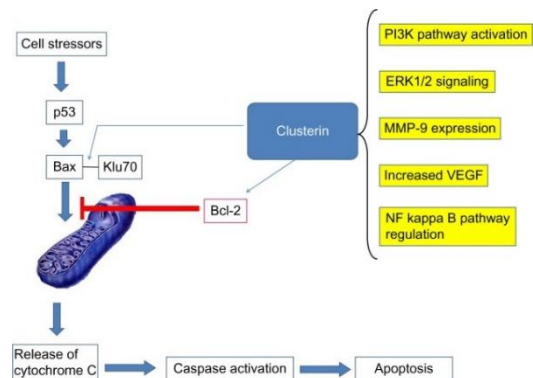


FIG. 1.24 Papel de la clusterina en la apoptosis celular. *OncotargetsTher*. 2014; 7:447-456

DIVERSOS ESTUDIOS han puesto de manifiesto las diversas rutas mediante las cuales la clusterina secretora CLUs puede inhibir la apoptosis celular y propiciar, de éste modo la supervivencia celular:

ACTUANDO COMO UNA CHAPERONA, la CLUs puede estabilizar la unión entre Ku70 y la proteína pro-apoptótica Bax (miembro de la familia Bcl-2), lo que impide la unión

1. INTRODUCCIÓN

de Bax con la membrana externa de la mitocondria y, por tanto evitando la activación de la cascada que inicia la apoptosis: [84-85]

APOPTOSIS: Bax-Ku70 + ↓CLUs → Bax

NO APOPTOSIS: Bax-Ku70 + CLUs → Bax-Ku70-CLUs

ACTIVANDO LA SOBREENPRESIÓN y activación por fosforilación de la megalina, que es un receptor de membrana para la clusterina. También promueve la activación por fosforilación de la cascada de activación de la proteína BAD, mediante la ruta de la fosforilación de la Fosfatidil-inositol 3-quinasa (Akt), mediada por IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*), lo que finalmente conlleva la inhibición de la secreción de citocromo-c y promueve la supervivencia de la célula. [87-88]

INHIBIENDO LA APOPTOSIS INDUCIDA por el estrés del Retículo Endoplasmático, al menos de forma parcial, mediante su interacción con proteínas reguladas por glucosa, promoviendo la expresión de CLU, e inhibiendo la apoptosis. [89]

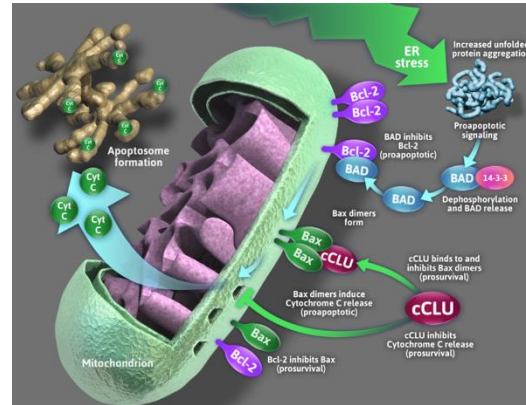


FIG. 1.25 Papel de la clusterina en la apoptosis celular. Oncogenex

1.3.3. LA CLUSTERINA Y EL CÁNCER DE MAMA

ADEMÁS DEL IMPORTANTE papel que la CLUs juega en la apoptosis, esta proteína también se ha asociado a mecanismos relacionados con la tumorigénesis tales como la migración e invasión celular, angiogénesis, quimioresistencia e inhibición de la transcripción de NF- κ B (Factor de necrosis tumoral). [91-93]

DIVERSAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN han puesto de manifiesto el papel de la clusterina en el cáncer de mama. Éstas parecen indicar que, al igual que en el cáncer de próstata, la CLUs le confiere a las células resistencia frente a la apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral TNF- α , a través de la activación de NF- κ B y la sobreexpresión de Bcl-2. [93]

LAS PRIMERAS INVESTIGACIONES revelaron que la expresión de CLU está

correlacionada positivamente con el tamaño del tumor así como que la expresión de CLUs está asociada con un estado negativo de los receptores de estrógenos y progesterona además de con la progresión desde el carcinoma primario hasta metastásico en los nódulos linfáticos. [95]

EN 2012, Niu et al. Investigaron como el silenciamiento de la CLUs con siRNA (*small interfering RNAs*) inhibe de forma significativa tanto la proliferación de células tumorales de mama MDA-MB-231 como su capacidad de invasión y migración. También demostraron que el silenciamiento de CLUs puede aumentar la tasa de apoptosis de las células, inhibiendo el crecimiento de las células. Por estos motivos, los autores consideran que el bloqueo de la expresión del gen CLUs puede suponer un valioso

método a tener en cuenta en el desarrollo de nuevas terapias frente al cáncer de mama. [96-97]

TAMBIÉN SE HA SUGERIDO que la CLUs está relacionada con el inicio del cáncer de mama triple negativo (CMTN), que son los que presentan ausencia de tinción en el receptor de estrógeno, en el receptor de progesterona y HER2/neu, ya que éstos pacientes presentan una sobre-expresión de CLUs frente a los pacientes que no son

triple negativo y, además, un mayor tamaño del tumor, nódulos axilares y un estado clínico más avanzado. En estas células tumorales e hiperplásicas, la expresión del ARNm de CLUs de la proteína es mayor que en las células de una glándula mamaria normal, por lo que los tratamientos de bloqueo de CLUs podrían ser beneficiosos en este tipo de pacientes CMTN. [98]

1.4. TERAPIAS GÉNICAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

1.4.1. LA TERAPIA GÉNICA

LA TERAPIA GÉNICA es la introducción de material exógeno, natural o recombinante, en sujetos humanos con la finalidad terapéutica de corregir deficiencias celulares expresadas en el nivel fenotípico o de dotar a las células de una nueva función.

ESTA TRANSFERENCIA de material genético exógeno se puede realizar mediante el uso de vectores virales, como retrovirus, adenovirus, virus asociados a adenovirus y herpesvirus, o mediante el uso de vectores no virales.

LOS MÉTODOS NO VIRALES incluyen métodos físicos, como la microinyección, electroporación y microproyectiles, y métodos químicos como la precipitación con fosfato de calcio, policonjugados, lípidos, liposomas y membranas derivadas de eritrocitos.

LA TERAPIA GÉNICA puede llevarse a cabo tanto en células germinales como en células somáticas, mediante técnicas *ex vivo* o técnicas *in vivo*.

LA TERAPIA GÉNICA EX VIVO es la técnica más utilizada y se basa en la obtención de

células del propio individuo para su cultivo y modificación genética y posterior reintroducción a través de vectores.

LA TERAPIA GÉNICA IN VIVO se basa en la introducción de material genético exógeno directamente al órgano diana a través de vectores, también conocida como terapia génica *in situ*, o en la introducción del material genético por vía parenteral para su efecto sistémico. El uso de distintos vectores facilita la localización celular y su acción en determinados tipos celulares.

LAS TÉCNICAS DE TERAPIA GÉNICA incluyen la inserción génica, donde no se modifica el gen defectuoso, la modificación génica, con la normalización del gen defectuoso, la cirugía génica, con la sustitución del gen defectuoso y, por último, el bloqueo de genes mediante el uso de ribocimas, triplécticos y oligonucleótidos anti-sentido.

EN LA ACTUALIDAD en la lucha contra el cáncer se hace necesario el desarrollo de nuevas terapias que mejoren el efecto de los citostáticos sobre las células tumorales y mejoren la supervivencia de los pacientes.

1.4.2. OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO (ODN)

UN OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO es una hebra de ADN monocatenario de corta longitud (entre 13-25 bases) con origen natural o artificial, que teóricamente puede hibridar con una única secuencia de ARNm diana presente en la célula, bloqueando su traducción.

LA ESPECIFICIDAD de éste método se basa en la estimación de que cualquier secuencia de al menos 13 bases en el ARN o de 17 bases en el ADN está representada una sola vez dentro del genoma humano.

ESTAS MOLÉCULAS se diseñan con el fin de modular la traducción de la información genética de las proteínas, principalmente de las relacionadas con la proliferación celular, apoptosis, angiogénesis y metástasis.

ATENDIENDO A SU MECANISMO de silenciamiento de genes en la célula, los oligonucleótidos antisentido se pueden clasificar en ARNasa H-Dependientes y de Bloqueo Estérico. [99]

TIPOS DE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO

OLIGONUCLEÓTIDOS ARNasa H-DEPENDIENTES: Son los usados con mayor frecuencia en investigación clínica e inducen la degradación del ARNm diana mediante la activación de la enzima ARNasa H o ribonucleasa H, que hidroliza los complejos híbridos ARN/ADN. La ARNasa-H supone una maquinaria de destrucción de éste tipo de moléculas muy eficiente, consiguiendo resultados de silenciamiento o inhibición de la expresión de la proteína diana de entre el 80 y el 95%.

ADEMÁS, estos oligonucleótidos son muy específicos, ya que pueden inhibir la expresión de una determinada proteína por medio de distintas secuencias diana que pueden estar muy separadas dentro de la misma región codificante. Aunque el mecanismo exacto de acción de la ARN-asa H no es bien conocido, se ha visto que homologías de 5 pares de bases son suficientes para inducir su actividad.

OLIGONUCLEÓTIDOS DE BLOQUEO ESTÉRICO: Impiden físicamente la progresión de la maquinaria de traducción, interfiriendo en las fases de iniciación o elongación. Al contrario que los oligonucleótidos ARNasa-H dependientes, tienen como diana una secuencia muy específica de la región codificante del ADN (extremo 5'- o región de inicio de codificación AUG). La eficacia de silenciamiento de la expresión génica por medio de ésta técnica es menor que en el anterior caso ya que, en ocasiones, el ribosoma puede deshacerse de la hebra antisentido y continuar con la traducción.

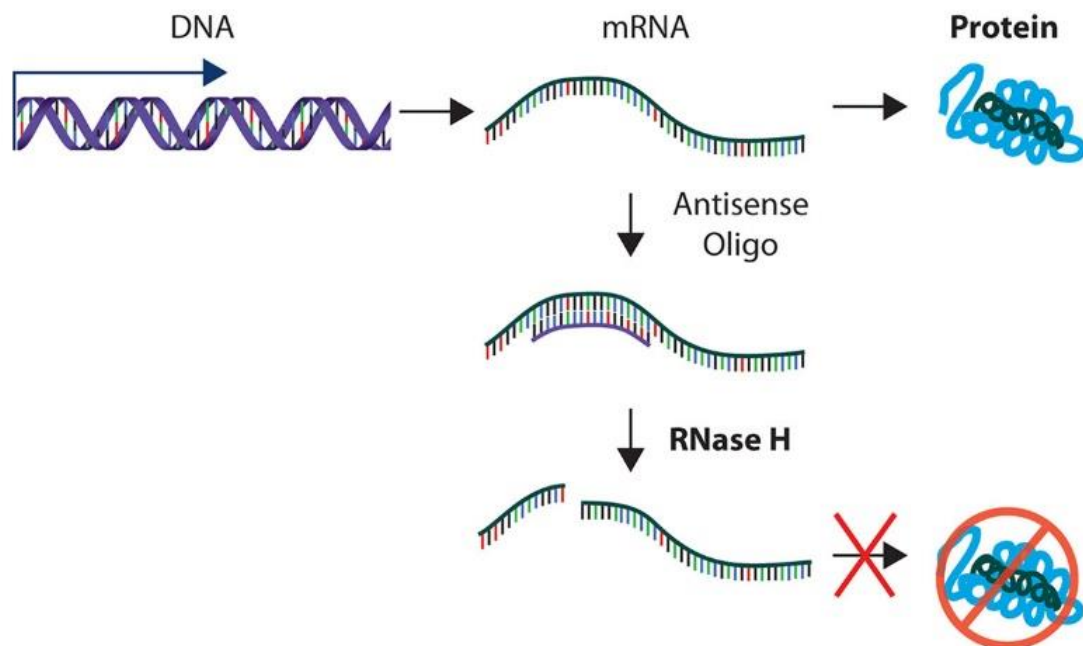


FIG. 1.26 Mecanismo de silenciamiento génico mediado por ODN. *ltdna*

1. INTRODUCCIÓN

PARA CONSEGUIR EL EFECTO de silenciamiento del gen diana, es necesario que el oligonucleótido antisentido pueda atravesar la membrana celular de las células. A día de hoy, el mecanismo exacto por el que esto ocurre sigue bajo estudio.

LA ENTRADA DEL OLIGONUCLEÓTIDO en la célula diana ocurre, al parecer, de forma mayoritaria mediante mecanismos de transporte activo como la endocitosis de adsorción y pinocitosis de fase fluida, procesos dependientes de la temperatura, la estructura, la concentración del oligonucleótido y la línea celular. Cuando la concentración del oligonucleótido es pequeña, puede ocurrir su internalización vía receptor de membrana. Cuando la concentración es alta, el receptor de membrana se satura y la entrada por pinocitosis cobra mayor importancia. [100-102]

PARA MEJORAR LA ENTRADA de estas moléculas en el interior de la célula así como su actividad espacial y temporal, se hace necesario el uso de transportadores. El uso conjunto de los oligonucleótidos con los vectores mejora, además, la estabilidad de éstos frente a la degradación por parte de las nucleasas al tiempo que permite disminuir las concentraciones de ensayo.

LA PRIMERA GENERACIÓN de vectores de transporte está basada en el uso de liposomas, coloides vesiculares compuestos generalmente por una bicapa de fosfolípidos y colesterol que dejan en su interior un compartimento acuoso en el que el oligonucleótido puede encapsularse. Debido a su carga positiva, los liposomas tienen gran afinidad por las membranas celulares, cuya carga residual en condiciones fisiológicas es negativa. Como ejemplo de vector de transporte muy usado

en los estudios de investigación se encuentra la **LIPOFECTINA**.

EN LO ESTUDIOS *IN VIVO* no se hace necesario el uso de este tipo de vectores de transporte, ya que las células incorporan los oligonucleótidos desde el exterior de la célula hasta el citoplasma y posteriormente, hacia el núcleo sin ayuda de estas sustancias mediante mecanismos que aún no están bien definidos.

EL DISEÑO DE ESTE TIPO DE MOLÉCULAS que puedan usarse en terapia humana es difícil, ya que hay que tener en cuenta varios factores que afectan a su estabilidad y actividad: Deben ser capaces de entrar en la célula diana, ser altamente afines a la secuencia complementaria de ARNm, deben estar modificados químicamente para evitar la digestión por las nucleasas, deben activar la ribonucleasa H que degrade selectivamente el complejo ODN-RNA y, por supuesto, no pueden causar efectos secundarios peligrosos. [103]

LA TERAPIA ANTISENTIDO se está empleando en la actualidad para bloquear la acción de diversas familias proteicas relacionadas con la proliferación celular y la progresión tumoral. [104]

TERAPIA ANTISENTIDO

APOPTOSIS DEFECTUOSA: A1, MCL1, BCL-2, BXL-XL, BCL-W, IAPs, Clusterina, HSP70MITF

CICLO CELULAR: Ciclina D, MYC, CDKs

REGULACIÓN GÉNICA ABERRANTE: DNA Metiltransferasa, Histona deacetilasa

FACTORES DE CRECIMIENTO: EGFR, PKA1, HER2/NEU, IGF1, IGFBP2, BRAF, PKC α , RAS/RAF

ANGIOGÉNESIS: VEGF, VEGFR, bFGF

INMORTAIDAD CELULAR: Telomerasa

METÁSTASIS: MMPs

1.4.3. siRNA - SMALL INTERFERING RNA

LA INTERFERENCIA DEL ARN (RNAi) es un mecanismo que regula la expresión génica limitando la transcripción de los genes bien, suprimiendo su transcripción (silenciamiento transcripcional de genes o TGS, del inglés *Transcriptional Gene Silencing*) o bien, activando un proceso de degradación de una determinada secuencia de ARN (silenciamiento post-transcripcional de genes o PTGS, del inglés *Post-Transcriptional Gene Silencing*). [105]

LA FUNCIÓN NATURAL de la interferencia del ARN (RNAi) y parece ser la protección del genoma frente a la invasión por elementos foráneos tales como virus o transposones. De hecho, suponen una efectiva maquinaria que ha encontrado en distintos organismos, desde los hongos hasta los organismos vegetales y animales vertebrados e invertebrados. [105]

RNAi También se ha asociado a procesos de regulación celular como el silenciado de transposones, mecanismos de defensa antiviral, regulación génica y modificación de cromosomas. [105]

DADA LA ALTA ESPECIFICIDAD de este proceso para silenciar su ARNm diana y por tanto, para reducir o suprimir la expresión del gen correspondiente, ha propiciado su uso en investigación como un método fácil y rápido de silenciamiento de genes.

CABE REMARCAR la naturaleza autocatalítica que propicia un efecto amplificado. Este efecto parece deberse a la acción de polimerasas ARN-dependientes o RdRP (del inglés *RNA-dependent RNA polymerase*), que sería la responsable de replicar los siRNA y mejorar la respuesta de defensa de la célula frente a la entrada de secuencias de ADN parásitas. [106-107]

AUNQUE A DÍA DE HOY aún no está bien definido como se produce el mecanismo de interferencia por iRNA, se ha propuesto un **MODELO DE INTERFERENCIA DE DOS PASOS** que comprende una maquinaria común que incluye: dsRNA (del inglés *Double Stranded RNA* o ARN bicatenario) como activador del proceso, ARN diana degradado de un modo específico y la actuación de un grupo de proteínas muy conservadas.

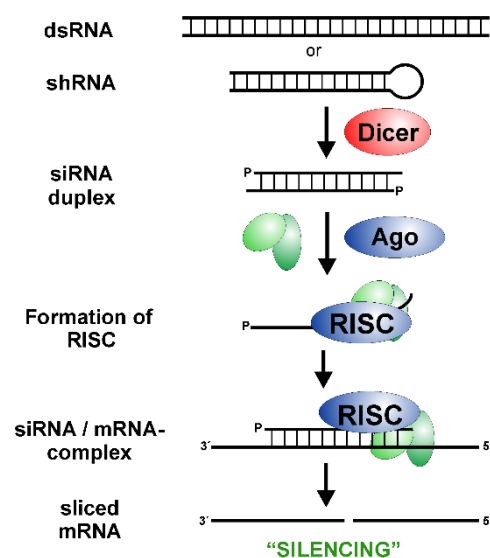


FIG. 1.27 Mecanismo de silenciamiento génico mediado por siRNA. Gene-quantification

EL PRIMER PASO, O FASE DE INICIO DE LA RNAi, comienza con unión y degradación de una molécula larga de ds-RNA a fragmentos de ARN (siRNA). Este proceso, dependiente de ATP, es llevado a cabo por la enzima **DICER**, una nucleasa perteneciente a la familia de las ARNasa III con alta especificidad por las moléculas de dsRNA.

EL PROCESO da como resultado una molécula de ARN bicatenario de entre 20 a 25 nucleótidos o **siRNA**, del inglés *small interfering RNA* (ARN de interferencia pequeño o ARNip) con 2 o 3 nucleótidos desemparejados en cada extremo 3', por lo

1. INTRODUCCIÓN

que cada hebra de ARN tiene un grupo fosfato 5' y un grupo hidroxilo 3' libre.[92]

LA ENZIMA DICER tiene cuatro dominios diferentes: un dominio helicasa amino-terminal, una parte central ARN-asa III, una zona de unión a dsRNA y un dominio PAZ de reconocimiento del sustrato altamente conservado.

EN LA SEGUNDA FASE, estas moléculas de siRNA se unen al complejo de multinucleasa RISC, que en presencia de ATP, activan el reconocimiento de su ARNm homólogo a la hebra antisentido y su posterior corte aproximadamente en la mitad de la región dúplex (entre 11 y 12 nucleótidos desde el extremo 5' de la hebra guía del siRNA). Estos fragmentos de ARNm seguramente son degradados más tarde por exoribonucleasas, ya que se ha visto que aunque el ARNm no se acumula en el citosol, sí es detectable en el núcleo. [109-110]

1.5. NUEVAS TERAPIAS BASADAS EN LA INHIBICIÓN DE LA CLUSTERINA Y DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS

1.5.1. INHIBIDORES DE LA CLUSTERINA

LOS EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE CLU en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama están en estudio y manifiestan resultados contradictorios.

EXISTEN EVIDENCIAS que establecen que la inhibición de CLUs en los estadios más tardíos de la evolución del cáncer tienen efectos terapéuticos beneficiosos, ya que la clusterina puede conferir una mayor resistencia de las células tumorales a los tratamientos. Por el contrario, el bloqueo de la clusterina en los estadios más tempranos tiene un efecto contrario, representando un biomarcador que se correlaciona de forma positiva con una mayor supervivencia. [111]

INVESTIGACIONES IN VITRO mostraron que el uso de oligonucleótidos anti-sentido (ODN) y siRNA específicos para el ARNm de la clusterina, sensibiliza a las células de cáncer de pulmón frente a la quimio y radioterapia, disminuyendo su potencial metastásico.

EL CUSTIRSEN (OGX-011, OncoGeneX Pharmaceuticals, Inc., Bothell, WA. USA) es un oligonucleótido antisentido de segunda generación diseñado para bloquear el exón 1 del ARNm de la clusterina secretora CLUs, disminuyendo su expresión y mejorando los resultados clínicos en pacientes con cáncer prostático avanzado. En el año 2014 comenzó la fase III de los ensayos con indicios de su utilidad en otros tipos de cáncer diferentes al cáncer de próstata, como cáncer de mama, pulmón o cáncer de ovario.

SIN EMBARGO, las investigaciones *in vivo* en pacientes con cáncer de pulmón aún no han revelado ningún resultado alentador. Los estudios llevados a cabo en el año 2009, demostraron como el Custirsén no evidencia ventajas cuando se asocia a la quimioterapia para el cáncer de mama. En 2014, en la fase III de los ensayos, se ha vuelto a comprobar que el tratamiento de pacientes con metástasis de cáncer prostático (CRPC) con Custirsén y quimioterapia basada en docetaxel/prednisona, no mejora la tasa de supervivencia en comparación con los pacientes tratados únicamente con quimioterapia, lo que hace necesario que se lleven a cabo más investigaciones en este campo. (Datos obtenidos de OncoGenex Pharmaceuticals Inc.) [106]

LOS EFECTOS SECUNDARIOS de este tipo de tratamiento van desde los típicos gripales, hasta una disminución en el recuento de neutrófilos, fiebre, derrame pleural o disnea

1.5.2. INHIBIDORES DE LAS PROTEINAS QUINASAS

ESTÁ DEMOSTRADO el papel de las MAPK en los fenómenos de resistencia a la quimio [88] y radioterapia [89] convencional, así como que las MAPK pueden estar implicadas en la respuesta a distintas terapias de cáncer, incluidas las basadas en inhibidores de tirosinas-quinasas. [115]

ACTUALMENTE se está llevando a cabo un esfuerzo considerable en la investigación de estrategias que inhiban las MAPK que participan en la tumorigénesis. En la actualidad, los métodos más efectivos están basados en el desarrollo de anticuerpos anti-receptores e inhibidores de bajo peso molecular.

ANTICUERPOS ANTI-RECEPTORES

LOS ANTICUERPOS se unen con el dominio extracelular del receptor HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor), proteína que se sobreexpresa en un gran número de adenocarcinomas humanos y en el 20-25% de los casos de cáncer de mama, relacionándose con un tumor más agresivo y de peor pronóstico.

citoquinas y reduciéndose la producción del factor de crecimiento endotelial.

ASÍ MISMO, la unión del anticuerpo favorece el inicio de una respuesta inmune citotóxica contra las células tumorales que sobreexpresan HER2, lo que incrementa el efecto citotóxico de la quimioterapia.

ESTA UNIÓN BLOQUEA la unión del receptor con el factor de crecimiento epidérmico, inhibiéndose el crecimiento tumoral, revirtiéndose la resistencia a

COMO EJEMPLO de esta terapia está el Trastuzumab (Herceptin) que se usa en cáncer mamario, ovárico, prostático y pulmonar. [116]

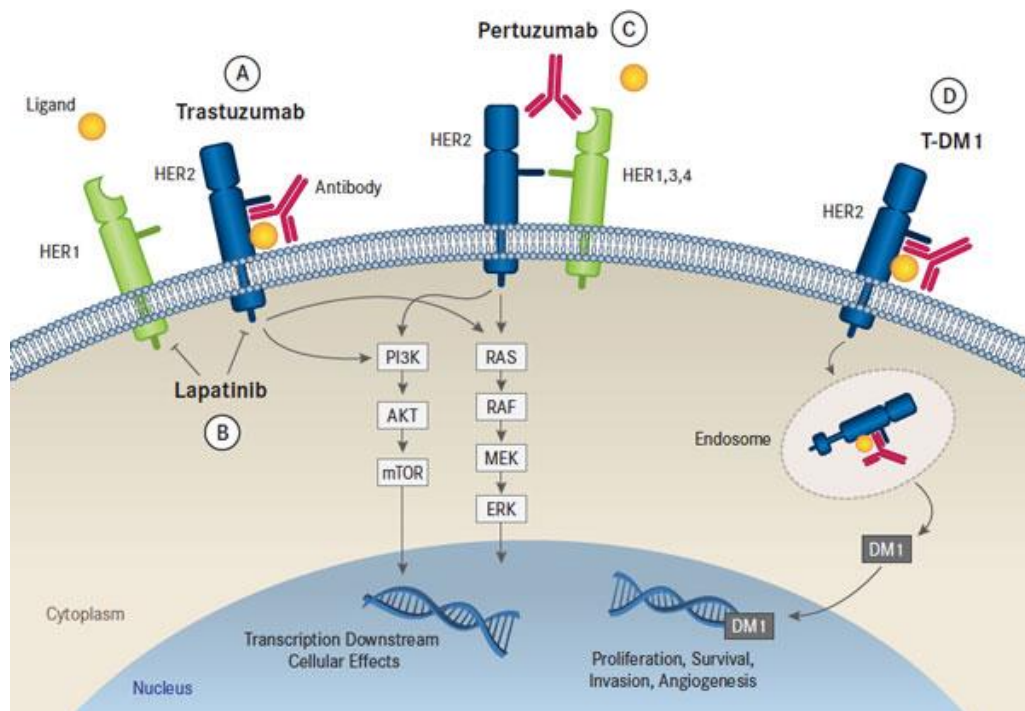


FIG. 1.28 Efecto celular de Trastuzumab, Pertuzumab y T-DM1. Antibody-Drug Conjugates and T-DM1. Onc Live. March 21, 2014

INHIBIDORES DE BAJO PESO MOLECULAR

EL EFECTO CELULAR de los inhibidores de bajo peso molecular se basa en el bloqueo del sitio de unión del ATP, impidiendo la activación por fosforilación del sustrato de la proteína quinasa y, por tanto, deteniendo la transducción de la señal al núcleo.

H89 (N-[2-(p-bromocinnamylamino)-ethyl]-5-isoquinolinesulfonaime}, CAS Nº 127243-85-0), es un potente inhibidor con acción selectiva frente a las PKA, proteína-quinasa dependientes de AMP cíclico (S6K1, MSK1, PK1, ROCKII, PKB α , MAPKAP-K1b), mediante inhibición competitiva por el ATP en su subunidad catalítica. Al inhibir a PKA, disminuye la fosforilación del residuo de treonina de Akt, impidiendo la asociación de PI3K con Ras y, por tanto, favoreciendo la actividad de la PI3K libre. La PI3K puede entonces activar al p38 mediante MAPK, incrementando la fosforilación de Akt e induciendo la apoptosis. H89 también puede inhibir a las proteína-quinasa activadas por estrés mitógeno (MSK). [117-118]

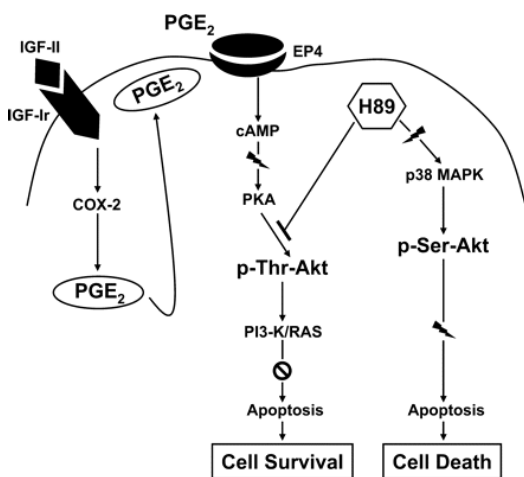


FIG 1.29 Efecto celular de H89 en la línea de adenocarcinoma humano Caco-2. *American Journal of Physiology*. Vol. 293. 2007

CHELERYTHRINE (C₂₁H₁₈N₄O₄Cl, CAS Nº 3895-92-9), un alcaloide de benzofenantridina que actúa como un potente y selectivo inhibidor de la proteína-quinasa C, promoviendo la liberación de citocromo c por parte de la mitocondria e induciendo apoptosis. [119-120]

GENISTEÍNA (4',5,7-Trihydroxyisoflavone, CAS Nº 446-72-0) es un flavonoide que atenúa la proliferación celular mediada por factores de crecimiento y citoquinas. Su acción se basa en una potente y específica inhibición de la autofosforilación de la tirosina-quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF). También parece desempeñar un papel en las rutas de traducción de las señales, como la inhibición de la ADN-topoisomerasa II, acción antiangiogénica y antioxidante. [121]

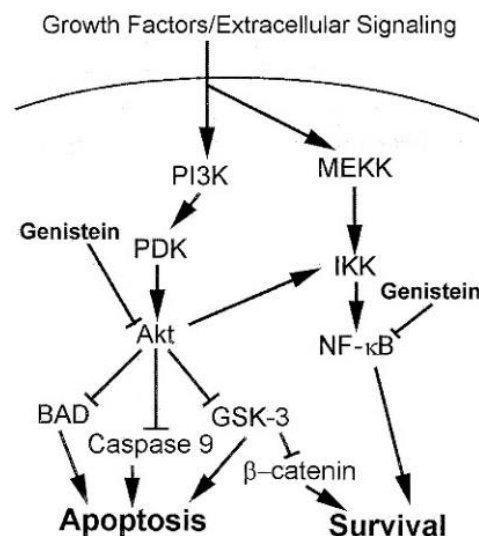


FIG. 1.30 Efecto celular de la Genisteína. *Clin. Cancer Res* July 2002 vol.8 no.7 2369-2377

AL IGUAL que otros citotóxicos, los inhibidores de bajo peso molecular de proteínas quinasa, al inhibir de forma permanente elementos fundamentales para la supervivencia proliferación celular, inducen toxicidad también en las células normales.

1. INTRODUCCIÓN

LOS EFECTOS DE LA TOXICIDAD son mayores durante el uso de inhibidores que inhiben múltiples receptores en comparación con inhibidores más específicos y acción reducida en el número de receptores inhibidos.

ENTRE LOS EFECTOS SECUNDARIOS más frecuentes se encuentran los vómitos, anorexia, diarrea, sangrado gastrointestinal y alteraciones dermatológicas (foliculitis facial, tricomegalia y ulceraciones). Otros efectos secundarios pueden incluir

hepatotoxicidad espasmos musculares localizados, nefropatía con pérdida de proteínas y anemia hemolítica, lo que afecta muy negativamente a la calidad de vida de los pacientes.

ACTUALMENTE cuando estos efectos secundarios se vuelven más severos, se prescribe la discontinuación temporal de la terapia así como una reducción de la dosis o frecuencia de administración del quimioterápico al reiniciar el tratamiento.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL E HIPÓTESIS INICIAL

SON BIEN CONOCIDAS las propiedades antitumorales de los inhibidores de las proteínas quinasas, siendo los fármacos de elección para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Sin embargo, los efectos secundarios que producen a altas dosis afectan de forma negativa a la salud de los pacientes y presentan una eficacia moderada cuando son utilizados como terapia única.

POR OTRO LADO, tal y como se ha visto, la expresión de la clusterina secretora CLUs por las células tumorales en respuesta a la presencia de este tipo de sustancias citotóxicas provoca resistencia tanto a la quimioterapia como a la radioterapia mediante la inhibición de la apoptosis. [1][2]

EL OBJETIVO GENERAL del presente proyecto consiste en comprobar si el bloqueo de agentes inhibidores de la apoptosis, como la proteína clusterina, pueden potenciar la actividad citotóxica de los inhibidores de las proteínas quinasas en las células tumorales con el fin de mejorar su eficacia.

LA HIPÓTESIS INICIAL se basa en que la inhibición de la expresión de la proteína clusterina podría ser la base de una nueva terapia que aumente la sensibilización de las células tumorales de mama frente a la acción citotóxica de los inhibidores de proteínas quinasas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASAS SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR

Comprobar el efecto de éste tipo de inhibidores enzimáticos sobre la supervivencia de las células tumorales de mama.

2.2.2. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE CLUSTERINA SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR

Comprobar el efecto que una inhibición selectiva de la expresión de la proteína clusterina tiene sobre la supervivencia de las células tumorales, con el fin de poner de manifiesto su papel citoprotector.

2.2.3. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASAS SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA

Estudiar el efecto de los inhibidores de proteínas quinasas sobre la expresión génica de la clusterina en líneas celulares de cáncer de mama.

2.2.4. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS COMBINADOS DE INHIBIDORES DE CLUSTERINA E INHIBIDORES DE PROTEINAS QUINASA

Comprobar si la sensibilidad de distintas líneas celulares a los inhibidores de proteínas quinasas se ve mejorada por el tratamiento con inhibidores de la clusterina.

2. OBJETIVOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MODELOS CELULARES

COMO MODELOS para investigar los tumores de mama y los mecanismos celulares de los citotóxicos seleccionados, se han elegido dos líneas celulares de cáncer de mama epitelial procedentes de la *American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA*.

LÍNEA MDA-MB-231:

Esta línea celular, aislada por primera vez en 1973 a partir de una muestra de derrame pleural de una paciente con cáncer de mama, es de la más utilizadas para el estudio experimental *in vitro* del cáncer de mama hormono-independiente ER(-). En ella la clusterina se expresa fuertemente de forma constitutiva, existiendo una expresión basal de esta proteína en condiciones normales. Esta línea celular presenta un crecimiento extraordinariamente rápido en medios de cultivo poco enriquecidos debido a una regulación autocrina a partir de factores de crecimiento celular que ellas mismas secretan al medio. Estas células presentan abundantes receptores de membrana para el factor de crecimiento epidérmico EGF aunque no se sobreestiman con dicho factor.

LÍNEA MCF-7:

Esta línea celular aislada por primera vez en 1970 a partir de una paciente caucasiana de 69 años con cáncer de mama, es muy utilizada para la realización de ensayos *in vitro* ya que mantiene ciertas características propias del epitelio de mama, como la habilidad de procesar estrógenos, en forma de estradiol, vía receptores de estrógenos en el citoplasma celular. La línea MCF-7 es, por tanto, hormono-dependiente, ER(+). Otros motivos que han movido a la elección de ésta línea es que en ella, la clusterina se expresa de forma inducible. Esta línea celular se caracteriza por requerir una elevada concentración de aminoácidos esenciales en el medio para su crecimiento así como por ser resistente a varios antitumorales, entre ellos, la Doxorubicina.

3.2. PROCEDIMIENTO DE CULTIVO

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO ESTÁNDAR PARA AMBAS LÍNEAS CELULARES	RPMI 1640 con L-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). SBF 8% (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA). Aminoácidos no esenciales (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA). Antibióticos (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA).
PROTOCOLO DE ELABORACIÓN DEL DILUYENTE DE LAS SOLUCIONES STOCK	<ol style="list-style-type: none"> 1. Cultivo de las células en placas de 12 pocillos (Albus), sembrándose aproximadamente 1×10^5 células/pocillo en medio estándar enriquecido. Incubación en la estufa de cultivos celulares a 37°C durante 12 horas para permitir que las células en suspensión se adhieran a la pared de la placa de cultivo. 2. Sustitución del medio estándar enriquecido con un medio portador del tratamiento de estudio. 3. Para conseguir la separación de las células del pocillo, se procede a la eliminación del medio con el tratamiento utilizado y adición de PBS-EDTA al 5%. Transcurridos 20 minutos, se añade PBS para recoger el mayor número de células que se colocan en un tubo eppendorf estéril. 4. Almacenamiento a -20°C para posteriores estudios.

3.3. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA

3.3.1. INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CLUSTERINA MEDIANTE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENIDO (ODN)

MATERIALES	
MEDIO DE CULTIVO	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's), de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO (USA), libre de suero, y suplementado con lipofectina para potenciar la transferencia de los ODN.
OLIGONUCLEÓTIDOS FOSFOROTIOATO (ODN) PRODUCIDOS PARA SU USO EN HUMANOS	<p>ODN-Clu y ODN_Control Roche Molecular Biochemical, Mannheim, Germany. Ambos ODN con una secuencia específica para el gen de la clusterina humana. Esta secuencia se corresponde con el sitio de inicio del exón II del gen CLU en humanos 5'-CAGCAGCAGAGTCTTCATCAT-3'.</p> <p>La secuencia control en este estudio fue 5'-CAGCAG-CAGAGTATTTATCAT-3'.</p> <p>La <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> de la base de datos de la <i>National Center for Biotechnology Information</i> mostró que no existían homologías entre los ODN utilizados con ningún otro gen humano conocido.</p>
TRANSPORTADOR	Lipofectina (Life Technologies, Glasgow, UK) previamente mezclada a temperatura ambiente y en una concentración 1,5µg/ml durante 20 minutos con medio DMEM, para potenciar la transferencia de los ODN.
MÉTODO	
PASO 1	Cultivo de las células en la dilución del transportador (medio DMEM y lipofectina 1,5µg/ml) junto con los ODN (10nM para el control y 100nM para clusterina).
PASO 2	Incubación a 37°C con agitación durante 4 horas
PASO 3	Sustitución del medio con lipofectina y los ODN por medio estándar e incubación a 37°C durante 24h.
PASO 5	Lectura de resultados.

Experiencias anteriores obtuvieron una máxima reducción en los niveles de ARNm empleando una concentración de ODN 100nM, lo que justifica la realización de las experiencias con esta concentración. [1]

3.3.2. INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CLUSTERINA MEDIANTE EL PLÁSMIDO PARA CLUSTERINA O siRNA

MATERIALES

MEDIO DE CULTIVO RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO (USA), suplementado con 10% FBS.

REACTIVO DE TRANSFERENCIA FuGene[®]6 Transfection Reagent (Promega Biotech Iberica, Spain)

siRNA DUPLEX sc-43688 (Santa Cruz Biotechnology, USA)

siRNA CONTROL sc-37007 (Santa Cruz Biotechnology, USA)

Para determinar la concentración óptima de siRNA necesaria, previamente se realizó el cultivo de las líneas celulares objeto del estudio con 50, 100 y 200nM, consiguiéndose la mayor mortalidad de las células con una concentración 200nM (comparado con el control):

- Para la línea MDA los resultados fueron los siguientes: $68,5 \pm 1,7$ vs $26 \pm 2,2$ ($p < 0,001$).
- Para la línea MCF-7: $55,2 \pm 4,1$ vs 40 ± 4 ($p = 0,04$).

MÉTODO

PASO 1 Añadir FuGene al medio DMEM e incubar a 37°C en agitación durante 5 minutos.

PASO 2 Añadir el siRNA al medio con FuGene. Incubar en agitación a 37°C durante 15 minutos.

PASO 3 Añadir la mezcla anterior a cada pocillo con las células de ensayo, de forma que la concentración final de siRNA sea 200nM.

PASO 4 Incubación de las células de ensayo durante 48h, a 37°C, con el fin de permitir la expresión del plásmido transferido.

PASO 5 Lectura de resultados

Para la preparación del control, se empleó un siRNA control con una secuencia que no conlleva la degradación específica de ningún RNAm celular conocido.

3.4. ENSAYOS COMBINADOS CON INHIBIDORES DE PROTEINAS QUINASA

MATERIALES	
INHIBIDORES DE LA PROTEIN-QUINASA	H89, Chelerythrine, Genisteina. Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo, USA
MEDIO DE CULTIVO	Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) libre de suero
TRANSPORTADOR ODN	Lipofectina (Life Technologies, Glasgow, UK) previamente mezclada a temperatura ambiente y en una concentración 1,5µg/ml durante 20 minutos con medio DMEM.
OLIGONUCLEÓTIDOS FOSFOROTIOATO (ODN) PRODUCIDOS PARA SU USO EN HUMANOS	ODN-Clu, Roche Molecular Biochemical, Mannheim, Germany. ODN-Clu: 5'-GCACAGCAGGAGAATCTTCAT-3', complementaria para la secuencia de clusterina. ODN-Clu Control: 5'-GCACAGCAGGAGGATATTCAT-3'
siRNA DUPLEX	sc-43688 (Santa Cruz Biotechnology, USA) complejo que contiene juegos de siRNA diseñados para bloquear de 3 a 5 dianas en la expresión del gen CLU.
siRNA CONTROL	sc-37007 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
REACTIVO TRANSFERENCIA siRNA	FuGene [®] 6 Transfection Reagent (Promega Biotech Iberica, Spain)

MÉTODO	ENSAYO CON INHIBIDORES DE PROTEÍNA-QUINASA	ENSAYO CON INHIBIDORES + ODN	ENSAYO CON INHIBIDORES + siRNA
PASO 1:	Incubación de las líneas celulares del ensayo durante 24 horas a 37°C en medio estándar DMEM junto con las concentraciones dadas de inhibidores: H89 (50nM), Chelerythrine (1,3µM), Genisteina (50µM).	Cultivo de las células en medio DMEM, libre de suero, con 1,5µg/ml de lipofectina y las concentraciones correspondientes de ODN (100nM para el control y 100 nM para clusterina) durante 4 horas en una estufa a 37°C con agitación constante.	Cultivo de las células en medio DMEM, libre de suero, junto con el reactivo de transferencia FuGene y el siRNA 200nM durante 48 horas, a 37°C.
PASO 2:	Para el control, las distintas líneas celulares se incubaron en medio de cultivo estándar, también durante 24 horas a 37°C.	Transcurrido el tiempo, se sustituye el medio con los ODN y la lipofectina por medio estándar y las diferentes dosis de inhibidores.	Dosificación de las concentraciones dadas de inhibidores.
PASO 3:	Transcurrido el tiempo, se comprobó la viabilidad celular mediante conteo en la cámara de Neubauer.	Incubación durante 24h a 37°C.	Incubación durante 24 horas, a 37°C.
		Comprobación de la viabilidad celular mediante conteo en la cámara de Neubauer.	Lectura de resultados mediante conteo en la cámara de Neubauer.

Cada experiencia se repite 2 veces.

Para poder determinar la dosis óptima de estos quimioterápicos, se realizaron ensayos con diferentes concentraciones y tiempos de incubación con el fin de elaborar una curva dosis-respuesta:

INHIBIDOR	CONCENTRACIÓN	TIEMPOS LECTURA
H89	50Nm	0, 8, 24, 48h
Chelerythrine	1,3µM	0, 8, 24, 48h
Genisteina	50µM	0, 8, 24, 48h

3.5. COMPROBACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE CONTAJE POR EXCLUSIÓN

MATERIALES	Cámara de Neubauer 50.000 células/pocillo. Azul tripán.
MÉTODO	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mezcla de un alícuota de 10µl del cultivo de la experiencia correspondiente con 5µl de azul tripán, coloide que se introduce en el interior de las células muertas a través de las roturas en su membrana. 2. Introducción de la muestra por el extremo de la cámara de Neubauer con ayuda de una micropipeta. 3. Colocación de la cámara de Neubauer en un microscopio de contraste de fases o de campo claro. Las células que aparecen de color azul son consideradas como no viables, y por exclusión, se consideran viables las células blancas.

3.5.1. LA CÁMARA DE NEUBAUER

SE TRATA DE UNA GRUESA PLACA DE CRISTAL con forma de portaobjetos, de unos 30-70mm y unos 4mm de grosor utilizada para realizar contajes de células.

PUEDE SER simple, con una porción central, donde se realiza el conteo, dividida en tres partes. **O DOBLE**, el modelo más común, con 2 zonas de conteo, una superior y otra inferior al eje longitudinal de la cámara.

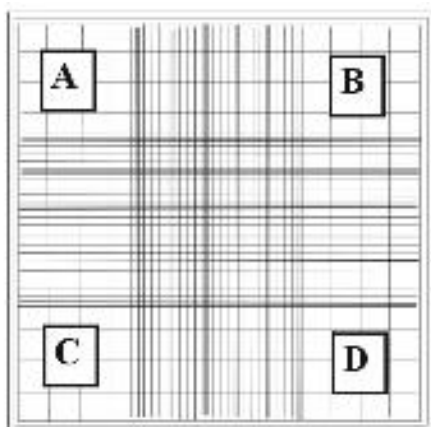


FIG. 3.1 Esquema de una cámara de Neubauer

LA RETÍCULA COMPLETA mide 3mmx3mm de lado y está subdividida en 9 cuadrados de 1mm de lado cada uno. El cuadrado central se divide en 25 cuadrados medianos de 0,2mm de lado y cada uno de estos cuadrados se subdivide a su vez en 16 cuadrados pequeños. El cuadrado central está formado, por tanto, por 400 cuadrados pequeños.

EL CUBREOBJETOS es un cuadrado de cristal de aproximadamente 22mm x 22mm que debe colocarse sobre la cámara de recuento de forma que cubra su parte central, delimitando un espacio entre la cámara y el cubreobjetos de 0,1mm. Para evitar que el cubreobjetos se levante y la distancia sea mayor a 0,1mm, se utilizan dos pinzas especiales que lo sujetan

3.6. COMPROBACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA CLUSTERINA

3.6.1. TÉCNICA RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTION-POLIMERASE CHAIN REACTION)

Esta técnica permite cuantificar la expresión del ARNm

MATERIALES Kit de extracción de ARN *High Pure RNA Isolation, Roche Biochemical, Manheim, Alemania.*

Kit RT-PCR *1st Strand cDNA synthesis kit, Roche Biochemical, Manheim, Alemania.*

PRIMERS (Roche Biochemical Manheim, Alemania):

CLUSTERINA: Cls: 5' GGCGACGATGACCGGACTGT 3'

Clas: 5' GGGACCGTCACAGTGATGGG 3'

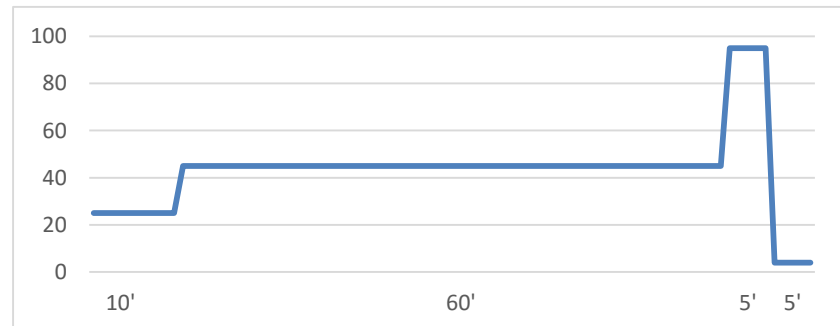
β -ACTINA: cho15: 5' GGCATCGTGATGGACTCCG 3'

cho 16: 5' GCTGGAAGGTGGACAGCGA 3'

PRIMERA FASE: AISLAMIENTO DEL ARN TOTAL METODO DE LA GUANIDINA ISOTIOCIANATO
Resuspensión de un cultivo con 10^7 células en 500 μ g de una solución de guanidina isotiocianato 4M.
Extracción con fenol/cloroformo.
Extracción de 400 μ g de la fase acuosa a un tubo estéril.
Precipitación del ARN con 2,5 μ l de β mercaptoetanol 14,3M.
Tratamiento con ADNsa I (Roche Biochemical, Mannheim, Alemania) durante 2 horas a 37°C para eliminar cualquier posible resto de contaminación por DNA genómico.
Almacenamiento de las muestras a -20°C.

SEGUNDA FASE: OBTENCIÓN DEL ADNc A 5 μ l del ARN aislado previamente, se le añaden 15 μ l de una solución máster elaborada con 2 μ l de tampón buffer 10x (100mM Tris, 500mM KCl, pH 8,3), 4 μ l de MgCl₂ (25mM), 2 μ l de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP 10mM), 2 μ l de primer oligo-p(dT)₁₅, 1 μ l de inhibidor de ARNasa (50 unidades/ μ l).
Enrasado con agua estéril y libre de ARNasa.
Adición de 0,6 μ l de la enzima AMV retrotranscriptasa.
Termociclado de la muestra (Termociclador Perkin Elmer Cetus Model 9600) con los parámetros que se especifican a continuación:

- Desnaturalización durante 10 minutos a 25°C.
- Polimerización durante 60 minutos a 45°C.
- Parada de la polimerización durante 5 minutos a 95°C.
- Parada 5 minutos a 4°C
- Almacenamiento a -20°C.



TERCERA FASE: PCR Por cada 5 μ l de muestra, se preparan de 25 μ l de una solución máster compuesta por Tampón para PCR 10x, MgCl₂ (25mM), dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP 10 mM), agua estéril, 10pM de primer (β -actina o clusterina) y 0,5U de Taq Polimerasa (Roche).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

La amplificación del ADN se realiza en un termociclador GeneAmp 2400 (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA).

AMPLIFICACIÓN CLUSTERINA:

i. Desnaturalización 5 min. a 94°C

30 ciclos:

ii. Desnaturalización 30s a 94°C

iii. Unión del cebador 60s a 64°C

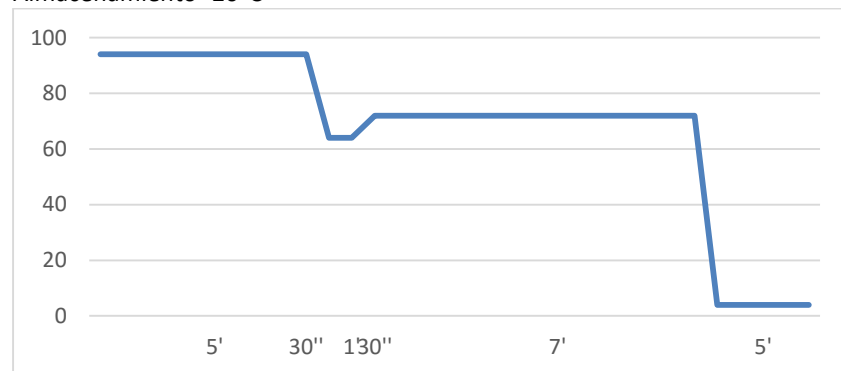
iv. Extensión 30s a 72°C

Elongación:

v. Elongación 7min a 72°C

vi. Finalización 5min a 4°C

Almacenamiento -20°C



AMPLIFICACIÓN β -ACTINA:

i. Desnaturalización 5 min. a 94°C

25 ciclos:

ii. Desnaturalización 30s a 94°C

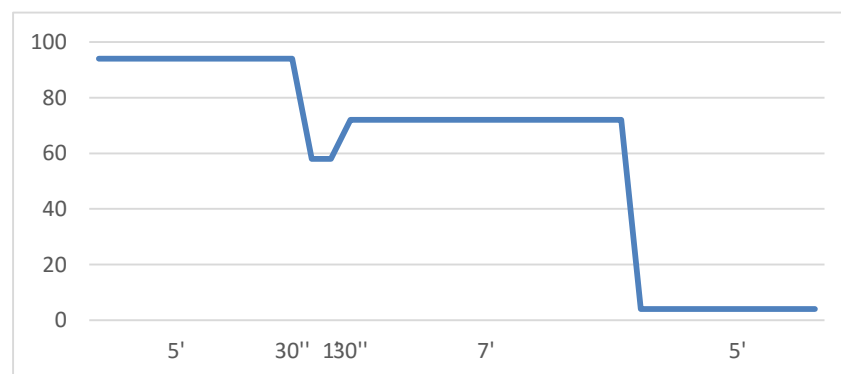
iii. Unión del cebador 60s a 58°C

iv. Extensión 30s a 72°C

v. Elongación 7min a 72°C

vi. Finalización 5min a 4°C

Almacenamiento -20°C



3.6.2. TÉCNICA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La malla porosa formada por la agarosa junto con la aplicación de una corriente eléctrica permite la separación de las moléculas según su tamaño y punto isoeléctrico.

MATERIALES Agarosa 1,5%
 Tampón TBE (Tris Borato EDTA) 10x
 Bromuro de etidio 10mg/ml
 Tampón de carga (azul de bromofenol) 1x
 Marcador de peso molecular interno PM VI (Roche Molecular Biochemical, Mannheim, Alemania) con rango de 154-2176pdb puesto que la proteína clusterina se obtiene a partir de un gen de 428 pares de bases, y la β -actina, a partir de 600).

ELABORACIÓN DEL GEL Echar en un matraz 1,5g de agarosa, 7,5ml de tampón TBE 10x y enrasar con agua destilada hasta 75ml.
 Cubrir con papel de aluminio y calentar hasta la disolución de la agarosa. Dejar enfriar hasta que no queme al tacto, y añadir 15 μ l de bromuro de etidio.
 Agitar manualmente hasta homogeneizar la mezcla.
 Verter en el molde del gel con el peine de 8 pocillos.
 Dejar enfriar a temperatura ambiente.

ELECTROFORESIS Colocar el gel solidificado en la cubeta de electroforesis
 Cubrir con tampón TBE 10x
 Mezclar 10 μ l del producto amplificado con 1 μ l de tampón de carga (azul de bromofenol).
 Cargar las muestras en la zona catódica del gel.
 Someter a una corriente eléctrica de 70V 19A durante 40 minutos.
 Visualización del patrón de migración con un transiluminador ultravioleta.

3. MATERIAL Y METODOS

3.6.3. TÉCNICA WESTERN BLOT

Esta técnica permite la separación, identificación y la cuantificación relativa de la expresión de la proteína clusterina en los extractos celulares tras la realización de cada una de las experiencias.

PRIMERA FASE	Obtención de los EXTRACTOS CELULARES a partir de los cultivos.
OBTENCIÓN EXTRACTOS CELULARES MATERIALES	<p>PBS (Phosphate buffered saline) frío (+2°C).</p> <p>Tampón de lisis (0,5% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 8.0) frío (+2°C).</p> <p>Mezcla de proteasa fresca (0,5mg/ml) para evitar la digestión por parte de las proteasas celulares.</p>
OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CELULARES	<p>Lavado de los cultivos celulares con PBS frío y agitación manual.</p> <p>Desechar el medio y volver a repetir.</p> <p>Volver a añadir PBS a la placa y rascar con una espátula estéril para favorecer la resuspensión de las células.</p> <p>Recoger el sobrenadante con una pipeta y colocar en tubos de microcentrífuga.</p> <p>Centrifugar a 1500rpm durante 5 minutos y desechar el sobrenadante.</p> <p>Añadir 180µl del tampón de lisis frío junto con 20µl de proteinasa K.</p> <p>Incubar durante 30 minutos en hielo.</p> <p>Clarificar el lisado mediante centrifugación durante 10 minutos a 12.000rpm a +4°C.</p> <p>Transferir el sobrenadante conteniendo la mezcla de proteínas a un tubo limpio y estéril y almacenar en frío o congelado a -20°C.</p>
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	<p>Extractos celulares</p> <p>Marcadores</p>
SEGUNDA FASE	SEPARACIÓN de las proteínas en función de peso molecular y movilidad electroforética mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.
CONSIDERACIONES PREVIAS:	<p>El gel de poliacrilamida se forma por copolimerización de la acrilamida y la bis-acrilamida, en una reacción iniciada por la Tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el amonio Persulfato (APS).</p> <p>Los extractos celulares se tratan con el detergente aniónico SDS para conseguir la desnaturalización parcial de las proteínas (sin estructura secundaria ni terciaria, pero sin afectar a los puentes di-sulfuro) con el fin de formar complejos desnaturalizados con una carga negativa más o menos homogénea a lo largo de la cadena polipeptídica y proporcional a su masa. (Se estima que el SDS se una en una proporción aproximada de 1,4g SDS/g proteína).</p>
GEL POLIACRILAMIDA MATERIALES	<p>Agua desionizada</p> <p>Acrilamida/bisacrilamida 40%</p> <p>TBE 10x</p> <p>APS (Amonio Persulfato) 10%</p> <p>TEMED (Tetrametiletiléndiamina)</p> <p>Azul Coomassie R250</p>
ELABORACIÓN DEL GEL SDS-POLIACRILAMIDA	Para preparar 15ml del gel, se utilizan 7,5ml de acrilamida/bisacrilamida, 1,5ml de TBE 10x, 6ml de agua desionizada, 20 µl de APS y 40µl de TEMED.
ELECTROFORESIS GEL POLIACRILAMIDA	<p>Cubrir el gel con el tampón de electroforesis.</p> <p>Someter a una corriente eléctrica de 200V.</p> <p>Tras comprobar que el tampón cubre totalmente el gel, se retira con cuidado el peine y se cargan las muestras (6µl del marcador, seguido por 15µl de las muestras en cada pocillo).</p> <p>Correr el gel hasta que el azul de bromofenol llegue casi al borde inferior del gel (40 minutos aproximadamente).</p>

	<p>Sacar el gel y sumergirlo en fijador durante 15 minutos, en un recipiente tapado para evitar los vapores tóxicos del metanol, con agitación suave. De este modo se lava buena parte del SDS del gel, que podría interferir con la tinción.</p> <p>Teñir el gel durante 1h con azul Coomassie R250.</p>
TERCERA FASE:	DETECCIÓN de la proteína clusterina mediante su unión al anticuerpo específico. Dado que los geles son frágiles y difíciles de manipular y que anticuerpos no son retenidos en éstos, se hace necesario transferir las proteínas a un soporte más adecuado. En este caso, se realizó una electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa, de forma que las proteínas migren hacia el polo positivo de la cámara bajo el efecto de un campo eléctrico.
MATERIAL	<p>Esonja</p> <p>6 hojas de papel de filtro</p> <p>Membrana nitrocelulosa</p> <p>Gel Poliacrilamida con las muestras</p> <p>Cámara de electrotransferencia</p> <p>Tampón de transferencia 25mM Tris, 190 mM Glicina, 20% Metanol</p>
MÉTODO	<p>Mojar el papel de filtro en el tampón de transferencia.</p> <p>El gel y la membrana se ponen en contacto directo y se fijan firmemente, a modo de sándwich, entre varias capas de papel absorbente y las esponjas de la cámara: Esonja – 3 Papeles de filtro – Membrana de nitrocelulosa – 3 Papeles de Filtro.</p> <p>Este complejo se sumerge en la cámara con el gel de transferencia, teniendo cuidado de colocar que la membrana de nitrocelulosa se encuentra entre el gel de poliacrilamida con las muestras y el electrodo positivo.</p> <p>Aplica la corriente eléctrica que permita la migración durante 4h.</p>
CUARTA FASE:	INMUNODETECCIÓN. Permite la visualización de las proteínas adheridas a la membrana mediante su unión a anticuerpos marcados.
MATERIALES	<p>Anticuerpo anti-CLU (Millipore, MA, USA) al 5% en BSA (Bovine Serum Albumina).</p> <p>Anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Millipore, MA, USA) diluido al 5% en el tampón de bloqueo.</p> <p>Anticuerpo control anti-ACTINA (Millipore, MA, USA) al 5% en BSA (Bovine Serum Albumina).</p> <p>Tampón de bloqueo: Leche desnatada diluida al 5% en TBS.</p> <p>Tampón de lavado TBST (Tris-Buffered Saline + Tween 20).</p> <p>Reactivo ECL (Enhanced chemiluminescent).</p>
MÉTODO	<p>Bloqueo de la membrana mediante su incubación durante 1 hora a 4°C. con el tampón de bloqueo.</p> <p>Incubación de la membrana con el anticuerpo primario y el tampón de bloqueo durante 12 horas a 4°C en un agitador.</p> <p>Lavado tres veces con TBST durante cinco minutos en un agitador y a temperatura ambiente.</p> <p>Incubación de la membrana con el anticuerpo secundario conjugado y el tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 90 minutos.</p> <p>Lavado tres veces con TBST durante cinco minutos en agitador y a temperatura ambiente.</p> <p>Cubrir totalmente la membrana con el reactivo ECL e incubación durante 2 minutos.</p> <p>Visualización de resultados.</p> <p>Visualización</p>

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

EL ESTUDIO ESTADÍSTICO se realiza mediante análisis univariante. Este análisis consiste en la comparación de las frecuencias entre dos variables mediante el test χ^2 , o en el caso de que este no proceda (resultados esperados inferiores a 5 en más de un 20% de los casos) mediante el test de Fisher.

LA COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS se realizó mediante el test t-student, una vez

comprobada la normalidad de la variable cuantitativa. En caso de que no se cumpliera esta condición, se procedió a la transformación de la variable.

EL NIVEL DE SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA establecida fue de $p < 0,05$, siendo todos los resultados estadísticos obtenidos mediante el programa de software SPSS.15 (Chicago, IL)

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. RECuentOS AL FINAL DE CADA ENSAYO REALIZADO

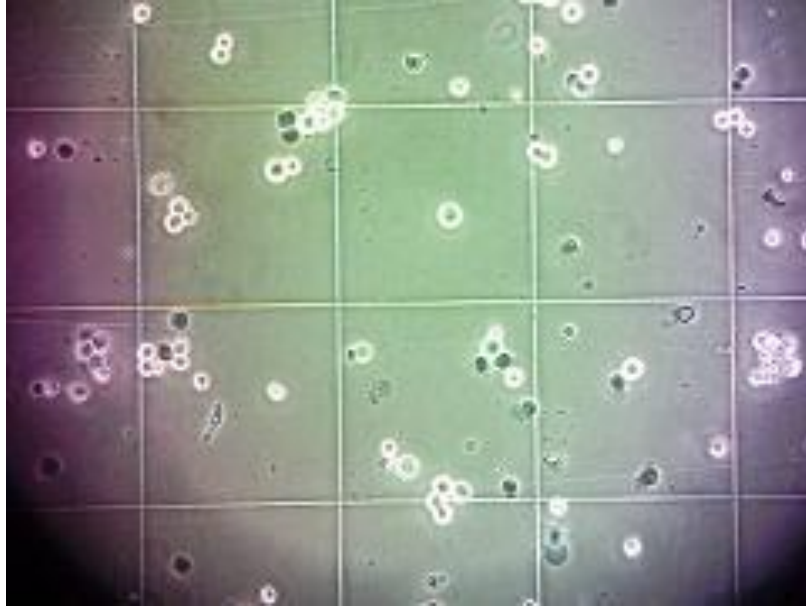
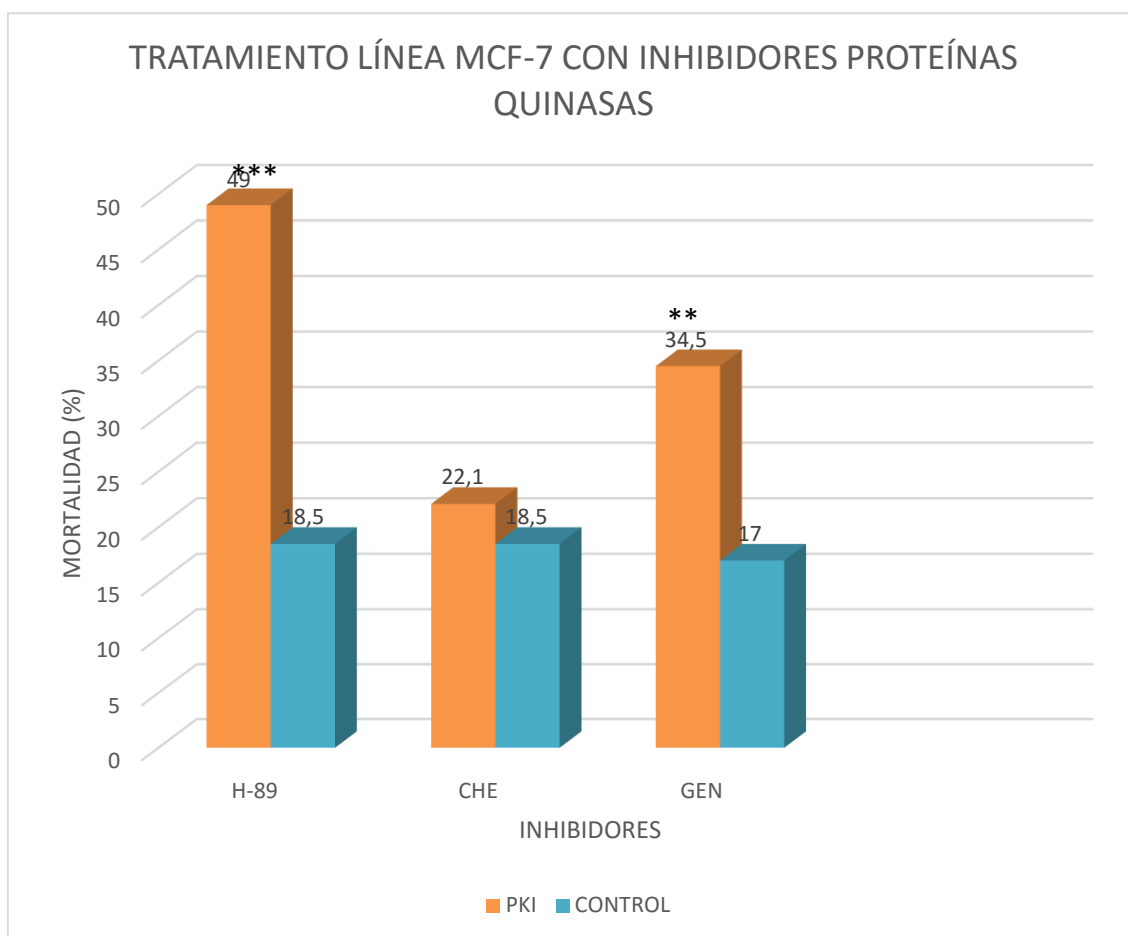


FIG. 4.1 Imagen de la cámara de Neubauer

Mediante microscopía las células no viables aparecen coloreadas de azul mientras que el resto, por exclusión, son consideradas viables.

4.2. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASAS SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR

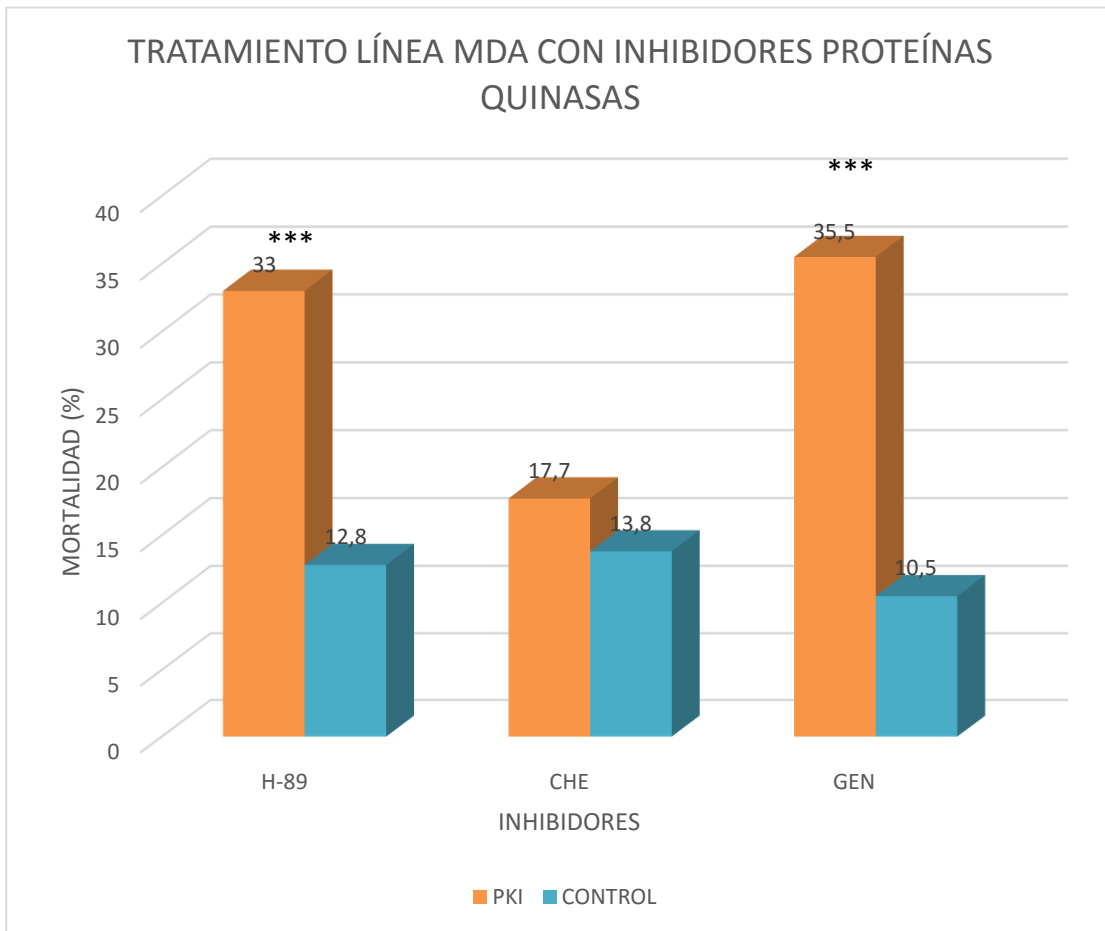


ANÁLISIS ESTADÍSTICO MCF-7			
TRATAMIENTO	CONTROL (%)	INHIBIDOR (%)	P
H-89	18,5±3,3	49,4±4	p<0,001
CHE	18,5±5	22,1±1,7	n.s.
GEN	17±1,1	34,5±3,6	p<0,01

Los resultados representan la media, expresada en forma de porcentaje, de los recuentos obtenidos en tres experiencias diferentes ± el error estándar de la media.
NIVEL DE SIGNIFICANCIA: *<0,05 **<0,01 ***<0,001

FIG. 4.2 Los resultados muestran como, en comparación con el control, los inhibidores de proteínas quinasas H89 (50nM) y Genisteina (50µM) tienen un significativo efecto citotóxico en las células tumorales de la línea MCF-7. Este efecto no es significativo tras el tratamiento con Chelerythrine en una concentración 1,3µM.

4. RESULTADOS

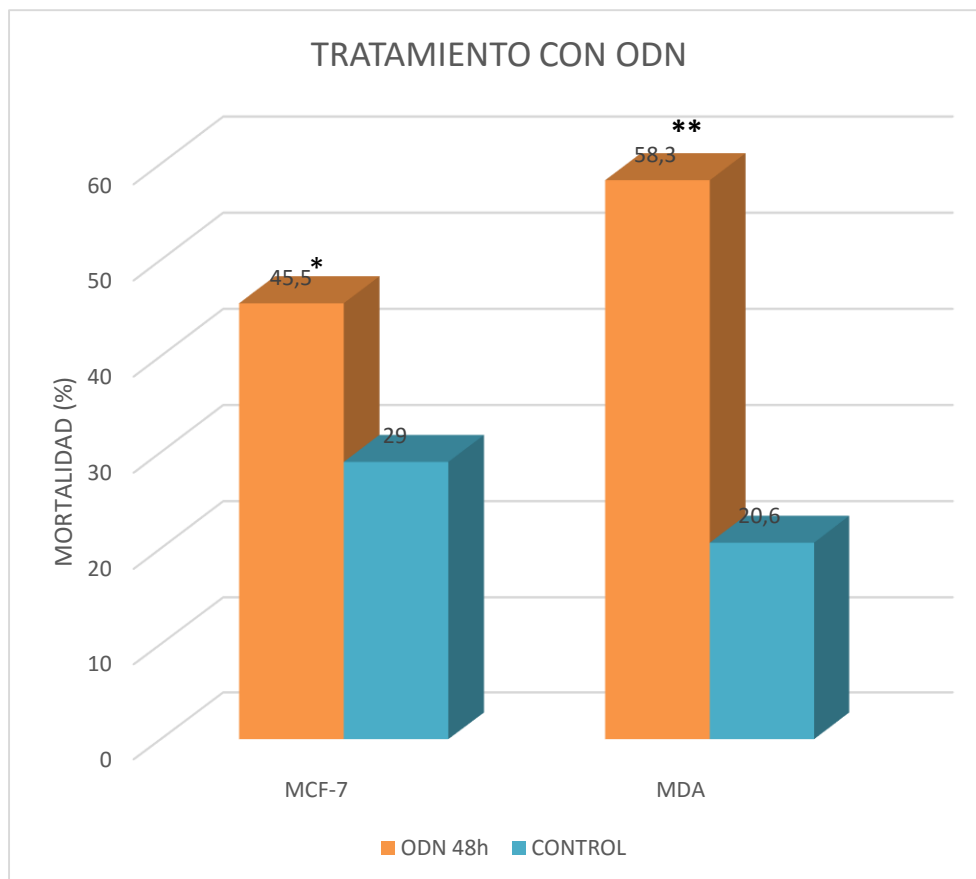


ANÁLISIS ESTADÍSTICO MDA			
TRATAMIENTO	CONTROL (%)	INHIBIDOR (%)	P
H-89	12,8±3,2	33±2	p<0,001
CHE	13,8±3	17,7±3	n.s.
GEN	10,5±3,4	35,5±4,5	p≤0,001

Los resultados representan la media, expresada en forma de porcentaje, de los recuentos obtenidos en tres experiencias diferentes ± el error estándar de la media.
NIVEL DE SIGNIFICANCIA: *<0,05 **<0,01 ***<0,001

FIG. 4.3 Los resultados evidencian que, en comparación con el control, el tratamiento exclusivamente con los inhibidores H89 (50nM) y Genisteina (50µM) producen un significativo efecto citotóxico sobre las células tumorales de la línea MDA. Este efecto no se observa de forma significativa tras el tratamiento con Chelerythrine 1,3µM.

4.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ODN CLUSTERINA SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR

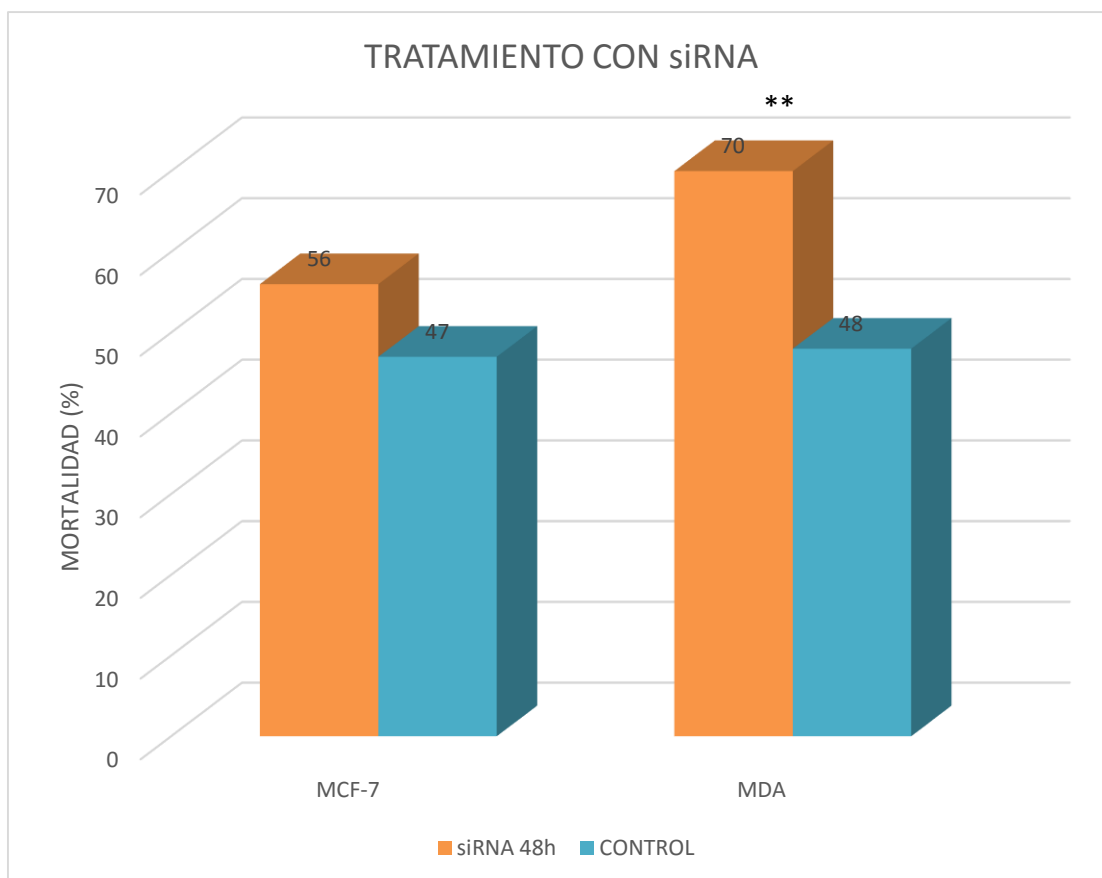


ANÁLISIS ESTADÍSTICO			
LÍNEA	CONTROL (%)	ODN (%)	P
MCF-7	29±3,8	45,5±2,3	p<0,05
MDA	20,6±4	58,3±3,1	P<0,01

Los resultados representan la media, expresada en forma de porcentaje, de los recuentos obtenidos en tres experiencias diferentes ± el error estándar de la media.
NIVEL DE SIGNIFICANCIA: *<0,05 **<0,01 ***<0,001

FIG. 4.4 El tratamiento aislado con los ODN (100nM) presenta un efecto citotóxico significativo en ambas líneas celulares, en comparación con los resultados tras el tratamiento con la secuencia control (100nM).

4.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON siRNA CLUSTERINA SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR



ANÁLISIS ESTADÍSTICO			
TRATAMIENTO	CONTROL siRNA (%)	siRNA (%)	P
MCF-7	41±6	56±10	n.s.
MDA	48±0	70±2	p<0,01

Los resultados representan la media, expresada en forma de porcentaje, de los recuentos obtenidos en tres experiencias diferentes ± el error estándar de la media.
NIVEL DE SIGNIFICANCIA: *<0,05 **<0,01 ***<0,001

FIG. 4.5 Los resultados muestran que el tratamiento aislado con el siRNA específico para clusterina en una concentración 200nM no aumenta de forma significativa, comparación con el control, la muerte de las células de la línea MCF-7. En el caso de la línea MDA-MB-231, dicho efecto sí es significativo.

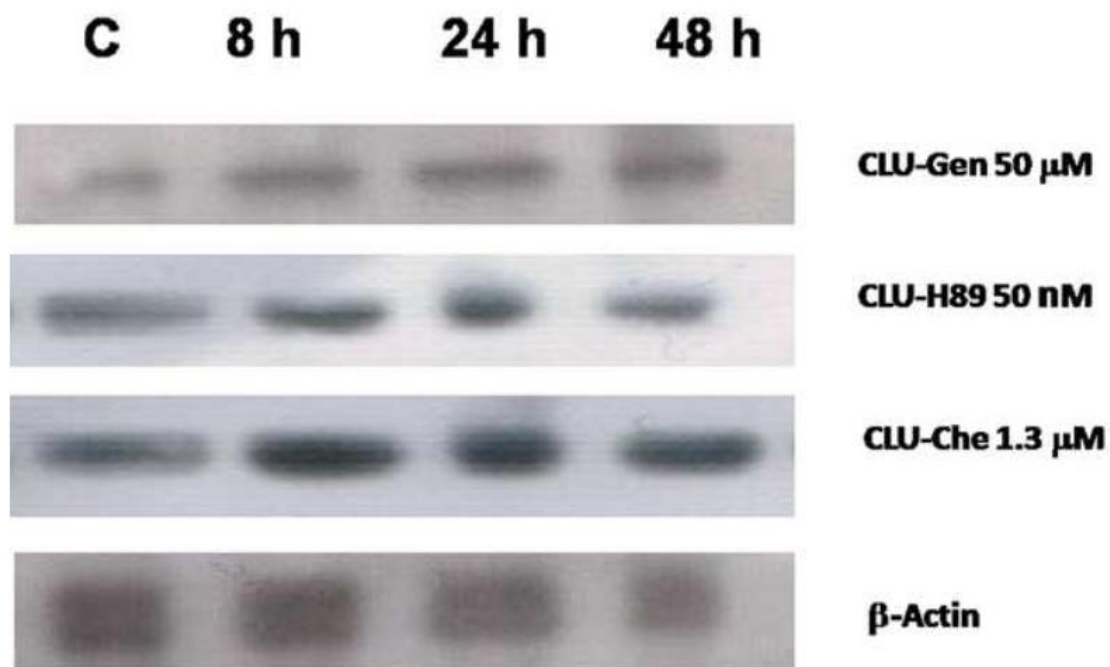
4.5. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEINAS QUINASAS SOBRE LA EXPRESIÓN LA CLUSTERINA

FIG. 4.6 El ensayo de Western-Blot a diferentes tiempos (0, 8, 24 y 48h) tras el tratamiento con los inhibidores enzimáticos elegidos (Genisteina 100μM, H89 50nM y Chelerythrine 1,3 μM) evidencia que la forma secretora de la clusterina (CLU-s) se sobreexpresa de forma máxima tan pronto como tras 8h de tratamiento y que este efecto se mantiene después de las 48h en la línea MDA.

4.6. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA

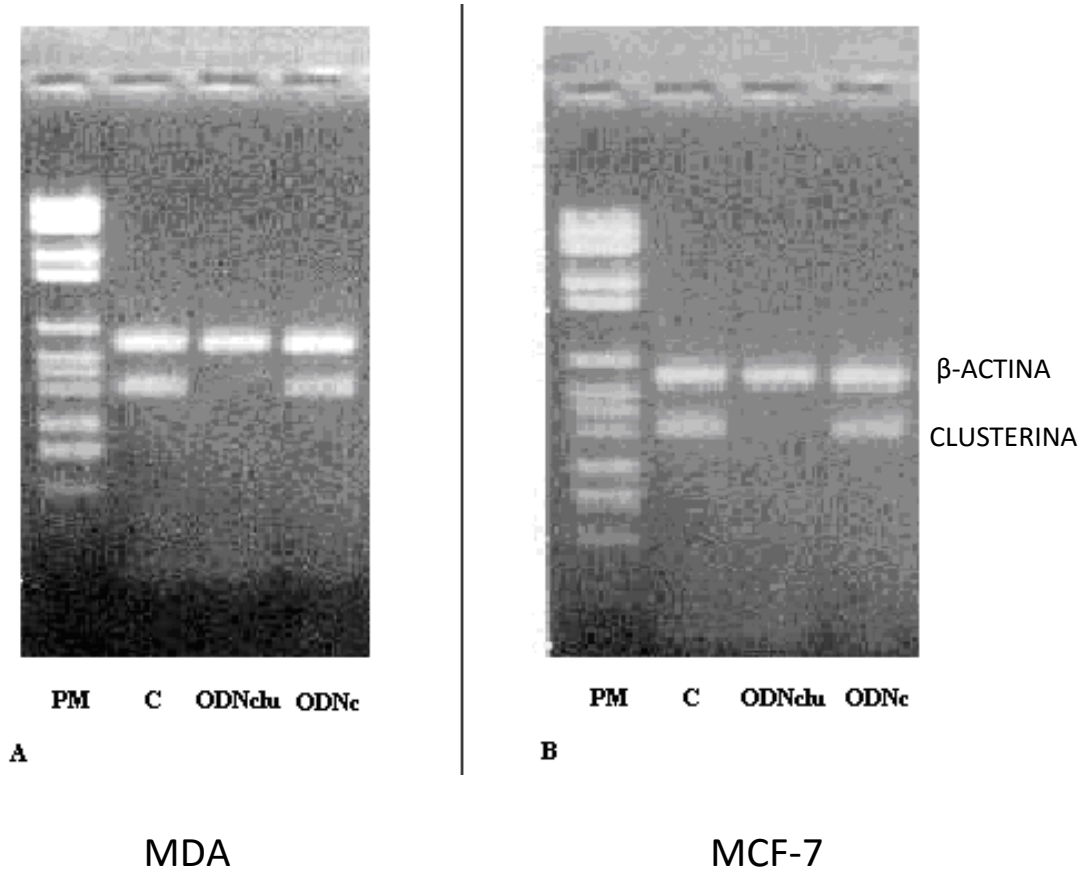


FIG. 4.7 La reacción de la retrotranscriptasa inversa muestra una fuerte disminución del ARNm de la clusterina tras el tratamiento con los ODN específicos de clusterina (ODNclu), en comparación con la expresión basal (C) y con el tratamiento con la secuencia control (ODNc).

PM: Peso Molecular.

4.7. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON siRNA SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA

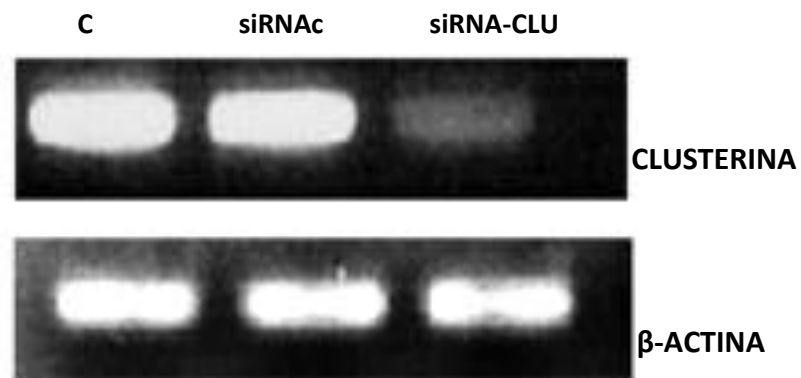
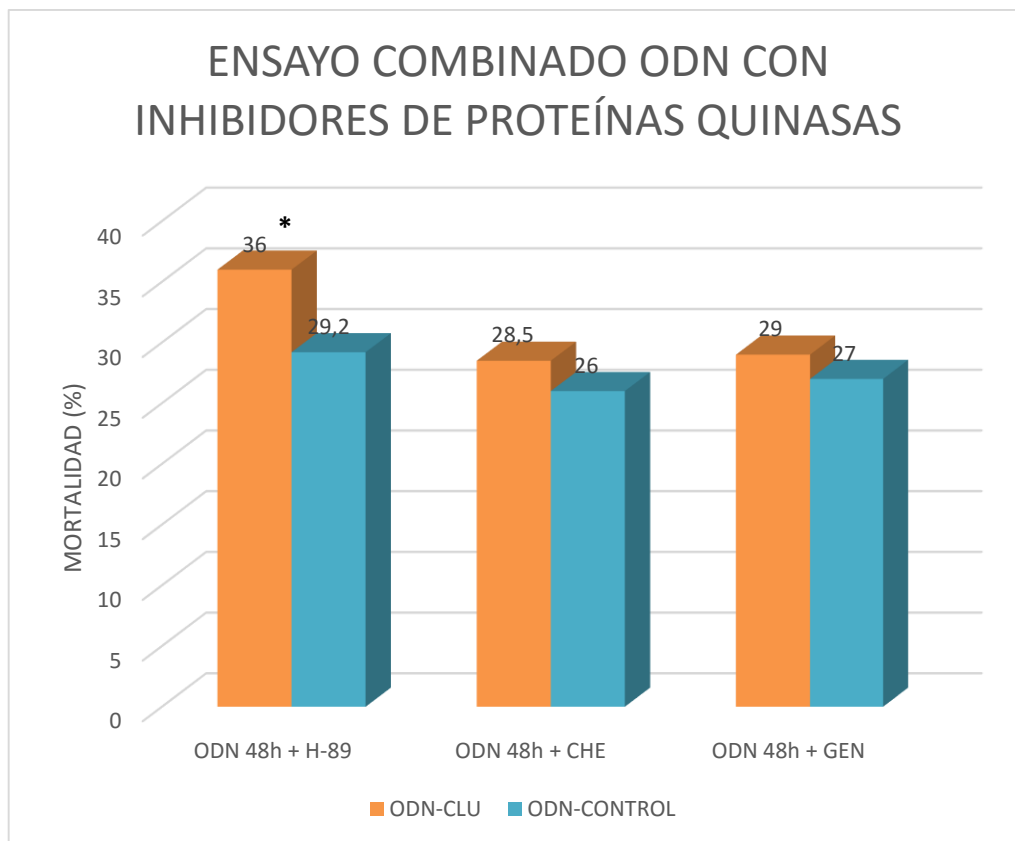


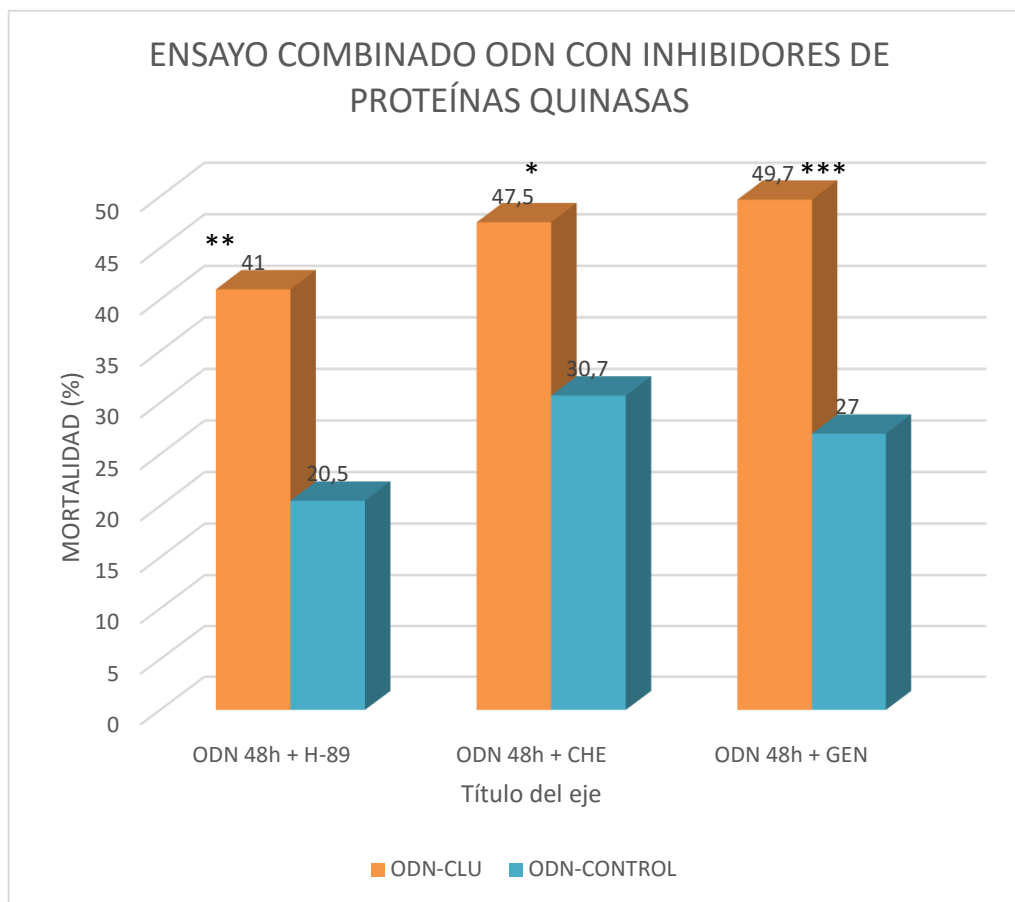
FIG. 4.8 El nivel de ARNm de clusterina tras su amplificación mediante la técnica de RT-PCR disminuye notablemente como muestra la electroforesis en gel de agarosa después del tratamiento con el siRNA específico para clusterina (siRNA-CLU), en comparación con las células cultivadas en medio normal (C) y el control positivo, β -actina.

4.8. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS COMBINADOS DE INHIBIDORES DE CLUSTERINA JUNTO CON INHIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASAS



ANÁLISIS ESTADÍSTICO MCF-7				
ODN-Clu (%)	TRATAMIENTO	ODN-Control + PKI (%)	ODN-Clu + PKI (%)	P
19,7±11,9	H-89 50nM	29,2±1,9	36±1,4	P<0,05
	CHE 1,3µM	26±1,5	28,5±1	N.S.
	GEN 50µM	27±1,8	29±2	N.S.
Los resultados representan la media, expresada en forma de porcentaje, de los recuentos obtenidos en tres experiencias diferentes ± el error estándar de la media. El valor de p se refiere a los valores de las dos columnas previas. NIVEL DE SIGNIFICANCIA: *<0,05 **<0,01 ***<0,001				

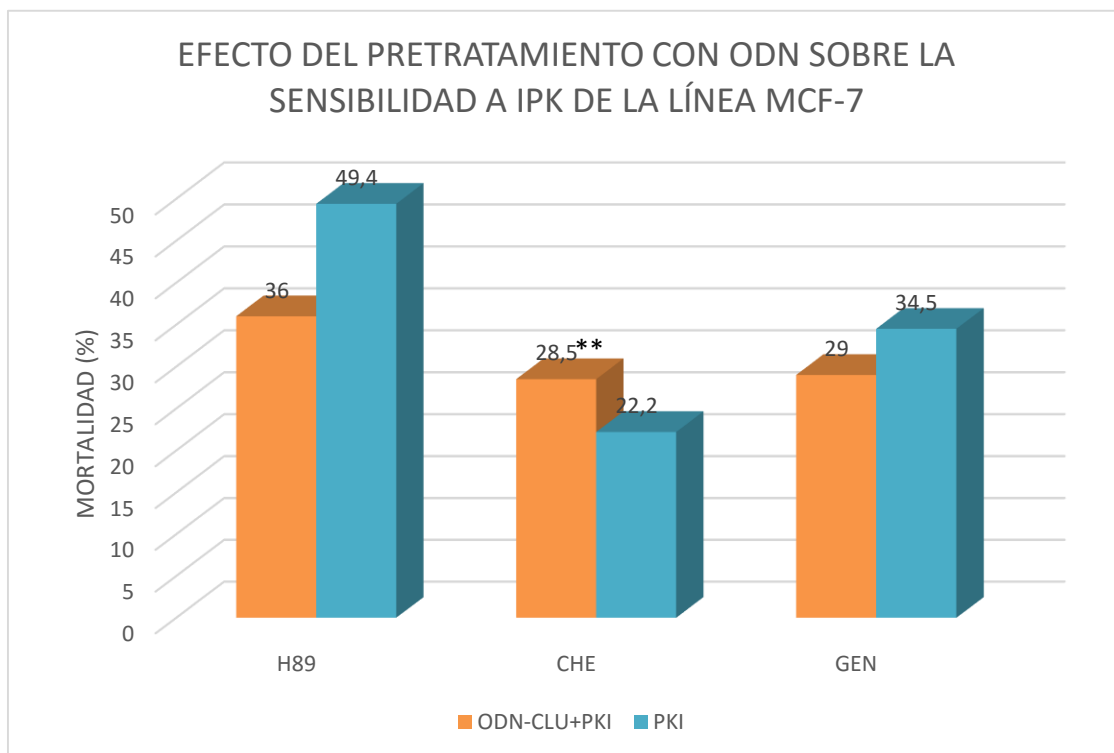
FIG. 4.9 Los resultados muestran como el único tratamiento combinado con ODN-CLU (100nM) que presenta un efecto significativo sobre la muerte de las células tumorales de la línea MCF-7, en comparación con el tratamiento con la secuencia control de ODN-CLU (100nM), es el realizado junto con el inhibidor de proteínas quinasas H-89.



ANÁLISIS ESTADÍSTICO MDA					
LÍNEA CELULAR	ODN-Clu (%)	TRATAMIENTO	ODN-Control + PKI (%)	ODN-Clu + PKI (%)	P
MDA	12,1±11,8	H-89	20,5±2,1	41±1,8	p<0,01
		CHE	30,7±1,7	47,3±7,5	p<0,05
		GEN	27±1	49,7±4,3	p≤0,001
Los resultados representan la media, expresada en forma de porcentaje, de los recuentos obtenidos en tres experiencias diferentes ± el error estándar de la media. El valor de p se refiere a los valores de las dos columnas previas. NIVEL DE SIGNIFICANCIA: *<0,05 **<0,01 ***<0,001					

FIG. 4.10 Los resultados muestran como el tratamiento previo de las células de la línea tumoral MDA-MB-231 con ODN-CLU (100nM) tiene un efecto significativo sobre la mortalidad, en comparación con el tratamiento con la secuencia control ODN (100nM) tanto para el inhibidor de proteínas quinasas H-89 50nM, como para el Chelerythrine 1,3µM y la Genisteina 50µM.

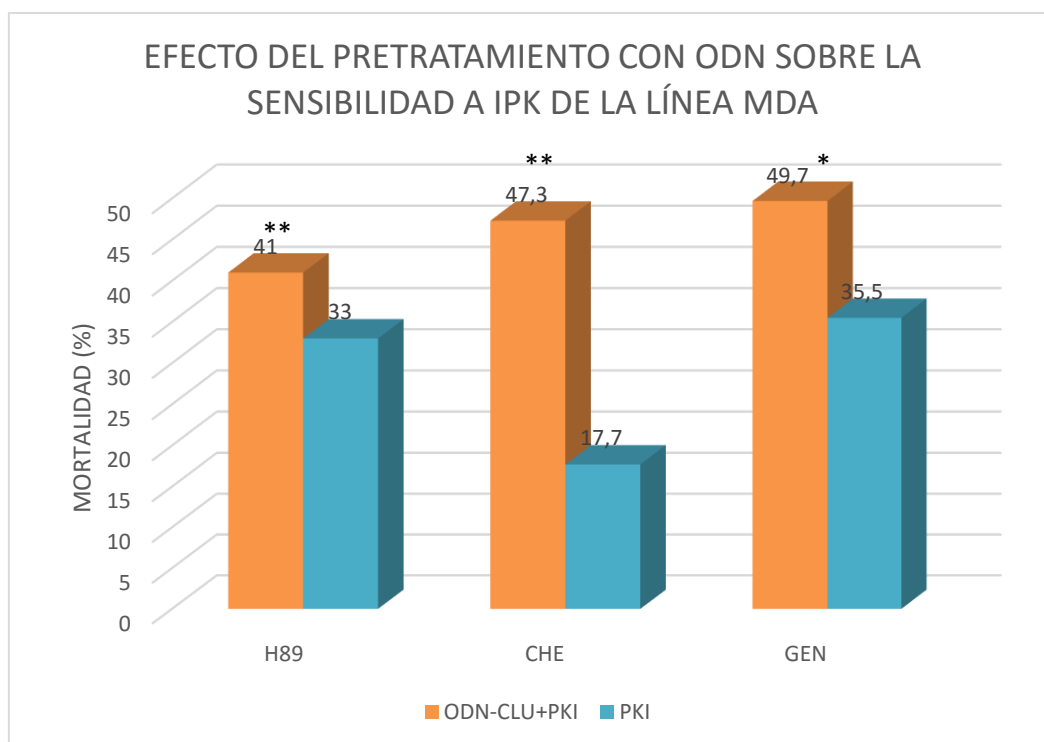
4. RESULTADOS



ANÁLISIS ESTADÍSTICO MCF-7			
TRATAMIENTO	ODN-CLU + INHIBIDOR (%)	INHIBIDOR (%)	P
H-89	36±1,4	49,4±4	n.s.
CHE	28,5±1	22,1±1,7	p<0,01
GEN	29±2	34,5±3,6	n.s.

Los resultados representan la media, expresada en forma de porcentaje, de los recuentos obtenidos en tres experiencias diferentes ± el error estándar de la media.
NIVEL DE SIGNIFICANCIA: *<0,05 **<0,01 ***<0,001

FIG. 4.11 Los resultados muestran como, en comparación con el tratamiento exclusivo con los inhibidores de proteínas quinasas H-89 (50nM), Chelerythrine (1,3µM) y Genisteina (50µM), el tratamiento previo de la línea tumoral MCF-7 con ODN-CLU (100nM) en combinación con el inhibidor Chelerythrine aumenta de forma significativa la mortalidad celular.

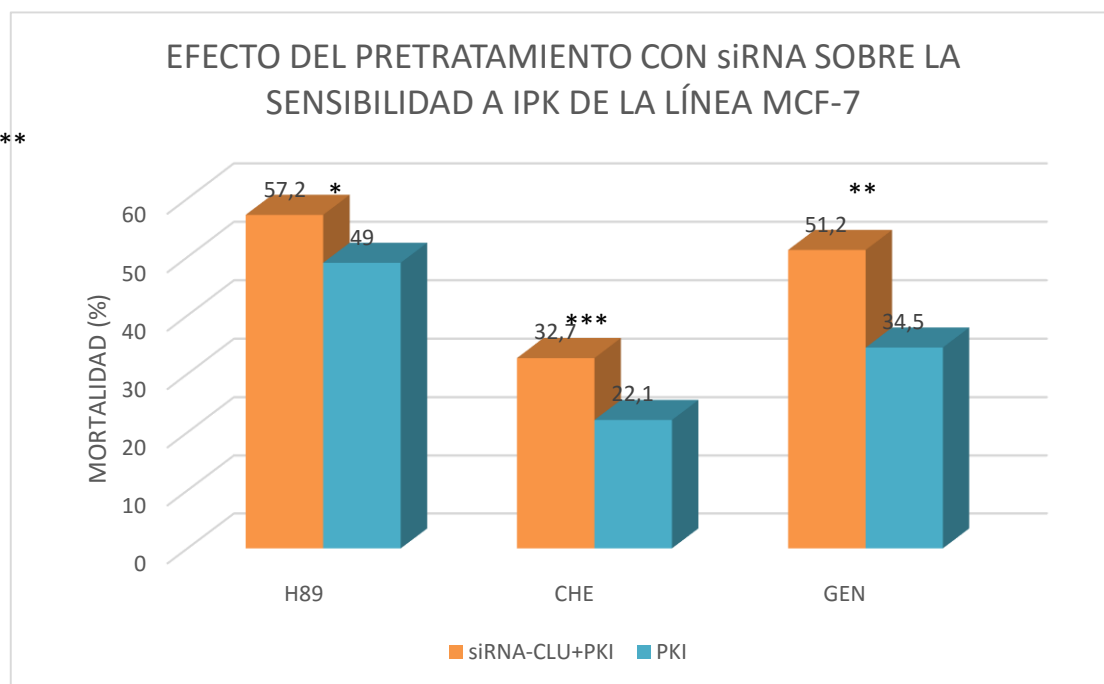


ANÁLISIS ESTADÍSTICO MDA			
TRATAMIENTO	ODN-CLU + INHIBIDOR (%)	INHIBIDOR (%)	P
H-89	41±1,8	33±2	p<0,01
CHE	47,3±7,5	17,7±3	p<0,01
GEN	49,7±4,3	35,5±4,5	p<0,05

Los resultados representan la media, expresada en forma de porcentaje, de los recuentos obtenidos en tres experiencias diferentes ± el error estándar de la media.
NIVEL DE SIGNIFICANCIA: *<0,05 **<0,01 ***<0,001

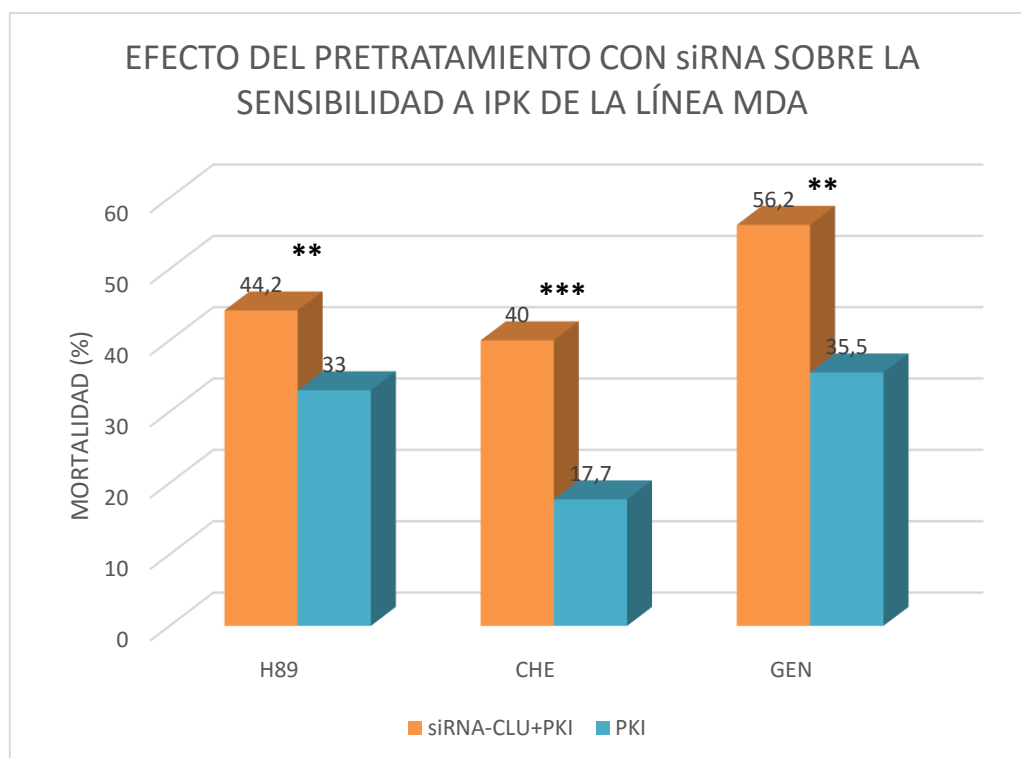
FIG. 4.12 Los resultados muestran como, en comparación con el tratamiento exclusivo con los inhibidores de proteínas quinasas H-89 (50nM), Chelerythrine (1,3µM) y Genisteina (50µM), el tratamiento previo de las células de la línea tumoral MDA-MB-231 con ODN-CLU (100nM) aumenta de forma significativa la mortalidad.

4. RESULTADOS



EFFECTOS DEL TRATAMIENTO COMBINADO CON siRNA Clu Y PKI				
LÍNEA MCF-7				
LÍNEA CELULAR	TRATAMIENTO	PKI (%)	PKI+siRNA (%)	P
MCF-7	H-89	49,4±4	57,2±1,04	p<0,05
	CHE	22,1±1,7	32,7±1	p<0,001
	GEN	34,5±3,6	51,2±2,17	p<0,01
Los resultados representan la media, expresada en forma de porcentaje, de los recuentos obtenidos en tres experiencias diferentes ± el error estándar de la media. NIVEL DE SIGNIFICANCIA: *<0,05 **<0,01 ***<0,001				

FIG. 4.13 Los resultados evidencian que el tratamiento previo de las células de la línea tumoral MCF-7 con siRNA para clusterina 200nM tiene un efecto citotóxico significativo en comparación con el tratamiento exclusivamente con los inhibidores H-89 50nM, Chelerythrine 1,3µM y Genisteina 50µM.



EFFECTOS DEL TRATAMIENTO COMBINADO CON siRNA Clu Y PKI LÍNEA MDA			
TRATAMIENTO	PKI (%)	PKI+siRNA (%)	P
H-89	33±2	44,2±2,6	p<0,01
CHE	17,7±3	40±2,6	p<0,001
GEN	35,5±4,5	56,25	p<0,01

Los resultados representan la media, expresada en forma de porcentaje, de los recuentos obtenidos en tres experiencias diferentes ± el error estándar de la media.
NIVEL DE SIGNIFICANCIA: *<0,05 **<0,01 ***<0,001

FIG. 4.14 Los resultados evidencian que el tratamiento previo de las células de la línea tumoral MDA-MB-231 con siRNA para clusterina 200nM tiene un efecto citotóxico significativo en comparación con el tratamiento exclusivamente con los inhibidores H-89 50nM, Chelerythrine 1,3µM y Genisteina 50µM

4. RESULTADOS

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASAS SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR

LAS MODIFICACIONES POST-TRANSDUCCIONALES, como la fosforilación reversible por acción de las proteínas quinasas, constituyen un proceso fundamental en la regulación de la actividad de las proteínas, pudiendo afectar a un 3% de todas las proteínas celulares.

LAS PROTEÍNAS QUINASAS tienen una amplia variedad de sustratos, desde proteínas estructurales, hasta enzimas metabólicas, reguladoras del ciclo celular y factores de transcripción, por lo que, junto con las proteínas fosfatasa, forman parte activa en las principales rutas metabólicas de las células controlando procesos tales como la proliferación, diferenciación, supervivencia celular, migración o angiogénesis. [1]

EN LOS ÚLTIMOS AÑOS, distintos estudios han puesto de manifiesto que diferentes tipos de cáncer tienen una base molecular común, que afecta de algún modo a la actividad normal de las proteínas quinasas. Como resultado, estos fallos originan una transmisión anormal de las señales, y la desregulación de los procesos anteriormente mencionados. [2-3]

EN LA ACTUALIDAD, las estrategias convencionales en el tratamiento del cáncer se basan en la combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia. No obstante, esta base molecular común a distintos tipos de cáncer, con una proteína quinasa disfuncional, ha provocado que en los últimos años los esfuerzos se centren en el desarrollo de inhibidores específicos para estas enzimas como base de nuevos tratamientos. [4]

ESTAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN se basan en el hecho de que, al tener un ancestro común, todas las proteínas quinasas tienen el mismo mecanismo catalítico que incluye un sitio de unión de la proteína sustrato, un sitio de unión para el ATP y un sitio de catálisis de la reacción de fosforilación [5] y en que el grado de conservación de los sitios de unión del ATP en las diferentes proteínas quinasas no es absoluto, siendo posible el desarrollo de sustancias altamente selectivas.

EL RASTREO DE GRANDES COLECCIONES de sustancias químicas naturales o sintéticas está dando como resultado el hallazgo de distintas sustancias que se unen al sitio de unión de las proteínas quinasas con una afinidad y especificidad mucho mayor que el ATP. Tras comprobarse tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* su efecto citotóxico e inhibidor del crecimiento celular, estas sustancias se han convertido en la base de nuevos tratamientos para diversos tipos de cáncer.

PARA EL PRESENTE ESTUDIO, se eligieron el H-89, la Genisteína y el Chelerythrine por presentar diferentes puntos de acción dentro de las rutas metabólicas de las proteínas quinasas. Así, mientras el Chelerythrine es un inhibidor de las isoformas A y B de la proteína quinasa C (PK-C) [6], H89 es un inhibidor de varios miembros de la proteína quinasa A (PK-A) en un proceso que a fecha de hoy no está demasiado claro y por último, la Genisteína, inhibe la tirosina quinasa (TK). El efecto significativo de estas tres sustancias sobre la supervivencia y proliferación de las células tumorales está avalado por los resultados

obtenidos en diversas publicaciones científicas. [6-11]

LAS PROTEÍNAS QUINASAS A PK-A incluyen a una familia de serina/treonina quinasas involucradas con la regulación del metabolismo del glucógeno, glucosa y lípidos en un proceso dosis-dependiente de AMPc. Cuando la concentración de AMPc es alta, cada una de las dos subunidades de la PKA puede unirse a dos moléculas de AMPc, lo que provoca un cambio conformacional que expone el sitio activo de la enzima. Este sitio activo, en un proceso dependiente de ATP, puede fosforilar a otras enzimas sustrato con distintos resultados dependiendo del tipo celular: desde la vasodilatación en los miocitos, hasta la gluconeogénesis en los hepatocitos, lipólisis en adipocitos. Las proteínas quinasas A que se han relacionado con la inestabilidad celular y la tumorigénesis están localizadas en el centrosoma y conllevan una remodelación anormal de la cromatina durante la mitosis. Las proteínas quinasas A también están involucradas con la regulación de la proliferación celular ya que interactúan con factores de transcripción como Raf-Ras que regulan la concentración de AMPc en el interior de la célula. Las cascadas de PKA también son necesarias para la correcta regulación de la función de las ciclinas. [12]

LA FAMILIA DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS C (PCK) incluye al menos 11 serina/treonina proteínas quinasas relacionadas con la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Todos los miembros de este grupo contienen un dominio regulatorio terminal con un sitio COOH-catalítico con capacidad de unión al ATP y al sustrato así como sitios de autofosforilación. [6]. La inhibición de las proteínas quinasas por el Chelerythrine induce la apoptosis por medio de la

activación de la cascada de señalización de las ceramidas, que incluyen la activación de una esfingomielinasa neutral, la acumulación de ceramida y la depleción de esfingomielina. Al contrario que otros inhibidores de proteínas quinasas, el Chelerythrine no inhibe otras quinasas ni activa la fosfolipasa D en las concentraciones a las cuales induce la apoptosis, sino que inhibe de forma altamente selectiva a las isoformas A y B de la proteína quinasa C en un proceso independiente de ATP.

LAS TIROSINAS QUINASAS son un grupo de más de 100 enzimas que pueden fosforilar un residuo de tirosina de una proteína sustrato para su activación/desactivación. Algunas tirosinas quinasas actúan como receptores de membrana, siendo parte fundamental en la transmisión de señales extracelulares hacia el citoplasma. La Genisteina inhibe de forma eficaz las tirosinas quinasas receptor. En el interior de la célula, también se ha visto que pueden inhibir a la ADN topoisomerasa II así como la ruta de señalización β -1 del factor de crecimiento de transformación (TGF). [13]

LÍNEA MCF-7

LOS RESULTADOS DEL ENSAYO de exposición de las células tumorales de la línea MCF-7 a los tres inhibidores de proteínas quinasas a las dosis elegidas, elegidos pone de manifiesto un significativo efecto citotóxico del H-89 (50nM) y de la GENISTEÍNA (50 μ M), no evidenciándose dicho efecto en el caso de la exposición al CHELERYTHRINE (1,3 μ M).

LÍNEA MDA

LOS RESULTADOS DEL MISMO ENSAYO realizado con la línea MDA evidencian un significativo efecto citotóxico de los inhibidores de proteínas quinasas H-89 y

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

GENISTEÍNA, no demostrándose para el CHELERYTHRINE.

AUNQUE LA INHIBICIÓN SELECTIVA de las proteínas quinasas C desencadena la apoptosis en la mayoría de las células de mamíferos, aún se detectan diferencias en la sensibilidad de distintos tipos celulares.

LA RESISTENCIA ENCONTRADA para ambas líneas celulares frente al Chelerythrine sugieren que en el caso de las líneas celulares MFC-7 y MDA-MB-231, la proliferación celular no depende de las isoformas A o B de la proteína quinasa C y sí de las tirosinas quinasas y proteínas quinasas A. Este hallazgo está apoyado por los obtenidos por los ensayos realizados en otros grupos de investigación. [14]

CABE AÑADIR que el efecto citotóxico de la Genisteina es dosis-dependiente, es decir, que cuando se emplean dosis elevadas, se inhibe el crecimiento de las células, mientras que a dosis bajas se puede estimular la proliferación de células tumorales de mama con receptores de estrógenos (ER α -positive). [10]

CON EL FIN DE EVITAR este posible efecto sobre la línea MCF-7, que es hormono dependiente, en nuestros ensayos se emplearon altas dosis de Genisteina. No obstante, no podemos saber si esta sustancia pudo activar de forma temprana los receptores de estrógenos ER α , afectando de algún modo la expresión de la clusterina y, por tanto, la supervivencia celular. [11]

5.3. EFECTO DE LOS INHIBIDORES LA CLUSTERINA SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR

LA CLUSTERINA es una proteína altamente conservada en distintas especies y que se ha detectado en una gran variedad de tejidos. Se trata de una proteína multifuncional, abarcando funciones en la célula tales como el transporte lipídico, agregación proteica, adhesión celular, cascada del complemento y apoptosis. [15]

SE HAN IDENTIFICADO tres isoformas de la clusterina cuya actividad está relacionada con la regulación de la apoptosis celular: La Isoforma 1, o isoforma nuclear CLUn; la isoforma 2, o isoforma secretora CLUs y la isoforma 11036, isoforma citoplasmática o CLUc. [16]

MIENTRAS QUE LA ISOFORMA SECRETORA tiene una función citoprotectora, las isoformas intracelulares, esto es, la clusterina citoplasmática y la clusterina nuclear promueven la muerte celular o apoptosis. [16]

ESTA ACTIVIDAD ANTIAPOPTÓTICA fue puesta de manifiesto por nuestro grupo de investigación en el año 2000, al encontrarse una relación directa entre la expresión de clusterina secretora y la actividad antiapoptótica en el cáncer de mama y laringe. [17-18]

LA CLUSTERINA ES CONSIDERADA un marcador tumoral con capacidad para modular la supervivencia de la célula cancerosa mediante la inhibición directa de la apoptosis o por la activación de factores anti-apoptóticos.

ESTE PAPEL CITOPROTECTOR de la clusterina secretora se basa en la inhibición de distintas rutas que activan la apoptosis celular, tales como el bloqueo de la acción

de la proteína Bax sobre la membrana mitocondrial, el secuestro de NF- κ B en el citoplasma para evitar la activación de los genes regulados por NF- κ B y la activación de varias rutas metabólicas controladas por proteínas quinasas y estrechamente relacionadas con la angiogénesis. [19-24]

ASÍ, DADO QUE LA SOBREENPRESIÓN de la clusterina junto con su función citoprotectora se relaciona estrechamente con la progresión y resistencia de distintos tipos de cáncer, en los últimos años se están desarrollando inhibidores específicos de esta proteína para potenciar el efecto citotóxico de la quimioterapia convencional.

ENTRE LOS INHIBIDORES específicos para clusterina se encuentran el ARN de interferencia pequeño, o siRNA, y los oligonucleótidos antisentido, u ODN.

EN LAS CÉLULAS VIVAS NORMALES, las moléculas de ARN de interferencia o RNAi, del inglés *RNA interference*, son una herramienta fundamental en la defensa de las células contra las infecciones virales, ya que inhiben la traducción y promueven la destrucción de forma amplificada de las secuencias de ARN bicatenario o dsRNA *double strand RNA* virales. [24]

EN EL LABORATORIO, las moléculas de RNAi se utilizan para inhibir de forma eficaz la expresión de un determinado gen, consiguiendo su silenciamiento.

EL MECANISMO DE RNAi se inicia cuando, tras la entrada de un *dsARN* en la célula, la enzima DICER produce su fragmentación y degrada la hebra sentido e incorpora la hebra antisentido al complejo RISC, que se

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

encarga de localizar el ARNm complementario y degradarlo de forma selectiva.

LA HEBRA ANTISENTIDO unida a una ARN-polimerasa dependiente de ARN, puede aparearse con un ARNm complementario y servir de molde para la síntesis de una nueva molécula de dsRNA.

DADO QUE ESTE PROCESO se realiza en repetidos ciclos de degradación específica, el resultado es el silenciamiento amplificado de la expresión del gen correspondiente, aunque en la mayoría de los casos, el silenciamiento no es completo, sino que el resultado es una reducción de la expresión o *knock-down*.

EN LOS ÚLTIMOS AÑOS se han diseñado RNAi para aproximadamente el 99% de los genes que codifican para proteínas en humanos y ratón.

OTRO MÉTODO EFICAZ para conseguir el silenciamiento de un determinado gen consiste en el uso de los ODN, cortas moléculas de ADN de una sola hebra que pueden hibridar con una única secuencia diana de ARNm, promoviendo su degradación por las ARNasas citoplasmáticas o incluso bloqueando la acción de los ribosomas, resultando en una inhibición de su traducción a proteínas. [26]

TRATAMIENTO CON ODN

LOS ENSAYOS REALIZADOS evidencian que, en comparación con los resultados del tratamiento con la secuencia ODN-control, el tratamiento con ODN específicos para clusterina inhibe de forma significativa la supervivencia de ambas líneas celulares, siendo ésta significancia mayor en el caso de la línea MDA-MB-231.

TRATAMIENTO CON siRNA

EN COMPARACIÓN con los resultados tras el tratamiento con la secuencia control, el tratamiento con siRNA específicos para clusterina, únicamente ejerce un efecto citotóxico significativo en la línea MDA-MB-231.

LA MAYOR SIGNIFICANCIA en la mortalidad de las células pertenecientes a la línea MDA-MB-231, donde la clusterina se expresa de forma constitutiva, se debe al bloqueo específico de la expresión de ésta proteína y, por tanto, al bloqueo de su papel citoprotector. [27]

EN EL CASO DE LA línea MCF-7, donde la de la expresión de la proteína clusterina es inducida, presentando una baja expresión de la misma en condiciones basales, este efecto citotóxico es mucho menos significativo.

5.4. EFECTO DE INHIBIDORES DE PROTEINAS QUINASAS SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA

LA CLUSTERINA se sobreexpresa como respuesta inespecífica a diversas condiciones de estrés celular como quimioterapia citotóxica, radiación, exceso de radicales oxígeno libre o carencia de andrógenos o estrógenos, aumentando la resistencia de la célula y su supervivencia. [16]

ESTA INVESTIGACIÓN pone en evidencia por primera vez que los inhibidores de proteínas quinasas Chelerythrine, H-89 y Genisteina producen la misma respuesta en las líneas tumorales de mama MDA-MB-231 y MCF-7, induciendo un significativo

aumento en la expresión de la proteína clusterina.

ESTOS DESCUBRIMIENTOS corroboran la hipótesis de que la clusterina secretora está implicada en la supervivencia celular dentro de un medio hostil y que representa una adquisición fenotípica que facilita la invasión local y la diseminación de las células tumorales, lo que puede explicar la resistencia observada en los estudios *in vivo* de las células tumorales de casos avanzados frente a las terapias basadas exclusivamente en quimioterapia convencional. [17-18]

5.5. EFECTO DE LOS ODN Y siRNA SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA

LOS RESULTADOS CONSTATAN que según lo esperado, tanto el tratamiento con ODN-CLU como siRNA-CLU inhiben de forma eficiente la expresión de la proteína clusterina en ambas líneas celulares.

5.6. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS PREVIOS CON ODN O siRNA

EN LOS ÚLTIMOS AÑOS diferentes estudios han confirmado un significativo aumento de la mortalidad celular tras el tratamiento combinado de ODN para clusterina junto con otros tratamientos convencionales, como en el caso del aumento de la sensibilidad a la radioterapia en cáncer de próstata [28-29]; la reducción en el crecimiento tumoral y la regresión vascular responsable de la metástasis del carcinoma de pulmón [30] o el incremento de la apoptosis en líneas celulares de próstata y cáncer de vejiga con sobre-expresión de clusterina tras el tratamiento combinado de radioterapia y ODN anticlusterina. [31-32]

LOS ESTUDIOS DE SILENCIAMIENTO con siRNA también están obteniendo resultados significativos para aumentar el efecto de la radioterapia, como en el caso de modelos celulares de cáncer de pulmón y mama. [33-34]

DURANTE ESTE ESTUDIO se ha investigado si la inhibición de la clusterina mediante el uso de ODN y siRNA puede aumentar la sensibilidad de las células tumorales de mama frente al tratamiento con inhibidores de proteínas quinasas así como las combinaciones con mayor efecto citotóxico.

TRATAMIENTO PREVIO CON ODN-CLU

LOS ENSAYOS REALIZADOS CON LA LÍNEA MDA-MB-231 confirman que el tratamiento previo con ODN-CLU aumenta de forma significativa la sensibilidad de las células a los inhibidores Chelerythrine, H-89 y Genisteina. Los resultados del ensayo realizado comparando el efecto del tratamiento previo con ODN-CLU u ODN-control corroboran que este efecto

sensibilizante se debe al bloqueo específico de la proteína clusterina.

ESTE HALLAZGO concuerda con los obtenidos en otras investigaciones, en las que se establece que el tratamiento combinado de oligonucleótidos antisentido o de siRNA anti-clusterina junto con quimioterápicos citotóxicos tiene un efecto antineoplásico más potente que el producido por el uso exclusivo de la quimioterapia.[35-38]

POR OTRO LADO, los resultados del mismo ensayo realizado en las células de la línea MCF-7, donde la clusterina no se expresa tan activamente como en la línea MDA-MB-231 no han sido tan significativos ya que, aunque el tratamiento exclusivamente con ODN-CLU sí afecta de forma significativa a la supervivencia celular, el tratamiento combinado con los inhibidores de proteínas quinasas muestra resultados no homogéneos.

LA MAYOR SENSIBILIDAD de las células MDA-MB-231 puede explicarse por el hecho de que exprese la proteína clusterina de forma constitutiva. Así, al disminuir la expresión de ésta proteína y su acción citoprotectora, se aumenta la sensibilidad a los citotóxicos.

TRATAMIENTO PREVIO CON siRNA

LOS RESULTADOS hacen patente que el tratamiento previo de ambas líneas celulares con siRNA específicos para clusterina aumenta de forma significativa la sensibilidad de ambas líneas celulares frente a la acción citotóxica de los tres inhibidores de proteínas quinasas elegidos, Chelerythrine, H-89 y Genisteina.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

EL MAYOR EFECTO sensibilizante ocasionado por el pretratamiento con siRNA, y que afecta a ambas líneas celulares, puede deberse a su efecto de silenciamiento amplificado en comparación con el mecanismo de silenciamiento llevado a cabo por los ODN.

LA SENSIBILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS a la apoptosis debida a la inhibición específica de la clusterina, viene a confirmar que la clusterina tiene un efecto citoprotector en las células tumorales de mama así como el importante papel de la terapia anticlusterina en el tratamiento de los carcinomas que expresan principalmente dicha proteína, como en el caso de las células de la línea MDA-MB-231. [17,36-40]

6. CONCLUSIONES

6.1. CONCLUSIONES

6.1.1. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASAS SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR

La supervivencia y proliferación de las células tumorales de las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 parece estar más relacionada con las tirosinas quinasas y proteínas quinasas A, siendo menos dependiente de las isoformas A y B de la proteína quinasa C.

6.1.2. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA CLUSTERINA SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR

La proteína clusterina juega un papel citoprotector que aumenta la supervivencia de las células tumorales que expresan de forma constitutiva de esta proteína.

6.1.3. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEINA QUINASA SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA

La expresión de la proteína clusterina en las células tumorales de mama, tanto en las que expresan la misma de forma constitutiva como en las que no, se ve incrementada tras su exposición a agentes citotóxicos como una respuesta adaptativa a un medio hostil que mejora su supervivencia.

6.1.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO PREVIO CON INHIBIDORES CLUSTERINA SOBRE LA SENSIBILIDAD A INHIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASAS

La inhibición previa de la expresión de la proteína clusterina aumenta la sensibilidad de las células tumorales de mama frente a la acción citotóxica de los inhibidores de proteínas quinasas. El efecto sensibilizante provocado por los siRNA es mayor que el provocado por los ODN.

6.2. CONCLUSIÓN FINAL

El tratamiento combinado de inhibidores de proteínas quinasas junto con inhibidores de clusterina puede suponer una estrategia novedosa y prometedora en casos de resistencia de las células tumorales de mama a las terapias convencionales.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN

1. Colditz GA, Baer HJ, Tamimi RM. Breast cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF, editors. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 3rd Ed. New York. Oxford University Press, 2006.
2. Lambe M, Hsieh CC, Chan HW, et al. Parity, age at first and last birth ad risk of breast cáncer: a populatio-based study in Seden. *Breast Cancer Research and Treatment* 1996; 38(3):305-311.
3. Bernstein L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cáncer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2002; 7(1):3-15.
4. Russo J, Moral R, Balogh GA, Mailo D, Russo IH. The protective role of pregnancy in breast cáncer. *Breast Cancer Research* 2005; 7(3):131-142.
5. Britt K, Ashworth A, Smalley M. Pregnancy and the risk of breast cáncer. *Endocrine-Related Cancer* 2007; 14(4):907-933.
6. Ma H, Bernstein L, Pike MC, Ursin G. Reproductive factors and breast cáncer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Breast Cancer Research* 2006; 8(4):R43.
7. Collaboative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cáncer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epideiological studies in 30 countries including 50,302 women with breast cáncer and 96,973 women without the diseases. *The Lancet* 2002; 360(9328):187-195.
8. Burkman R, Schlesselman JJ, Ziemann M Safety concerns and health benefits associated with oral contraception. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2004; 190(4 Suppl):S55-22.
9. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cáncer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53,297 women with breast cáncer and 100,239 women without breast cáncer from 54 epideiological studies. *Lancet* 1996;347(9017):1713-1727.
10. Chlebowski RT, Anderson G, Manson JE, et al Estrogen alone in postmenopausal and breast cáncer detection by means of mammography and breast biopsy. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28(16):2690-2697.
11. Chlebowski RT, Anderson GL, Gass M, et al. Estrogen plus progestin and breast cáncer incidence and mortality in postmenopausal women. *JAMA* 2010; 304(15):1684-1692.
12. Bradt J, Gae JP, Tengrup I, Manjer J. Age at diagnosis in relation to survival following breast cáncer: a cohort study.
13. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2010;96:3-1383.
14. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, et al. Alcohol, tobacco and breast cáncer—collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cáncer and 95,067 women without the disease. *British Journal of Cancer* 2002;87 (11):1234-1245.
15. Allen NE, Beral V, Casabonne D, et al. Moderate alcohol intake and cáncer incidence in women. *Journal of the National Cancer Institute* 2009;101(5):296-305.
16. Ballard-Barbash R, Berrigan D, Potischman N, Dowling E. Obesity and cancer epidemiology. In: Berger NA, editor. *Cancer and Energy Balance, Epidemiology and Overview*. New York: Springer-Verlag New York, LLC, 2010.
17. Ballard-Barbash R, Hunsberger S, Alciati MH. Physical activity, weight control, and breast cancer risk and survival: clinical trial rationale and design considerations. *Journal of the National Cancer Institute* 2009; 101(9):630–643.
18. Wolin KY, Carson K, Colditz GA. Obesity and cancer. *Oncologist* 2010; 15(6):556–565.

19. Ballard-Barbash R, Hunsberger S, Alciati MH. Physical activity, weight control, and breast cancer risk and survival: clinical trial rationale and design considerations. *Journal of the National Cancer Institute* 2009; 101(9):630–643.
20. Melinda L. Irwin, Anne McTiernan, JoAnn E. Manson, Cynthia A. Thomson, Barbara Sternfeld, Marcia L. Stefanick, Jean Wactawsky-Wende, Lynette Craft, Dorothy Lane, Lisa W. Martin, Rowan Chlebowski. Physical Activity and Survival in Postmenopausal Women with Breast Cancer: Results from the Women's Health Initiative. *Cancer Prev. Res.* 2011 Apr; 4(4):522-529.
21. Brinton LA, Cook MB, McCormack V, Johnson KC, Olsson H, Casagrande JT, Cooke , Falk RT, Gapstur SM, Gaudet MM, Gaziano JM, Gkiokas G, Guenel P, Henderson BE, Hollenbeck A, Hsing AW, Kolonel LN, Isaacs C, Lubin JH, Michels KB, Negri E, Parisi D, Petridou ET, Pike MC, Riboli E, Sesso HD, Snyder K, Swerdlow AJ, European Rare Cancer Study Group, Trichopoulos D, Ursin G, Van den Brandt PA, Van Den Eeden SK, Weiderpass E, Willett WC, Ewertz M, Thomas DB. Anthropometric and hormonal risk factors for male breast cancer: Male Breast cancer pooling Project results. *J. Natl Cancer Inst* 2014;106:djt465.
22. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et. al. (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975–2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. Bethesda, MD, 2012. Retrieved September 7, 2012.
23. Armstrong K, Calzone K, Stoplfer J., Fitzgerald G., Coyne J., Weber B. Factors associated with decisions about clinical BRCA1/2 testing. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000 Nov;9(11):1251-4.
24. Lisa Golmard, Virginie Caux-Moncoutier, Grégoire Davy, Essam Al Ageeli, Brigitte Poirot, Carole Tirapo, Dorothee Michau, Catherine Barbarux, Catherine Dubois d'Enghien, André Nicolas, Laurent Castera, Xavir Sastr-Garau, Marc-Henri Stern, Claude Houdayer, Dominique Stoppa-Lyonnet. Germline mutation in the RAD51B gene confers predisposition to breast cancer. *BM Cancer* 2013, 13:484.
25. Paul D.P. Pharoah, Nicholas E. Day, Stephen Duffy, Douglas F. Easton, Bruce A.J.Ponder. Family History and the Risk of Breast Cancer. A systematic review and meta-analysis.
26. Schacht DV, Yamaguchi K, Lai J, Kulkarni K, Sennet CA, Abe H. Importance o a personal history of breast cancer as a risk factor for the development of subsequent breast cancer: results from screening breast MRI. *AJR AmJ Roentgenol*, 2014 Feb;202(2):289-92.
27. Elizabeth Ward, Ahmedin Jemal DVM, Vilma Cokkinides, Gopal K. Singh, Cheryll Cardinez, Asa Ghafoor, Michael Thun. Cancer Disparities by Race/Ethnicity and Socioeconomic Status. *Cancer Journal for Clinicians*. Vol.54.2;78-93, March/April 2014.
28. Lisa A. Newman, Kent A. Griffith, Ismail Jatoi, Michael S. Simon, Joseph P. Crowe, Graham A. Colditz. Meta-Analysis of Survival i African American and White American Patients with Breast Cancer: Ethnicity Compared With Socioeconomic Status. *American Society of Clinical Oncology*.2005.03.3472.
29. NF. Boyd, J.W. Byng, R.A. Jong, E.K Fishell, L.E. Little, A.B. Miller, G.A. Lockwood, D.L.Tritchler, M.J.Yaffe. Quantitative Classification of Mammographic Densities and Breast Cancer Risk: Results From the Canadian National Breast Screening Study. *JNCI Natl Cancer Inst* (1995) 87 (9):670-675.
30. Nelson HD, Tyne K, Naik A, et al. Screening for breast cancer: an update for the U.S. Preventive services Task Force. *Ann Intern Med* 151 (19):727-37,W237-42,2009].
31. [Edge SB, Byrd DR, Compton CC. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 347-76.]
32. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW: Prognosis in T2N0M0 stage I breast carcinoma: a 20-year follow-up study. *J Clin Oncol* 9 (9): 1650-61, 1991. [PUBMED Abstract]
33. Diab SG, Clark GM, Osborne CK, et al.: Tumor characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous breast carcinomas. *J Clin Oncol* 17 (5): 1442-8, 1999. [PUBMED Abstract]
34. Rakha EA, Lee AH, Evans AJ, et al.: Tubular carcinoma of the breast: further evidence to support its excellent prognosis. *J Clin Oncol* 28 (1): 99-104, 2010.

7. BIBLIOGRAFÍA

35. J. G. Santillán-Benítez^a, ?. Quiroz-Ordóñez^b, H. Mendieta-Zerón^c, L. M. Gómez-Oliván. Expresión génica y receptores hormonales en cáncer mamario. "El camino hacia la búsqueda de terapias preventivas". Revista Medicina e Investigación. Vol 01 num 01. Ene-Jun 2013.
36. Igor Vivanco & Charles L. Sawyer. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* 2, 489-501 (July 2002).
37. Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, Wongvipat N, Pegram MD, Ramos L, Gorman CM, Parker MG, Sliwkowski MS, Slamon DJ. HER-2 Tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene*, 1995;10(12):2435-2446.
38. Fortunato Ciardiello, Rosa Caputo, Roberto Bianco, Vincenzo Damiano, Gabriella Fontanini, Sabina Cuccato, Sabino de Placido, A. Raffaele Bianco, Giampaolo Tortora. Inhibition of Growth Factor Production and Angiogenesis in Human Cancer Cells by ZD1839 (Iressa), a Selective Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor. *Clin Cancer Res*. May 2001 7;1459.
39. Hantschel, O. y Superti-Furga, G. Regulation of the c-Abl y Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:33-44.
40. Dodson Ca, Yeoh S, Hang T, Bayliss. A kinetic test characterizes kinase intramolecular and intermolecular autophosphorylation mechanisms. *Sci Signal* 2013 Jul 2,6(2829):ra54.
41. Peng-Wang, Fang Wu, Jingdong Zhang, Todd McMullen, Leah C. Young, Robert J. Ingham, Liang Li, Raymond Lai. Serine phosphorylation of NPM-ALK, which is dependent on the auto-activation of the kinase activation loop, contributes to its oncogenic potential. *Carcinogenesis* (2011) 32 (2):146-153.
42. Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 3, 11-22
43. Rocky Cipriano, Kristy L.S. Miskimen, Benjamin L. Bryson, Chase R. Foy, Courtney A. Bartel and Mark W. Jackson. FAM83B-mediated activation of PI3K/AKT and MAPK signaling cooperates to promote epithelial cell transformation and resistance to targeted therapies. *Oncotarget* 2013 May; 4(5):729-738.
44. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M et al (2003). The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 8(4):307-25.
45. Zhou BP, Hung MC(2003): Dysregulation of cellular signaling by HER2/neu in breast cancer. *Semin. Oncol*. 30(5 Suppl 16):38-48.
46. Ménard S, Cassalini P, Campiglio M, Pupa SM; Tagliabue E (2004): Role of HER2/neu in tumor progression and therapy. *Cell. Mol. Life Sci*. 61(23):2965-78.
47. Sang Seol Jung, Hyung Soon Park, Insong James Lee, Hong Namkoong, Seung Min Shing, Goang Won Cho, Seon-Ah Ha, Yong Gyu Park, Youn Soo Lee, Jesang Ko and Jim Woo Kim. The HCCR Oncoprotein as a Biomarker for Human Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* November 1, 2005. 11;7700.
48. Seon-Ah Ha, Youn Soo Lee, Seung Min Shing, Hyun Ke Kim, Sanghee Kim, Hong Namkoong, Hae Joo Kim, Sang Min Jung, Yu Sun Lee, Yeun Jun Chung, Sang Seol Jung, Jin Wo Kim. Oncoprotein HCCR-1 expression in breast cancer is well correlated with known breast cancer prognostic factors including HER2 overexpression, p53 mutation, and ER/PR status. *BCM Cancer* 2009, 9:51.
49. Xuyu Zu, Jun Ma, Hongxia Liu, Feg Liu, Chunyan Tan, Lingling Yu, Jue Wang, Zhenhua Xie, Deliang Cao, Yuyang Jiang. Pro-oncogene Pokemon promotes breast cancer progression by upregulating survivin expression. *Breast Cancer Research* 201, 13:R26.
50. CUI Ming, Xu Hai, Yan. Expression and clinical significance of pokemon protein in breast cancer. *Journal of Clinical Surgery* 2007-06.
51. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007;68:81-8.
52. Coulombe P, Meloche S. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773:1376-87.

53. Kolch W. *Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Ra/MEK/ERK pathway by protein interactions.* *Biochem J.* 2000;351 Pt 2:289-305.
54. Roux PP, Blenis J. *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions.* *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68:320-44.
55. Meskiene I y Hit H (2000) *MAP kinase pathways:molecular plug-and-play chips for the cell.* *Plant Mol Biol* 42:791-806.
56. Wong P, Taillefer D, Lakins J, Pineault J, Chader G, Tenniswood M. *Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration.* *Eur J Biochem.* 1994 May 1;221(3):917-25.
57. Denis –michel, Gilles Chatelain, Sophie North, Gilbert Brun. *Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene.* *Biochem J* (1997) 328,45-50.
58. Tomas Koltai. *Clusterin: a key player in cancer chemoresistance and its inhibition.* *Onco Targets Ther.* 2014;7:447-456.
59. Zoubeidi A, Chi K, Gleave M. *Targeting the cytoprotective chaperone, clusterin, for treatment of advanced cáncer.* *Clin Cancer Res.* 2010 Feb 15;16(4):1088-93.
60. Higano CS. *Potential use of curtsen to treat prostate cáncer.* *Onco Targets Ther.* 2013; 6:785-97.
61. Pucci S, Bonnno E, Pichiorri F, Angeloni C, Spagnoli LG. *Modulation of diferent clusterin isoforms in human colon tumorigenesis.* *Oncogene* 2004; Mar.25:23/43:2298-304.
62. Djeu JY, Wei S. *Clusterin and chemoresistance.* *Adv Cancer Res.* 2009;105:77-92.
63. Jones SE, Jomary C. *Clusterin.* *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 May;34(5):427-31.
64. Kumar B. Reddy, Ge Jin, Mary C Karode, Judith A.K. Harmony, Philip H. Howe. *Transforming Growth Factor β (TGF β)-Induced Nuclear Localization of Apolipoprotein J/Clusterin in Epithelial Cells.* *Biochemistry,* 1996,35(19),pp6157-6163.
65. Rizzi F, Bettuzzi S. *The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis.* *Endocr Relat Cancer.* 2010;17(1):R1–R17.
66. Leong W.F., Chow V.T. *Transcriptomic and proteomic analyses of rhabdomyosarcoma cells reveal differential cellular gene expression in response to enterovirus 71 infection.* *Cell. Microbiol.* 8:565-580(2006)
67. Ranney M.K., Ahmed I.S., Potts K.R., Craven R.J. *Multiple pathways regulating the anti-apoptotic protein clusterin in breast cancer.* *Biochim. Biophys. Acta* 1772:1103-1111(2007)
68. Cochrane D.R., Wang Z., Muramaki M., Gleave M.E., Nelson C.C. *Differential regulation of clusterin and its isoforms by androgens in prostate cells.* *J. Biol. Chem.* 282:2278-2287(2007)
69. Jenne D.E., Tschopp J. *Molecular structure and functional characterization of a human complement cytolysis inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:7123-7127(1989)
70. Wong P., Taillefer D., Lakins J., Pineault J., Chader G., Tenniswood M. *Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration.* *Eur. J. Biochem.* 221:917-925(1994)
71. de Silva H., Stuart W.D., Park Y.B., Mao S.J.T., Gil C.M., Wetterau J.R., Busch S.J., Harmony J.A.K. *Purification and characterization of apolipoprotein J.* *J. Biol. Chem.* 265:14292-14297(1990)
72. Ghiso J., Matsubara E., Koudinov A., Choi-Miura N.-H., Tomita M., Wisniewski T., Frangione B. *The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex.* *Biochem. J.* 293:27-30(1993)
73. Hochstrasser A.-C., James R.W., Martin B.M., Harrington M., Hochstrasser D.F., Pometta D., Merrill C.R. *HDL particle associated proteins in plasma and cerebrospinal fluid: identification and partial sequencing.* *Appl. Theor. Electrophor.* 1:73-76(1988)
74. de Silva H.V., Harmony J.A.K., Stuart W.D., Gil C.M., Robbins J. *Apolipoprotein J: structure and tissue distribution.* *Biochemistry* 29:5380-5389(1990)
75. Kelso G.J., Stuart W.D., Richter R.J., Furlong C.E., Jordan-Starck T.C., Harmony J.A.K. *Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma.* *Biochemistry* 33:832-839(1994)

7. BIBLIOGRAFÍA

76. Poon S., Easterbrook-Smith S.B., Rybchyn M.S., Carver J.A., Wilson M.R. Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry* 39:15953-15960(2000)
77. Stewart E.M., Aquilina J.A., Easterbrook-Smith S.B., Murphy-Durland D., Jacobsen C., Moestrup S., Wilson M.R. Effects of glycosylation on the structure and function of the extracellular chaperone clusterin. *Biochemistry* 46:1412-1422(2007)
78. Yerbury J.J., Poon S., Meehan S., Thompson B., Kumita J.R., Dobson C.M., Wilson M.R. The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *FASEB J.* 21:2312-2322(2007)
79. Andersen C.L., Schepeler T., Thorsen K., Birkenkamp-Demtroder K., Mansilla F., Aaltonen L.A., Laurberg S., Orntoft T.F. Clusterin expression in normal mucosa and colorectal cancer. *Mol. Cell. Proteomics* 6:1039-1048(2007)
80. Sensibar JA, Sutkowski DM, Raffo A. Prevention of cell death induced by tumor necrosis factor alpha in LNCaP cells by overexpression of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). *Cancer Res.* 1995;55(11):2431-2437.
81. Kim N, Yoo JC, Han JY, Hwang EM, Jeong EY, Sun CH, Yi CH, Roh GS, Kim GS, Kim HJ, Kang SS, Cho GJ, Park JY, Choi WS. Human nuclear clusterin mediates apoptosis by interacting with Bcl-XL through C-Terminal coiled coil domain. *J Cell Physiol.* 2012 Mar;227(3):1157-67. Doi:10.1002/jcp.22836.
82. Irene M. Ghobrial, Thomas E. Witzig, Alex A. Adjei. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *Cancer Journal for Clinicians.* Vol. 55,3;178-194. May-Jun 2005.
83. Michel D, Chatelain G, North S, Brun G. Stress-Induced transcription of the clusterin/apoJ gene. *Biochem J.* 1997;328(Pt 1):45-50. Viard I, Wehrli P, Jornot L. Clusterin gene expression mediates resistance to apoptotic cell death induced by heat shock and oxidative stress. *J Invest Dermatol.* 1999;112(3):290-296.
84. Loison F, Debure L, Nizard P, le Goff P, Michel D, le Dréan Y. Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress: implication of HSF1-HSF2 heterocomplexes. *Biochem J.* 2006;395(1):223-231.
85. Trougakos IP, Lourda M, Antonelou MH. Intracellular clusterin inhibits mitochondrial apoptosis by suppressing p53-activating stress signals and stabilizing the cytosolic Ku70-Bax protein complex. *Clin Cancer Res.* 2009;15(1):48-59.
86. Essabani A, Garcia L, Zonetti MJ, Fisco T, Pucci S, Chiocchia G. Exon-skipping strategy by ratio modulation between cytoprotective versus pro-apoptotic clusterin forms increased sensibility of LNCaP to cell death. *PLoS One.* 2013;8(2):e54920.
87. Ammar H Closset JL. Clusterin activates survival growth the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem.* 2008;283(19):12851-12861.
88. Ma X, Bay Y. IGF-1 activates the P13K/AKT signaling pathway via upregulation of secretory clusterin. *Mol Med Rep.* 2012;6(6):1433-1437.
89. Wang C, Jiang K, Gao D, Kang X, Sun C, Zhang Q, Li Y Sun L, Zhang S, Guo K, Liu Y. Clusterin protects hepatocellular carcinoma cells from endoplasmic reticulum stress induced apoptosis through GRP78. *PLoS One* v8(2);2013
90. Li N, Zoubeidei A, Beraldi E, Glave ME. GPR78 regulates clusterin stability, retrotranslocation and mitochondrial localization under ER stress in prostate cancer. *Oncogene,* 2013 Apr 11;32(15):1933-42.
91. Fu Y, Lai Y, Wag Q. Overexpression of clusterin promotes angiogenesis via the vascular endothelial growth factor in primary ovarian cancer. *Mol Med Rep.* 2013;7(6):1726-1732.
92. Wang X, Luo L, Dong D, Yu Q, Zhao K. Clusterin plays an important role in clear renal cell cancer metastasis. *Urol Int* 2011 Aug 29.
93. Essabani A, Margottin-Goguet F, Chiocchia G. Identification of clusterin domain involved in NF-kappaB pathway regulation. *J Biol Chem.* 2010;285(7):4273-4277.

94. Wang Y, Wang X, Zhao H, Liang B, Du Q. Clusterin confers resistance to TNF-alpha-induced apoptosis in breast cancer cells through NF-kappaB activation and Bcl2 overexpression. *J Chemother.* 2012;24(6):348-357.
95. Redondo M, Villar E, Torres-Muñoz J, Tellez T, Morell M, Petto CK. Overexpression of clusterin in human breast carcinoma. *Am J Patol.* 2000;157(2):393-399.
96. Niu Z, Li X, Hu B. Small interfering RNA targeted to secretory clusterin blocks tumor growth, motility, and invasion in breast cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2012;44(12):1991-998.
97. Li J, Jia L, Zhao P, Jiang Y, Zhong S, Chen D. Stable knockdown of clusterin by vectorbased RNA interference in a human breast cancer cell line inhibits tumour cell invasion and metastasis. *J Int Med Res.* 2012;40(2):545-555.
98. Zhang D, sun B, Zhao X. Secreted CLU is associated with the initiation of triple-negative breast cancer. *Ancr Biol Ther.* 2012;13(5):321-329.
99. Nathalie Dias and C.A. Stein. Antisense Oligonucleotides: Basic Concept and Mechanisms. *Molecular Cancer Therapeutics.* Vol.1, 347-35, March 2002.
100. Loke S.L., Stein C.A., Zhang X.H, Mori K, Nakanishi M, Subasinghe C, Cohen JS, Neckers L.M. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 86:3474-3478, 1989.
101. Yakubov, LA, Deeva EA, Zarytova VF, Ivanova EM, Rytte AS, Yurchenko LV, Vlassov V.V. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA;* 86:6454-6458, 1989.
102. Vlassov, VV, Balakireva LA, Yakubov LA. Transport of oligonucleotides across natural and model membranes. *Biochim. Biophys. Acta,* 1197:95-108, 1994.
103. Tomita N, Morishita R. Antisense oligonucleotides as a powerful molecular strategy for gene therapy in cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* 2004;10(7):797-803.
104. Jansen B, Zangemeister-Winttke U. Antisense therapy for cancer-the time of truth. *Lancet Oncol,* 2002;3:672-83.
105. Neema Agrawal PV, N. Dasaradhi, Asif Mohammed, Pawan Malhotra, Raj K. Bhatnagar, Sunil K. Mukherjee. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* Dec. 2003, p. 657-685.
106. Lipardi C, Q. Wei, BM Patterson. 2001. RNAi as a random degradation PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNA that degraded to generate new siRNAs. *Cell* 101:297-307.
107. Sijen, T., J. Fleenor, F. Simmer, KL Thijssen, S Parris, L Timmons, RH Plasterk, A Fire. 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107;465-476.
108. Hamilton AJ, DC Baulcombe. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286:950-952.
109. Hammond SM, E Bernstein, D. Beach, GJHannon. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophilla* cells. *Nature* 404:293-296.
110. Fargard M, H. Vaucheret. 2000. (Trans) gene silencing in plants: how many mechanisms *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:167-194.
111. Panico F, Rizzi F, Fabbri LM, Bettuzzi S, Luppi F. Clusterin (CLU) and lung cancer. *Adv Cancer Res.* 2009;105:63-76.
112. Chia S, Dent S, Ellard S. Phase II trial of OGX-011 in combination with docetaxel in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(2):708-713.
113. Perona R, Sánchez-Pérez I. Signalling pathways involved in clinical responses to chemotherapy. *Clin Transl Oncol.* 2007;9:925-33.
114. Valerie K, Yacoub A, Hagan MP, Curiel DT, Fisher PB, Grant S, et al. Radiation-Induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Mol Cancer Ther.* 2007;6:789-801.

7. BIBLIOGRAFÍA

115. Aceves-Luquero CI, Agarwal A, Callejas-Valera JL, Arias González L, Esparis-Ogando A, del Peso Ovalle L et al. ERK2, but not ERK1, mediates acquired and de novo resistance to imatinib mesylate: implication for CML therapy. *PLoS One*. 2009;4:e6124.
116. Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM, Fox JA. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Seminars in Oncology* 1999, 26(4 Suppl 12):60-70.
117. Lochner, J.A. Moolman. The many faces of H89: A Review. *Cardiovascular Drug Reviews* 2006, Vol. 24, n 3-4, pp.261-274.
118. Vincenza Leone, Antonella di Palma, Paolo Ricchi, Fabio Acquaviva, Maria Giannouli, Anna Maria Di Prisco, Francesca Iuliano, Angela M. Acquaviva. PGE₂ inhibits apoptosis in human adenocarcinoma Caco-2 cell line through Ras-PI3K association and cAMP-dependent kinase A activation. *American Journal of Physiology*. Vol. 293. 2007
119. Stephen P. Davies, Helen Reddy, Matilde Caivano, Philip Cohen. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* (2000) 351,95-105.
120. Kah Fei Wan, Shing-Leng Chan, Sunil Kumar Sukumaran, Mei-Chin Lee, Victor C. Yu. Chelerythrine induces apoptosis through a Bax/Bak-independent Mitochondrial Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 283 n°13, pp.8423-8433, March 28, 2008.
121. Helen Kim, T Greg Peterson, Stephen Barnes. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor β signaling pathways. *Am J Clin Nutr* 1998;68(suppl):1418S-25S

2. OBJETIVOS

1. Miyake H, Hara I, Kamidono S, Gleave ME. Synergistic chemosensitization and inhibition of tumor growth and metastasis by the antisense oligodeoxynucleotide targeting clustering gene in a human bladder cancer model. *Clin Cancer Res* 2001;7:4245-4252.
2. He LR, Liu MZ, Li BK, Rao HL, Liao YJ, Zhang LJ, et al. Clsterin as a predictor for cheoradiotherapy sensivity and patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2009;100(12):2354-60.

3. MATERIAL Y METODOS

1. Maximino Redondo, Teresa Téllez, María Jj. Roldán, Alfonso Serrano, Marilina García-Aranda, Martín E. Gleave, María L Hortas, Miguel Morell. Anticlusterin treatment of breast cancer cells increases the sensitivities of chemotherapy and tamoxifen and counteracts the inhibitory action of desamethasone on chemotherapy-induced cytotoxicity. *Breast Cancer Res*.v9(6);2007.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. Giamas G, Stebbin HJ, Vorgias CE, Knippschild U. Protein kinases as targets for cancer treatment. *Pharmacogenomics* 2007;8(8):1005-16
2. Cohen P. Protein kinases-the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov*. 1. 309-315.
3. Bianco, R, Melisi, D, Ciardiello, F, Tortora. G. Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets. *Eur J Cancer*. 42. 290-294.
4. Noble M, E Endicott JA, Johnson L. Protein kinase inhibitors insights into drug design from structure. *Science*. 303, 1800-1805.

5. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298. 1912-1934.
6. Chmura SJ, Dolan ME, Cha A, Mauceri HJ, Kufe DW, Weichselbaum RR. In vitro and in vivo activity of protein kinase C inhibitor chelerythrine chloride induces tumor cell toxicity and growth delay in vivo. *Clin Cancer Res* 2000; 6(2):737-42.
7. Baerjee S, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Multi-targeted therapy of cancer by genistein *Cancer Lett* 2008 October 8;269(2):226-242. Doi:10.1016/j.canlet.2008.03.052.
8. Hussain A, Harish G, Prabhu SA, Mohsin J, Khan MA, Rizvi TA et al. Inhibitory effect of genistein on the invasive potential of human cervical cancer cells via modulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1 expression. *Cancer Epidemiol* 2012; 36(6):e387-93, doi:10.1016/j.canep.2012.07.2006.
9. Chmura SJ, Dolan ME, Cha A, Mauceri HJ, Kufe DW, Weichselbaum RR. In vitro and in vivo activity of protein kinase C inhibitor chelerythrine chloride induces tumor cell toxicity and growth delay in vivo. *Clin Cancer Res* 2000;6(2):737-42.
10. Lattrich C, Lubi J, Springwald A, Oerse R, Ortmann O, Treck O. Additive effects of trastuzumab and genistein on human breast cancer cells. *Anti-Cancer Drugs* 2011, 22:253-61).
11. Nikov GN, Hopkins NE, Boue S, Alworth WL. Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation. *Environ Health Perspect* 200;108:867-872.
12. Antonio Caretta and Carla Mucignat-Caretta. Protein Kinase in Cancer. *Cancers* 2011, 3, 913-926;doi:10.3390/cancers3010913.
13. Kim H, Peterson TG, Barnes S. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways. *Am J Clin Nutr* 1998 Dec;68(6 Suppl):1418S-1425S.
14. Liu DS, Krebs CE, Liu SJ. Proliferation of human breast cancer cells and anti-cancer action of doxorubicin and vinblastine are independent of PKC-alpha. *J Cell Biochem*. 2007 May 15;101(2):517-28.
15. Rizzi F, Bettuzzi S. The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(1):R1-R17.
16. Mitchel D, Chaletlain G, North S, Brun G. Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene. *Biochem J* 1997;328(Pt 1):45-50.
17. Redondo M, Villar E, Torres-Muñoz J, Tellez T, Morell M, Petito C. Overexpression of clusterin in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 2000;157(2):393-9.
18. Redondo M, Esteban F, González-Moles MA, Delgado-Rodríguez M, Nevado M, Torres-Muñoz JE, Tellez T, Villar E, Morell M, Petito CK. Expression of the antiapoptotic proteins clusterin and Bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinomas. *Tumour Biol*. 2006;27(4):195-200.
19. Trougakos IP, Lourda M, Antonelou MH, et al. Intracellular clusterin inhibits mitochondrial apoptosis by suppressing p53-activating stress signals and stabilizing the cytosolic Ku70-Bax protein complex. *Clin Cancer Res*. 2009;15(1):48-59.
20. Ammar H, Closset JL. Clusterin activates survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem*. 2008;283(19):12851-12856.
21. Ma X, Bai Y. IGF-1 activates the P13K/Akt signaling pathway via upregulation of secretory clusterin. *Mol Med Rep*. 2012;6(6):1433-1437.
22. Wang X, Luo L, Dong D, Yu Q, Zhao K. Clusterin plays an important role in clear renal cell cancer metastasis. *Urol Int*. 2013 Aug 29.
23. Essabani A, Margottin-Goguet F, Chiocchia G. Identification of clusterin domain involved in NF-kappa B pathway regulation. *J Biol Chem* 2010;285(7):4273-4277
24. Zoubeidi A, Ettinger S, Beraldi E. clusterin facilitates COMMD1 and I-kappaB degradation to enhance NF-kappaB activity in prostate cancer cells. *Mol Cancer res*. 2010;8(1):119-130.

7. BIBLIOGRAFÍA

25. Chotkowskia HL, Ciotab AT, Jiab Y, Puig-Basagoitic F, Kramerb LD, Shic PY, Glaser RL. 2008. West Nile virus infection of *Drosophila melanogaster* induces a protective RNAi response. *Virology* 377:197-206.
26. Nathalie Dias, CA Stein. Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms. *Molecular Cancer Therapeutics* vol.1;347-355, March 2002.
27. Trougakos IP, So A, Jansen B, Gleave ME, Gonos ES. Silencing expression of the clusterin/apolipoprotein j gene in human cancer cells using small interfering RNA induces spontaneous apoptosis, reduced growth ability, an cell sensitization to genotoxic and oxidative stress. *Cancer Res* 2004;64:1834-1842.
28. Zellweger T, Chi K, Miyake H, Adomat H, Kiyama S, Skov K, Gleave M. Enhanced radiation sensitivity in prostate cancer by inhibition of the cell survival protein clusterin. *Clin Cancer Res* 2002;8:3276-84.
29. Zellweger T, Kiyama S, Chi K, Miyake H, Adomat H, Skov K, Gleave ME. Overexpression of the cytoprotective protein clusterin decreases radiosensitivity in the human LNCaP prostate tumour model. *BJU Int* 2003;92:463-9.
30. Cao C, Shinohara ET, Li H, Niermann KJ, Kim KW, Sekhar KR, Gleave M, Freeman M, Lu B. Clusterin as a therapeutic target for radiation sensitization in a lung cancer model. *Int J radiat Oncol Biol Phys.* 2005;63(4):1228-36.
31. Yamanaka K, Gleave M, Hara I, Muramaki M, Miyake H. Synergistic antitumor effect of combined use of adenoviral-mediated p53 gene transference and antisense oligodeoxynucleotide targeting clusterin gene in an androgen-independent human prostate cancer model. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(2):187-95.
32. Yamanaka K, Gleave M, Muramaki M, Hara I, Miyake H. enhanced radiosensitivity by inhibition of the anti-apoptotic gene clusterin using antisense oligodeoxynucleotide in a human bladder cancer model. *Oncol Rep* 2005;13(5):885-90.
33. Panico F, Rizzi F, Fabbri LM, Bettuzzi S, Luppi F. Clusterin (CLU) and lung cancer. *Adv Cancer Res.* 2009; 105():63-76.
34. Damon Sutton, Saejeong Kim, Xintao Shai, Konstantin Leskov, Joao Marques, Bryan RG Williams, David A Boothman, Jimming Gao. Efficient suppression of secretory clusterin levels by polymer-siRNA nanocomplexes enhances ionizing radiation lethality in human MCF-7 breast cancer in vitro. *Int J Nanomedicine* 2006 Jun; 1(2):155-162.
35. Gleave M, Miyake H: Use of antisense oligonucleotides targeting the cytoprotective gene, clusterin, to enhance androgen and chemo-sensitivity in prostate cancer. *World J Urol* 2005;23:38-46.
36. Redondo M, Téllez T, Roldan MJ, Serrano A, Garcia-Aranda M, Gleave ME, et al. Anticlustarin treatment of breast cancer cells increases the sensitivities of chemotherapy and tamoxifen and counteracts the inhibitory action of dexamethasone on chemotherapy-induced cytotoxicity. *Breast Cancer Res* 2007;9:R86.
37. Gleave ME, Miyake H, Zellweger T, Chi K, July L, Nelson C et al. Use of antisense oligonucleotides targeting the antiapoptotic gene, clusterin/testosterone-repressed prostate message 2, to enhance androgen sensitivity and chemosensitivity in prostate cancer. *Urology* 2001, 58:39-49.
38. Jansen B, Schallagbauer-Wadl H, Brown BD, Bryan RN, van Elsas A, Muller M, et al. Bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nat Med* 1998;4:232-234.
39. Djeu JY, Wei S. Clusterin and chemoresistance. *Adv. Cancer Res* 2009;105:77-92. Doi:10.1016/S0065-230X(09)05005-2.
40. Niu ZH, Wang Y, Chun B, Li CX, Wu L. Secretory clusterin (sCLU) overexpression is associated with resistance to preoperative neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer. *Eur. Rev Med Pharmacol Sci* 2013;17(10);1337-44.