

Universitat Autònoma de Barcelona

Tesis Doctoral

**Inhibición de la apoptosis y acúmulo de alteraciones
genéticas en la progresión metastática
del cáncer de mama:
variabilidad genética y selección poblacional.**

Olga Méndez Fernández

2002

Universitat Autònoma de Barcelona

**Inhibición de la apoptosis y acúmulo de alteraciones genéticas en
la progresión metastática del cáncer de mama: variabilidad
genética y selección poblacional.**

Memoria presentada por
Olga Méndez Fernández

para optar al grado de
Doctora en Biología

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Àngels Sierra Jiménez
en el Institut de Recerca Oncològica
adscribita al Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia,
Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona.
Programa de Biologia Cel·lular
Tutora: Rosa Miró

Àngels Sierra

Olga Méndez

Barcelona, Julio 2002

A mis padres,
A mi hermana

Na boa poesía, como na boa ciencia, cada palabra é unha chave, mais tamén unha pechadura. Descóbrenos un segredo mais tamén suxire outros, e o que nos prende é esa mestura de claridade e misterio, o espacio neboento onde se debuxa e desdebuxa o ser humano.

Eduardo Pondal

Cuando estaba en la facultad vi una frase en un departamento que me llamó la atención decía:"Copiar de uno es plagio, copiar de muchos es investigación", y la verdad es que ha sido mucha gente la que me ha ayudado durante todo este tiempo, así que espero no olvidarme a nadie.

A la Dra. Àngels Sierra le agradezco la oportunidad que me dio para realizar la tesis sobre un tema tan interesante y lleno de posibilidades.

También le quiero agradecer la libertad que me ha dado a lo largo de estos años para poder realizar mi trabajo.

A Sandra, Yolanda y Laura, quisiera agradecerles todos los ratos compartidos durante todo este tiempo, los buenos que han sido muchos, y algunos realmente memorables tanto dentro como fuera del lab, y los no tan buenos, que de esos también hemos tenido..., pero con vosotras han sido un poco más llevaderos. Sandra mi compañera de poyata, tanto al principio como al final (aunque fuera de okupa), quisiera agradecerle toda su ayuda y paciencia al mirar la dichosa libreta de los DNAs, también me gustaría agradecerle su sinceridad, su apoyo incondicional y ese toque tan genial que tiene (por cierto...). A Yolanda, quisiera agradecerle todos los ratos compartidos, creo que nadie como ella entiende lo que siento al llegar este momento. Gracias por los consejos, las ideas, los ánimos y tu forma de hacer las cosas. Gracias por los pequeños detalles del día a día. A Laura quisiera agradecerle la enorme paciencia que ha tenido conmigo y esos problemillas, digamos diferentes, para los que tengo un cierto don. Pero sobretodo gracias por tu sensatez y por hacerme ver las cosas desde otro punto de vista. Carácter por carácter.

A Ruth, quisiera agradecerle el haberme transmitido cuando más lo necesitaba un poco de esa enorme energía y vitalidad que desprende. Gracias por escucharme y por entenderme. A Rakel la "nostra nena", quisiera darle las gracias por su enorme dulzura, y por ese sexto sentido que tiene conmigo. Y al resto de gente del grupo Alex, Antonio, Berta y Marta.

Al resto de gente del lab quisiera agradecerles todos los buenos ratos pasados durante estos años. A los que ahora tenemos al lado, y con los que compartimos el día a día la Dra. Àngels Fabra, Ana, Mireia, Anna, Eva. Gracias a todas. Marinela, gracias por esa enorme simpatía y por esos genes que quizás compartimos..., Antonia, gracias por esa imaginación increíble que me ha sido de gran ayuda incluso estando en la otra punta del mundo, gracias por tu enorme disposición para ayudarme a resolver cualquier problema o problemilla. Tener a alguien como tú en el lab es un autentico lujo. Tampoco quisiera olvidarme de Pedro, Marc y Lluís. Ni de la gente del estabulario, Mila con su enorme simpatía y Blanca, nuestra mamá en el lab.

Al resto del antiguo CIM, ahora casi en la otra punta. A Maria quisiera agradecerle todas las charlas que hemos tenido. Gracias por decirme "que encara soc molt petita per entendre certes coses", espero seguir siéndolo para no tener que entenderlas. Gracias por tus consejos, por permitirme disfrutar hablando de ciencia y gracias por esa enorme capacidad para

movilizar a la gente ya sea para apuntarse a un congreso o para hacer una apuesta. A Miguel Angel quisiera agradecerle toda la ayuda prestada para poder hacer este trabajo. Gracias por los consejos, y por dejarme ver tu forma eficiente y coherente de hacer ciencia. A Pere Jordi, por los buenos momentos compartidos en el rincón de la sabiduría. A Jordi gracias por las conversaciones y los consejos. A Eli quisiera agradecerle su sinceridad y su capacidad de implicación, haciéndonos participar a casi todos en las movidas de D-recerca. Gracias al resto de gente del lab Gemma, Mar, Cris, Jairo, y aquellos que ya hace bastante que no están por allí, Silvia, Rosa, Isabel, Laia, Rosana y Olga Campos, ahora en el lab de al lado.

No quiero olvidarme del resto de compañeros del COM, con los que hemos compartido salas, aparatos, meriendas, y hasta villancicos. Quisiera agradecerle especialmente a Fredi que me animara y escuchara, y las charlas en mitad del enorme pasillo. Gracias también a Harvey por hacernos las cosas más fáciles.

Al Dr. Victor Moreno del Institut Català d'Oncologia, quisiera agradecerle la ayuda y el consejo en el análisis estadístico de los resultados obtenidos del *array*.

Me gustaría agradecerle a la Dra. Virginia Nunes del departamento de Genética Molecular de nuestro instituto la oportunidad de utilizar su laboratorio y las instalaciones que allí hay. Sin esto, la parte final de esta tesis no hubiera sido posible. Me gustaría agradecerles especialmente la ayuda prestada con el *lightcycler* tanto a Carlos, como a Benja. Uno vía mail y el otro en vivo y en directo me han ayudado a solventar las numerosas cuestiones, y problemas que iban apareciendo con el paso de los días, y los experimentos.

No puedo olvidarme de Tim. El experimento de *arrays* se hizo en su laboratorio. Quisiera agradecerle su enorme entusiasmo, y el permitirme escuchar en primera persona como se llegó a un "gran descubrimiento científico". Many thanks for all your help, for accepting me in your lab, and for facilitate my work there. La estancia en su lab me permitió ver otra forma de trabajar, pero sobre todo me permitió conocer otra cultura muy diferente a la nuestra y enormemente variada. Gracias especialmente a Kevin, mi profe en tierras americanas, y a Becky y Song por facilitar mi estancia allí. Y gracias también a Yoshi, por ese *feeling* que nos une incluso a través de los océanos.

A la Dra. Rosa Miró, quisiera agradecerle el asesoramiento a lo largo de estos años, y su buena disponibilidad para ayudarme a solucionar los diferentes tramites necesarios hasta llegar aquí.

A Marta quisiera agradecerle todos los ratos que hemos compartido desde aquellos días ahora ya casi lejanos del esplai. Gracias por los consejos y por tu forma sosegada de afrontar las diferentes etapas que nos tocan vivir. A Marta C. quisiera agradecerle esos paseos tan buenos que nos sirven para ponernos al día de los últimos acontecimientos.

A Olga, gracias por los buenos ratos pasados, por los amuletos con sabor celta y por esos mails que nos sirven para practicar un idioma que ninguna de las dos nos atrevemos a hablar.

A Pepi, Sonia y Rosana quisiera agradecerles todos los cines, cafés, ceniquis, conversaciones...y esos viajecitos tan geniales que nos hemos marcado. Pero sobre todo gracias por vuestro apoyo incondicional en estos últimos meses.

A mi hermana quisiera agradecerle su enorme paciencia, su apoyo, sus consejos y esa enorme madurez que me hace dudar de quien es realmente la hermana mayor.

A mis padres, gracias por todo. Gracias por haberme enseñado cuales son mis orígenes, y por haberme transmitido desde pequeña el interés por conocer y aprender cosas nuevas. Gracias por vuestro cariño y ayuda, especialmente durante estos últimos meses.

Abreviaturas

435/P	MDA-MB 435 P
AIF	factor inductor de apoptosis
AP-PCR	<i>arbitrarily primed polymerase chain reaction</i>
ApoD	apolipoproteína D
Asp	ácido aspártico
CGH	hibridación genómica comparada
CIN	inestabilidad cromosómica
CPos	control positivo
DD	dominio de muerte
DD	<i>differential display</i>
DED	dominio efector de muerte
DEPC	dietil pirocarbonato
DLB	tampón de carga desnaturalizante
DMEM	<i>Dubelcco's Modification of Eagle's Medium</i>
dNTP	deoxinucleótidos trifosfato
DSB	roturas de doble cadena de DNA
dsDNA	<i>double-stranded DNA</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGF-R	receptor del factor de crecimiento epidérmico
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FBS	suero bovino fetal
GDF	<i>Genomic Damage Fraction</i>
GF	<i>Gains Fraction</i>
HKG	<i>housekeeping gene</i>
HNPCC	cáncer de colon hereditario no poliposis
i.m.f.p.	<i>intramammary fat pad</i>
IHQ	inmunohistoquímica
LB	tampón de carga
LF	<i>Losses Fraction</i>
LOH	pérdida de heterocigosis
MC	medio completo
MCSS	medio completo sin suero
MI	inestabilidad de microsatélites
MMR	<i>mismatch repair</i>

Abreviaturas

MMP	metaloproteinasas de matriz
N ₀	sin afectación ganglionar
N ₁	afectación ganglionar
O/N	<i>over night</i>
pb	par de bases
PCD	muerte celular programada
PBS	tampón fosfato salino
PSA	persulfato amónico
PSMA	antígeno de membrana específico de próstata
PT	poro de transición de permeabilidad
RDA	análisis de las diferencias representacionales
RT	transcripción reversa
SAGE	análisis seriado de la expresión génica
S.D.	desviación estándar
SDS	dodecil sulfato sódico
SSC	citrato sódico salino
TBE	tris bórico EDTA
TDT	deoxinucleotidil transferasa terminal
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethylene-diamine
TGF- α	factor de crecimiento transformante α
T _m	temperatura de <i>melting</i>
TNF	factor de necrosis tumoral
UV	ultravioleta
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular
$\Delta\psi$	potencial de membrana

Índice

I. <u>Introducción.</u>	1
1.1 Cáncer de mama.	3
1.1.1 Bases moleculares.	4
1.1.2 Progresión tumoral en el cáncer de mama.	6
1.2 Apoptosis y cáncer.	11
1.2.1 Fases funcionales de la apoptosis.	11
1.2.2 Genes de la familia de Bcl-2.	15
1.2.3 Papel de la mitocondria en la inducción de apoptosis.	18
1.2.4 Alteraciones de la apoptosis y cáncer.	19
1.3 Inestabilidad genética en relación con el cáncer.	22
1.3.1 El cáncer como proceso evolutivo.	22
1.3.2 Inestabilidad genética como motor de la progresión tumoral.	23
1.3.3 Hipótesis del fenotipo mutador.	24
1.3.4 Teorías sobre los mecanismos que promueven la progresión tumoral.	25
1.3.5 Evidencias de la existencia de un fenotipo mutador.	26
1.3.5.1 Inestabilidad de microsatélites.	26
1.3.5.2 Inestabilidad cromosómica.	29
1.3.6 Inestabilidad genética, ciclo celular y apoptosis.	30
1.4 Desregulación de la expresión génica en cáncer.	32
1.4.1 Metodologías para el estudio de la expresión génica.	33
1.4.2 Expresión génica asociada al potencial tumorigénico de las células.	35
1.4.3 Expresión génica asociada al potencial metastático de los tumores.	36
II. <u>Hipótesis y Objetivos.</u>	39
III. <u>Material y métodos.</u>	43
3.1 Determinación del <i>status</i> de apoptosis y de la presencia de inestabilidad de microsatélites en carcinomas ductales infiltrantes de mama.	45
3.1.1 Descripción de las muestras y características clínicas de las pacientes.	45

3.1.2 Extracción de DNA.....	45
3.1.3 Detección de mutaciones en el gen <i>bax</i>	46
3.1.3.1 Condiciones de la PCR.....	46
3.1.3.2 Comprobación de los productos de PCR.....	47
3.1.3.3 Resolución del fragmento amplificado.....	47
3.1.4 Análisis de la existencia de inestabilidad de microsatélites.....	49
3.1.4.1 Electroforesis y preparación de las muestras.....	51
3.1.4.2 Tinción de plata.....	51
3.1.5 Determinación de células apoptóticas por detección <i>in situ</i> de la fragmentación de DNA.....	53
3.1.6 Determinación de la expresión de las proteínas Bcl-2, Bcl-x _L , Bax y p53.....	53
3.1.7 Análisis estadístico.....	54
3.2 Análisis del acúmulo de alteraciones genéticas mediante AP-PCR.....	54
3.2.1 Modelo experimental de metástasis humana.....	54
3.2.1.1 Líneas celulares.....	54
3.2.1.2 Condiciones de cultivo.....	55
3.2.1.3 Análisis de la expresión de Bcl-2 y Bcl-x _L	56
3.2.1.4 Selección <i>in vivo</i> de variantes tumorales y metastáticas.....	56
3.2.1.5 Obtención de DNA.....	58
3.2.2 AP-PCR: <i>Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction</i>	58
3.2.2.1 Características técnicas de la AP-PCR.....	59
3.2.3 Condiciones de las AP-PCRs.....	60
3.2.3.1 Electroforesis y preparación de las muestras.....	62
3.2.3.2 Selección de bandas.....	63
3.2.4 Análisis densitométrico de las bandas.....	63
3.2.5 Cuantificación del daño genómico.....	65
3.2.6 Análisis filogenético.....	66
3.2.7 Análisis mediante <i>clusters</i>	67
3.3 Expresión génica diferencial entre variantes metastáticas y el tumor.....	67
3.3.1 Modelo celular utilizado para el estudio.....	67
3.3.1.1 Condiciones de cultivo.....	68
3.3.1.2 Extracción de RNA.....	68

3.3.2 <i>Microarrays</i>	69
3.3.2.1 cDNA <i>microarray</i> de Research Genetics.....	70
3.3.2.2 Organización del <i>array</i>	71
3.3.3 Protocolo de hibridación del <i>array</i>	72
3.3.4 Análisis con el programa <i>Pathways</i> TM	75
3.3.5 Procesamiento de datos.....	77
3.3.6 Comprobación mediante PCR a tiempo real de los resultados obtenidos del análisis del <i>array</i>	77
3.3.6.1 Transcripción inversa (RT) de los RNAs.....	79
3.3.6.2 Puesta a punto de las PCRs y comprobación de los fragmentos amplificados... 80	
3.3.6.3 PCR a tiempo real.....	80
3.3.6.4 Determinación de los cambios de expresión.....	81
IV. <u>Resultados</u>	83
4.1 Asociación entre el <i>status</i> de apoptosis tumoral y la presencia de inestabilidad de microsatélites en carcinomas ductales infiltrantes de mama.....	85
4.1.1 Determinación de inestabilidad de microsatélites en los tumores: asociación con la pérdida de apoptosis y las características clínico-patológicas.....	85
4.1.2 Análisis de mutaciones en el tercer exón del gen <i>bax</i> y expresión de la proteína Bax.....	88
4.2 Influencia de la inhibición de la apoptosis sobre el acúmulo de alteraciones genéticas en células de cáncer de mama: <i>in vitro</i> , y en tumores y metástasis <i>in vivo</i>	90
4.2.1 Descripción de las líneas celulares y de las variantes tumorales y metastáticas analizadas.....	90
4.2.2 Análisis del daño genómico mediante AP-PCR.....	92
4.2.2.1 Determinación del límite de cambio de la técnica.....	92
4.2.2.2 Análisis de los patrones de bandas.....	94
4.2.3 Análisis global del daño genómico en el modelo experimental.....	95
4.2.4 Daño genómico asociado a la sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x _L	96
4.2.5 Selección celular inducida por la inhibición del proceso apoptótico: efecto de la variabilidad genética sobre la tumorigénesis y la progresión metastática.....	98

4.2.5.1	Análisis del daño genómico en variantes tumorales.....	99
4.2.5.2	Análisis del daño genómico en variantes metastáticas.....	100
4.2.6	Relación entre daño genético y capacidad tumorigénica y metastática.	101
4.2.7	Análisis del acúmulo de alteraciones en variantes metastáticas con diferente organoespecificidad.....	104
4.2.7.1	Selección de variantes metastáticas con diferente organoespecificidad.....	106
4.2.8	Clasificación mediante <i>clusters</i> de los cambios genéticos detectados por AP-PCR.....	110
4.3	Expresión génica diferencial en variantes metastáticas con diferente organoespecificidad.	112
4.3.1	Evaluación de las hibridaciones del <i>array</i>	112
4.3.2	Análisis de los datos procedentes del <i>array</i>	115
4.3.3	Determinación de los cambios de expresión.	118
4.3.3.1	Identificación de genes diferencialmente expresados.	121
4.3.4	Comprobación mediante PCR a tiempo real de los niveles de expresión de algunos de los genes seleccionados mediante el análisis del <i>array</i>	128
V.	<u>Discusión.</u>	133
5.1	Asociación entre el <i>status</i> de apoptosis y la presencia de inestabilidad de microsatélites en carcinomas ductales infiltrantes de mama.	137
5.1.1	Estudio de la existencia de mutaciones <i>frameshift</i> y del nivel de expresión de Bax.....	137
5.1.2	Análisis de la existencia de inestabilidad de microsatélites.....	138
5.2	Acúmulo de alteraciones genéticas asociadas a la inhibición de la apoptosis en la progresión metastática del cáncer de mama.....	141
5.2.1	Sobreexpresión de moléculas antiapoptóticas y aumento del daño genómico.....	142
5.2.2	Acúmulo de alteraciones genéticas durante el proceso de progresión tumoral del cáncer de mama.	144
5.2.3	Relación entre inestabilidad genética y capacidad tumorigénica y metastática.....	146
5.2.4	Variabilidad genética y localización de las metástasis.....	149

5.3 Expresión génica diferencial entre variantes metastáticas con distinta localización.....	150
5.3.1 Identificación de genes asociados a la actividad metastática de las células.....	152
5.3.2 Identificación de genes relacionados con la organoespecificidad en ganglio.....	158
5.3.3 Genes potencialmente asociados a metástasis ósea y pulmonar.....	161
VI. <u>Conclusiones.</u>	165
VII. <u>Bibliografía.</u>	169

I. Introducción

1.1 Cáncer de mama.

El cáncer de mama es el tipo de tumor más frecuente en mujeres, representa un 18% de los tumores femeninos, siendo la segunda causa de muerte por cáncer en los países occidentales (Bundred, 2001).

Existen numerosos factores asociados a un mayor riesgo de padecer este tipo de cáncer, como el *status* hormonal de las pacientes, una menarquia temprana y una menopausia tardía, que incrementan entre un 30-50% el riesgo de padecer esta enfermedad; todo ello relacionado con los niveles de estrógenos circulantes (Vogel, 2000). La incidencia del cáncer de mama aumenta con la edad (Metttlin, 1999), y también varía considerablemente en función de las áreas geográficas y de las etnias. Así, las mujeres caucásicas de Europa y Norteamérica tienen un riesgo 5 veces superior de padecer este tipo de cáncer que las mujeres asiáticas (Adami et al., 1998).

La transformación maligna de las células del epitelio mamario implica cambios tanto genéticos como epigenéticos, que acaban induciendo una proliferación celular incontrolada y una muerte celular aberrante. Todas estas alteraciones favorecen el proceso de progresión tumoral, y la posterior aparición de metástasis (Russo et al., 1998).

La adquisición de capacidad metastática de las células de cáncer de mama se asocia con un mal pronóstico, y es el problema clínico de mayor relevancia, ya que es lo que en último término causa la muerte de las pacientes. Una de las particularidades del cáncer de mama es que las metástasis suelen aparecer varios años después de la exéresis quirúrgica del tumor primario, lo que implica la existencia de micrometástasis que han podido permanecer en el organismo un promedio de entre 5 y 15 años, de forma silente y clínicamente indetectables (Karrison et al., 1999).

Conocer que alteraciones genéticas están implicadas en cada una de las fases del proceso de progresión tumoral, así como sus consecuencias biológicas, es necesario para poder prevenir y tratar, de una forma adecuada, la evolución metastática de las pacientes con cáncer de mama.

1.1.1 Bases moleculares.

El cáncer de mama es una enfermedad altamente heterogénea, tanto desde el punto de vista histológico como molecular, que se caracteriza por la existencia de numerosas aberraciones genéticas (Welch y Wei, 1998). Algunas de las alteraciones descritas, como la sobreexpresión de c-erbB2 o la pérdida de función de p53, están implicadas directamente en el proceso de progresión tumoral, y otras como la presencia de inestabilidad de microsatélites confieren inestabilidad genética, incrementando así la probabilidad de adquirir alteraciones genéticas secundarias (Ingvarsson, 1999). En la Tabla 1 se recogen algunas de las principales alteraciones genéticas implicadas en esta patología.

Tabla 1. Principales alteraciones genéticas asociadas a cáncer de mama.

Gen	Localización	Función celular	Alteración genética (%)	Referencias
c-erbB2	17q12	Receptor de factor de crecimiento	Sobreexpresión /Amplificación (20-30%)	Schnitt, 2001
c-myc	8q24	Proliferación, apoptosis	Sobreexp./Amp (50-100%)	Liao y Dickson, 2000
ciclina D1	11q13	Ciclo celular	Sobreexp./Amp (20-50%)	Barnes y Gillett, 1998
ciclina E	19q12->q13	Ciclo celular	Sobreexpresión (0-88%)	Scott y Walker, 1997 Steeg y Zhou, 1998
EGFR	7q21	F. de crecimiento	Sobreexp./Amp (40%)	Fox y Harris, 1997
TGF- α	2p11-p13	F. de crecimiento	Sobreexpresión	Dahiya y Deng, 1998
p53	17p13.1	Inestabilidad genética	Mutación/LOH (20-25%)	Bièche et al., 1995
BRCA1	17q21	Reparación DNA,	Mutación/LOH (<5%)	Nathanson et al., 2001
BRCA2	13q12-q13	ciclo celular		

Aproximadamente el 10% de los tumores de mama son hereditarios, y de estos, entre un 15-20% tienen mutaciones de los genes **BRCA1** y **BRCA2** en la línea germinal. Estos dos genes supresores de tumores preservan la estructura de la cromatina actuando en el proceso de reparación y recombinación del DNA, en el control del ciclo celular y la regulación transcripcional de otros genes (Venkitaraman, 2002). Entre los genes diana de la acción de BRCA1 se encuentran p53, p21 y Bcl-x_L. BRCA1 interactúa uniéndose específicamente a

BRCA2, p53 y RAD51, entre otras proteínas. En el caso de BRCA2 no se ha encontrado homología con otros genes y la proteína contiene dominios cuya función no se ha definido (Nathanson et al., 2001).

El gen supresor de tumor **p53** está implicado en el mantenimiento de la estabilidad genética. En presencia de daño en el DNA, p53 induce parada de ciclo celular para permitir la reparación y, si esto no es posible, activa el programa de muerte celular por apoptosis (Harrington et al., 1994). Entre un 20-25% de los tumores de mama tienen mutaciones somáticas puntuales en este gen supresor de tumor (Bièche y Lidereau, 1995). La disfunción de p53 se asocia con peor pronóstico especialmente en pacientes sin afectación ganglionar (Bergh, 1999; Mirza et al., 2002).

La familia de receptores tirosina quinasa, al que pertenece el receptor del factor de crecimiento epidérmico, tiene un papel central en el proceso de progresión tumoral. En cáncer de mama, el pronóstico de las pacientes se correlaciona inversamente con la sobreexpresión y/o amplificación de alguno de estos receptores (Kim et al., 1999). La expresión de **EGF-R** (*epidermal growth factor receptor*) se correlaciona con la positividad de ganglios linfáticos axilares, y en general su expresión es mayor en las metástasis (Battaglia et al., 1988).

Otro de los miembros de esta familia, el proto-oncogen **c-erbB-2**, también conocido como neu o HER2/neu, está amplificado y/o sobreexpresado en un 20-30% de los carcinomas de mama humanos y en muchas de las líneas celulares de cáncer de mama (Dowsett et al., 2000). La sobreexpresión de este factor de crecimiento se asocia con mayor agresividad de los tumores y peor pronóstico, además de disminuir la sensibilidad de las células tumorales a la terapia sistémica adyuvante (Dahiya y Deng, 1998; Beenken et al., 2001).

También se han relacionado factores de crecimiento con cáncer de mama. El **TGF- α** (*transforming growth factor α*), se ha detectado en lesiones benignas de mama y en adenocarcinomas, aunque su expresión suele ser mayor cuando aumenta el grado de malignización (Perroteau et al., 1986). Este factor está implicado en estimular la proliferación celular, y puede ser secretado de forma autocrina por las propias células tumorales (Dahiya y Deng, 1998).

Otras alteraciones descritas en cáncer de mama están más relacionadas con la inestabilidad genética. Una de ellas es la existencia de **aberraciones cromosómicas**, una característica común a la práctica totalidad de tumores. De hecho, las anomalías cromosómicas son el cambio genético más frecuente en el cáncer de mama, encontrándose alteraciones en prácticamente todos los cromosomas. Estos desequilibrios de los cromosomas podrían ser suficientes en determinadas circunstancias para proporcionar una ventaja selectiva de crecimiento (Dahiya y Deng, 1998), pudiendo contribuir a la tumorigénesis al modificar la dosis de algunos genes.

El desequilibrio alélico o **pérdida de heterocigosis (LOH)** afecta a una gran cantidad de *loci* cromosómicos, sugiriendo la presencia de genes supresores de tumores, como p53, BRCA1 o BRCA2 (Gentile et al., 2001). Existen numerosas zonas de LOH implicadas en cáncer de mama como por ejemplo el brazo corto del cromosoma 8 (8p), la región del cromosoma 9, 9p22-p23, así como LOH en 1q, 3p 7q, 13q, 17p y 16q, entre otros (Deng et al., 1994; Hirano et al., 2001).

La **inestabilidad de microsatélites**, consecuencia de la pérdida de función de los genes implicados en la reparación de *mismatch*, puede darse en secuencias codificantes, aunque mayoritariamente afecta a secuencias anónimas. La existencia de este tipo de inestabilidad es un signo de pérdida de la integridad del DNA, además de estar implicado directamente en favorecer el acúmulo de alteraciones genéticas (Perucho, 1996; Malkhosyan et al., 1996). Su incidencia en el cáncer de mama es controvertida, el porcentaje y el momento de aparición en el proceso de progresión tumoral varía considerablemente según los estudios (Claij y te Riele, 1999) (Ver apartado **1.3.5.1** Introducción).

1.1.2 Progresión tumoral en el cáncer de mama.

En cáncer de mama, a diferencia de lo que sucede en otros tumores, no está claro que el proceso de progresión tumoral venga definido por una relación lineal entre etapas bien delimitadas. A pesar de esto, existen evidencias de que es un proceso en múltiples pasos (*multi-step*) a través de los cuales, y de forma secuencial, se irían acumulando alteraciones genéticas en las células que configurarían el fenotipo de malignización (Russo et al., 1998;

Bai et al., 2001). Muchas de esas alteraciones aún no han sido identificadas, y se desconoce cual es su implicación en la progresión tumoral.

En la Figura 1 se muestra uno de los modelos propuestos para explicar la progresión del cáncer de mama, indicándose algunas de las alteraciones genéticas descritas, como son las alteraciones en p53, BRCA1 y BRCA2, factores de crecimiento, oncogenes y LOH en diferentes regiones del genoma (Bièche y Lidereau, 1995).

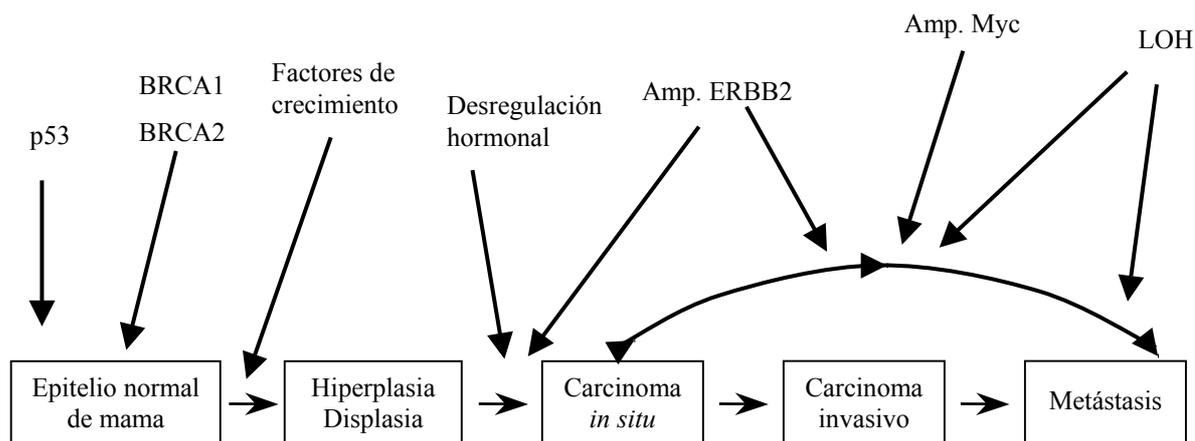


Figura 1. Modelo de progresión tumoral propuesto para cáncer de mama (adaptado de Bièche y Lidereau, 1995).

Sin embargo, este proceso secuencial no ha sido reproducido experimentalmente. A partir de lesiones de mama procedentes de diferentes estadios, no se obtuvieron líneas celulares correspondientes a fases intermedias de la progresión tumoral, lo cual dificulta el establecimiento de modelos así como la determinación de las posibles alteraciones genéticas implicadas directamente en cada una de las etapas (Russo et al., 2000). Por otro lado, teniendo en cuenta la heterogeneidad que caracteriza el cáncer de mama, tanto a nivel histológico y bioquímico, como a nivel clínico y geográfico es cuestionable la existencia de un único modelo genético que explique la progresión tumoral (Nathanson et al., 2001; Welch y Wei, 1998).

A pesar de esta heterogeneidad, existen algunas alteraciones que se asocian de forma recurrente con el proceso de progresión tumoral, así la presencia de LOH se detecta ya en etapas tempranas, como son las hiperplasias ductales y las hiperplasias ductales atípicas, sugiriendo la presencia en esos *loci* de genes supresores de tumores determinantes en la malignización de las células (Kittiniyom et al., 2001; Kurose et al., 2001). Por otro lado, la amplificación/sobreexpresión de oncogenes como EGF-R o Her-2 se detectan principalmente

en las etapas invasivas (Bange et al., 2001). También se ha demostrado la importancia que tienen las alteraciones epigenéticas tanto en el desarrollo del tumor como en la progresión. Existen numerosos genes inactivados por metilación, implicados en la regulación del ciclo celular como p16, receptores hormonales, moléculas de adhesión como E-cadherina e inhibidores de metaloproteasas de matriz extracelular, entre otros (Yang et al., 2001).

Dada la dificultad para establecer modelos que expliquen la progresión tumoral en cáncer de mama, habría que tener en cuenta que quizá no son tan importantes mutaciones puntuales, como alteraciones globales de determinadas vías de señalización implicadas en crecimiento, diferenciación y supervivencia, que convergen entre sí, y no pueden ser consideradas como elementos aislados (McCormick, 1999). Además, el fenotipo celular es el resultado tanto del potencial genético como de la interacción que las células establecen con el microentorno en el que se encuentran (Nathanson et al., 2001).

La **diseminación metastática** de las células del tumor primario a órganos distantes junto con la formación de metástasis es la culminación del proceso de progresión tumoral, que implica varias etapas y complejas interacciones entre las células tumorales y las células del huésped (Figura 2) (Bundred, 2001).

Una vez formado el tumor primario, se requiere la formación de vasos sanguíneos o angiogénesis para garantizar su crecimiento. El proceso de neoformación vascular es el resultado de un predominio de moléculas activadoras frente a la presencia de moléculas inhibitoras, producidas por el propio tumor y por las células del microentorno. La mayoría de tumores sólidos secretan VEGF (*vascular endothelial growth factor*), uno de los más potentes mitógenos endoteliales (Böhle y Kalthoff, 1999). El siguiente paso en la cascada de diseminación metastática es la disociación de algunas células del tumor primario. Esta pérdida de interacciones celulares está ocasionada por alteraciones en moléculas de adhesión como las integrinas (Engers y Gabbert, 2000). La migración se lleva cabo cuando las células tumorales degradan proteolíticamente la matriz extracelular y pueden invadir el estroma circundante. Las metaloproteinasas (MMP) son enzimas producidas por las células tumorales que tienen un papel fundamental en la proteólisis de proteínas de la matriz extracelular como colágeno, laminina o elastina entre otras (Vihinen y Kähäri, 2002).

Además de degradar la matriz, se ha descrito que las células tumorales son capaces de desplazarse activamente hacia esas zonas modificadas por la proteólisis. En este proceso podrían intervenir tanto factores quimiotácticos del entorno como factores de la propia célula tumoral. Esta capacidad de motilidad de la célula tumoral también será necesaria en etapas posteriores como la intravasación y la extravasación (Gómez y Curiel, 1998). La intravasación es el mecanismo a través del cual las células penetran en el torrente sanguíneo o linfático que las vehiculizará permitiéndoles la diseminación de forma pasiva hacia otras partes del organismo e interactuar con otros tipos celulares. En un momento dado, las células tumorales pueden quedar ancladas (adhesión/arrest), ya sea por limitaciones físicas o bien por unión a moléculas específicas implicadas en adhesión, lo que facilitará la extravasación, un proceso que implica diferentes etapas como proteólisis de la pared vascular, adhesión célula-sustrato, ya sea a células endoteliales como a proteínas del endotelio, y locomoción activa hacia el nuevo órgano (Gómez y Curiel, 1998; Paku et al., 2001). Finalmente las células tumorales tendrán que ser capaces de migrar dentro del órgano que han colonizado, si esto va acompañado de un posterior crecimiento, se llegarán a formar metástasis macroscópicas, clínicamente detectables en un órgano diferente al de origen (Yoshida et al., 2000). La complejidad del proceso metastático hace que sea altamente selectivo, y que sólo una pequeña subpoblación de células que han migrado del tumor primario tenga el potencial necesario para superar todas las etapas y finalmente crecer en un órgano distante (Hampl et al., 1999; Fidler, 2002).

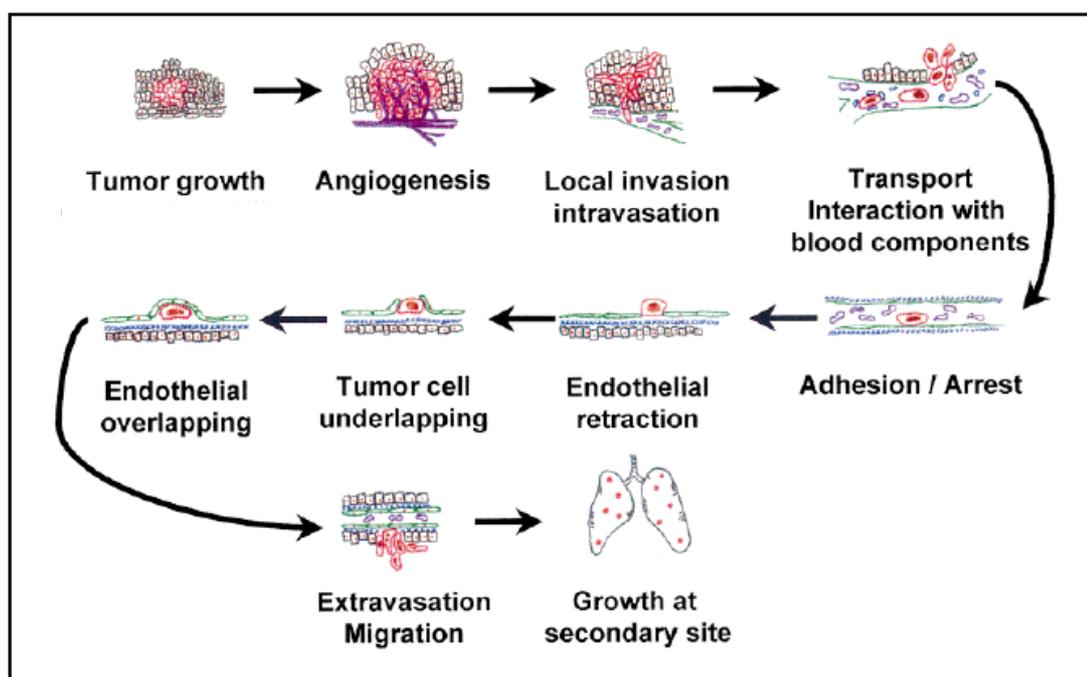


Figura 2. Etapas del proceso de progresión tumoral y diseminación metastática (Welch y Rinker-Schaeffer, 1999).

En pacientes afectas de cáncer de mama, las metástasis suelen aparecer años después de la exéresis quirúrgica del tumor. El desarrollo de estas metástasis tardías implica que las células con habilidad metastática permanecen en estado quiescente (*dormancy*), como alternativa al crecimiento tumoral continuo (Demicheli et al., 1997). El desarrollo final de metástasis clínicamente detectables depende tanto del propio tumor como del microentorno donde se encuentran y la relación que entre ellos se establezca, así como de la capacidad del sistema inmune del individuo para actuar de una forma efectiva durante ese periodo (Naumov et al., 2002).

La existencia de *dormancy* se ha puesto de manifiesto en modelos tumorales animales (Holmgren et al., 1995) y también en tumores humanos tanto de mama como de melanoma (Uhr et al., 1991). Este fenómeno forma parte del proceso secuencial y altamente selectivo, que implica múltiples interacciones huésped-tumor durante el desarrollo metastático (Welch y Rinker-Schaeffer, 1999).

Existen varias hipótesis para explicar que las células metastáticas puedan permanecer silentes. Las micrometástasis pueden tener altos índices de proliferación que quedan compensados por un incremento en la tasa de apoptosis (Holmgren et al., 1995), además muchas de estas células quedan paradas en la fase G₀ del ciclo celular, sin perder la capacidad de volver a ciclar y llegar a establecer metástasis años después (Engers y Gabbert, 2000).

Históricamente se ha considerado al sistema inmune, más específicamente la inmunidad mediada por células, como uno de los principales responsables de este fenómeno (Uhr et al., 1991; Schirmacher, 2001). Trabajos actuales han demostrado además la implicación que otros factores como el control de la angiogénesis, tienen en el proceso de *dormancy* (Hart, 1999).

El microentorno del órgano diana juega un papel fundamental en modular la supervivencia y posterior crecimiento de las células metastáticas, ya que afecta la expresión génica, la adhesión celular, la invasión y la respuesta a los diferentes factores de crecimiento presentes en el medio, pudiendo determinar así la supervivencia o muerte celular (Ladeda et al., 2001). Como se constata clínicamente, la interconexión de todos estos factores podrían favorecer el crecimiento de las metástasis años más tarde de la exéresis del tumor (Karrison et al., 1999). Aunque el promedio de la aparición de las metástasis tardías varía entre 5 y 15 años, se han

llegado a detectar metástasis 20-25 años más tarde. Este estado quiescente duraría hasta que algún cambio en las células tumorales o en el tejido diana ofrezca una ventaja proliferativa.

1.2 Apoptosis y cáncer.

La muerte celular es un proceso fisiológico, necesario para el normal desarrollo y existencia de los organismos multicelulares. La **apoptosis**, es el estereotipo de muerte celular programada. Este término griego que hace referencia a la caída de las hojas fue propuesto por Kerr y colaboradores (Granville et al., 1998).

La apoptosis, es un proceso de muerte celular altamente conservado a lo largo de la evolución, desde nemátodos hasta mamíferos. Se describió inicialmente por sus características morfológicas, incluyendo la pérdida de los contactos intercelulares, invaginación de la membrana citoplasmática, encogimiento celular, condensación de la cromatina, fragmentación del DNA y la posterior fragmentación celular en los llamados cuerpos apoptóticos (Korsmeyer, 1995). Se trata además de un proceso controlado genéticamente, este descubrimiento fue de gran importancia para entender la biología del desarrollo y la homeostasis de los tejidos, ya que el número de células de un tejido está regulado tanto por factores que influyen en la supervivencia celular, como por los que controlan la proliferación y diferenciación (Thompson, 1995). Como cualquier otro programa metabólico o del desarrollo, la apoptosis puede verse afectada por alteraciones genéticas. De hecho, en numerosas patologías humanas, desde enfermedades neurodegenerativas hasta cáncer, pasando por enfermedades autoinmunes, se han descrito fallos en las vías apoptóticas (Hetts, 1998).

1.2.1 Fases funcionales de la apoptosis.

Al igual que el ciclo de división celular, las vías que gobiernan la muerte celular programada (PCD), son complejas y están altamente reguladas. El proceso apoptótico se puede subdividir en tres fases funcionales diferentes: fase de iniciación, fase efectora, y fase de degradación o ejecutora (Kroemer et al., 1997) (Figura 3).

Fase de iniciación

La fase de iniciación se caracteriza por ser altamente heterogénea. Existe una gran variedad de factores tanto extracelulares, incluyendo hipoxia, radiación, receptores de muerte, pérdida de interacción célula-matriz, depleción de factores de crecimiento, o shock térmico; como intracelulares, entre los que se incluye el daño en el DNA, ya sea inducido por defectos en los *checkpoints* (puntos de control) del ciclo celular o por toxinas exógenas, que pueden activar el programa de apoptosis (Jäättelä, 1999; Li y Yuan, 1999).

Una de las vías moleculares de muerte celular mejor caracterizadas es la relacionada con los llamados receptores de muerte. Estas moléculas pertenecen a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), algunos de los mejor caracterizados como inductores de apoptosis son TNF-R1, Fas (CD95), DR3, DR4 y DR5 entre otros (Ashkenazi y Dixit, 1998). Estos receptores tienen un dominio citosólico conservado, conocido como dominio de muerte, DD (*Death Domain*), capaz de interactuar con la maquinaria apoptótica intracelular. Los receptores de muerte una vez activados por unión de su ligando específico, interactúan a través del DD con moléculas adaptadoras que también contienen ese dominio, además de tener un dominio adicional para la inducción de muerte celular, conocido como dominio efector de muerte (DED: *Death Effector Domain*) (Berglund et al., 2000). El dominio DED de las proteínas adaptadoras puede interactuar con ciertas caspasas que también contienen dominios DED homólogos dentro de sus prodominios, es el caso de las caspasas 8 y 10 (Muzio et al., 1998). La oligomerización de caspasas dentro del complejo del receptor de muerte, hace que caspasa 8 se active por autoproteólisis, eliminándose el prodominio DED que contiene, por lo que la forma activa de la caspasa se libera al citosol, donde podrá procesar y activar otras caspasas (Slee et al., 1999).

En algunas líneas celulares, como la línea linfoblástica B SKW6.4 y la línea de linfoma T H9 se ha visto que la vía de apoptosis inducida por Fas es independiente de la actividad mitocondrial. Sin embargo, en líneas celulares como Jurkat la sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-x_L es capaz de bloquear la apoptosis inducida por esta vía (Scaffidi et al., 1998).

Fase efectora

A pesar de la gran variedad de estímulos que son capaces de inducir el programa de muerte celular, las diferentes señales convergen en la fase efectora, donde se determinará si la célula

entra o no en apoptosis. Esta fase se caracteriza por estar regulada a nivel mitocondrial en la mayoría de sistemas estudiados (Gross et al., 1999).

Fase ejecutora

La fase ejecutora se caracteriza por la activación de una familia de cistein proteasas conocidas como caspasas. Durante esta fase se pondrán de manifiesto las características bioquímicas y morfológicas propias de la apoptosis (Kroemer et al., 1997).

Algunos de los genes implicados en la fase ejecutora final de la apoptosis fueron descritos inicialmente en *Caenorhabditis elegans*, es el caso de CED-3 y CED-4, demostrándose posteriormente que la maquinaria bioquímica que gobierna la apoptosis en nemátodos y mamíferos está altamente conservada (Wang, 2001).

En humanos, ICE fue el primer miembro descrito de una familia de cistein proteasas, que de forma casi exclusiva degradan sus sustratos en residuos de ácido aspártico (Asp). Desde el descubrimiento inicial de ICE, se han descrito hasta 13 moléculas homólogas conocidas con el nombre genérico de **caspasas** (cisteinil proteasas específicas de aspartato) (Thornberry y Lazebnik, 1998). Estas proteasas están presentes en el citoplasma en forma de zimógenos, y para pasar a la forma activa requieren ser procesadas proteolíticamente ya sea por otras proteasas, generalmente caspasas, o por procesamiento autocatalítico (Nicholson y Thornberry, 1997).

El análisis filogenético de los miembros de la familia de caspasas permitió agrupar estas enzimas en dos grandes subfamilias: ICE y CED-3. Se ha sugerido que los miembros de la subfamilia ICE (caspasa 1, 4 y 5) podrían participar en sucesos proinflamatorios, mientras que los miembros de la subfamilia de CED-3 (caspsas 2 a 9) están principalmente implicadas en las vías de inducción de apoptosis (Salvesen y Dixit, 1997).

Ya que las caspasas activan sus sustratos mediante roturas en residuos Asp, y también se pueden autoactivar de la misma manera, es fácil la existencia de cascadas proteolíticas, con algunas caspasas funcionando como iniciadoras (*upstream*) y otras como efectoras (*downstream*) (Siegel et al., 1998). Las caspasas iniciadoras se caracterizan por la presencia de largos prodominios N-terminal, que además son capaces de unir otras proteínas también implicadas en la cascada de activación. Las caspasas efectoras, que funcionan como efectoras últimas de la apoptosis, en general tienen prodominios pequeños y son activadas por caspasas *upstream* (Li y Yuan, 1999).

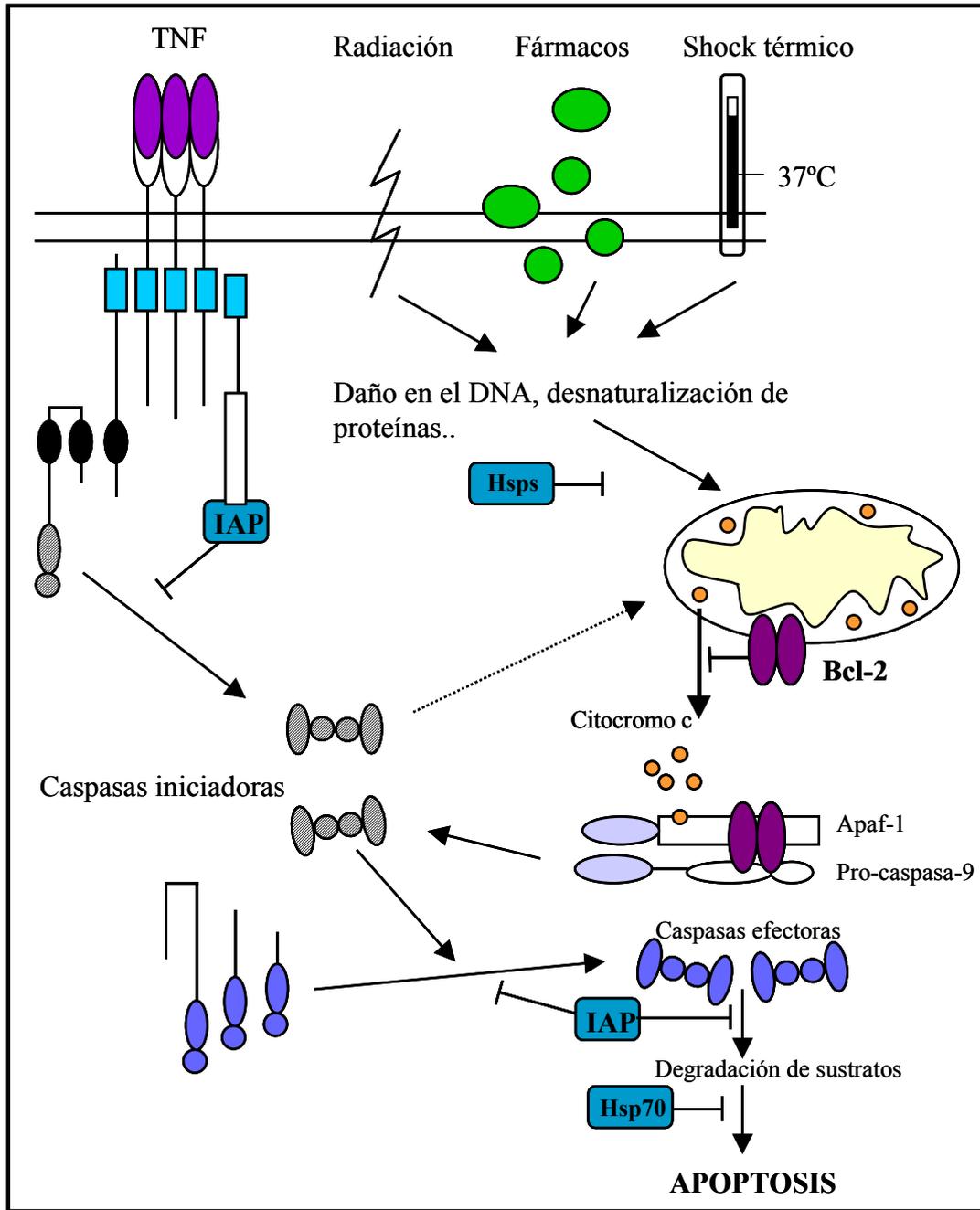


Figura 3. Principales vías de inducción de apoptosis. La **vía de los receptores de muerte** (parte izquierda de la figura), mediada por la activación de receptores de la familia del factor de necrosis tumoral tras unión con su ligando específico. La **vía mitocondrial** (derecha de la figura) es la principal encargada de inducir apoptosis como respuesta tanto a señales extracelulares, como a insultos internos como la existencia de daño en el DNA. Las diferentes vía convergen en la mitocondria, lugar donde están ubicadas las moléculas de la familia de Bcl-2.

Estas dos vías mayoritarias de inducción de apoptosis convergen a nivel de la activación de caspasa 3. A partir de este punto se activan numerosos subprogramas, la suma de los cuales es responsable de la muerte de la célula por apoptosis (adaptado de Jäättelä, 1999).

1.2.2 Genes de la familia de Bcl-2.

Como se ha dicho anteriormente, una de las características comunes a un mayor número de procesos apoptóticos, es la regulación a nivel mitocondrial. Factores de crecimiento, citoquinas o daño en el DNA, son algunos de los factores implicados en inducir apoptosis a través de la mitocondria, mediante señales que afectan la función de los miembros de la familia de Bcl-2, implicados en la regulación de la función mitocondrial (Kroemer et al., 1997; Lowe y Lin, 2000).

El proto-oncogen Bcl-2 se describió inicialmente en el punto de rotura de la translocación cromosómica t(14;18) en linfomas foliculares de célula B. Con esta reordenación cromosómica Bcl-2 se transloca al *locus* de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas, induciendo una sobreexpresión masiva del mismo en las células B (Tsujimoto et al., 1985). El potencial oncogénico de Bcl-2 se verificó posteriormente mediante el uso de ratones transgénicos poseedores de una construcción que representaba la fusión entre Bcl-2 y una inmunoglobulina con resultado final de sobreexpresión de Bcl-2, observándose que en los animales aparecían linfomas de células B maduras las cuales mostraban una mayor supervivencia, mientras que no aumentaba la tasa de proliferación (McDonnell et al., 1989).

A diferencia de otros oncogenes, Bcl-2 incrementa la supervivencia celular en condiciones de crecimiento subóptimas inhibiendo apoptosis (Kelekar y Thompson, 1998). La sobreexpresión de Bcl-2 es capaz de proteger a las células frente a un amplio abanico de señales apoptóticas, como privación de factores de crecimiento, irradiación, drogas citotóxicas, calor, desregulación de oncogenes y, en algunos tipos celulares, de la activación de receptores de muerte (Jäätelä, 1999).

Hasta el momento se han identificado en humanos hasta 17 miembros de la familia de Bcl-2, entre los que hay tanto moléculas proapoptóticas como antiapoptóticas (Tsujimoto y Shimizu, 2000).

Todos los miembros de la familia comparten al menos 1 dominio de homología con Bcl-2 (Adams y Cory, 2001). Los miembros antiapoptóticos como Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-W, Mcl-1, A1 y Boo conservan los 4 dominios de homología (BH1 a BH4). El dominio BH4 es característico de los miembros que promueven supervivencia celular (Reed, 1997). En cuanto a los miembros proapoptóticos, su grado de conservación es menor, y existen 2 subfamilias

que difieren marcadamente en su relación con Bcl-2. La primera que incluye moléculas como Bax, Bak, Bad o Mtd (Bok), son muy parecidas a Bcl-2, y mantienen los dominios de homología BH1, BH2 y BH3. Los otros 7 miembros de mamíferos con capacidad apoptótica (Bik, Bid, Bim, Hrk, Blk, Bnip3 y Bbip3L) sólo tienen el dominio central BH3, estas proteínas no están relacionadas con ninguna otra proteína conocida, y sólo Bik y Blk son similares entre ellas (Tsujiyamoto y Shimizu, 2000) (Figura 4).

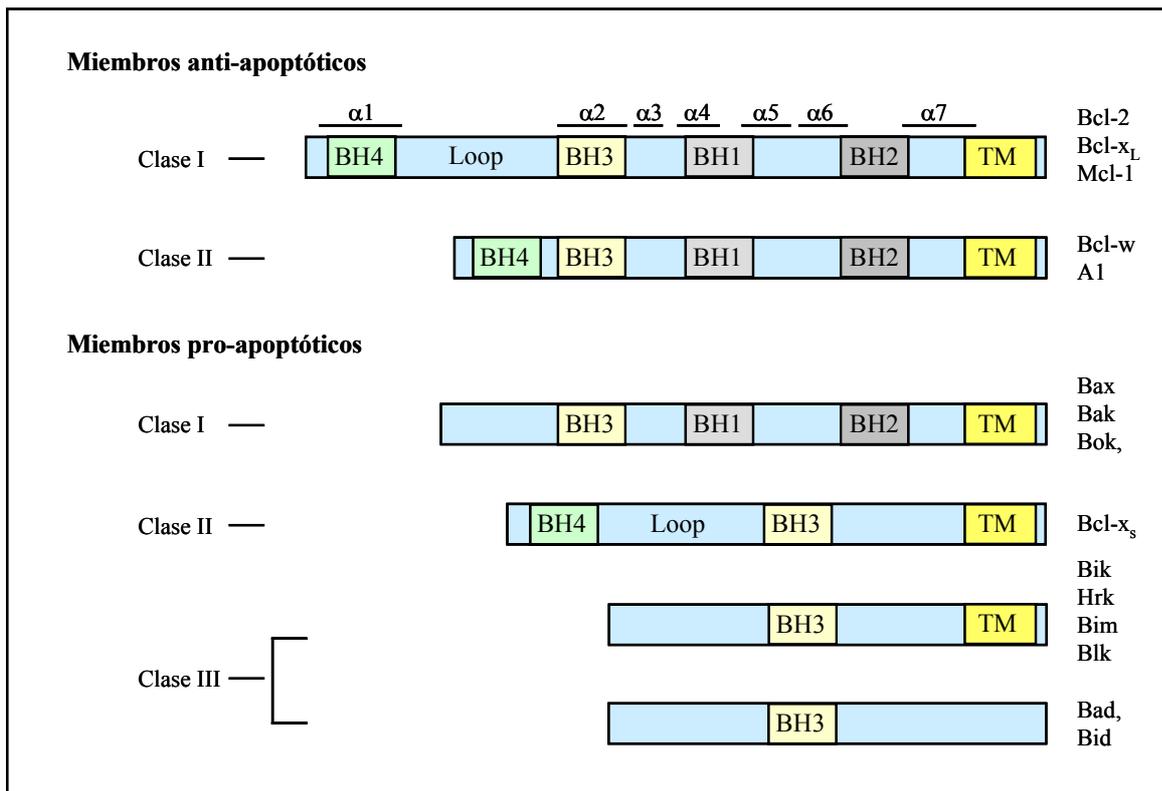


Figura 4. Clasificación de las proteínas de la familia de Bcl-2 en función de la organización de dominios. Se indican los dominios de homología de Bcl-2 (BH) y los dominios transmembrana (TM) (adaptado de Kelekar y Thompson, 1998).

La mayoría de moléculas de las 2 subfamilias con mayor grado de homología tienen un extremo C-terminal hidrofóbico, que facilita su interacción con el retículo endoplasmático, la envoltura nuclear y la membrana mitocondrial externa, que es donde reside mayoritariamente Bcl-2 (Krajewski et al., 1993). Sin embargo, Bax a pesar de tener el extremo C-terminal suele localizarse en el citosol, mientras que Bcl-x_L se encuentra tanto en forma soluble como unido a membranas (Antonsson y Martinou, 2000). La localización de estas proteínas cambia durante la apoptosis, induciéndose una redistribución hacia la membrana (Hsu et al., 1997).

Se han encontrado similitudes estructurales entre algunas proteínas de la familia de Bcl-2 y los dominios formadores de poro de algunas toxinas bacterianas, esto ha hecho pensar que estas proteínas podrían funcionar, al menos en parte, como formadoras de canales iónicos en las membranas intracelulares (Schendel et al., 1997). Estudios *in vitro* han demostrado que tanto Bcl-2 como Bcl-x_L, y también Bax uno de los miembros proapoptóticos de la familia, son capaces de formar poros en membranas lipídicas (Antonsson y Martinou, 2000). A pH fisiológico Bcl-2 es capaz de bloquear de forma prácticamente completa la actividad del poro inducido por Bax, estos resultados sugieren un posible mecanismo por el que Bcl-2 sería capaz de antagonizar la función proapoptótica de Bax. Los canales inducidos por moléculas pro y antiapoptóticas tienen propiedades diferentes, sobre todo con respecto a pH, seguramente como consecuencia de la diferente función de las proteínas (Antonsson et al., 1997). A pesar de estos resultados, aún no está clara la existencia de estos canales *in vivo*, y en caso de existir que transportarían exactamente (Reed, 1999 b). Algunos autores han propuesto que más que formar nuevos poros en la membrana mitocondrial, los miembros de la familia de Bcl-2 podrían estabilizar o perturbar canales ya existentes, como el poro de transición de permeabilidad (PT), que se forma en sitios de contacto entre membranas y permite el paso de nucleótidos de adenina y otras moléculas pequeñas (Crompton, 1999).

Los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 tienen además la capacidad de interactuar entre ellos mediante los dominios conservados: BH1, BH2 y BH3 (Korsmeyer, 1995; Kelekar y Thompson, 1998), y también son capaces de interactuar con otras proteínas no pertenecientes a la familia de Bcl-2, que podrían estar implicadas en su regulación (Vander Heiden y Thompson, 1999). Se ha sugerido que la heterodimerización induce la neutralización de una de las dos partes siendo la cantidad relativa de agonistas y antagonistas de muerte, más que sus niveles individuales, lo que define la sensibilidad de las células para entrar en apoptosis (Jäättelä, 1999).

Para formar los heterodímeros, una hélice α anfipática del dominio BH3 de las proteínas apoptogénicas se puede unir a un surco hidrofóbico de las proteínas antiapoptóticas creado por las hélices α de los dominios BH3, BH1 y BH2. En el grupo de proteínas que sólo tiene el dominio BH3, se supone que este corto motivo es necesario y probablemente suficiente para inducir apoptosis (Sattler et al., 1997). Estas proteínas podrían bloquear las proteínas antiapoptóticas, convirtiéndolas a una conformación inactiva o incluso apoptogénica. En los

miembros que inducen supervivencia, la capacidad de unión a BH3, sólo sería una parte de su acción antiapoptótica, requiriendo posiblemente otros efectores (Minn et al., 1999).

Sin embargo, aún quedan muchos aspectos relativos a la capacidad de interacción de los miembros de esta familia de proteínas por aclarar. Estudios recientes indican que existen mecanismos de muerte tanto dependientes como independientes de la heterodimerización de Bcl-2, Bcl-x_L y Bax (Zha y Reed, 1997; Minn et al., 1999).

En el caso de las proteínas que inducen supervivencia celular parece claro que la heterodimerización no es necesaria para que lleven a cabo su función (Minn et al., 1999). En cuanto a las proteínas con actividad proapoptótica, hay que diferenciar el grupo que conserva los dominios de homología BH1, BH2 y BH3 que también podrían llevar a cabo su función con independencia de la formación de heterodímeros (Adams y Cory, 1998). Mientras que en las proteínas proapoptóticas que sólo tienen el dominio BH3 la formación de dímeros es esencial para su actividad (Kelekar et al., 1997).

1.2.3 Papel de la mitocondria en la inducción de apoptosis.

La apoptosis puede ser inducida por una gran cantidad de factores tanto extracelulares como intracelulares. La mayoría de estas señales inductoras de muerte convergen en la mitocondria (Green y Reed, 1998). Este orgánulo tiene un papel fundamental en su control.

Tras recibir un estímulo proapoptótico, una de las características que precede a la muerte celular es la permeabilización de la membrana mitocondrial, seguida de la liberación de factores apoptogénicos, como el citocromo c o el factor inductor de apoptosis (AIF) desde el espacio intermembrana hacia el citosol, donde activarán moléculas implicadas en la fase efectora de la apoptosis (Kroemer et al., 1997).

AIF tiene la capacidad de inducir en el núcleo los cambios morfológicos típicos de la apoptosis de una forma caspasa independiente (Susin et al., 1999). El citocromo c en cambio es capaz de activar directamente caspasas mediante la unión con la proteína citoplasmática Apaf-1 en presencia de ATP o dATP, esto da lugar a la formación de un complejo oligomérico que recluta a procaspasa 9 induciendo su autoprocésamiento y posterior activación (Wang, 2001).

La liberación de AIF depende de la existencia de un poro de transición de permeabilidad que se caracteriza por la pérdida del potencial de membrana ($\Delta\psi$), en cambio la liberación de citocromo c puede ser tanto dependiente como independiente de PT (Tsujiimoto y Shimizu, 2000).

Por otro lado, la membrana mitocondrial externa es el lugar donde interaccionan los miembros de la familia de Bcl-2 (Loeffler y Kroemer, 2000).

Análisis genéticos y bioquímicos indican que los miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2 son los iniciadores de la apoptosis, y llevarían a cabo esta función uniéndose y bloqueando los mecanismos de protección ejercidos por los miembros antiapoptóticos (Jäättelä, 1999). Se ha visto que tanto Bcl-2 como Bcl-x_L previenen todos los cambios mitocondriales, incluyendo la pérdida del potencial de membrana y la liberación de citocromo c, un evento necesario para la posterior activación de caspasa 3 (Granville et al., 1998). Sin embargo, no está claro como tras la translocación de proteínas proapoptóticas del citosol a la mitocondria, inducida por los estímulos apoptóticos, se induce la liberación de activadores de caspasas como el citocromo c (Wolter et al., 1997). Se han propuesto dos posibles explicaciones, por un lado Bax podría formar poros en la membrana mitocondrial externa y así permitir la salida de citocromo c, o inducir indirectamente la liberación de citocromo c y la pérdida de potencial de membrana interfiriendo los efectos supresores de las proteínas antiapoptóticas, de forma que permitiría la activación de caspasas y secundariamente la abertura del poro (Jürgensmeier et al., 1998). También se propuso que Bcl-x_L podría tener la capacidad de secuestrar Apaf-1 y de esta forma bloquear la activación de caspasas, sin embargo, estudios posteriores no muestran ninguna evidencia sobre la formación de estos complejos, sino que más bien parece que Apaf-1 estaría en forma monomérica en el citosol (Moriishi et al., 1999).

1.2.4 Alteraciones de la apoptosis y cáncer.

Los defectos en las vías de señalización de apoptosis son frecuentes en las células tumorales. El desequilibrio que estas alteraciones producen al aumentar la supervivencia de las células, juega un papel muy importante tanto en la tumorigénesis y la progresión tumoral, como en la respuesta de los tumores a los agentes quimioterapéuticos (Wright et al., 1994; Krajewski et al., 1999; Strasser, 1999).

Los cambios genéticos que se seleccionan durante el proceso de progresión tumoral pueden afectar a las vías de regulación de apoptosis ya sean alteraciones que inducen resistencia a apoptosis, como son ganancias de función en los genes *bcl-2* y *bcl-x_L*, o bien disminución de las señales inductoras de muerte celular, por alteraciones en genes como p53 o la proteína activadora de caspasas Apaf-1 (Huang y Oliff, 2001).

Deficiencias en las vías de apoptosis pueden contribuir a la progresión tumoral tanto en las etapas iniciales de malignización celular, como en la progresión hacia el fenotipo invasivo y metastático de los tumores, ya que el aumento de la supervivencia celular crea un ambiente permisivo para la existencia de inestabilidad genética, en condiciones en las que normalmente se induciría muerte, como pueden ser fallos en los *checkpoints* del ciclo celular, crecimiento independiente de anclaje o privación de oxígeno y nutrientes entre otras (Hartwell y Kastan, 1994; Reed, 1999 b).

La apoptosis y los genes que la controlan, tanto inductores como inhibidores, tienen un gran efecto sobre el fenotipo maligno. Moléculas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-x_L se encuentran sobreexpresadas en diferentes tipos de tumores, confiriendo además resistencia frente a un gran número de quimioterápicos (Thompson, 1995). En cáncer de mama Bcl-2 se expresa entre el 60-80% de los casos (Leek et al., 1994; Silvestrini et al., 1994; Sierra et al., 1995; Kumar et al., 2000), preferentemente en tumores de grado histológico I y II (Sierra et al., 1998). La relación entre la expresión de este oncogen y los factores pronóstico varía según las series estudiadas. Mientras que en algunos casos se asocia a la presencia de metástasis ganglionares (Sierra et al., 1995) y un menor tiempo libre de enfermedad (Sjöström et al., 2002), en otros casos la expresión de Bcl-2 se relaciona con factores de buen pronóstico (Kymionis et al., 2001). La sobreexpresión de Bcl-2 en células derivadas de cáncer de mama humano induce un aumento de la capacidad de invasión y migración celular, y del número de metástasis en el animal de experimentación (Del Bufalo et al., 1997). De la misma manera Bax, un promotor de muerte se encuentra inactivado en ciertos tipos de cáncer de colon (Yamamoto et al., 1997) y en tumores hematopoyéticos (Meijerink et al., 1998). La pérdida de expresión de Bax en tumores de mama humanos se correlaciona con una menor supervivencia de las pacientes y una progresión tumoral más rápida (Kumar et al., 2000). Experimentalmente, se ha visto que contribuye a acelerar la tumorigénesis en cerebro y mama (Granville et al., 1998).

También se han encontrado alteraciones en otros genes relacionados con apoptosis como p53, un gen supresor de tumor que se encuentra inactivado en la mitad de los tumores humanos (Miyashita y Reed, 1995). p53 induce una parada del ciclo celular en G₁ en células que han sufrido daño genético, de esta forma se permite la reparación de los posibles errores antes de la replicación, evitando así que las células hijas puedan acumular mutaciones y contribuyan a la existencia de inestabilidad genética (Kuerbitz et al., 1992). Por otro lado si el daño en el DNA es excesivo, en condiciones normales, se induce apoptosis para evitar que las mutaciones pasen a las células hijas. Estudios con ratones *knockout* para esta proteína han demostrado que la p53 endógena podría participar en la apoptosis inducida por radiación en el timo, pero no para la muerte celular inducida por glucocorticoides u otras señales apoptóticas. Por lo tanto, el rol de p53 en apoptosis aparece ligado a la existencia de daño en el DNA, y podría ser estímulo y tejido específico (Harrington et al., 1994).

El oncogen *myc*, típicamente implicado en proliferación, puede ser un potente inductor de apoptosis bajo determinadas condiciones de estrés, daño genotóxico o privación de factores de crecimiento. Esta dualidad también la tienen otras moléculas como por ejemplo la proteína E2F1 (Evan y Vousden, 2001). En cáncer de mama la sobreexpresión de Bcl-2 y c-Myc incrementa el riesgo de metástasis ganglionares en las pacientes, lo que sugiere la existencia de un sinergismo entre los mecanismos de acción de estos dos oncogenes (Sierra et al., 1999).

La implicación de las vías apoptóticas en los mecanismos de progresión tumoral, hace que los diferentes genes y proteínas que regulan apoptosis puedan servir como potenciales dianas terapéuticas. En general, las proteínas reguladoras de apoptosis pueden afectar la muerte celular inducida por agentes quimioterápicos y potenciar la resistencia a múltiples fármacos (Schaich et al., 2001). Algunas de las aplicaciones que ya se están haciendo son el uso de oligonucleótidos antisentido contra Bcl-2, que tanto *in vitro* como en modelos animales, reduce los niveles de la proteína, haciendo por lo tanto a las células tumorales más sensibles al uso de agentes quimioterapéuticos (Reed, 1999 a).

También en diferentes tipos de tumores como los oligodendrogliomas de bajo grado, se ha descrito que la expresión de Bcl-2 impide la apoptosis inducida por radioterapia (Deininger et al., 1999).

1.3 Inestabilidad genética en relación con el cáncer.

1.3.1 El cáncer como proceso evolutivo.

El desarrollo del cáncer es un proceso evolutivo, y como tal implica replicación, variación y selección.

La progresión tumoral es un proceso de cambio gradual en el que las células adquieren de forma progresiva las características de crecimiento, angiogénesis, invasión, y metástasis que caracterizan a los tumores malignos. Siendo **el acúmulo secuencial de alteraciones genéticas lo que induce la malignización de las células** (Hellman, 1997).

En cada ronda de replicación, ya sea debido a factores exógenos o endógenos, las células pueden sufrir alteraciones en su material genético. La mayoría de estos errores son, o bien irrelevantes para la vida de la célula, o bien deletéreos, ya sea porque afectan a algún gen crítico para la viabilidad celular o porque se activa el programa de muerte celular por apoptosis (Boland y Ricciardiello, 1999). Sin embargo, se puede dar el caso de que alguna de estas alteraciones llegue a conferir a la célula una ventaja de crecimiento, bien por un incremento en la proliferación o por una disminución de la muerte celular (Nowell, 1976). Esta ventaja de crecimiento resultará en una **expansión clonal** de ese linaje celular en particular (Figura 5). Posteriormente, podría ocurrir de nuevo otra mutación que también proporcionará una ventaja de crecimiento a la célula que la sufre, y a toda su progenie (Cahill et al., 1999).

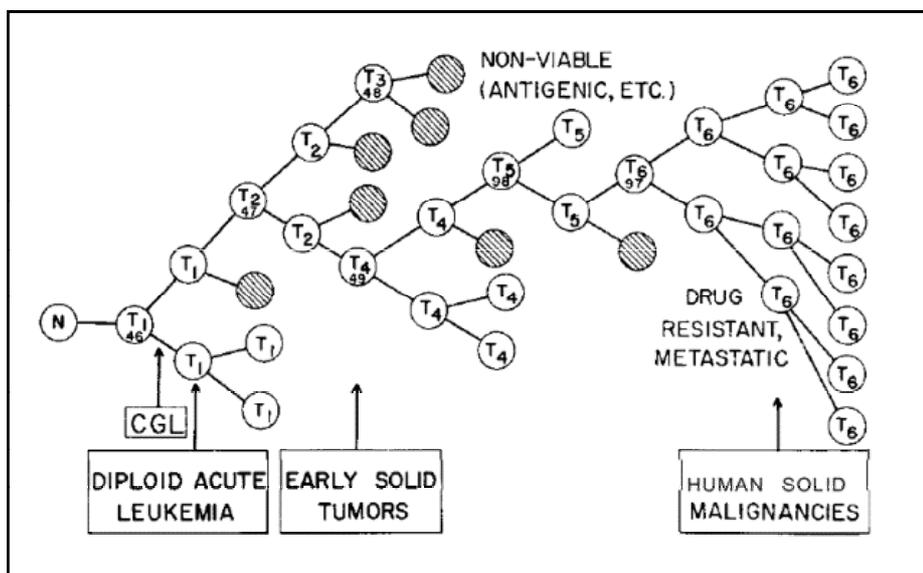


Figura 5. Modelo de progresión tumoral como proceso evolutivo (Nowell, 1976).

El acúmulo sucesivo de mutaciones que afectan al control del crecimiento, diferenciación y supervivencia es lo que caracteriza la progresión tumoral (McCormick, 1999). Este concepto, definido inicialmente por Foulds, implica la adquisición en múltiples pasos (*multistep*), de alteraciones que afectan tanto a protooncogenes como a genes supresores de tumores (Hellman, 1997). Estos dos tipos de genes son las principales dianas de las alteraciones ya que ambos están relacionados con el crecimiento celular, promoviéndolo o inhibiéndolo, respectivamente. Los protooncogenes tienen mutaciones de ganancia de función, y en general con sólo un alelo mutado su función ya se ve afectada, mientras que los genes supresores de tumores, tienen mutaciones de pérdida de función, por lo que salvo excepciones sólo se pierde su función si los dos alelos están mutados (Ross, 2000).

La progresión tumoral resulta de la heterogeneidad celular de los tumores y la selección de las subpoblaciones mejor adaptadas para sobrevivir en el entorno tumoral en que se encuentran (Breivik, 2001). El microentorno tisular será el encargado de seleccionar aquellas poblaciones celulares con las alteraciones genéticas que confieren alguna ventaja para crecer en esas condiciones, pero *¿de donde viene la variabilidad celular a partir de la cual se seleccionan las poblaciones mejor adaptadas?*.

1.3.2 Inestabilidad genética como motor de la progresión tumoral.

Diferentes autores, entre ellos Nowell en 1976, han propuesto la existencia de un mecanismo subyacente de inestabilidad genética como causante de las múltiples alteraciones existentes en las células tumorales, tanto a nivel génico como cromosómico.

La inestabilidad genética puede ser resultado de factores internos a la propia célula como mutación, amplificación, fenotipos mutadores o deficiencias en los mecanismos de reparación del DNA, pero también podría venir inducida por factores presentes en el microentorno tumoral (Nowell, 1986; Heppner y Miller, 1998). La inestabilidad genética sería tanto el motor de la progresión tumoral como el motor de la heterogeneidad genética necesaria para la progresión tumoral (Lengauer et al., 1998).

Según esta teoría, los precursores de las células tumorales a diferencia de las células normales tendrían un nivel basal de inestabilidad, por lo que serían más sensibles a los agentes que pueden incrementar la inestabilidad genética y podrían generar una población celular genéticamente heterogénea (Loeb y Loeb, 1999; Coleman y Tsongalis, 1999), lo que facilitará

que alguna de las variantes celulares resultantes tenga alguna ventaja selectiva y así sea capaz de proliferar en condiciones adversas y continuar el proceso de progresión tumoral (Volpe, 1988; Nowell, 1976). Sin embargo un exceso de inestabilidad genética puede tener un efecto deletéreo, si la célula supera el umbral de viabilidad se activarán las vías de inducción de apoptosis y morirá. Por lo tanto, para que la célula tumoral progrese tiene que existir un equilibrio entre la tasa de inestabilidad y la supervivencia celular (Cahill et al., 1999) (Figura 6).

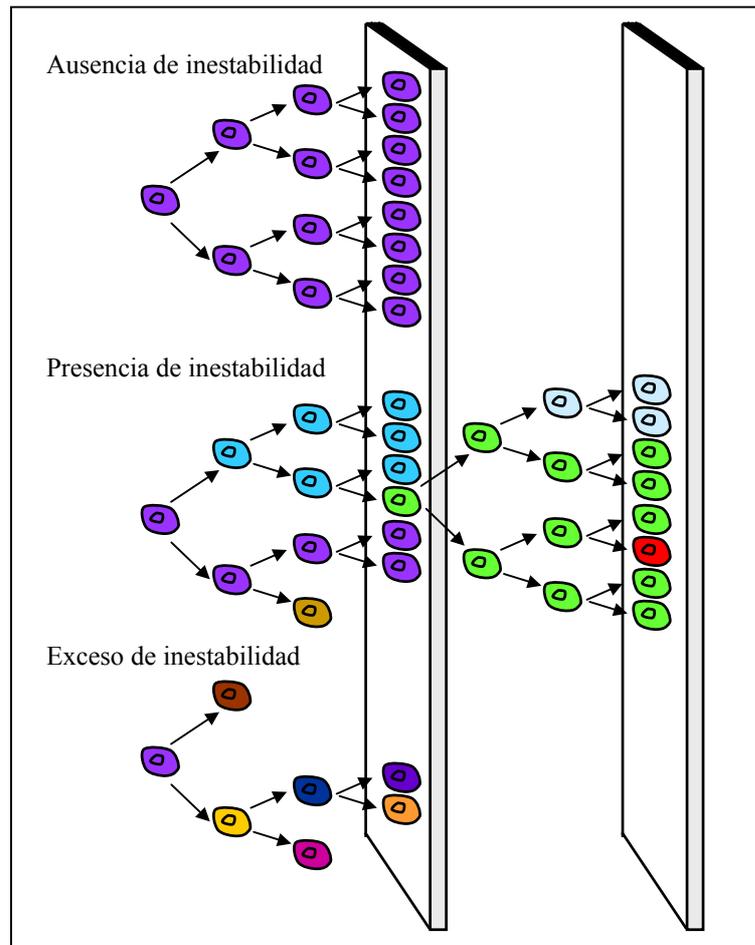


Figura 6. Inestabilidad genética como motor de la progresión tumoral. En el esquema se representan las 3 situaciones posibles, ausencia de inestabilidad, presencia de inestabilidad genética y exceso de la misma (adaptado de Cahill et al., 1999).

1.3.3 Hipótesis del fenotipo mutador.

Las células tumorales se caracterizan por la presencia de un elevado número de mutaciones. Sin embargo, teniendo en cuenta que la tasa de mutación espontánea en células normales es de 1.4×10^{-10} mutaciones/ par de bases/ división, parece poco probable que la aparición de

mutaciones espontáneas sea la fuente de las múltiples alteraciones genéticas detectables en las células tumorales (Orr-Weaver y Weinberg, 1998). Estas observaciones llevaron a Loeb en 1991 a proponer la existencia de un **fenotipo mutador** como mecanismo temprano en la progresión de los tumores. Este fenotipo sería el resultado de la existencia de mutaciones en genes encargados de mantener la estabilidad del genoma (Jackson y Loeb, 1998 a).

Existen diferentes vías implicadas en el mantenimiento de la estabilidad genética, tanto a nivel nucleotídico, como cromosómico. La inactivación o desregulación de cualquiera de los posibles genes implicados en estas vías, ya sean genes de reparación, replicación, recombinación, segregación cromosómica, o *checkpoints* del ciclo celular incrementará la probabilidad de que sucesivas alteraciones genéticas aparezcan (Jackson y Loeb, 1998 b; Loeb, 2001).

1.3.4 Teorías sobre los mecanismos que promueven la progresión tumoral.

Teniendo en cuenta que el cáncer es resultado de un acúmulo secuencial de alteraciones genéticas (*multistep*) y que la tasa de mutación espontánea es demasiado baja, se sugirió la existencia de un fenotipo mutador en el que la tasa de mutación estaba notablemente incrementada (Loeb, 1991). El descubrimiento de que alteraciones en el sistema de reparación de *mismatch* incrementaba la tasa de mutaciones de secuencias repetitivas sencillas en un tipo concreto de cáncer colorrectal corroboraba esta hipótesis (Ionov et al., 1993).

Sin embargo, algunos autores consideran que la inestabilidad genética, no sería la fuerza impulsora (*driving force*) para el desarrollo del cáncer, sino que la presión selectiva del entorno tumoral y la expansión clonal son suficientes para facilitar la progresión tumoral (Tomlinson y Bodmer, 1999). Mediante el uso de modelos matemáticos basados en datos de cáncer colorrectal, Tomlinson y colaboradores en 1996 analizaron el rol que tenía la tasa de mutación en el crecimiento de tumores esporádicos, y llegaron a la conclusión de que la selección, sin necesidad de un incremento en la tasa de mutación, era suficiente para explicar la evolución de los tumores. Según estos modelos, la selección sería la fuerza impulsora en la iniciación de la mayoría de los cánceres humanos, y la inestabilidad genética sería un evento tardío en su desarrollo. Teniendo esto en cuenta, la mutación que confiera una ventaja

selectiva de crecimiento debería ser considerada como el evento crítico en el desarrollo del cáncer (Chow y Rubin, 2000).

Seguramente el desarrollo de la mayoría de tumores requiere tanto la existencia de inestabilidad genética como la expansión clonal y posterior presión selectiva, aunque hasta ahora se desconoce la contribución de cada uno de ellos (Loeb y Loeb, 1999; Jackson y Loeb, 1998 a).

1.3.5 Evidencias de la existencia de un fenotipo mutador.

1.3.5.1 Inestabilidad de microsatélites.

La primera evidencia de un fenotipo mutador en cáncer fue la descripción de inestabilidad de microsatélites (MI) en una forma de cáncer colorrectal familiar conocida como cáncer de colon hereditario no poliposis (HNPCC) (Ionov et al., 1993). Esta forma de inestabilidad se caracteriza por los cambios de longitud – inserciones o deleciones – en las secuencias microsatélite del DNA. Los microsatélites son secuencias cortas, de entre 1 y 6 pb, de DNA repetitivo, altamente polimórficas, distribuidas a lo largo de todo el genoma (Sturzeneker et al., 2000).

En las células normales, el número de repeticiones de una secuencia determinada se mantiene con una gran exactitud gracias a la eliminación de los apareamientos incorrectos (*mismatch*) base-base que se generan como consecuencia del deslizamiento (*slippage*) de la DNA polimerasa durante el proceso de replicación. La existencia de inestabilidad se cree que es debida a fallos en este sistema de reparación de errores del DNA o *mismatch repair* (MMR).

Cuando estos fallos se dan dentro de una secuencia de DNA repetitivo, se generan *loops* de inserción-delección, y el resultado final será una ganancia o una pérdida del número de repeticiones de esa secuencia en particular, este fenómeno es lo que se conoce como inestabilidad de microsatélites (Claij y te Riele, 1999; Perucho, 1998; Peltomaki, 2001).

En humanos se han descrito al menos 6 proteínas diferentes implicadas en el sistema de reparación de *mismatch*, hMSH2, hMSH6, hMSH3, hMLH1, hPMS2 y hMLH3 (Aquilina y Bignami, 2001).

Mutaciones en cualquiera de estos genes podrían ser responsables de la inducción de inestabilidad de microsatélites, pudiendo inducir además la aparición de mutaciones

secundarias en otros genes que contengan dianas estructurales para estas mutaciones, y de esta forma ser seleccionadas durante la tumorigénesis. Es decir, este tipo de inestabilidad, conferiría a las células propiedades mutadoras (Perucho, 1996; Percesepe et al., 1998).

Existen diferentes evidencias que asocian la existencia de mutaciones en los genes del sistema MMR con la existencia de inestabilidad de microsatélites. Se han encontrado mutaciones en la línea germinal de individuos con HNPCC y también mutaciones somáticas en tumores esporádicos con este tipo de inestabilidad (Ohmiya et al., 2001). Además, experimentos con líneas celulares deficientes para alguno de los genes de reparación, han demostrado que la introducción de ese gen conlleva la recuperación de la estabilidad de microsatélites (Arzimanoglou et al., 1998).

Sin embargo, en muchos casos con MI no se han detectado mutaciones en los genes del sistema MMR. Recientemente, se ha demostrado la correlación entre la hipermetilación de la región promotora del gen MLH1 y su pérdida de expresión en tumores donde no hay mutaciones detectables en MLH1 (Kane et al., 1997). Por lo tanto, una proporción de los tumores esporádicos con inestabilidad de microsatélites, pero sin mutaciones en los genes MMR, tendría inactivos estos genes por mecanismos epigenéticos, y no por mutaciones somáticas o pérdidas de heterocigosis (Sturzeneker et al., 2000; Peltomaki, 2001).

Tampoco se puede excluir la posibilidad de que en algunos casos, la existencia de MI sea debido a otros factores diferentes a los genes MMR (Brentnall, 1995), incluyendo fallos en cualquiera de los componentes del sistema de reparación de errores como el mecanismo *proofreading* (corrector de pruebas) de replicación del DNA (Claij y te Riele, 1999).

Independientemente del mecanismo que origina la existencia de inestabilidad de microsatélites, se ha visto que las células tumorales con este tipo de alteraciones tienen una tasa de mutación entre 100 y 1000 veces superior a la de las células normales (Yamasaki y Mironov, 2000).

Las mutaciones de microsatélites además de afectar a secuencias anónimas de DNA pueden afectar también a genes relacionados con cáncer que contengan secuencias nucleotídicas repetidas (Calin et al., 2000; Duval y Hamelin, 2002). La inserción o deleción de uno o dos nucleótidos originará un cambio en la pauta de lectura dando lugar a una proteína truncada y por lo tanto no funcional. Se han descrito diversos genes con estas características, algunos implicados en el control del crecimiento como TGF β R2, otros como Bax, son inductores de

apoptosis, y otros como MSH3 y MSH6 están relacionados con la reparación del DNA (Loeb y Loeb, 1999; Breivik y Gaudernack, 1999).

La MI está bien caracterizada en algunos tipos de cáncer de origen epitelial como colon, endometrio y estómago (Ouyang et al., 1998; Claij y te Riele, 1999). Aproximadamente un 15% de los tumores colorrectales son inestables (Percesepe et al., 1998), siendo en estos carcinomas donde la incidencia de MI es mayor. Sin embargo, en otros tumores esporádicos como pulmón o mama no está bien establecida su incidencia, existiendo una gran variabilidad en función de los trabajos. En cáncer de mama oscila entre 5-21%, según las series estudiadas (Contegiacomo et al., 1995; De Marchis et al., 1997; Dillon et al., 1997; Schmitt et al., 1999). También existen trabajos que no detectan inestabilidad (Anbazhagan et al., 1999), y otros en los que prácticamente todos los tumores analizados son inestables (Bhattacharyya et al., 1999) (Tabla 2).

En cuanto al papel que juega la inestabilidad en la progresión tumoral, los estudios de cáncer colorrectal indican que la presencia de inestabilidad de microsatélites es un evento temprano en el desarrollo tumoral ya que se detecta en criptas aberrantes. Sin embargo en otros tipos de tumores como los de célula no pequeña de pulmón o tumores esporádicos de mama, parece ser un evento tardío en el desarrollo tumoral (Arzimanoglou et al., 1998). Aunque, en cáncer de mama también se ha descrito que la inestabilidad de microsatélites podría ser un evento temprano en la progresión tumoral (Dahiya y Deng, 1998).

Tabla 2. Frecuencia de inestabilidad de microsatélites en pacientes con cáncer de mama.

Inestabilidad de microsatélites en tumores de mama	
10,6 %	Wooster et al., 1994
20 %	Yee et al., 1994
21 %	Contegiacomo et al., 1995
30 %	Paulson et al., 1996
24,7 %	De Marchis et al., 1997
10,8 %	Dillon et al., 1997
2 %	Boland et al., 1998
0 %	Zhou et al., 1998
0 %	Anbazhagan et al., 1999
0 %	Benachenhou et al., 1999
72 %	Bhattacharyya et al., 1999
1,9 %	Minobe et al., 1999
8,3 %	Schmitt et al., 1999
11,6 %	Méndez et al., 2001

1.3.5.2 Inestabilidad cromosómica.

La inestabilidad genética también se puede manifestar a nivel del mantenimiento de la integridad cromosómica. De hecho, los mecanismos moleculares implicados en preservar la información genética se pueden subdividir en aquellos encargados de mantener la integridad de las secuencias genómicas, incluyendo el sistema de reparación de *mismatch* mencionado anteriormente, y por otro lado están los mecanismos encargados de mantener la integridad a nivel cromosómico (Lengauer et al., 1997).

Los cambios en el número de cromosomas, o aneuploidía, son muy frecuentes en la mayoría de los tumores humanos (Aragane et al., 2001; Phillips et al., 2001; Dahiya y Deng, 1998). También se detectan frecuentemente otro tipo de alteraciones cromosómicas como translocaciones, deleciones y amplificaciones (Loeb y Loeb, 1999). Esta alteración generalizada del genoma de las células tumorales podría ser consecuencia de la existencia de un mecanismo subyacente de inestabilidad cromosómica (CIN).

Se sabe poco acerca de cómo se origina este tipo de inestabilidad o de la ventaja selectiva que podría conferir a los tumores. Una posible explicación sería que la alteración en la dosis génica podría potenciar la inestabilidad genética, y por tanto representaría otra forma de fenotipo mutador, aunque en este sentido existen trabajos contradictorios. Algunos autores han visto que la pérdida de genes supresores de tumores y la amplificación de oncogenes se relacionan con la aneuploidía, y parecen jugar un papel central en el desarrollo de tumores con inestabilidad cromosómica (Breivik y Gaudernack, 1999; Loeb y Loeb, 2000). Sin embargo, en otros casos se ha visto que la pérdida de función de p53 no es suficiente para inducir aneuploidía, lo cual sugeriría que sólo en presencia de otras alteraciones genéticas o epigenéticas, la ausencia de p53 es capaz de potenciar una tendencia a la inestabilidad preexistente (Bunz et al., 2002).

Además, CIN promovería el proceso carcinogénico incrementando la tasa de mutación a nivel cromosómico. La pérdida o ganancia de cromosomas enteros es presumiblemente el resultado de una alteración en el aparato mitótico o en la formación del huso (Compagni y Christofori, 2000). Estudios recientes han relacionado la existencia de inestabilidad cromosómica con pérdidas de función de *checkpoints* mitóticos. Este tipo de alteraciones favorecería una disyunción incorrecta de las cromátidas hermanas durante la división celular, induciendo por tanto CIN como consecuencia de una segregación cromosómica defectuosa (Breivik y Gaudernack, 1999).

Algunos autores consideran que la forma predominante de inestabilidad genética durante la tumorigénesis es la que afecta tanto a fragmentos como a cromosomas enteros, más que la que implica alteraciones a nivel de unos pocos nucleótidos (Lengauer et al., 1997; Duesberg et al., 1999). La inestabilidad cromosómica es mucho más frecuente en los tumores que la inestabilidad de microsatélites, pudiendo ser debida a alteraciones en proteínas implicadas en el control de la división celular, o en cualquiera de los *checkpoints* encargados de controlar la progresión a lo largo del ciclo celular (Lengauer et al., 1998).

1.3.6 Inestabilidad genética, ciclo celular y apoptosis.

Alteraciones en las fases del ciclo celular proporcionan otro mecanismo para la generación del fenotipo mutador. Durante la progresión del ciclo celular hay varias vías reguladoras que funcionan como *checkpoints*, y controlan la reparación del daño en el DNA antes de pasar a la siguiente fase del ciclo. Cuando estos *checkpoints* se activan, una de sus funciones es prevenir

la expansión de células con daño genético no reparado. El fallo en la inducción de la respuesta apoptótica descrito en muchas células tumorales favorece la creación de un ambiente permisivo para la inestabilidad genética y el acúmulo de mutaciones (Hartwell y Kastan, 1994).

Los *checkpoints* del ciclo celular son vías genéticas que incluyen genes implicados en detectar el daño genético, producir parada de ciclo celular, iniciar la reparación o inducir apoptosis, mutaciones en los mismos contribuyen a la tumorigénesis y al cariotipo anómalo de las células. Por lo tanto, la eliminación de estos puntos de control es una manera de desarrollar un fenotipo mutador (Minn et al., 1996).

La pérdida de apoptosis puede contribuir a la inestabilidad genética propia de las células tumorales. En 1996 Minn y colaboradores demostraron que las células que sobreexpresaban la proteína antiapoptótica Bcl-x_L tenían una tasa espontánea de tetraploidización mayor y si se acompañaba de una pérdida de función de p53, ambos factores podían cooperar y contribuir a la inestabilidad genética, permitiendo el acúmulo de células con daño en el DNA.

Tanto Bcl-2 como Bcl-x_L son capaces de inhibir la vía de replicación conservativa de RAD51. Inhibiendo esta vía de reparación aumenta la tasa de mutagénesis frente a agentes genotóxicos (UV, rayos γ , estrés oxidativo) hasta 2.5 veces por célula y por generación (Saintigny et al., 2001).

Por lo tanto, la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2, además de inhibir apoptosis facilitan la oncogénesis contribuyendo a la existencia de un fenotipo mutador y la inestabilidad genética mediante la inhibición de diferentes vías implicadas en la reparación del DNA.

La apoptosis también podría contribuir a la inestabilidad genética, actuando como vehículo de la misma. Los experimentos de Holmgren y colaboradores en 1999, parecen indicar que el DNA contenido dentro de los cuerpos apoptóticos podría ser incorporado mediante fagocitosis por las células vecinas, y de esta forma contribuirían a diversificar los diferentes componentes celulares que forman parte de un tumor (Hanahan y Weinberg, 2000).

1.4 Desregulación de la expresión génica en cáncer.

Históricamente, la patología molecular del cáncer se ha centrado en estudiar las alteraciones de las células tumorales a nivel genómico, pero muchos genes que no han sufrido mutaciones, pueden presentar alteraciones a nivel de RNA o de proteína (Celis et al., 2000), pudiendo igualmente afectar distintos procesos celulares, no sólo proliferación, sino también interacción célula-célula, célula-matriz, reparación de DNA, invasión y motilidad, angiogénesis, senescencia y apoptosis entre otros.

El cáncer surge como resultado de un acúmulo de alteraciones genéticas, las cuales afectaran a las complejas redes de regulación transcripcional. Los múltiples productos proteicos que se expresan en la célula en un momento dado, actúan coordinadamente regulándose los unos a los otros. La mutación de uno de ellos puede traducirse en un cambio estable a nivel de mRNA en algunos de los componentes de la vía de señalización. Según esto, resulta lógico pensar que la progresión tumoral sea el resultado de una alteración en la expresión génica, ya sea por mutación directa de los genes o por cambios en su vía de regulación (Zhang et al., 1998), lo que hace que su estudio sea enormemente útil, tanto por su contribución para comprender las bases moleculares del cáncer, como por su potencial rol como dianas terapéuticas (Sager, 1997).

El éxito de los estudios de expresión diferencial dependerá de la medida en que reflejan mutaciones y otros cambios cuantitativos en el DNA y modificaciones postraduccionales de proteínas (Szallasi, 1998). Un ejemplo de alteración a nivel de DNA, pero con efecto a nivel transcripcional y con importantes implicaciones en cáncer, es el silenciamiento de genes supresores de tumor causada por hipermetilación de sus promotores (Ponder, 2001).

Una parte importante de los efectos que todos estos cambios producen, se pueden detectar a nivel de RNA (DeRisi et al., 1997). Además, mutaciones fuera de la región codificante, especialmente las localizadas en elementos reguladores como el promotor, o en secuencias implicadas en mantener la estabilidad del RNA, también son detectables mediante estudios de expresión génica, siendo este tipo de estudios altamente informativos sobre los cambios implicados en cáncer a todos los niveles de regulación biológica desde el DNA a las proteínas. Aunque esto no es una correlación perfecta, se puede dar el caso de que diferentes alteraciones produzcan cambios de expresión muy similares. También puede haber cambios

tanto en el genoma (ej.: telómeros) como en los niveles de actividad de las proteínas, que no vayan acompañados de un cambio detectable en los niveles de mRNA (Szallasi, 1998).

1.4.1 Metodologías para el estudio de la expresión génica.

El desarrollo en los últimos años de nuevas tecnologías, ha permitido abordar de forma más exhaustiva, el análisis tanto del transcriptoma como del proteoma de las células. Por un lado el análisis simultáneo de miles de genes permitirá conocer que cambios subyacen en las vías y programas genéticos de las células transformadas y por otro, la búsqueda de genes individuales, que son importantes en la biología del cáncer, se ha hecho mucho más rápida y eficiente. Todos estos aspectos, serán de gran utilidad en un futuro, tanto a nivel diagnóstico como de tratamiento (Viator y Huber, 1997).

Existen numerosas técnicas para detectar y cuantificar los niveles de expresión génica, incluyendo *Northern blots*, ensayo de protección de la nucleasa S1, secuenciación de librerías de cDNA, etc. De todas ellas, las más ampliamente utilizadas son el *differential display*, sustracción de ácidos nucleicos, análisis seriado de la expresión génica (SAGE), y en los últimos años el uso de *microarrays* de expresión. Estas técnicas, proporcionan información de la expresión génica estática, en que tejido se expresa el gen, y dinámica, es decir cual es el perfil de expresión de un gen en relación con el resto (Duggan, et al, 1999).

A continuación se describe brevemente en que consisten algunas de ellas, así como sus ventajas e inconvenientes.

La técnica de *differential display* (DD) ha sido ampliamente utilizada para identificar y aislar genes que se expresan de forma desigual en dos poblaciones celulares. Los mRNAs de interés se retrotranscriben y se amplifican mediante PCR utilizando 2 *primers*, uno que se une a la cola poliA, y otro que se une a una cierta distancia del extremo poliA. La visualización de las secuencias amplificadas se hace mediante un gel, donde se puede comparar que secuencias son más o menos abundantes en cada una de las muestras.

Las ventajas de esta técnica son su relativa simplicidad, junto con el potencial de descubrir secuencias previamente no descritas. El principal inconveniente es que se necesitan analizar muchos *primers* para estudiar un gran número de secuencias, a lo que se une la dificultad para

cuantificar las diferencias en los niveles de expresión, lo que incrementa el riesgo de falsos positivos (Gray y Collins, 2000).

Las técnicas basadas en la **hibridación sustractiva de ácidos nucleicos**, incluyendo el análisis de las diferencias representacionales (RDA), consisten en hibridar una población de DNA o cDNA presente en exceso con otra que está en defecto, para eliminar así de la segunda población las secuencias comunes a la primera y enriquecerla con las que son diferentes.

La ventaja de enriquecer la muestra con unas determinadas secuencias es que permite reducir la complejidad y por lo tanto incrementa la eficiencia. En contrapartida, sólo permiten comparar dos muestras a la vez, y además los genes diana tienen que ser únicos, ya que en el caso de familias de genes, pueden ser sustraídos genes con un alto grado de homología al que nos interesa. Estas técnicas además no permiten detectar genes *upregulados* presentes en las dos poblaciones analizadas (Vieter y Huber, 1997).

En los casos en que el principal objetivo del estudio es catalogar todos los mRNAs típicamente expresados en una población el **análisis seriado de la expresión génica** es de gran utilidad. Esta técnica permite el análisis simultáneo y cuantitativo de un gran número de transcritos. Se basa en que secuencias nucleotídicas cortas, son suficientes para identificar de forma única un transcrito, y mediante concatenación de esas secuencias es posible llevar a cabo el análisis de transcritos de forma seriada mediante secuenciación. La principal ventaja de usar esta técnica es que permite analizar de forma no sesgada las frecuencias con las que los genes se expresan. Uno de los inconvenientes es la falta de clones para las secuencias nuevas, y por otra parte para obtener datos útiles y fiables es necesario secuenciar miles de secuencias cortas (*short sequence tags*) para cada muestra (Gray y Collins 2000; Velculescu et al., 1995).

La técnica de **microarrays** se ha empezado a utilizar en los últimos años para realizar estudios de expresión génica. El fundamento de esta metodología se explica en el apartado **3.3.2** del Material y métodos.

Uno de los principales valores de la utilización de esta técnica radica en que además de permitir hacer un *screening* a nivel de genes individuales, también nos permite realizar estudios de expresión génica a nivel global (Golub, 2001).

El conjunto de genes que se expresan o transcriben, en un momento dado, a partir del DNA genómico es lo que se conoce como perfil de expresión o transcriptoma. A diferencia del genoma, el transcriptoma es altamente dinámico y cambia rápida y dramáticamente en respuesta a perturbaciones, o incluso durante procesos celulares normales como pueden ser la replicación del DNA o la división celular (Lockhart y Winzeler, 2000).

Conocer cuando, donde, y en que grado se expresa un gen es crucial para entender la actividad y el rol biológico de la proteína que codifica. Estudiar los patrones de expresión multigénicos es imprescindible para entender las funciones celulares y las vías bioquímicas (Heyer et al., 1999). El uso de *microarrays* será de gran interés para descifrar la compleja red de interacciones de genes involucrados en ciclo celular, transducción de señales o apoptosis. Además, una gran proporción de genes están representados por ESTs (*expressed sequence tag*) anónimas. Detectar cambios en los niveles de expresión de estas secuencias no conocidas permitirá conocer más acerca de su función (Brown y Botstein, 1999).

Los *microarrays*, al igual que las técnicas de análisis del proteoma, son novedades y muy potentes ya que permiten analizar los niveles de expresión de miles de genes simultáneamente (Celis et al., 2000).

Este tipo de tecnología está en pleno desarrollo y por lo tanto aún se necesitarán unos años para llegar a estandarizarla y poder sacarle el máximo provecho. Muchas cuestiones, tanto referentes al análisis de datos, como otras más técnicas todavía no están del todo solventadas.

1.4.2 Expresión génica asociada al potencial tumorigénico de las células.

Existen numerosos ejemplos en que alteraciones de la expresión génica se relacionan con cáncer, lo cual no sorprende, si tenemos en cuenta el alto grado de aberraciones genéticas existentes en la mayoría de tumores sólidos (Yokota, 2000).

Las técnicas de expresión diferencial se han aplicado al estudio de diferentes tipos de tumores, permitiendo detectar genes sobre e infraexpresados. Estos análisis permiten estudiar tanto las diferencias entre tejido normal y tumoral, como comparar las diferentes etapas de la progresión tumoral, y determinar los genes más relevantes en cada una de ellas (Gray y Collins, 2000).

La aplicación de esta técnica al estudio de tumores de mama ha permitido subclasificarlos en base a sus perfiles moleculares, lo cual complementa la clasificación basada en los factores pronóstico clásicos. Esto ayudará a determinar cual es la terapia más apropiada para cada tipo de tumor (Bertucci et al., 2000). Los estudios de expresión diferencial también permiten conocer los perfiles de expresión asociados a determinadas perturbaciones ya sean fisiológicas, patológicas o provocadas tras el tratamiento de las células. Así, el uso de *microarrays* ha permitido clasificar diferentes tumores y líneas celulares de cáncer de mama con respecto a la expresión de genes relacionados con proliferación y respecto a los genes regulados por IFN (Perou et al., 1999).

Mediante hibridación sustractiva y *differential display*, se ha descrito como la expresión del gen T1A12, un *insulin-like growth factor-binding protein*, varía en la progresión del cáncer de mama. Detectándose su expresión en células hiperplásicas, mientras que no se detectaba en células invasivas de carcinoma (Burger, 1998).

Otra posible aplicación de este tipo de estudios es analizar la expresión diferencial en respuesta a diferentes tratamientos, por ejemplo genes que responden al tratamiento con andrógenos (Averboukh et al., 1996). La comparación de células que sobreexpresan p53 frente a células *wild-type*, permite estudiar que genes están siendo regulados por ese gen en particular (Madden et al., 1997). También resulta de interés estudiar que genes se expresan de forma diferencial a lo largo del ciclo celular, ya que cambios de expresión en los reguladores del ciclo pueden favorecer el desarrollo tumoral (Alpan et al., 1996).

Todo esto hace que las técnicas de expresión diferencial sean de gran utilidad en el estudio del cáncer, además este tipo de análisis no sólo permite estudiar genes conocidos cuya expresión varía en determinadas condiciones, sino que permite trabajar con secuencias no conocidas, pero cuyo perfil de expresión puede resultar de interés (Brown y Botstein, 1999).

1.4.3 Expresión génica asociada al potencial metastático de los tumores.

De la misma forma que existen genes sobre o infraexpresados en el tejido tumoral respecto al normal, también existen genes diferencialmente expresados en relación con el potencial

metastático de las células tumorales. Sin embargo la relación causa-efecto, entre alteraciones genéticas y el fenotipo metastático resultante no está demasiado clara.

En cáncer de mama mediante *differential display* se detectó la expresión constitutiva del gen *com-1* (*candidate of metastasis-1*) que parecía diferenciar entre células con potencial metastático y aquellas que carecían de él (Ree et al., 1999). También se ha asociado la expresión de lisil oxidasa y de un factor de transcripción *zinc finger* a líneas celulares de cáncer de mama con potencial invasivo o metastático (Kirschmann et al., 1999).

En tumores gástricos, el uso de *microarrays* permitió detectar que tanto la E-cadherina como la integrina $\beta 4$ estaban *down-reguladas* en líneas metastáticas (Hippo et al., 2001). De la misma manera, en un modelo murino de osteosarcoma se detectó que la expresión del gen *Ezrin* implicado en motilidad, invasión y adherencia estaba sobreexpresado en tumores derivados de una línea celular altamente metastática, mientras que su expresión era menor en tumores poco metastáticos (Khanna et al., 2001).

Se han descrito numerosos genes potencialmente implicados en la regulación de la actividad metastática, como el gen supresor de metástasis *Kiss-1* descrito en melanoma y en la línea celular de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB 435 (Lee y Welch, 1997). El reto pendiente es conocer si los perfiles de expresión de estos genes son clínicamente válidos para predecir el potencial metastático en pacientes afectados de cáncer, ya que no siempre se han encontrado alteraciones de esos genes en las células tumorales, y sus perfiles de expresión no siempre correlacionan con el potencial metastático de las células (Yokota, 2000).

Es necesario profundizar más en este tipo de estudios, para poder conocer que genes se alteran y que efecto tienen, y así poder comprender el complejo mecanismo molecular de la metástasis, uno de los aspectos de mayor importancia en la investigación sobre cáncer por su relevancia clínica.

II. Hipótesis y objetivos

Hipótesis.

En el carcinoma ductal infiltrante de mama la inhibición de la apoptosis secundaria a la desregulación de genes de la familia de Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L, Bax) podría facilitar un acúmulo de alteraciones genéticas, y contribuir a la selección poblacional que determina la actividad metastática del tumor y la ubicación de las metástasis.

Objetivos.

1. Analizar en un grupo de tumores provenientes de pacientes con cáncer de mama, la relación entre el *status* de apoptosis del tumor, la presencia de inestabilidad de microsatélites, y la correlación de estos parámetros con las características clínico-patológicas de las pacientes.
2. Estudiar en un modelo experimental *in vivo/in vitro*, si la sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-x_L induce un mayor número de alteraciones genéticas en las células, que inflencie la selección poblacional y repercuta sobre la capacidad y ubicuidad metastática de los tumores.
3. Estimar las diferencias de expresión génica que finalmente acontecen entre el tumor y las metástasis que este mismo origina en distintos órganos, a fin de determinar genes relacionados con la actividad metastática de las células e implicados en el crecimiento organoespecífico de las metástasis.

III. Material y métodos

3.1 Determinación del *status* de apoptosis y de la presencia de inestabilidad de microsátélites en carcinomas ductales infiltrantes de mama.

3.1.1 Descripción de las muestras y características clínicas de las pacientes.

Las muestras de carcinoma ductal infiltrante de mama estudiadas se obtuvieron de tejido fresco suministrado por el Servicio de Patología de la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge (C.S.U.B.), Barcelona. Las pacientes habían sido diagnosticadas en el citado hospital entre 1988 y 1994, y no habían recibido ninguna forma de tratamiento antes de la cirugía. El grado y el tipo histológico se determinaron según los criterios establecidos en la clasificación Bloom-Richardson.

La existencia de mutaciones *frameshift* en el tercer exón del gen *bax* se analizó en un grupo de 105 tumores, 49 de ellos de estadio T₁ (≤ 2 cm) y 56 de estadios T₂₋₃ ($2 > T_{2-3} < 5$ cm). Sesenta de las 105 pacientes no tenían afectación ganglionar (N₀), y 45 si tenían afectación ganglionar en el momento del diagnóstico (N₁). La edad de las pacientes variaba entre 30 y 86 años, estando 51 de ellas en edad pre-menopáusica.

En 86 de los 105 tumores se disponía del correspondiente tejido normal, o en su defecto de sangre periférica. En este grupo de tumores se analizó la existencia de inestabilidad de microsátélites, ya que el estudio de este tipo de alteración requiere comparar DNA tumoral respecto a su propio DNA normal.

El análisis del *status* de apoptosis incluía la detección *in situ* de las células apoptóticas en el tumor y la expresión de proteínas relacionadas con este tipo de muerte. Las determinaciones se hicieron en cortes seriados de muestras incluidas en parafina en un grupo de 55 pacientes.

3.1.2 Extracción de DNA.

Las extracciones de DNA genómico se realizaron siguiendo el protocolo convencional de extracción con fenol/cloroformo (Sambrook et al., 1989). El DNA de las muestras se cuantificó mediante el espectrofotómetro, diluyéndolo a una concentración de 20 ng/ μ l. La calidad y cantidad del DNA se verificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La concentración final se ajustó según la señal de bromuro, cuando fue necesario.

3.1.3 Detección de mutaciones en el gen *bax*.

3.1.3.1 Condiciones de la PCR.

La existencia de mutaciones *frameshift* en el tercer exón del gen *bax*, dentro de un microsatélite que contiene 8 guaninas consecutivas, se determinó en un grupo de 105 tumores de mama. Se utilizó como control positivo DNA de la línea de carcinoma colorrectal LoVo, ya que estas células presentan una inserción y una deleción dentro de esta secuencia microsatélite (Rampino et al., 1997). La amplificación de este fragmento se hizo mediante PCR, utilizando los *primers* y condiciones que se especifican en la Tabla 3.

Tabla 3. *Primers*, mezcla de reacción y condiciones de la PCR para amplificar el fragmento (G)₈ del gen *bax*.

<i>primers:</i>	5'-ATC CAG GAT CGA GCA GGG CG-3'	
	5'-ACT CGC TCA GCT TCT TGG TG-3'	
Mezcla de reacción:	H ₂ O.....	14,2 µl
	<i>Buffer</i> 10X ¹	2,5 µl
	dNTPs 1 mM de cada uno ²	4 µl
	<i>primer up</i> , 25 µM.....	1 µl
	<i>primer down</i> , 25 µM.....	1 µl
	[α- ³² P]dATP ³	0,1 µl
	Taq DNA polimerasa 5 u/µl ¹	0,2 µl
	DNA [20 ng/µl].....	2 µl
Condiciones PCR:	4 min a 94°C	 30 ciclos
	30 sec a 94°C	
	30 sec a 55°C	
	30 sec a 72°C	
	5 min a 72°C	

¹ DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), que se suministra con el tampón correspondiente 10 veces concentrado (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM MgCl₂, 0,1% gelatina). ² dNTP: deoxinucleótidos trifosfato (Pharmacia Biotech, UK). ³ [α-³²P]dATP: deoxiadenosina trifosfato marcada radioactivamente, 3000 Ci/mmol; 10 µCi/µl (Amersham, Life Science, UK).

3.1.3.2 Comprobación de los productos de PCR.

Las condiciones para la amplificación del gen *bax* se adaptaron de las descritas por Rampino y colaboradores (1997). Para comprobar la estandarización de la técnica, los productos de las primeras amplificaciones se resolvieron mediante electroforesis en geles pequeños (150 x 170 x 8mm) de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes. Para detectar el fragmento de 94 pb amplificado se utilizaron geles con un porcentaje de acrilamida del 10%, diluyendo 5 µl del producto de PCR con 5 µl del tampón de carga LB (5% glicerol, 0,4% azul de bromofenol, 0,4% xilencianol), preparado como *stock* 2X. También se cargaron 5 µl del marcador de peso molecular ϕ X174, para así poder comparar el tamaño del producto de PCR con los fragmentos del marcador. Los geles corrieron aproximadamente 2 h a 250V, posteriormente se tiñeron 5 min con bromuro de etidio y se visualizaron con luz ultravioleta.

3.1.3.3 Resolución del fragmento amplificado.

Preparación de los geles

Una vez comprobado que las condiciones de amplificación eran correctas, el análisis del fragmento de 94 pb se hizo mediante geles de secuenciación (390 x 310 x 4 mm) que permiten una mayor resolución. Para prepararlos, la cara del cristal que iba a estar en contacto con el gel se limpiaba previamente con agua destilada y etanol. Además, la cara interior de uno de los cristales, en general el grande, se trataba con Sigmacote (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO), una solución repelente de silicona que evita que el gel se quede pegado a los dos cristales y se rompa a la hora de separarlos. Los cristales se montaban con separadores de 4 mm y el conjunto se sujetaba con pinzas metálicas.

Posteriormente se preparaba el gel. Para este tipo de análisis se utilizaron geles desnaturizantes de poliacrilamida al 6%/ 8 M urea (la urea es un agente desnaturizante que anula los efectos conformacionales de las cadenas de ácidos nucleicos sobre su movilidad electroforética). La composición de estos geles era la siguiente:

- 9 ml de solución de 1,2X TBE/9,4 M urea
- 51 ml de solución al 40% acrilamida: bisacrilamida (29:1)

La polimerización de los geles se inducía añadiendo a la solución del gel 600 µl de PSA (persulfato amónico) y 25 µl de TEMED (N, N, N', N'- Tetramethylethylene-diamine).

Preparación de las muestras

Los productos de PCR se diluyeron (1:2) en tampón desnaturalizante de carga DLB (93% formamida desionizada, 0,01 M EDTA, 0,001 M NaOH, 0,01% azul de bromofenol), se desnaturalizaron a 95°C durante 3 min e inmediatamente se colocaron en hielo hasta el momento de cargarlas, para evitar su renaturalización.

Electroforesis

Una vez polimerizado, el gel se colocaba en la cubeta de electroforesis, llenando con tampón TBE (90 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA, pH 8,3) los depósitos superior e inferior. Luego se sacaban los peines y se formaban los pocillos clavando con cuidado los dientes en el gel. A continuación y antes de cargar las muestras, los geles se precorrían durante unos minutos a 55 W para equilibrar los tampones del gel y de la cubeta, y así conseguir una mejor resolución de las bandas.

Después se cargaban 2 µl de cada muestra, no sin antes limpiar los pocillos con TBE mediante una jeringa, esto permitía eliminar la urea que difunde del gel hacia fuera y que podría interferir en la carga. La electroforesis con el fragmento amplificado del gen *bax* corrió durante 2 h a 55 W.

Secado, exposición y revelado

Al finalizar la electroforesis, el cristal tratado con Sigmacote se separaba haciendo palanca con una cuchilla o espátula y procurando que el gel quedara enganchado en el otro vidrio. A continuación, sobre el gel se colocaba una hoja de papel Whatman 3MM de su mismo tamaño, o un poco mayor, y presionando ligeramente, el gel se separaba del cristal y quedaba enganchado en el papel. Seguidamente se cubría con un plástico transparente fino y se secaba al vacío a 80°C.

Una vez seco, se sacaba el plástico y se exponía a una película sensible a los rayos X. La exposición se realizaba a temperatura ambiente y sin pantalla intensificadora entre 1-3 días, dependiendo del estado de la radioactividad.

3.1.4 Análisis de la existencia de inestabilidad de microsatélites.

En un grupo de 86 tumores de mama con su correspondiente tejido normal, se analizó la existencia de inestabilidad de microsatélites (MI) con 5 secuencias repetidas situadas en diferentes cromosomas. Dos de las repeticiones eran mononucleótidos del tipo (A)_n, y las otras tres eran dinucleótidos del tipo (CA)_n. Todas estas secuencias están situadas en regiones de DNA no codificante, ya sea en regiones intergénicas o en regiones intrónicas. Tal es el caso de Bat 26, cuya secuencia está localizada en el intrón 5 del gen hMSH2 (Zhou et al., 1998; González-García et al., 2000).

En la Tabla 4 se indica el nombre de cada marcador y la secuencia de los *primers* utilizados, el cromosoma en que se encuentra, el tipo de repetición, indicando el tamaño del fragmento amplificado y la temperatura de *annealing* (anillamiento) de la PCR.

Tabla 4. Descripción y características de los 5 microsatélites utilizados para el análisis de MI.

Microsatélites (repetición)	<i>primers:</i>	Fragmento amplificado	T ^a <i>annealing</i>
SIT2 Crom. 2 (A)	5'-CTC ACT GAT GAT CAT ATT GAA AT-3' 5'-GGT GAA ATC CTG TCT CTA CTA AAA A-3'	280 pb	50°C
Bat26 Crom. 2 (A)	5'-TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC-3' 5'-AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C-3'	120 pb	60°C
D4S2948 Crom. 4 (CA)	5'-TGC AGG CTA AGT ATG TTC CA-3' 5'-TTC CCG GCT CTG TAA CAC-3'	135-144 pb	55°C
D21S415 Crom. 21 (CA)	5'-CCT GAT TTG TCT TTC ATC TCG-3' 5'-TGC CTG CTG TTG GAC TTA CT-3'	130-148 pb	57°C
D21S1235 Crom. 21 (CA)	5'-CTT TCA TGT GTG TCT ACG GAT-3' 5'-GGC TAC TCT CTG CCC AGA T-3'	112-144 pb	60°C

Para amplificar cada uno de los 5 microsatélites analizados, se utilizaron los *primers* y los reactivos que se especifican en la Tabla 5.

Tabla 5. Descripción de los componentes de la reacción de PCR para cada uno de los 5 microsatélites que se utilizaron en el análisis de MI.

	SIT2	Bat 26	D4S2948	D21S415	D21S1235
H₂O	17,3 µl	16,25 µl	16,9 µl	15,9 µl	15,9 µl
Tampón PCR 10X	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
dNTPs 1 mM de cada uno	3 µl	4 µl	4 µl	3 µl	3 µl
MgCl₂ 100 mM	–	–	–	0,075 µl	0,075 µl
KCl 1 M	–	–	–	0,25 µl	0,25 µl
<i>primer up</i>, 100 µM	0,5 µl	0,5 µl	0,2 µl	1 µl	1 µl
<i>primer down</i>, 100 µM	0,5 µl	0,5 µl	0,2 µl	1 µl	1 µl
Taq DNA polimerasa 5 u/µl	0,2 µl	0,25 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
DNA [20 ng/µl]	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl

Después de añadir a cada tubo la mezcla de reacción correspondiente, se ponía una gota de aceite mineral para evitar la evaporación. Las condiciones de la PCR para cada uno de los *primers* son las siguientes:

Tabla 6. Condiciones utilizadas para cada una de las PCRs. (* Ver T^a de *annealing* en Tabla 4).

SIT2;D4S2948;D21S415; D21S1235	Bat 26
2 min a 95°C	2 min a 94°C
30 sec a 94°C	45 sec a 94°C
30 sec a * °C	45 sec a 60°C
30 sec a 72°C	45 sec a 72°C
40 ciclos	40 ciclos
5 min a 72°C	5 min a 72°C

3.1.4.1 Electroforesis y preparación de las muestras.

La preparación de los geles, las muestras y la electroforesis son tal y como se describen en el apartado 3.1.3.2. A continuación se especifican las diluciones de cada producto de PCR, y las condiciones de electroforesis para los marcadores utilizados en este análisis.

Tabla 7. Condiciones para cada uno de los *primers*.

	SIT2	Bat 26	D4S2948	D21S415	D21S1235
Dilución	1:2	1:2	1:3	1:2	1:2
Carga	4 µl	3 µl	3 µl	5 µl	4-5 µl
Electroforesis	5 h a 55W	2,3 h a 55W	2 h a 55W	2 h a 55W	2 h a 55W

3.1.4.2 Tinción de plata.

Para analizar la existencia de inestabilidad de microsátélites, las PCRs no se hicieron radioactivas, y la detección de los productos de PCR se llevó a cabo tiñendo con plata los geles (adaptado de Schlegel et al., 1996).

La composición y preparación del gel es la misma que la descrita para los geles de secuenciación desnaturalizantes (Ver apartado 3.1.3.2), a diferencia de que para hacer la tinción de plata, uno de los cristales, generalmente el pequeño se trata con la siguiente solución:

- 5 ml Etanol Absoluto
- 150 µl Acido acético 10%
- 22 µl γ -methacryloxypropyl-trimethoxylane (Sigma)

Este tratamiento permite que el gel quede adherido al cristal y así poder teñirlo, ya que los geles grandes no se pueden manejar a menos que estén unidos a un cristal. Inicialmente los cristales se trataban durante 15 min, pero se comprobó que era suficiente 2-3 min, y además se reducían considerablemente los problemas al despegar los dos cristales.

Una vez finalizada la electroforesis, se separaban los dos cristales y se iniciaba la tinción:

- 1.- Fijación. Se coloca el gel en una bandeja con etanol 10% y se agita suavemente durante 10 min.
- 2.- Lavado. Se hace un lavado de 30 sec-1 min con H₂O destilada (opcional).
- 3.- Oxidación. El gel se mantiene en agitación suave durante 3 min en una solución de ácido nítrico al 1%.
- 4.- Lavados. Se hacen dos lavados de 30 sec-1 min con H₂O destilada.
- 5.- Tinción. El gel se trata con una solución de AgNO₃ (2 g/l), durante 20 min en agitación suave.
- 6.- Lavados. Se hacen dos lavados de 2-3 min con H₂O destilada. Estos lavados son importantes para evitar que posteriormente haya una rápida saturación del carbonato o demasiada tinción inespecífica.
- 7.- Revelado. El revelado se lleva a cabo mediante una solución de NaCO₃ (29,6 g/l) a la que se le añaden, justo antes de utilizarla, 540 µl de formaldehído 37%. El gel se agita suavemente con esta solución hasta que aparece un precipitado marrón. Para mejorar la calidad del revelado primero se añade una parte de la solución de carbonato, se espera a que aparezcan los primeros precipitados, se elimina esa solución, y se añade el resto esperando hasta que aparecen las bandas de forma clara.
- 8.- Parada. Cuando las bandas se detectan con nitidez, la reacción se para sumergiendo el gel en una solución de ácido acético al 10% durante 5-10 min.
- 9.- Finalmente el gel se lava durante unos minutos con H₂O destilada y después se deja secar a temperatura ambiente.
- 10.- Una vez seco el gel se consigue un duplicado, iluminando durante aproximadamente medio minuto con luz fluorescente blanca una película sensible (*duplicating*). También se puede obtener la imagen del gel escaneándolo (EPSON GT-850 con unidad de transparencias; Seiko Epson Corporation. Nagamo, Japón).

3.1.5 Determinación de células apoptóticas por detección *in situ* de la fragmentación de DNA.

La muerte celular por apoptosis se caracteriza por la activación de endonucleasas que digieren el DNA a nivel de nucleosomas. Para detectar *in situ* la existencia de oligonucleosomas se utilizó la técnica de “*nick end labeling*” (Gavrieli et al., 1992). Esta técnica se basa en la unión específica de deoxinucleotidil transferasa terminal (TDT) a los extremos 3'-OH libres del DNA.

La técnica se llevó a cabo en cortes de muestras incluidas en parafina. Antes de hacer un pre-tratamiento durante 15 min con proteinasa K, 20 µg/ml (Sigma), las muestras se desparafinaban y se rehidrataban gradualmente mediante alcoholes. Tras inhibir la peroxidasa endógena, las muestras se incubaron durante 1 h a 37°C con TDT-terminal disuelto en buffer TDT (Boehringer Mannheim) y poli-dUTP biotinilado (Boehringer Mannheim). Después se trataron con peroxidasa marcada con estreptavidina, para ser revelada la reacción con diaminobenzidina, y finalmente se contratiñeron con hematoxilina.

Se consideró que las células de los tumores tenían una pérdida de apoptosis cuando se teñían menos del 1% de los núcleos.

3.1.6 Determinación de la expresión de las proteínas Bcl-2, Bcl-x_L, Bax y p53.

La expresión de Bcl-2 se determinó mediante inmunohistoquímica (IHQ) utilizando un anticuerpo monoclonal, clon 124 (ICI, Cambridge Research Biochemicals Incorporated, Cheshire, UK) a dilución 1:200. La detección de Bcl-x_L y Bax se hizo mediante anticuerpos policlonales, clones S-18 y N-20 (Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA) respectivamente, a dilución 1:200. En el caso de p53 se utilizaron dos anticuerpos monoclonales, clon BP-53-12-1 (Biogenex, San Ramón, CA) y Ab-6, clon DO-1 (Oncogene Science, Uniondale, NY) a una dilución de 1:60 y 1:100, respectivamente.

Para cuantificar la expresión de Bcl-2, Bcl-x_L y Bax por IHQ se estimó el número de las células del tumor con tinción citoplasmática. La sobreexpresión de estas proteínas se definió como la presencia de más de un 25% de células teñidas.

La sobreexpresión de p53 se consideró positiva cuando el tumor presentaba más de un 25% de núcleos teñidos con cualquiera de los dos anticuerpos. Este porcentaje se escogió en base a

un estudio previo en el cual las mutaciones de p53 mostraban una alta correlación con la sobreexpresión de la proteína (Sierra et al., 1996).

La expresión de la proteína proapoptótica Bax se determinó también mediante **western blot**. 50 µg de proteína se resolvieron en un gel de acrilamida al 12%. Las proteínas así separadas se transfirieron a una membrana Hybond ECL (Amersham) de nitrocelulosa. La membrana se incubó con un anticuerpo monoclonal de Bax (N-20) a dilución 1:200 (Santa Cruz Biotechnology), y con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. La reactividad del antígeno se demostró con el sistema ECL de quimioluminiscencia (Amersham). Para comprobar que en todas las muestras se analizaba la misma cantidad de proteína se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-actina ac-40 (Sigma) a dilución 1:1000.

3.1.7 Análisis estadístico.

Para comparar proporciones de una variable entre grupos se utilizó el test de Chi-cuadrado, y cuando fue apropiado el test exacto de Fisher (SPSS, *Statistical Package for the social sciences* 8.0). En todos los análisis realizados se estableció la significación estadística para valores de $\alpha \leq 0.05$. Los valores de p se determinaron mediante tests estadísticos de dos colas.

3.2 Análisis del acúmulo de alteraciones genéticas mediante AP-PCR.

3.2.1 Modelo experimental de metástasis humana.

3.2.1.1 Líneas celulares.

En este estudio se ha utilizado la línea celular de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB 435 parental (435/P), cedida a nuestro laboratorio por la Dra. Price (M.D. Anderson Cancer Center, TX). Esta línea celular se derivó a partir de una efusión pleural de una paciente caucásica de 31 años con adenocarcinoma ductal infiltrante de mama (Cailleau et al., 1978).

Estas células se transfectaron con el vector de expresión eucariota (pSSF) que contenía el gen Bcl-2 o Bcl-x_L humano (estos plásmidos fueron cedidos a nuestro laboratorio por el Dr.

Gabriel Núñez), induciéndose de forma estable la sobreexpresión de estas proteínas. También se obtuvieron clones control que contenían tan sólo el vector de expresión pSSF-neo (Figura 7) (Fernández et al., 2000).

De estos tranfectantes se obtuvieron variantes celulares, derivadas mediante cultivo primario, de tumores inducidos ortotópicamente y de las respectivas metástasis que estos tumores ocasionaban. La expresión de los genes transfectados en las distintas variantes obtenidas se confirmó mediante western blot.

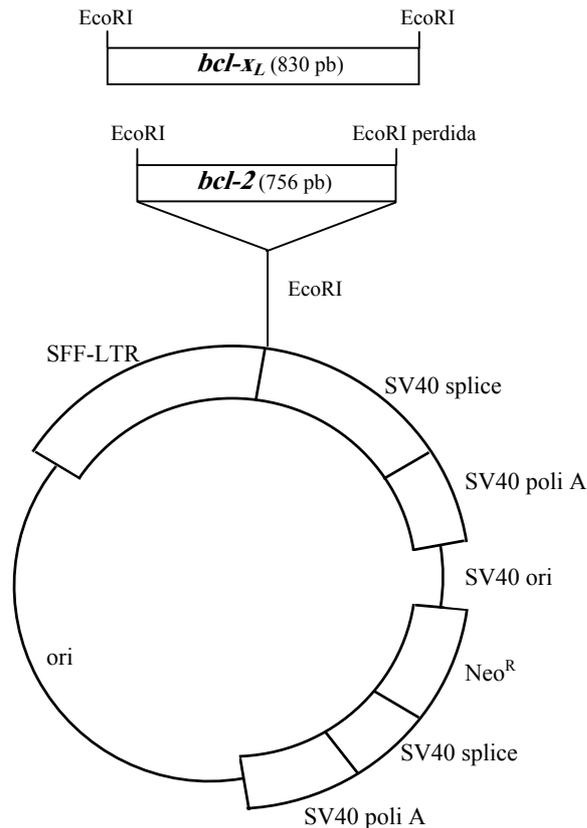


Figura 7. Mapa genético del plásmido pSSF utilizado en las transfecciones, indicándose el tamaño del inserto correspondiente tanto al gen *bcl-2* como *bcl-x_L* humanos.

3.2.1.2 Condiciones de cultivo.

Las líneas celulares crecen en una mezcla 1:1 (v/v) de medio de cultivo DMEM (*Dubelcco's Modification of Eagle's Medium*) y medio Ham F12 (DMEM/F12) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS), 2 mM de L-Glutamina y, en el caso de los transfectantes seleccionados, 500 µg/ml de neomicina G418 (Life Technologies, Inc. Gibco BRL). Las células se mantienen en un incubador humidificado a 37°C en una atmósfera al 5% CO₂-95% de aire.

El medio se renueva cada 2-3 días por aspiración y adición de medio fresco. Cuando los cultivos llegaban al estado de subconfluencia, se procedía a expandirlos previo tratamiento con PBS 1X (en mM: NaCl 136, KCl 2,7, NaHPO₄·2H₂O 9,35, KH₂PO₄ 1,47) y tripsina al 0,05%, con EDTA 0,2 g/l (Gibco BRL).

De estos cultivos celulares se obtenían *pellets*, de los cuales se extraía DNA, RNA o proteínas.

3.2.1.3 Análisis de la expresión de Bcl-2 y Bcl-x_L.

La expresión de Bcl-2 y Bcl-x_L en las líneas transfectadas se comprobó mediante western blot, utilizando un anticuerpo monoclonal de Bcl-2 (H-100) a dilución 1:200 (Santa Cruz Biotechnology) y un anticuerpo policlonal de Bcl-x_L (S-18) a una dilución 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology). Las condiciones son tal y como se describen en el apartado 3.1.6.

3.2.1.4 Selección *in vivo* de variantes tumorales y metastáticas.

Se utilizaron ratones hembra atímicos de la cepa Balb-c/nude, de entre 6 y 7 semanas, para inducir tumores ortotópicos inyectando i.m.f.p. (*intramammary fat pad*) 1x10⁶ células.

Por este procedimiento se obtuvieron tumores y metástasis provenientes de las células 435/Neo, y de los transfectantes 435/Bcl-2 y 435/Bcl-x_L, incluyéndose también tumores y metástasis inducidas con un *pool* de células transfectadas con el gen Bcl-x_L (435/Bcl-x_L pool) para identificar un posible efecto de la variación clonal sobre las propiedades celulares.

La exéresis quirúrgica del tumor primario se hizo entre 4 y 6 semanas después del implante. Los ratones se sacrificaron cuando estaban moribundos y se examinó la existencia de metástasis en pulmón, ganglios y hueso. A partir de los tumores y metástasis extraídos del animal de experimentación se derivaron, mediante cultivo primario y selección con neomicina, distintas variantes tumorales y metastáticas que se volvieron a implantar en el animal de experimentación. Esta operación se realizó 2 veces más, derivando después de cada implante una nueva generación de variantes tumorales y metastáticas (Figura 8).

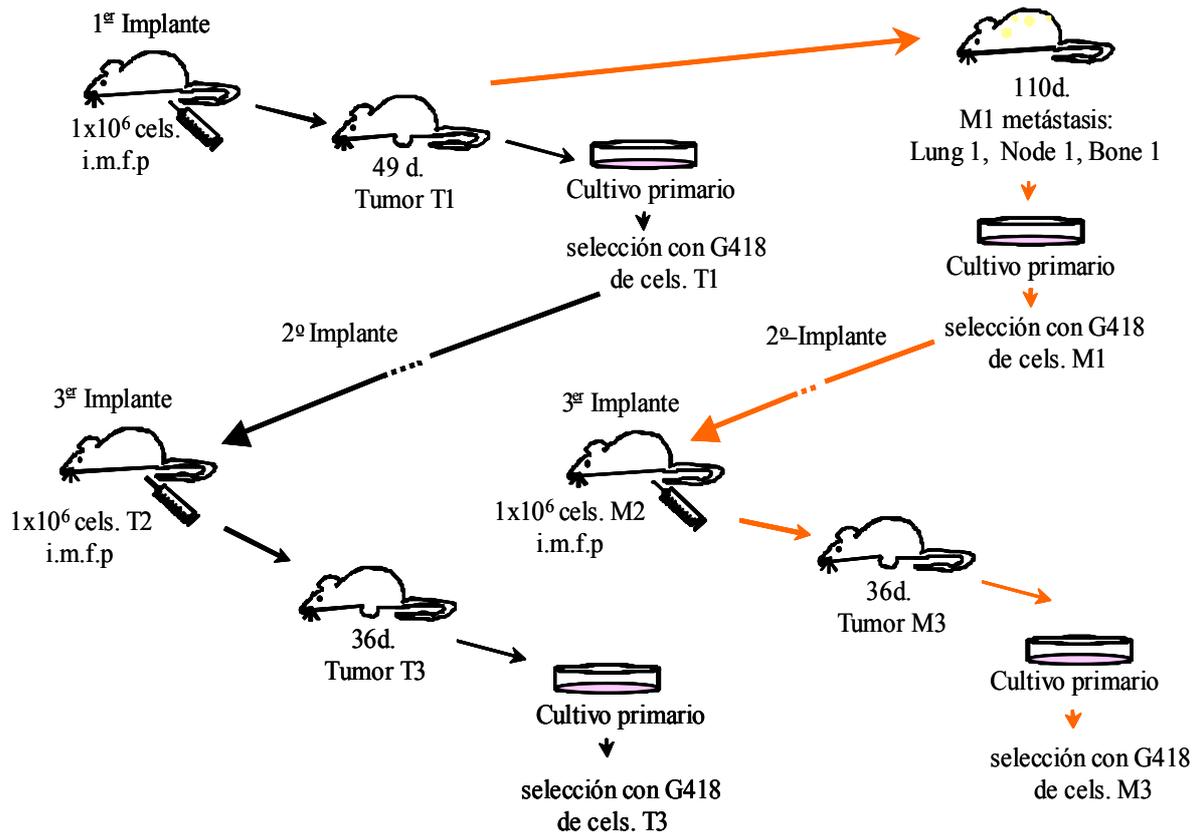


Figura 8. Esquema de los sucesivos pases de selección *in vivo/in vitro*. Con flechas negras se indican los sucesivos implantes y la selección de variantes celulares derivadas de tumores: T1 de la primera generación, T2 de la segunda y T3 de la tercera. Las flechas naranjas muestran la selección de variantes celulares derivadas de metástasis: M1 de la primera generación, M2 de la segunda y M3 de la tercera.

Tras los 3 pases sucesivos de selección *in vivo/in vitro* se seleccionaron las siguientes variantes celulares:

* Primera generación de variantes tumorales:

435/Neo_{Tumor1}; 435/Bcl-2_{Tumor1}; 435/Bcl-x_L C1_{Tumor1} y 435/Bcl-x_L pool_{Tumor1}

* Primera generación de variantes metastáticas:

435/Bcl-x_L C1_{Lung1}; 435/Bcl-x_L C1_{Node1}; 435/Bcl-x_L C1_{Bone1}; 435/Bcl-x_L pool_{Lung1} y 435/Bcl-x_L pool_{Node1}

* Segunda generación de tumores:

435/Bcl-x_L C1_{Lung1Tumor2}; 435/Bcl-x_L C1_{Node1Tumor2} y 435/Bcl-x_L C1_{Bone1Tumor2}

* Segunda generación de metástasis:

435/Bcl-x_L C1_{Lung1Nodeback2}; 435/Bcl-x_L C1_{Node1Nodedors2a} y 435/Bcl-x_L C1_{Node1Nodedors2b}

* Tercera generación de tumores:

435/Neo_{Tumor3}; 435/Bcl-2_{Tumor3}; 435/Bcl-x_L C1_{Tumor3} y 435/Bcl-x_L pool_{Tumor3}

* Tercera generación de metástasis:

435/Neo_{Lung3}; 435/Bcl-2_{Lung3}; 435/Bcl-x_L C1_{Node3}; 435/Bcl-x_L C1_{Nodeback3}; 435/Bcl-x_L pool_{Lung3} y 435/Bcl-x_L pool_{Nodeback3}

Todas estas líneas celulares se analizaron mediante AP-PCR.

3.2.1.5 Obtención de DNA.

Las extracciones de DNA se hicieron, tal y como se describe en el apartado 3.1.2, a partir de los *pellets* congelados de cada una de las líneas celulares.

Para realizar la técnica de AP-PCR es especialmente crítico comprobar tanto la concentración como la calidad del DNA. Los diferentes DNAs utilizados deben estar a la misma concentración para que las comparaciones de sus patrones de bandas resulten válidos. Por otro lado, la degradación del DNA da lugar a patrones anómalos, normalmente con una marcada disminución de la intensidad de las bandas en la parte superior o inferior del carril, lo cual también invalida la comparación.

3.2.2 AP-PCR: *Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*.

La AP-PCR (*Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*) es una técnica de *fingerprinting* de DNA, descrita por Welsh y McClelland en 1990. Esta técnica se basa en la amplificación mediante PCR de múltiples fragmentos de DNA genómico, generalmente utilizando un único *primer* arbitrario.

La técnica de la AP-PCR proporciona un *fingerprint* representativo del genoma y con un patrón de bandas diferente para cada organismo, lo que ha hecho que esta técnica haya sido ampliamente utilizada en estudios de taxonomía y filogenia, ya que permite detectar fácilmente diferencias entre los genomas de diferentes especies o variedades (Welsh y McClelland, 1994).

La AP-PCR también se ha utilizado en la investigación sobre cáncer, permitiendo detectar alteraciones genéticas concretas, como la existencia de inestabilidad de microsatélites en tumores colorrectales (Ionov et al., 1993).

3.2.2.1 Características técnicas de la AP-PCR.

En una PCR convencional, se amplifica una secuencia diana mediante el uso de dos *primers* específicos, cuyas secuencias flanquean la secuencia de interés. Tras varios ciclos de desnaturalización y síntesis se consigue una amplificación exponencial de la secuencia diana.

En general, las PCRs específicas se llevan a cabo en condiciones de alta astringencia, para evitar la amplificación de otras secuencias diferentes a la de interés. Sin embargo, la base de la AP-PCR es la amplificación de DNA genómico, generalmente con un único *primer* arbitrario, que es capaz de unirse a diferentes puntos a lo largo de la muestra de DNA con los que comparte un cierto grado de homología. Para conseguir esto, los primeros ciclos de la reacción se realizan en condiciones de baja astringencia, lo que generalmente se consigue con temperaturas de *annealing* bajas, o bien incrementando la concentración de magnesio.

Tras unas cuantas rondas de amplificación con estas condiciones se obtienen una serie de productos que han incorporado la secuencia original del *primer* en los dos extremos. Cuando se incrementa la temperatura de *annealing* (alta astringencia) estos productos se amplificaran con mayor eficiencia, generando un número discreto de bandas que proporcionan un *fingerprint* del genoma (Figura 9) (Navarro y Jorcano, 1999).

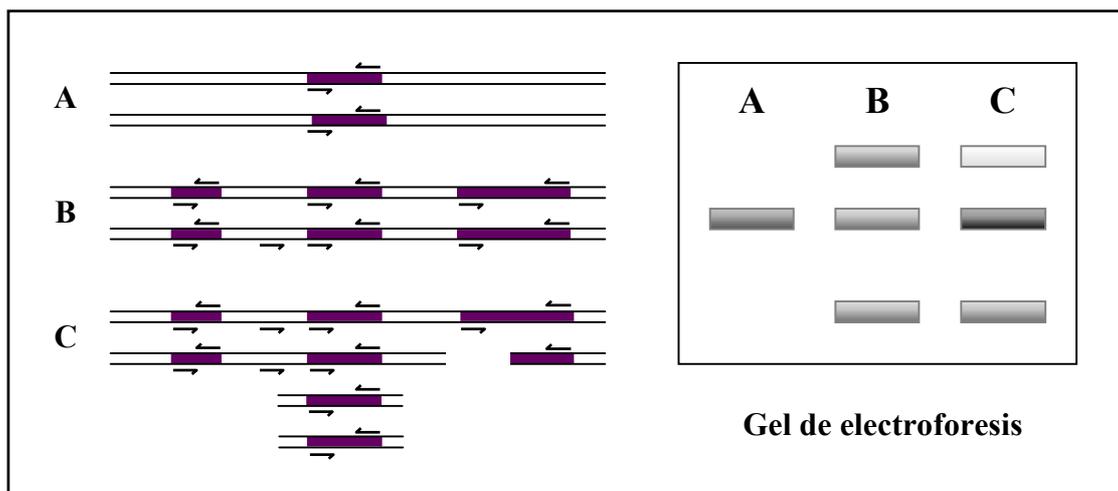


Figura 9. Principio de la AP-PCR. Los cambios de intensidad detectados en el gel de electroforesis reflejan el aumento o la disminución en el número de copias de la secuencia correspondiente.

En algunos experimentos de AP-PCR, cuando se trabaja con *primers* cuyas secuencias son muy redundantes, no es necesario utilizar condiciones de baja astringencia.

La amplificación sólo tiene lugar si hay dos sitios posibles de unión del *primer* en las cadenas opuestas del DNA y a una distancia moderada, usualmente 1 Kb o menos. Utilizando las condiciones estándar de amplificación se suelen obtener entre 40 y 80 bandas de intensidad suficiente para ser detectables tras la separación en un gel de acrilamida desnaturizante. El tamaño de las secuencias amplificadas está entre 100 y 2000 nucleótidos (Peinado et al., 1992).

Los patrones de bandas que se obtienen por AP-PCR son diferentes en función del *primer* utilizado, además se ha comprobado que los patrones obtenidos son consistentes y reproducibles. Sin embargo, existen experimentos de AP-PCR con patrones de bandas no reproducibles, por eso es necesario comprobar la reproducibilidad de la técnica con cada *primer* que se utilice.

La amplificación mediante AP-PCR es semicuantitativa, es decir la intensidad de las bandas amplificadas es proporcional a los niveles relativos de su correspondiente secuencia en la muestra de DNA analizada. Además, las bandas amplificadas mediante esta técnica corresponden mayoritariamente a secuencias de copia única, más que a elementos repetitivos. Otra característica interesante de la AP-PCR que es, tanto consecuencia como confirmación de su naturaleza arbitraria, es que los cromosomas más grandes están representados por un mayor número de bandas que los cromosomas pequeños (Perucho et al., 1995; Arribas et al., 1997).

3.2.3 Condiciones de las AP-PCRs.

Las AP-PCRs se realizaron con 4 *primers* diferentes. Los *primers* se seleccionaron en base a su reproducibilidad y a la calidad del *fingerprint* que se obtenía con cada uno de ellos. Tres de los cuatro experimentos se realizaron con un único *primer* arbitrario (Ocean, pU6 y Blue) (Arribas et al., 1999; Tórtola et al., 1999; Yasuda et al., 1996) y en el cuarto se añadieron simultáneamente dos *primers* a la mezcla de reacción (D12S77 *up* y *down*) (Arribas et al., 1997). Las secuencias y concentraciones de los *primers* utilizados se describen en la Tabla 8.

Tabla 8. Identificación, concentración y secuencia de los *primers* utilizados para AP-PCR.

<i>primers</i>	[<i>primer</i>]	secuencias
Ocean	20 μ M	5'-CAG AAT TCT CAG CAG ATC CG-3'
pU6	100 μ M	5'-GCT TCT GAC TTA TTC TTG CTC TTA G-3'
Blue	20 μ M	5'- CCG AAT TCG CAA AGC TCT GA-3'
D12S77	100 μ M	U: 5'-GAA GGG CAA CAA CAG TGA A-3' D: 5'-CTT TTT TTT CTC CCC CAC TC-3'

A continuación se indican las cantidades de cada uno de los reactivos utilizados en los cuatro experimentos de AP-PCR (Tabla 9) y las condiciones de amplificación de los diferentes *primers* (Tabla 10).

Tabla 9. Mezcla de reacción para cada AP-PCR. (* Ver concentración del *primer* en Tabla 8).

	Ocean	pU6	Blue	D12S77
H₂O	14,79 μ l	16,8 μ l	14,79 μ l	13,8 μ l
Tampón PCR 10X	2,7 μ l	2,5 μ l	2,7 μ l	2,5 μ l
dNTPs 1 mM de cada uno	2,7 μ l	2,5 μ l	2,7 μ l	5 μ l
MgCl₂	0,54 μ l	0,25 μ l	0,54 μ l	0,25 μ l
<i>primer</i> *μM	1,35 μ l	0,5 μ l	1,35 μ l	0,25 μ l + 0,25 μ l
[α-³³P]dATP	0,2 μ l	0,2 μ l	0,2 μ l	0,2 μ l
Taq DNA polimerasa 5 u/μl	0,22 μ l	0,25 μ l	0,22 μ l	0,25 μ l
DNA [20 ng/μl]	2,5 μ l	2 μ l	2,5 μ l	2,5 μ l

Tabla 10. Condiciones para cada una de las AP-PCRs.

Blue; Ocean	pU6	D12S77
4 min a 94°C	2 min a 95°C	30 sec a 94°C
30 sec a 94°C 1 min a 50 °C 1 min 30 sec a 72°C	30 sec a 94°C 30 sec a 50°C 30 sec a 72°C	20 sec a 94°C 30 sec a 55°C 45 sec a 72°C
15 sec a 94°C 15 sec a 60°C 30 sec a 72°C	5 min a 72°C	5 min a 72°C
5 min a 72°C		

3.2.3.1 Electroforesis y preparación de las muestras.

La preparación de los geles, las muestras y la electroforesis son tal y como se describen en el apartado 3.1.3.2, a diferencia de que los geles se precorrían antes de cargar las muestras alrededor de una hora a 70 W, en lugar de a 55 W, ya que se observó que mejoraba la resolución de las AP-PCRs.

Las condiciones de electroforesis para los *primers* utilizados y las diluciones de los productos de PCR que se resolvían en cada gel se especifican en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones de electroforesis para cada uno de los *primers* y dilución de los productos de PCR.

	Ocean	pU6	Blue	D12S77
Dilución	1:3	1:3	1:3	1:3
Carga	3,5 µl	3,5 µl	3 µl	3,5 µl
Electroforesis	5,5 h a 55W	3,5 h a 55W	5,5-6 h a 55W	3,5 h a 55W

3.2.3.2 Selección de bandas.

Una vez finalizada la electroforesis y revelada la película, para cada uno de los *primers* analizados se seleccionaron un determinado número de bandas (entre 39 y 46 según el *primer*) que eran representativas del *fingerprint* obtenido.

Se consideraron como bandas todas las marcas bien definidas y claramente distinguibles del fondo, descartando las más intensas, así como las más tenues, debido a la dificultad que presentaban estas señales para ser cuantificadas de forma apropiada. Cuando se identificaban dos bandas cercanas que podían corresponder a las dos cadenas de una única secuencia de DNA debido a su comportamiento similar de forma recurrente, se siguieron considerando como bandas independientes, ya que constituían controles internos de la técnica.

3.2.4 Análisis densitométrico de las bandas.

Aunque la observación a simple vista de los patrones obtenidos permite distinguir bandas que han sufrido alteraciones, para que los resultados sean fiables y reproducibles se necesita un método objetivo y estandarizado que evite la subjetividad del análisis directo. El método escogido ha sido el del **análisis densitométrico** de los *fingerprints* obtenidos. Para ello, las películas se escanearon (EPSON GT-8500 con unidad de transparencias; Seiko Epson Corporation, Nagano, Japón) a una resolución de 200 píxels/pulgada, utilizando el programa de captación de imágenes Adobe Photoshop y se guardaron en formato .TIFF. Las imágenes obtenidas se transfirieron al programa de densitometría Phoretix 1D Advanced Versión 3.0 (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle upon Tine, Reino Unido), el cual permite cuantificar la intensidad de las bandas. En la Figura 10 se muestran esquemáticamente los diferentes pasos seguidos para analizar la intensidad de las bandas utilizando este programa.

Los carriles con intensidades no comparables o con patrones de bandas anómalos se descartaron. Cuando las irregularidades afectaban sólo a una zona en la que no interferían para el análisis de bandas, el carril se incluyó en el estudio. Aunque el programa de densitometría que hemos utilizado permite medir la intensidad de la banda considerando su volumen, debido a la dificultad existente en algunos casos para determinar los límites de las bandas, y al solapamiento parcial de los perfiles de algunas de ellas, se consideró que el método más apropiado era determinar la intensidad del pico.

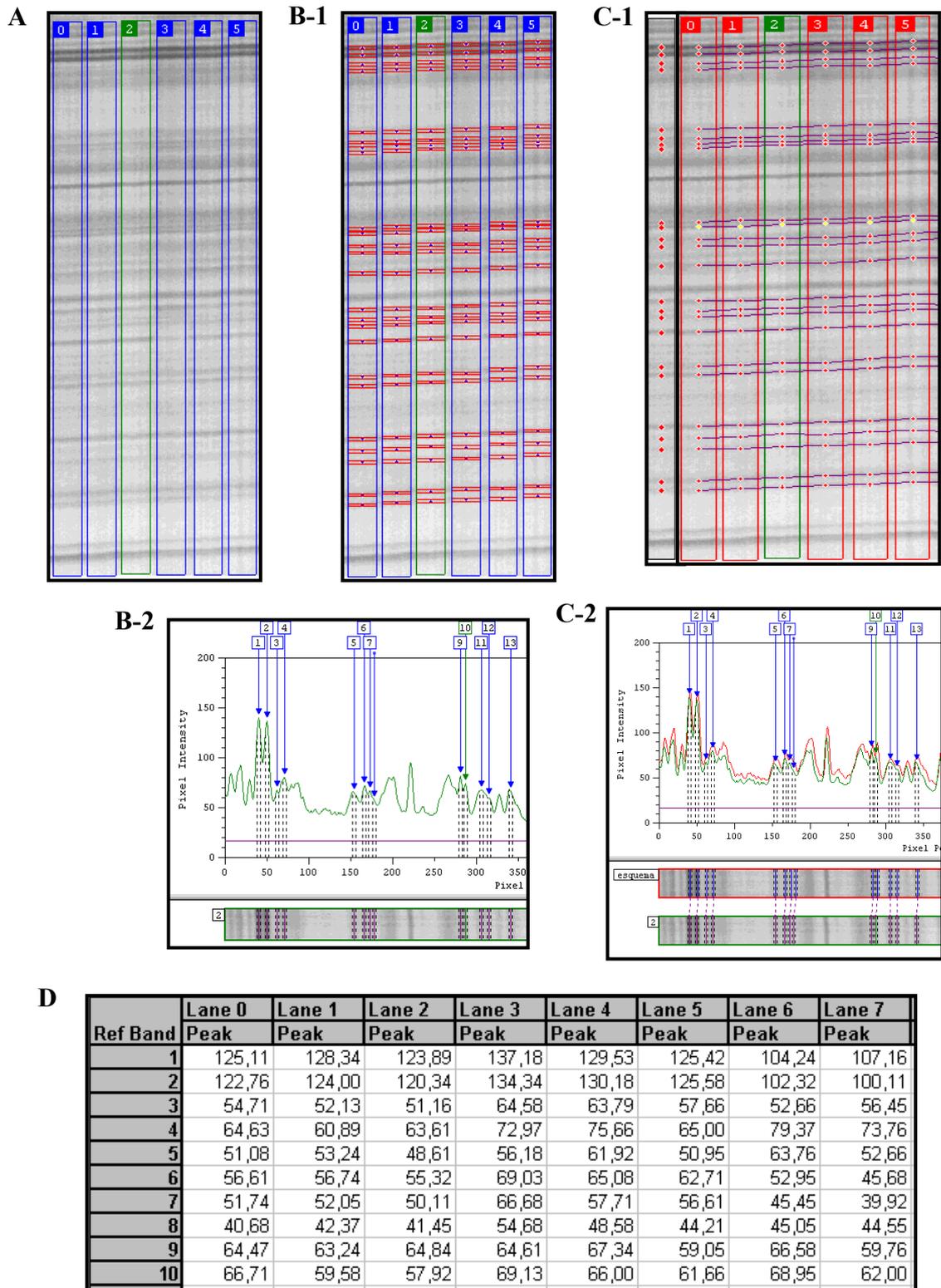


Figura 10. Esquema del funcionamiento del programa de densitometría Phoretix 1D Advanced. **A.** Definición de los carriles. **B-1.** Detección de las bandas seleccionadas inicialmente. Los puntos indican la horizontal donde se mide el pico de cada banda. **B-2.** Perfil de intensidad de las bandas del carril 2 seleccionado en B-1. **C-1.** Alineación de las bandas con relación al carril de referencia. **C-2.** Asociación de cada una de las bandas respecto al carril de referencia (en rojo). **D.** Valores de los picos de intensidad absoluta de las bandas en los diferentes carriles analizados.

3.2.5 Cuantificación del daño genómico.

Una vez determinada la intensidad de todas las bandas analizadas, los valores de las densidades ópticas obtenidas se transfirieron a una hoja de cálculo de Microsoft Excel, para poder comparar las intensidades de las bandas en las diferentes variantes celulares en relación con su variante de origen y así poder determinar que bandas habían sufrido algún tipo de alteración.

Para reducir la posibilidad de error causada por pequeñas variaciones en la intensidad total de los carriles, se calculó la **intensidad relativa** de cada banda, para ello se modificó la intensidad absoluta teniendo en cuenta tanto la intensidad total del carril como la intensidad global del experimento y el número de bandas analizadas. La intensidad relativa se calculó en cada caso según la siguiente formula:

$$\text{Intensidad relativa} = \frac{\text{intensidad de la banda}}{\text{intensidad total del carril}} \times \text{n}^\circ \text{ bandas del carril} \times \text{int. media experimento}$$

Aunque como se ha dicho anteriormente la AP-PCR es una técnica reproducible, existe un cierto grado de variabilidad, que se pondrá de manifiesto al cuantificar la intensidad de cada una de las bandas. Por lo tanto, es conveniente analizar la variabilidad de la técnica, para así poder determinar el límite a partir del cual las diferencias que encontramos se pueden considerar alteraciones reales. Para ello se valoró la **reproducibilidad intraensayo** analizando con el *primer* Ocean una muestra por cuadruplicado (435/Neo) y otras 3 (435/Bcl-2, 435/Bcl-2_{Tumor3} y 435/Bcl-x_L) por duplicado. A partir de los datos obtenidos, para cada una de las muestras se calculó la intensidad media y la desviación estándar de cada banda analizada, y se dedujo cual era la recta que se podía considerar como límite de variabilidad de la técnica, y que ofrecía un 1% de probabilidad de error en la determinación de los cambios. De esta forma, para cada banda se calculó el límite de variabilidad que le correspondía en función de la recta obtenida.

Para simplificar el análisis no se consideró la magnitud del cambio, es decir su valor numérico. Únicamente se valoró la presencia o ausencia de cambios y el sentido de los mismos, es decir ganancias o pérdidas de intensidad de las bandas. Los incrementos y los

decrementos de intensidad se midieron por separado. La suma de los cambios se dividió por el número total de bandas identificadas en los 4 experimentos de AP-PCR, calculándose los índices correspondientes a los aumentos de intensidad de las bandas: fracción de ganancias o GF (*Gains Fraction*); a las pérdidas de intensidad de las bandas: fracción de pérdidas o LF (*Losses Fraction*), y la suma de ambas que sería la fracción de daño genómico o GDF (*Genomic Damage Fraction*).

$$GF = \frac{\text{n}^\circ \text{ bandas con ganancias}}{\text{n}^\circ \text{ bandas analizadas}} \qquad LF = \frac{\text{n}^\circ \text{ bandas con pérdidas}}{\text{n}^\circ \text{ bandas analizadas}}$$

El GDF se definiría como:

$$GDF = \frac{\text{n}^\circ \text{ bandas con cambios}}{\text{n}^\circ \text{ bandas analizadas}}$$

El GDF es un índice, resultado de sumar GF y LF, que permite valorar la porción del genoma que está alterada, y cuantificar el número de alteraciones genéticas existentes en una variante celular con relación a una que se coge como referencia.

3.2.6 Análisis filogenético.

Los árboles filogenéticos se hicieron utilizando el programa Contml del paquete PHILYP (*Phylogenetic Inference Package*) version 3.5c. Distribuido por el autor Felsenstein, J. 1993. Department of Genetics, University of Washington, Seattle. Este programa utiliza un método de máxima verosimilitud para calcular *clusters* de caracteres continuos (*continuous character maximun likelihood clustering methods*), de esta forma podremos calcular la distancia entre las diferentes líneas analizadas en función de la similitud de las 175 bandas de AP-PCR, y determinar que líneas celulares están más próximas entre sí, y más cercanas a la línea que se toma como referencia. En este modelo se considera que las alteraciones genéticas no ocurren al azar, sino que una vez que ha ocurrido un suceso, se incrementa la probabilidad de que ocurran otros (Jiang et al., 2000). El programa cuando encuentra la pareja que más se parece, la compara con cada una de las líneas celulares restantes y encuentra la línea celular que más se aproxima a ellas, y así sucesivamente. El programa Phylip ofrece la posible vía evolutiva más lineal y sencilla que se puede derivar de la información analizada. Una vez reconstruidos

los árboles filogenéticos mediante el software PHILYP, se graficaron utilizando el programa de dibujo de árboles TreeView versión 1.6.1(<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>). Para obtener los árboles filogenéticos se utilizaron los valores derivados del análisis de AP-PCR transformados en 0 (no cambio), 1 (ganancia) y -1 (pérdida).

3.2.7 Análisis mediante *clusters*.

Los resultados de AP-PCR transformados en 0, 1 y -1 se analizaron mediante un programa de *clusters*. Estos métodos se basan en la utilización de algoritmos estadísticos que permiten agrupar los genes, en nuestro caso las bandas de AP-PCR, en función de su similitud (Eisen et al., 1998), permitiendo visualizar de forma global toda la información de que se dispone. Nosotros hemos utilizado el programa de construcción de *clusters* elaborado por Michael Eisen (*Stanford University*), que contiene dos programas *Cluster* y *TreeView*. El método utilizado por el programa *cluster* para organizar la información fue el de *clusters* jerárquicos: *Average Linkage Clustering*. El programa *TreeView* permite visualizar la información generada.

3.3 Expresión génica diferencial entre variantes metastáticas y el tumor.

3.3.1 Modelo celular utilizado para el estudio.

Los estudios de expresión diferencial se llevaron a cabo entre variantes metastáticas originadas en distintos órganos y el tumor ortotópico. Se analizaron 3 variantes metastáticas de primera generación con diferente organoespecificidad: pulmón (435/Bcl-x_L C1_{Lung1}), hueso (435/Bcl-x_L C1_{Bone1}) y ganglio (435/Bcl-x_L C1_{Node1}); y una variante metastática de tercera generación derivada de una metástasis ganglionar: 435/Bcl-x_L C1_{Node3}. Como punto de comparación de estas cuatro líneas metastáticas se utilizó el correspondiente tumor de la primera generación: 435/Bcl-x_L C1_{Tumor1}. Todas estas líneas celulares se habían analizado previamente mediante AP-PCR.

3.3.1.1 Condiciones de cultivo.

Las condiciones de cultivo son las mismas que las descritas en el apartado 3.2.1.2. En este caso, era especialmente importante la estandarización del cultivo, para minimizar los cambios de expresión causados por el diferente estado de las células. Para asegurarnos que todos los cultivos estaban en plena fase exponencial, antes de sembrar las células utilizadas para extraer el RNA se mantuvieron un par de pases en estado de subconfluencia. Además, teniendo en cuenta que las líneas utilizadas tenían diferente capacidad de adherencia, para evitar seleccionar subpoblaciones más adherentes, en todos los pases se recogía el sobrenadante.

➤ Día 1. Se plantaron 1×10^6 células de cada línea celular en una placa de cultivo de 100 mm de diámetro y se dejaron un O/N.

➤ Día 2. Una vez adheridas se les cambió el medio y se les añadió MCSS (medio completo sin suero), con la intención de sincronizar las células y así igualar el estado del cultivo en todas las líneas. El MCSS se dejó durante 4 h con la finalidad de eliminar los posibles restos de suero, transcurrido este tiempo se añadió MCSS fresco y se dejó hasta el día siguiente.

➤ Día 3. Se reemplazó el MCSS por MC 10% de suero.

➤ Día 4. Se empezó la extracción de RNA.

3.3.1.2 Extracción de RNA.

La extracción de RNA total se hizo con Trizol® Reagent (Life Technologies), siguiendo el protocolo que se resume a continuación:

En el primer paso de **homogenización**, las células se lisaron añadiendo directamente entre 2-4 ml de trizol a la placa de cultivo (10 cm de Ø). El segundo paso permite separar la muestra en fases y **extraer el RNA**. El homogenizado se incubaba durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente se añadían 0,2 ml de cloroformo por cada ml de trizol, se agitaba durante 15 seg y se incubaba a temperatura ambiente 2-3 min. Pasado este tiempo las muestras se centrifugan a 12.000 g, durante 10 min a 4°C. Tras la centrifugación, la mezcla se separa en una fase roja inferior

correspondiente al trizol-cloroformo, una interfase y una fase acuosa superior incolora. El RNA está en la fase acuosa, mientras que la fase de trizol y la interfase contienen DNA y proteínas.

Para **precipitar el RNA**, la fase acuosa se transfería a un nuevo tubo y se añadían 0,5 ml de isopropanol por cada ml de trizol. Después, las muestras se incubaban 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaban a 12.000 g, durante 10 min a 4°C. Tras la centrifugación, el RNA formaba un precipitado, muchas veces visible, de tipo gelatinoso.

Una vez se eliminaba el sobrenadante, el *pellet* de RNA se lavaba con etanol 75%, añadiendo al menos 1 ml por cada ml de trizol. Se mezclaba mediante vortex y se centrifugaba a 7500 g durante 5 min a 4 °C. Para evaporar el etanol, los *pellets* de RNA se dejaban secar al aire durante 10-15 min y se resuspendían en H₂O DEPC (dietil pirocarbonato) o *Buffer OEB Elution Buffer* (Qiagen). Finalmente, las muestras se incubaban durante 10 min. en un baño a 55-60°C.

La concentración de RNA se valoró mediante el espectrofotómetro determinando A₂₆₀, ya que esta es la longitud de onda a la que los ácidos nucleicos, tanto DNA como RNA, presentan la máxima absorbancia. También se determinó A₂₈₀, que es donde tienen su máximo de absorbancia las proteínas, la ratio A₂₆₀₋₂₈₀ permite valorar el grado de contaminación proteica. La calidad de los RNAs se comprobó corriendo 1 µl de RNA disuelto en LB 5X, en un gel de formaldehído (1,2% de agarosa disuelta en H₂O DEPC, MOPS 1X, formaldehído 7,4%). Las electroforesis corrieron entre 35-40 min a 100 V. Los geles se tiñeron con una solución al 0,1M de NH₄Ac y 0,5 µg/ml de bromuro de etidio durante 15 min en agitación, destiñéndolos posteriormente en H₂O y visualizándolos con UV.

3.3.2 *Microarrays*.

La tecnología de *microarrays* es una técnica con diferentes áreas de aplicación que ha empezado a utilizarse ampliamente en los últimos años en el análisis de la expresión génica.

El *array* consiste en un soporte sólido, que suele ser de nylon o vidrio, donde los cDNAs o los oligonucleótidos correspondientes a los genes que se van a analizar se sitúan siguiendo un patrón fijo. Sobre ese *array* se hibridarán las sondas del mRNA de interés, que pueden estar marcadas con fluorescencia o con radioactividad. Una vez hibridadas las sondas de RNA con

el DNA complementario presente en el *array*, las emisiones de radioactividad o fluorescencia de la sonda específicamente unida se detectan utilizando el escáner apropiado, dándonos una estima cuantitativa de la expresión de cada gen. En último término estas señales representan las cantidades de RNA presentes originalmente en la célula (Duggan et al., 1999).

Una vez preparadas e hibridadas las muestras sobre el *array*, el paso final del proceso es la conversión de la imagen adquirida en una tabla numérica que asocia un valor único a cada gen en el *array*. Esto se consigue mediante paquetes de análisis que reconocen automáticamente la posición de cada punto en la imagen y convierten la distribución de intensidades de píxeles en una medida de la intensidad para cada punto (Bassett et al., 1999).

Finalmente, una vez que los datos se han adquirido hay que transformarlos a un formato que facilite el análisis y que reduzca los posibles artefactos estadísticos. La manipulación de los datos es necesaria para corregir por ejemplo las diferencias de intensidad a lo largo de todo el *array*, para realizar esta corrección los datos se tienen que normalizar con respecto a una cantidad que se considera constante en todo el *array*. Existen diferentes estrategias para llevar a cabo este proceso, una de ellas implica el uso de los llamados *housekeeping genes*, cuya expresión se considera que no varía. Otra posibilidad, cuando el número de genes monitorizados es suficientemente alto, es normalizar utilizando la media o la mediana de las intensidades de todos los genes analizados. Aún no se sabe cual de las dos opciones es la mejor, pero teniendo en cuenta la dificultad para encontrar *housekeeping* reales, es decir genes cuya expresión sea realmente constante en diferentes tipos celulares y bajo diferentes condiciones fisiológicas o de tratamiento, la segunda opción parece mas adecuada (Dopazo et al., 2001).

3.3.2.1 cDNA *microarray* de Research Genetics.

Todas las hibridaciones se hicieron sobre una membrana de microarrays *GeneFilters* GF211 *Human "named genes"* (Research Genetics, Huntsville, AL). El *array* contiene 3964 elementos individuales, cada uno de ellos correspondiente a un gen humano conocido. Cada elemento consiste en un *spot* de 0,5 ng de cDNA inmovilizado sobre la membrana de nitrocelulosa. Los cDNAs son de aproximadamente 1 Kb de longitud y contienen la región 3'UTR completa. Los clones (***data points***) presentes en este *array* son clones de cDNA I.M.A.G.E./LLNL, que han sido aislados y secuenciados para confirmar que la secuencia era la correcta. Además, distribuidos a lo largo del *array* hay 192 **controles positivos** y 168 ***Housekeeping Genes***.

Los controles positivos son *spots* de DNA genómico total, que se utilizan como marcas para alinear la imagen en el *software*. También permiten monitorizar el grado de homogeneidad de la hibridación y en algunos casos se utilizan como base de la normalización de los estudios de expresión. Los *housekeeping genes* son genes, que al ser analizados con dos fluorocromos diferentes por el NIH, su señal de hibridación no difería entre tejidos. Sin embargo, no todos se expresan al mismo nivel, es decir algunos genes se expresaran con niveles bajos, mientras que otros lo harán con niveles altos.

3.3.2.2 Organización del *array*.

El *array* está organizado en dos campos: superior (*field 1*) e inferior (*field 2*). Cada uno de los campos se divide en 8 rejillas (*grids*), indicadas con las letras de la A a la H. Cada una de las rejillas contiene 11 columnas con los genes de análisis (*data points*) y una columna control, formada por controles positivos y *housekeeping genes*. Las columnas están numeradas de la 1 a la 12, siendo la columna control la 1. Cada rejilla contiene además 30 filas (Figura 11).

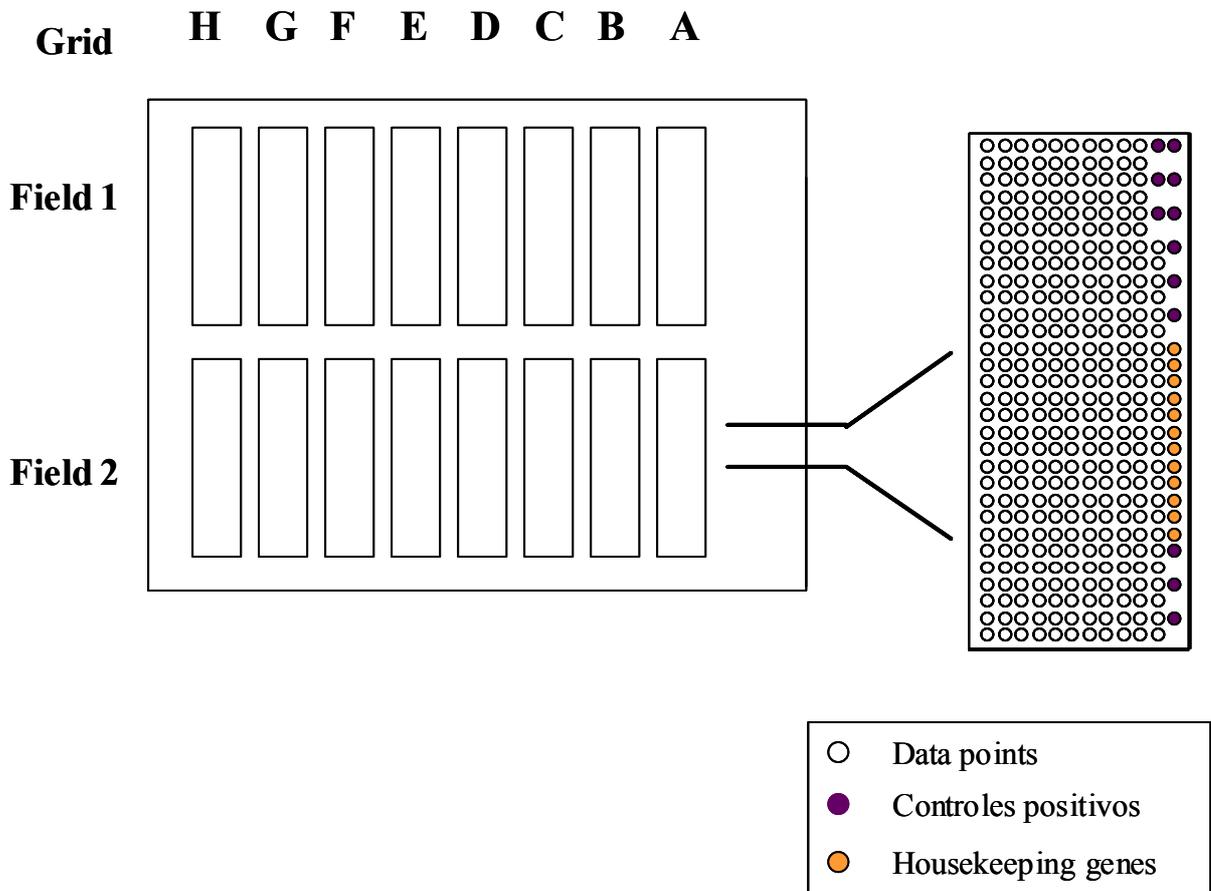


Figura 11. Esquema de la organización del *array* de Research Genetics GF211.

3.3.3 Protocolo de hibridación del *array*.

Antes de utilizar una membrana nueva se tiene que lavar con SDS 0,5%, previamente llevado a ebullición. Con este tratamiento se elimina cualquier residuo existente y se mejora la calidad de las hibridaciones. Los restos de SDS se eliminan manteniendo la membrana en SSC (150 mM NaCl, 15 mM citrato sódico, pH 7) 2X hasta el momento de iniciar la pre-hibridación.

A. Pre-hibridación.

La pre-hibridación de las membranas se lleva a cabo mediante rotación suave (8-10 rpm) durante un mínimo de 2 h a 42°C en la siguiente solución:

- 5 ml de solución de hibridación MicroHyb (Research Genetics), previamente atemperada a 42°C.
- 5 µg de DNA humano Cot-1 (Life Technologies), previamente desnaturalizada por ebullición durante 3 min.
- 5 µg de Poli dA (Research Genetics, 1 µg/µl).

B. Marcaje del RNA.

Este proceso se llevó a cabo en diferentes etapas que se describen a continuación:

B.1 *Priming*

En la Tabla 12 se indica la mezcla utilizada para unir el oligodT al RNA.

Tabla 12. Condiciones utilizadas para anillar el oligodT al RNA total.

RNA total.....	7 µg (Volumen ≤8 µl)
Oligo dT ¹	2 µl
Volumen final.....	10 µl

¹ 1 µg/µl 10-20 mer mixture, (Research Genetics).

Esta mezcla se incubó durante 10 min a 70°C y luego se enfría en hielo durante 2 min.

B.2 Elongación

En la Tabla 13 se indican los productos utilizados en la transcripción reversa del RNA, al que previamente se le había unido el oligodT. La reacción se llevó a cabo durante 90 min a 37°C.

Tabla 13. Mezcla de reacción utilizada para la transcripción reversa.

<i>First Strand Buffer</i> 5X ¹	6 µl
DTT, 0,1 M ¹	1 µl
dNTPs (dATP, dGTP y dTTP), 20 mM ²	1,5 µl
Transcriptasa reversa (Superscript II) ¹	1,5 µl
³³ P dCTP ³	10 µl

¹Life technologies. ²Pharmacia. ³[10 mCi/ml] (Amersham).

B.3 Purificación de la sonda.

La purificación de la sonda se hace mediante una columna de cromatografía Bio-Spin 6 (Bio-Rad) que permite eliminar los nucleótidos no incorporados.

Antes de purificar, el volumen de la muestra se completa con H₂O DEPC hasta 100 µl, añadiendo 1 µl de ésta solución a un vial que contiene 5 ml de líquido de centelleo. Así conoceremos el número de cpms de la sonda sin purificar.

B.3.1 Utilización de la columna:

1. Se invierte la columna varias veces para resuspender su contenido y eliminar posibles burbujas.
2. Se rompen los extremos de la columna y se elimina el exceso de *buffer*. Posteriormente se centrifuga durante 5 min a 1000 g para que quede completamente libre de *buffer*.
3. La columna se coloca sobre un tubo de 1,5 ml nuevo y se aplica cuidadosamente la sonda sobre la superficie de la resina.
4. Se centrifuga durante 5 min a 1000 g y se recupera la sonda ya purificada. 1 µl de la misma se añadirá a un tubo con 5 ml de líquido de centelleo.

B.3.2 Contage de la sonda.

La emisión de ^{33}P se mide en un contador β (contador Wallac). Para cada una de las sondas marcadas dispondremos de dos valores, uno correspondiente a las cpms de la sonda sin purificar y otro a las cpms de la sonda ya purificada. El porcentaje de incorporación de radioactividad es:

$$\text{Porcentaje incorporación de radioactividad} = \frac{\text{cpms antes de purificar}}{\text{cpms después de purificar}} \times 100$$

Esto nos permite saber la eficiencia de marcaje de la sonda y así comprobar si el RNA se ha marcado satisfactoriamente. Las eficiencias de incorporación pueden variar en cada marcaje por eso, para asegurar que en todos los casos se está comparando la misma cantidad de RNA, se añade siempre toda la sonda marcada.

C. Hibridación.

Antes de empezar la hibridación, la sonda purificada se desnatura durante 3 min a 95°C y después se enfría en hielo. Al tubo que contiene la membrana con la solución de pre-hibridación se le añade la sonda, previamente desnaturada.

La hibridación se hace en agitación suave (8-10 rpm) durante un mínimo de 12-18 h a 42°C.

D. Lavados.

Los lavados se hacen con una rotación que oscila entre 12-15 rpm. En primer lugar, se saca la solución de hibridación y se hace un lavado rápido con SSC 2X para eliminar la mayor parte de la sonda no hibridada. Después se hacen 2 lavados, cada uno con 30-40 ml de SSC 2X, 1% SDS durante 20 min a 50°C. El tercer lavado se hace con SSC 0,5X, 1% SDS durante 15 min a 55°C.

Finalmente, se saca la membrana y se coloca en una cubeta con SSC 2X para eliminar el exceso de SDS.

E. Captación de la imagen.

Una vez finalizados los lavados, para evitar que la membrana se seque se coloca sobre papel Whatman humedecido con SSC 2X y se envuelve con un plástico fino y transparente. Con cuidado se eliminan las burbujas y arrugas que puedan haber quedado y que podrían interferir en la captación de la imagen.

La membrana se coloca en el cassette, alineándola con alguna de las marcas existentes y después se pone la pantalla de Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Tras exponer la membrana durante un O/N, la pantalla se escaneó con un Storm Scanner (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) a una resolución (*pixel size*) de 50 micron.

Las imágenes escaneadas se importaron al programa de análisis de datos de *arrays Pathways* (Research Genetics).

F. Deshibridación.

La deshibridación de la membrana (*stripping*) previamente marcada, se hizo añadiendo SDS 0,5% en ebullición y manteniéndola durante 1 h en agitación. Este proceso se hizo siempre por duplicado, ya que se comprobó que aumentaba la cantidad de sonda deshibridada. La eficiencia del *stripping* se comprobó con un contador Geiger y también exponiendo la membrana deshibridada a una pantalla de Phosphorimager, que posteriormente se escaneó.

3.3.4 Análisis con el programa *Pathways*TM.

Se utilizó el *software Pathways*TM (Research Genetics) para analizar los experimentos de *microarray*. A continuación se resume el funcionamiento de este programa:

* *Importing*: el primer paso del análisis consiste en importar las imágenes en formato .TIFF de la membrana y convertirlas al formato interno que el *software* utilizará para analizar y comparar las imágenes del filtro (*GeneFilters*).

Una vez importada la imagen, lo primero que hay que hacer es alinearla. Para ello, puede ser útil incrementar la intensidad de los puntos, ya que eso facilitará su posterior localización y alineamiento. Esta modificación virtual no implica cambio en los datos de la imagen que permanecen almacenados. La imagen se alinea (*Align Image*) utilizando 16 puntos control

distribuidos a lo largo de toda la membrana. El programa valora si el alineamiento realizado está dentro de los márgenes de tolerancia establecidos. Una vez finalizado este proceso, aparece una rejilla en la que puede confirmarse el alineamiento de todos los puntos del *array*.

* *Analyzing*: el programa permite analizar cada una de las hibridaciones de forma independiente (*single GeneFilter*), proporcionando la intensidad de cada uno de los puntos presentes en el *array*. Esta intensidad, es la intensidad cruda (*raw intensity*) de los puntos de la imagen original y dependerá del alineamiento realizado durante el proceso de importación. Las diferencias de intensidad se visualizan mediante una escala de grises, también se pueden agrupar los genes en función de sus intensidades (*intensity distribution tool*). Además, el programa proporciona la intensidad promedio del *background*, calculado para todo el *array*. Este número es el mismo para todos los puntos de la imagen y se calcula utilizando el espacio entre los dos campos del *array*.

La información obtenida del análisis individual se puede transferir a una hoja de Microsoft Excel, donde entre otros datos aparecerá información referente a la localización de los puntos en el *array*, a la secuencia de los genes, así como la intensidad cruda de cada uno de los puntos.

* *Comparing*: con la opción de *Compare GeneFilter*, el programa permite comparar las hibridaciones dos a dos, normalizando sus intensidades. Existe la opción de normalizar utilizando los controles positivos, o bien utilizando la información de cada uno de los genes incluidos en el *array* (*Data points*).

Para facilitar la comparación de las dos imágenes se requiere ajustar los valores de las intensidades, multiplicándolas por un factor de normalización que permite obtener intensidades comparables. Este proceso de normalización genera una ratio de intensidades, que nos permite saber el número de veces que un gen está más o menos expresado en una de las hibridaciones que se están comparando. El programa permite representar las comparaciones en una escala de falso color rojo y verde, de forma que, cuando la intensidad es mayor en la primera imagen, por ejemplo una ratio de 2:1, se asigna el color rojo, y cuando la intensidad es mayor en la segunda imagen, por ejemplo una ratio de 1:2, se asigna el color verde. Cuando las dos intensidades son equivalentes, ratio 1:1, se indica con color amarillo.

En este caso además de obtener para cada punto la intensidad cruda y el *background* total del *array*, se obtiene la intensidad normalizada. El programa no sustrae el *background* de la intensidad normalizada. También se puede representar el número de genes en función de sus ratios mediante histogramas.

Una vez finalizada la comparación, la información generada se transfiere a una hoja de cálculo de Microsoft Excel, donde aparecerá además de toda la información referente a cada uno de los puntos (localización, secuencia, intensidad cruda, etc.), el resultado de la comparación entre las dos hibridaciones.

3.3.5 Procesamiento de datos.

Los datos del experimento de *microarrays*, obtenidos tras analizar cada una de las hibridaciones de forma independiente, se transfirieron desde la hoja de cálculo de Microsoft Excel al programa SPSS 8.0, con el que se hicieron todos los análisis.

3.3.6 Comprobación mediante PCR a tiempo real de los resultados obtenidos del análisis del *array*.

La expresión de algunos de los genes detectados como sobre o infraexpresados en el *array* se evaluaron mediante PCR a tiempo real en un termociclador fluorescente: Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Germany).

Esta técnica permite monitorizar de forma continua la fluorescencia resultado de la amplificación de DNA, pudiéndose determinar el número inicial de copias del transcrito amplificado.

Un método simple y genérico de monitorizar la síntesis de productos se basa en la utilización del colorante de doble cadena (*double-stranded*) de DNA SYBR® Green I, que permite obtener una estima del número inicial de copias, limitado sólo por efectos estocásticos. Sin embargo, la cuantificación basada en los colorantes de doble cadena es en general menos sensible que otros métodos, ya que se detectan todos los productos de dsDNA, para evitarlo se elimina la fluorescencia de los productos de dsDNA que estén por debajo de la temperatura de *melting* (T_m) del producto deseado. Esto es posible ya que los productos específicos generalmente tienen una temperatura de *melting* (fusión) superior a los no específicos. Por lo

tanto, la formación de producto específico se valora monitorizando la adquisición de fluorescencia a temperaturas a las que solamente el producto deseado está en forma de doble cadena (Morrison et al., 1998).

Nosotros hemos utilizado para hacer la PCR a tiempo real el termociclador fluorescente Lightcycler. Para la cuantificación, el *software* LightCycler sólo considera los valores de fluorescencia medidos durante la fase exponencial del proceso de amplificación por PCR. Esta fase es la fase *log-linear*, ya que la curva de crecimiento exponencial se transforma logarítmicamente en una línea.

El *software* permite dos métodos de cuantificación (*fit points* y segunda derivada), ambos referidos a la fase log-linear de la PCR, ya que sólo esta fase permite asumir que la reacción de PCR para todas las muestras se da bajo condiciones comparables. El método de cuantificación permite detectar el *crossing point* de cada una de las muestras analizadas. Los *crossing point* representan número de ciclos en los que la fluorescencia de todas las muestras es la misma. El número de ciclo, y por lo tanto el *crossing point* depende de la cantidad inicial de transcrito presente en la muestra. A mayor cantidad inicial, menos ciclos son necesarios para adquirir un determinado valor de fluorescencia. La cuantificación se basa en esta relación inversamente proporcional.

Los dos métodos de cuantificación son similares, nosotros hemos utilizado el de *fit points* ya que permite ajustar los valores manualmente de forma que la valoración se de en el momento en que todas las muestras están en la fase log-linear.

Una vez terminada la PCR se genera una curva de *melting*, en la que se monitoriza la fluorescencia de las muestras en relación con el incremento de temperatura. A medida que se incrementa la temperatura la fluorescencia disminuirá. En el caso del SYBR Green esto es debido a la separación de la doble cadena y consecuentemente a la liberación del fluorocromo. La curva de *melting* permite determinar la T_m característica de un determinado producto.

Con esta técnica se analizó la expresión de genes asociados a actividad metastática, como el colágeno tipoVI $\alpha 2$ (*upregulado*), y la proteína *zinc finger 5* y el receptor LCR1 acoplado a proteína G (*downregulados*). También se analizaron genes detectados como sobreexpresados en las 2 metástasis ganglionares como son la integrina $\beta 1$ y la apolipoproteína D, y genes

sobreexpresados asociados a metástasis ósea como la *heat shock* 70 kDa proteína 1 y el componente C2 del complemento.

3.3.6.1 Transcripción inversa (RT) de los RNAs.

Se retrotranscribieron 300 y 900 ng de RNA total de cada una de las líneas celulares (435/Bcl-x_L C1_{Tumor1}, 435/Bcl-x_L C1_{Lung1}, 435/Bcl-x_L C1_{Bone1}, 435/Bcl-x_L C1_{Node1} y 435/Bcl-x_L C1_{Node3}). En la Tabla 14 se indica la mezcla de reacción y las condiciones utilizadas.

Tabla 14. Condiciones de la transcripción reversa.

Mezcla de reacción:	H ₂ O.....3,2 µl
	Tampón RT 5X ¹4 µl
	dNTPs 1 mM de cada uno ²10 µl
	<i>primer</i> (poli-T) 100 µM.....0,1 µl
	inhibidor de RNAsas ³0,5 µl
	M-MLV RT ¹1 µl
	RNA total ⁴1,2 µl
Condiciones RT:	1 h a 37°C
	5 min a 95°C

¹ Transcriptasa inversa del virus murino de la leucemia de Moloney (M-MLV RT) que se suministra con el tampón correspondiente 5 veces concentrado (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ y 10 mM DTT) (Promega Corporation, WI). ² dNTP: deoxinucleótidos trifosfato (Pharmacia). ³ Inhibidor de ribonucleasas RNasin® (Promega). ⁴ Para todos los genes analizados se utilizaron 300 ng de RNA total, excepto en el caso del componente C2 del complemento donde se retrotranscribieron 900 ng.

Al final de la reacción, los tubos se centrifugaban para recuperar todo el volumen en la base y luego se guardaban a -80°C hasta realizar la PCR.

En la Tabla 15 se muestran los genes que finalmente se pudieron estudiar mediante PCR a tiempo real, indicándose para cada uno de ellos los *primers* seleccionados para llevar a cabo la amplificación.

Los *primers* se diseñaron con el programa Primer3 (desarrollado por Steve Rozen y Helen J. Skaletsky en el Whitehead Institute y Howard Hughes Medical Institute), tras introducir la secuencia contenida en el *array*. La expresión de todos estos genes se referenció respecto a la expresión de ciclofilina, un gen considerado como *housekeeping* (Mahony et al., 1998).

Tabla 15. *Primers* y tamaño del fragmento amplificado para cada uno de los genes analizados.

Gen	<i>primers</i> :	Fragmento amplificado
Ciclofilina	5'-CTC CTT TGA GCT GTT TGC AG-3' 5'-CAC CAC ATG CTT GCC ATC C-3'	325 pb
Integrina β 1	5'-AGC AGT AAT GCA AGG CCA AT-3' 5'-GTC CCA ACC TGA TCC TGT GT-3'	207 pb
Apolipoproteína D	5'-AAA GCT CCA GGT CCC TTC TC-3' 5'-CAG CGT CCA TTC TCA AAG GT-3'	220 pb
Proteína G*	5'-GGT GCT GAA ATC AAC CCA CT-3' 5'-TGG CCC AAG TTC CTT AGT TG-3'	263 pb
Heat shock 70Kd proteína 1	5'-CCG AGA AGG ACG AGT TTG AG-3' 5'-GCA GCA AAG TCC TTG AGT CC-3'	232 pb
Componente C2 del complemento	5'-GTC AAG TCA ACC AGG GAA GG-3' 5'-GCC CCT CCA TCT TCT ACC TC-3'	205 pb

* Probable G protein- coupled receptor LCR1 homolog.

3.3.6.2 Puesta a punto de las PCRs y comprobación de los fragmentos amplificados.

Mediante PCR convencional se pusieron a punto las condiciones de amplificación para cada uno de los *primers*. Los fragmentos amplificados se resolvieron en geles de poliacrilamida no desnaturizantes (Ver apartado 3.1.3.1 Material y métodos) para comprobar que correspondía en cada caso al tamaño esperado según los *primers* utilizados.

3.3.6.3 PCR a tiempo real

Una vez puesta a punto la PCR convencional, se optimizaron las condiciones para llevar a cabo la amplificación mediante PCR cuantitativa, modificando las concentraciones de cloruro

de magnesio, así como los tiempos y temperaturas de cada una de las etapas. A continuación se indica la mezcla de reacción utilizada para cada uno de los genes analizados (Tabla 16).

Tabla 16. Mezcla de reacción utilizada para cada uno de los *primers*.

	Ciclofilina	Integrina $\beta 1$	Apolipoproteína D	Proteína G	Heat shock 70 kDa	C2 Complemento
H₂O	12,2 μ l	13,6 μ l	13,8 μ l	13,8 μ l	14,4 μ l	13,6 μ l
MgCl₂ ¹	3,2 μ l	1,6 μ l	1,6 μ l	1,6 μ l	0,8 μ l	1,6 μ l
<i>primer up</i>, 100 μM	0,3 μ l *	0,4 μ l	0,3 μ l	0,3 μ l	0,4 μ l	0,4 μ l
<i>primer down</i>, 100 μM	0,3 μ l *	0,4 μ l	0,3 μ l	0,3 μ l	0,4 μ l	0,4 μ l
Lightcycler FastStart DNA Master SYBR Green I mix	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
RT	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l

¹ Stock solution 25 mM (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). * *stock* a 10 μ M.

En las Tablas 17 y 18 se indican las condiciones de amplificación utilizadas para cada uno de los genes estudiados. Cada reacción consiste en una desnaturalización inicial de 10 min, seguida de entre 40-50 ciclos de amplificación, que variaba en función del gen. El producto fluorescente se detectó en el último paso de cada ciclo mediante una única adquisición. Tras la fase de amplificación se hizo una curva de *melting*, para determinar la especificidad de los productos de PCR. La amplificación con cada uno de los *primers* se hizo en todos los casos por duplicado.

3.3.6.4 Determinación de los cambios de expresión.

La valoración de los resultados obtenidos se hizo mediante el *software* Lightcycler versión 3.5. Este programa permite restar el *background* para obtener el valor en el que se inicia la amplificación con cada uno de los *primers* utilizados (*crossing point*).

Para cada amplificación se calculó la media de los duplicados. El valor promedio del *crossing point* obtenido para cada uno de los genes analizados se referenció respecto al valor obtenido mediante la amplificación con el gen de la ciclofilina (*housekeeping*).

Tabla 17. Condiciones de amplificación utilizadas.

Ciclofilina	Integrina β1	Apolipoproteína D
10 min a 95°C	10 min a 95°C	10 min a 95°C
0 sec a 95°C 13 sec a 55 °C 8 sec a 72°C	0 sec a 95°C 10 sec a 65°C 8 sec a 72°C	2 sec a 95°C 10 sec a 60°C 9 sec a 72°C 2 sec a 85 °C
	40 ciclos	45 ciclos
5 sec a 95°C	5 sec a 95°C	5 sec a 95°C
25 sec a 65°C	25 sec a 65°C	25 sec a 65°C
0 sec a 90°C	0 sec a 90	0 sec a 96°C
20 sec a 40°C	20 sec a 40	20 sec a 40°C

Tabla 18. Condiciones de amplificación utilizadas.

Proteína G	Heat shock 70 kDa	C2 complemento
10 min a 95°C	10 min a 95°C	10 min a 95°C
3 sec a 95°C 10 sec a 60°C 11 sec a 72°C 2 sec a 82 °C	2 sec a 95°C 10 sec a 68°C 10 sec a 72°C	4 sec a 95°C 8 sec a 63°C 9 sec a 72°C 2 sec a 88°C
	45 ciclos	45 ciclos
5 sec a 95°C	5 sec a 95°C	5 sec a 95°C
25 sec a 70°C	25 sec a 73°C	25 sec a 68°C
0 sec a 90°C	0 sec a 95	0 sec a 98°C
20 sec a 40°C	20 sec a 40	20 sec a 40°C

IV. Resultados

4.1 Asociación entre el *status* de apoptosis tumoral y la presencia de inestabilidad de microsatélites en carcinomas ductales infiltrantes de mama.

4.1.1 Determinación de inestabilidad de microsatélites en los tumores: asociación con la pérdida de apoptosis y las características clínico-patológicas.

La existencia de inestabilidad de microsatélites (MI) se determinó comparando el DNA normal y el DNA tumoral procedente de 86 pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama. Se analizaron mediante PCR 5 secuencias de microsatélites (SIT2, Bat26, D4S2948, D21S1235 y D21S415), y se consideró que una muestra tenía inestabilidad cuando presentaba alteraciones en la movilidad electroforética de las bandas de DNA, con al menos 2 de los 5 microsatélites estudiados (40% de los marcadores analizados).

Según este criterio, se encontró que un 11,6% (10/86) de los tumores presentaban alteraciones ya fueran en forma de deleciones o de expansiones de la secuencia analizada. En la Figura 12 se muestran algunos ejemplos de tumores en los que se observó MI.

Todas las alteraciones detectadas afectaban exclusivamente a las secuencias de dinucleótidos estudiadas (D2S2948, D21S1235 y D21S415). De los 11 tumores con MI dos presentaban modificaciones electroforéticas en los 3 dinucleótidos analizados, mientras que en los 8 tumores restantes se evidenciaban alteraciones en dos de las tres secuencias dinucleotídicas. En todos los casos existían alteraciones como mínimo en dos de los marcadores.

Ninguna de las muestras analizadas presentó alteraciones en las secuencias de mononucleótidos estudiadas (SIT2 y Bat26).

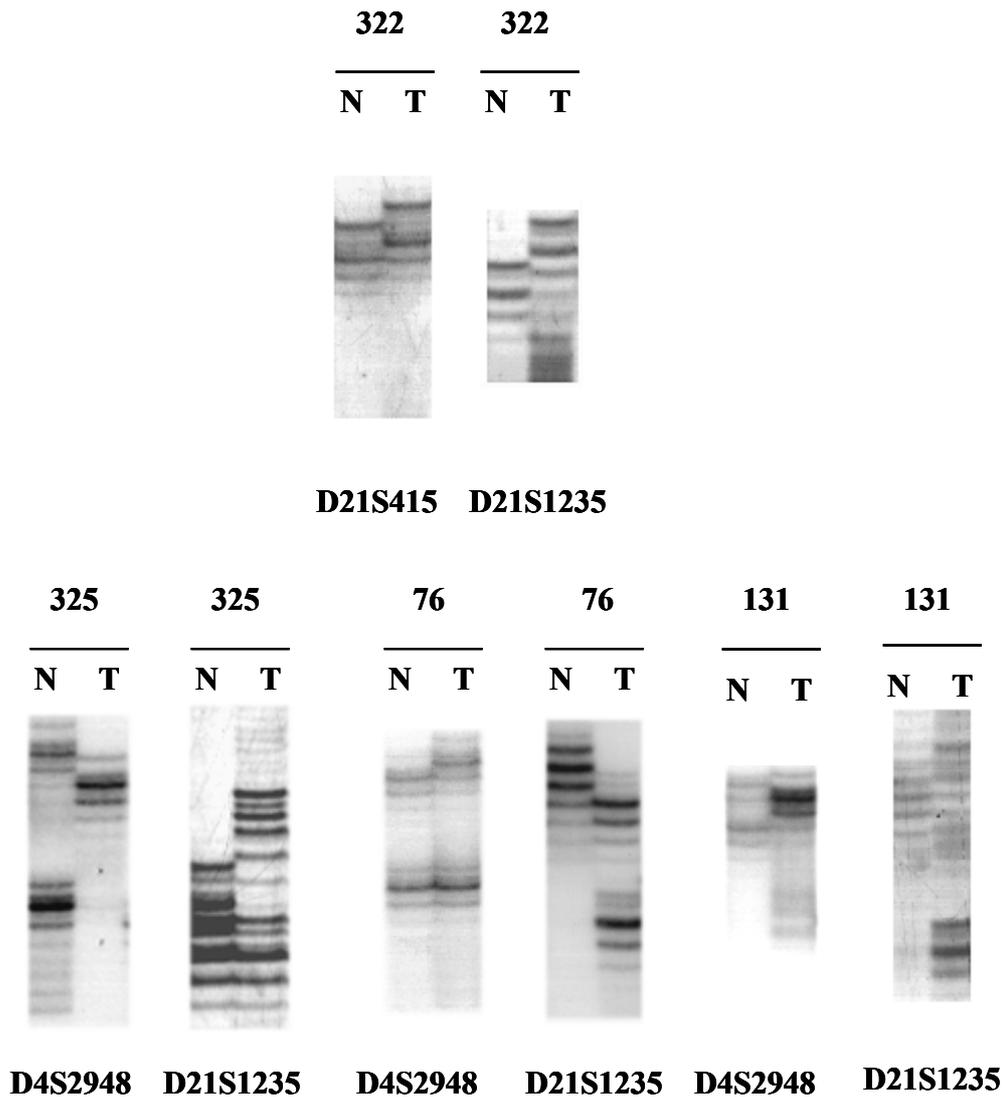


Figura 12. Ejemplos de tumores de mama con inestabilidad de microsatélites. En cada caso se compara el patrón de bandas del tejido normal (N) con el del tejido tumoral (T) de la misma paciente. La inestabilidad se asoció a la aparición de bandas suplementarias en el tejido tumoral con respecto al tejido normal con al menos dos de los marcadores utilizados.

En el grupo de tumores estudiados se había determinado previamente el **status de apoptosis del tumor**, analizando *in situ* el número de células apoptóticas y la expresión de algunas proteínas que intervienen en este tipo de muerte celular, como Bax, Bcl-2, Bcl-x_L y p53. Tal y como se muestra en la Figura 13, se detectó pérdida de apoptosis en un 80% (8/10) de los tumores con inestabilidad de microsatélites (MI⁺), frente a un 17,8% (8/45) de tumores con pérdida de apoptosis en el grupo que no presentaba este tipo de inestabilidad (MI⁻). Siendo estas diferencias estadísticamente significativas (χ^2 test, p = 0,0004).

La pérdida de apoptosis se asoció a una sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-x_L en un 75% de los casos (6/8). Sin embargo, las diferencias de expresión de Bcl-2 y Bcl-x_L entre tumores MI⁺ y MI⁻ no fueron estadísticamente significativas.

Tampoco se observó una correlación entre la expresión de la proteína proapoptótica Bax y la presencia o ausencia de MI. Un 70% de los tumores MI⁺ presentaban una menor expresión de Bax, una cifra similar a la obtenida en los carcinomas MI⁻ (82,2%). La expresión de p53 también fue similar entre tumores MI⁺ y MI⁻.

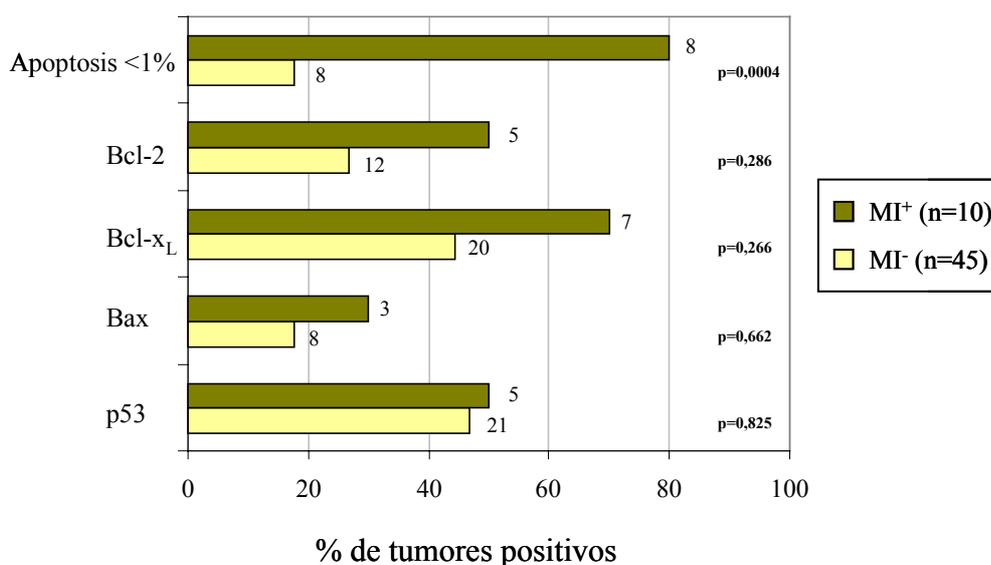


Figura 13. Asociación entre el *status* de apoptosis y la presencia de inestabilidad de microsatélites (MI⁺) en carcinomas ductales infiltrantes de mama. Se representa el porcentaje de tumores MI⁺ y MI⁻ en relación con el número de células apoptóticas y con la expresión de proteínas reguladoras de apoptosis (Bcl-2, Bcl-x_L, Bax y p53).

También se analizó la asociación de algunos **parámetros clínico-patológicos** de valor pronóstico, como la edad, el *status* hormonal, el grado histológico, el tamaño del tumor y la presencia de metástasis ganglionares, con la existencia o no de inestabilidad de microsatélites en los tumores (Tabla 19).

La afectación ganglionar de las pacientes en el momento del diagnóstico (N₁) no difirió significativamente entre tumores MI⁺, un 60% (6/10), y tumores MI⁻ un 39,5% (30/76), (χ^2 test, p = 0,31). La distribución del estado hormonal (χ^2 , p = 0,44), el grado histológico (χ^2 , p = 0,92) y el tamaño del tumor (χ^2 , p = 0,52), así como, la edad de las pacientes (χ^2 , p = 1,00), fue similar en ambos grupos.

Tabla 19. Distribución de las características clínico-patológicas de pacientes con tumores de mama MI⁺ y MI⁻. Para cada una de las variables se indica la significación estadística obtenida al comparar los dos grupos analizados.

	MI+ n(%)	MI- n(%)	Pacientes analizadas	χ^2 TEST
EDAD				
≤50	3(30)	19(25)	22	
>50	7(70)	57(75)	64	p=1,00
STATUS HORMONAL				
premenopausia	4(40)	18(23,7)	22	
postmenopausia	6(60)	58(76,3)	64	p=0,44
GRADO HISTOLÓGICO				
G1	1(10)	5(6,6)	6	
G2	5(50)	38(50)	43	
G3	4(40)	33(43,4)	37	p=0,92
TAMAÑO DEL TUMOR				
T1 (≤2cm.)	4(40)	40(52,6)	44	
T2 (<5cm.)	6(60)	36(47,4)	42	p=0,52
NODULOS LINFÁTICOS				
N ⁻	4(40)	45(60,5)	50	
N ⁺	6(60)	30(39,5)	36	p=0,31

4.1.2 Análisis de mutaciones en el tercer exón del gen *bax* y expresión de la proteína Bax.

Puesto que se habían descrito mutaciones del gen *bax* en carcinomas de colon MI⁺, quisimos analizar si estas mutaciones podían ser la causa de la pérdida de apoptosis que observamos en los carcinomas de mama con este tipo de inestabilidad.

Tras poner a punto las condiciones de PCR, se analizó la existencia de mutaciones en el gen *bax* en una región de 8 deoxiguanosinas consecutivas situadas en el tercer exón.

Los análisis se hicieron a partir de DNA procedente de 105 tumores ductales infiltrantes de mama, amplificando una región de 94 pb que contiene la secuencia repetitiva. Como control positivo de la mutación se utilizó DNA de la línea de cáncer colorrectal LoVo, que contiene tanto una inserción como una deleción de la secuencia de interés.

Ninguna de las muestras analizadas presentaba alteraciones en la región de 8 deoxiguanosinas que se estaba amplificando, tal y como se muestra en la Figura 14.

LOVO 69 76 131 285 322 313 354 392

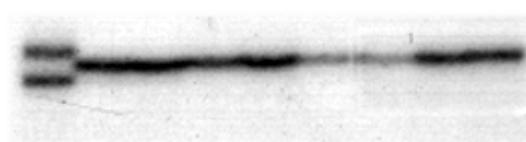


Figura 14. Análisis de la existencia de mutaciones *frameshift* en el tercer exón del gen *bax*. Los productos de PCR obtenidos no evidenciaron alteraciones en las muestras de cáncer de mama estudiadas. Como control positivo se utilizó la línea celular de cáncer colorrectal LoVo, que contiene tanto una inserción como una deleción de la secuencia (G)₈ analizada.

Aunque no se detectaron mutaciones en la región del gen *bax* estudiada, y los estudios de IHQ no habían evidenciado diferencias entre los tumores MI⁺ y MI⁻, se corroboró la expresión de la proteína por western blot en los tumores MI⁺, observándose en algunos casos disminuciones en la expresión (Figura 15).

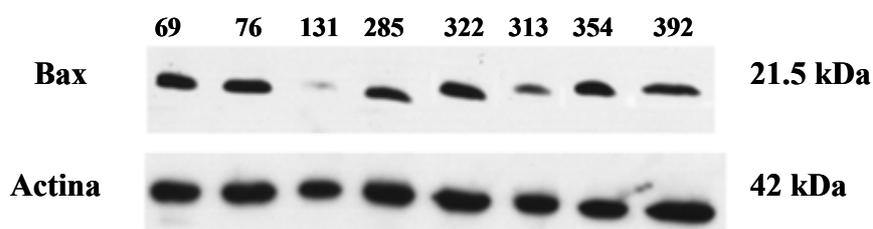


Figura 15. Análisis de la expresión de la proteína Bax en tumores MI⁺ mediante western blot. En cada caso se cargaron 50µg de proteína total y se utilizó la expresión de actina como control de carga proteica.

4.2 Influencia de la inhibición de la apoptosis sobre el acúmulo de alteraciones genéticas en células de cáncer de mama: *in vitro*, y en tumores y metástasis *in vivo*.

4.2.1 Descripción de las líneas celulares y de las variantes tumorales y metastáticas analizadas.

En la Figura 16 se muestra un esquema descriptivo de la procedencia de las líneas celulares obtenidas por transfección de las células MDA-MB 435 con un vector de expresión que contenía el gen Bcl-2 o Bcl-x_L humano, o bien sin inserto, así como de las variantes celulares que se obtuvieron de tumores primarios y de las metástasis que estas células originaron en distintos órganos.

Se estudiaron mediante AP-PCR un total de 30 líneas, entre las que se incluyen la línea parental MDA-MB 435/P, los transfectantes con los genes antiapoptóticos Bcl-2 (435/Bcl-2) y Bcl-x_L (435/Bcl-x_L C1 y 435/Bcl-x_L pool), y los transfectantes con neomicina (435/Neo). En el análisis también se incluyeron variantes celulares obtenidas de tumores de primera (Tumor1) y tercera (Tumor3) generación derivados de cada uno de los transfectantes, así como variantes metastáticas de estos tumores procedentes de distintos órganos. La nomenclatura que se utiliza para cada una de ellas hace referencia al transfectante del que derivan, el órgano de procedencia y la generación en que se obtuvieron. Así por ejemplo, la línea 435/Bcl-x_L C1_{Node3} hace referencia a una variante metastática derivada de la línea 435/Bcl-x_L C1, obtenida en ganglios linfáticos tras el tercer implante ortotópico. También se incluyeron variantes celulares, tanto tumorales como metastáticas, derivadas de una metástasis anterior, en este caso el nombre indica el órgano de origen de la primera metástasis y si la línea derivada en segundo lugar es un tumor (435/Bcl-x_L C1_{Node1Tumor2}) o una metástasis (435/Bcl-x_L C1_{Lung1Nodeback2})

Antes de iniciar los experimentos de AP-PCR, se comprobó mediante western blot la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L en las líneas transfectadas y en las variantes celulares obtenidas tras los diferentes implantes en el animal de experimentación (Figura 17), pudiendo verse que la sobreexpresión, tanto de Bcl-2 como de Bcl-x_L, se mantenía con el paso de las generaciones.

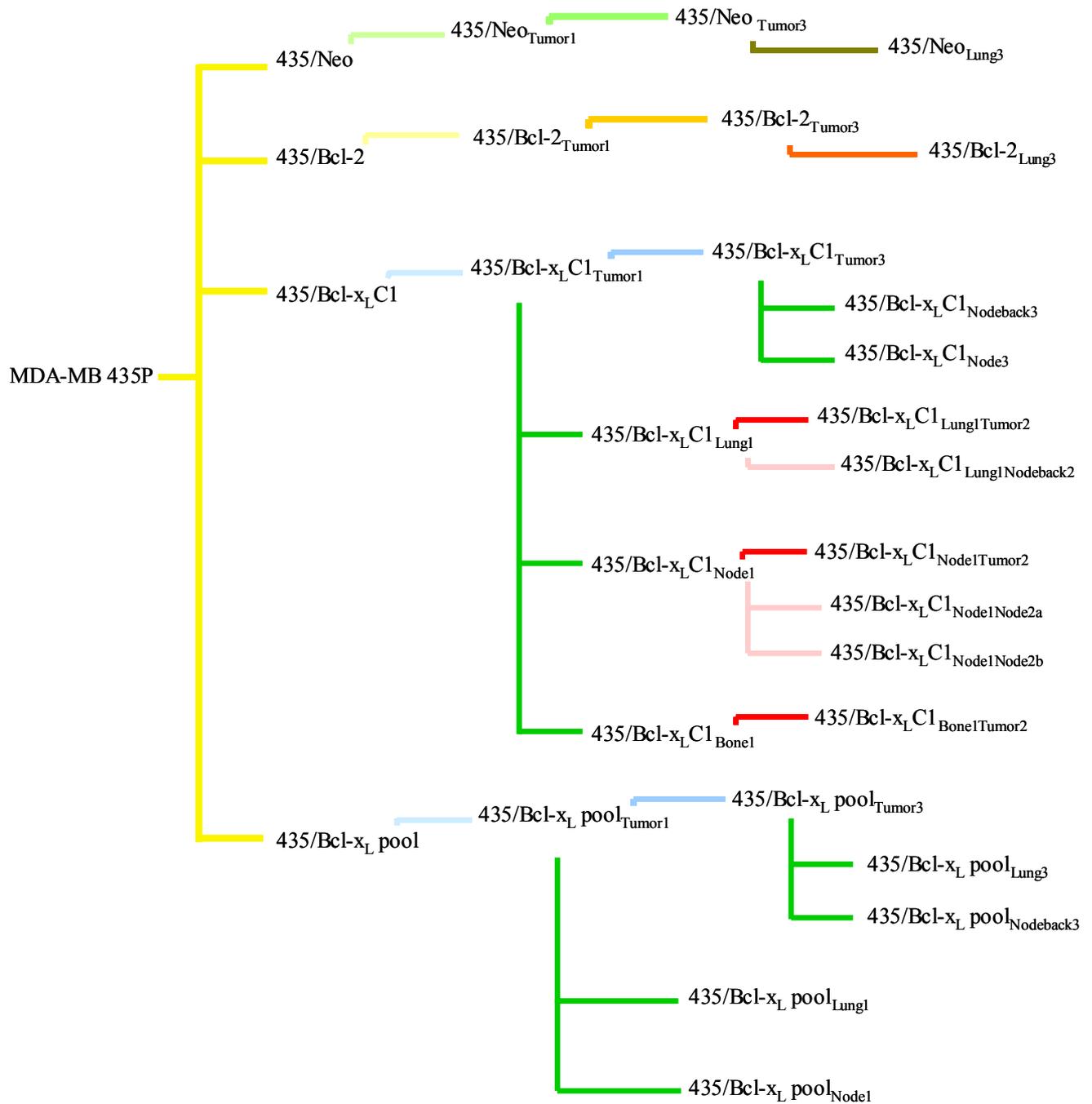


Figura 16. Esquema ilustrativo de las diferentes líneas celulares analizadas mediante AP-PCR. Las líneas de conexión entre ellas indican procedencia, conectando cada una de las variantes celulares con su antecesora. La gradación de colores hace referencia al proceso de selección seguido.

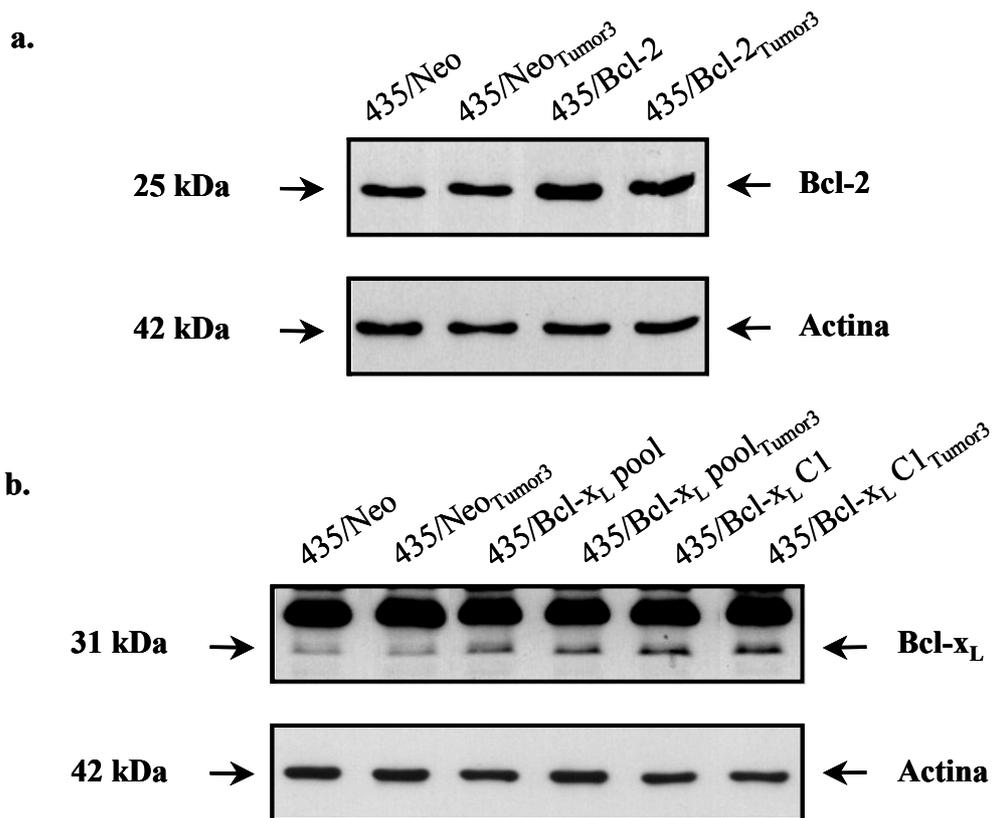


Figura 17. Comprobación mediante western blot de la expresión de Bcl-2 (a.) y Bcl-x_L (b.) en las líneas transfectadas y en variantes tumorales derivadas de los sucesivos implantes *in vivo/in vitro* en el animal de experimentación. Se cargaron 50µg de proteína total, y se analizó la expresión de Bcl-2 y Bcl-x_L en los transfectantes 435/Neo, 435/Bcl-2, 435/Bcl-x_L pool, 435/Bcl-x_L C1, y en las líneas celulares procedentes de los respectivos tumores de la tercera generación. En ambos casos se utilizó la expresión de actina como control de carga proteica.

4.2.2 Análisis del daño genómico mediante AP-PCR.

4.2.2.1 Determinación del límite de cambio de la técnica.

Dado que en función de los *primers* utilizados existe un cierto grado de variabilidad, se llevaron a cabo experimentos de reproducibilidad intraensayo para determinar el límite de cambio o límite de variabilidad de la técnica (Ver apartado 3.2.5 del Material y métodos).

En la Figura 18 se representa la relación entre la intensidad media y la desviación estándar (S.D.) del total de bandas analizadas en las réplicas de cuatro muestras, observándose una ligera tendencia a que las bandas de más intensidad muestren una mayor desviación estándar. Por eso se consideró el límite de cambio como una recta proporcional a la intensidad de las

bandas. Tomando como referencia la recta de regresión, el **límite de cambio** de la técnica es la recta paralela por debajo de la cual están el 99% de los puntos. Para considerar real el cambio de intensidad de una banda en una variante celular determinada con respecto a su línea de origen, es necesario que al extrapolar su valor en la recta definida por el experimento de reproducibilidad, la diferencia de intensidad este por encima del límite de cambio determinado por la recta. De esta forma podremos considerar como reales cambios con un 1% de probabilidad de error. Es decir, todas las diferencias de intensidad por debajo de ese límite tendrán un 99% de probabilidad de ser producto de variaciones propias de la técnica.

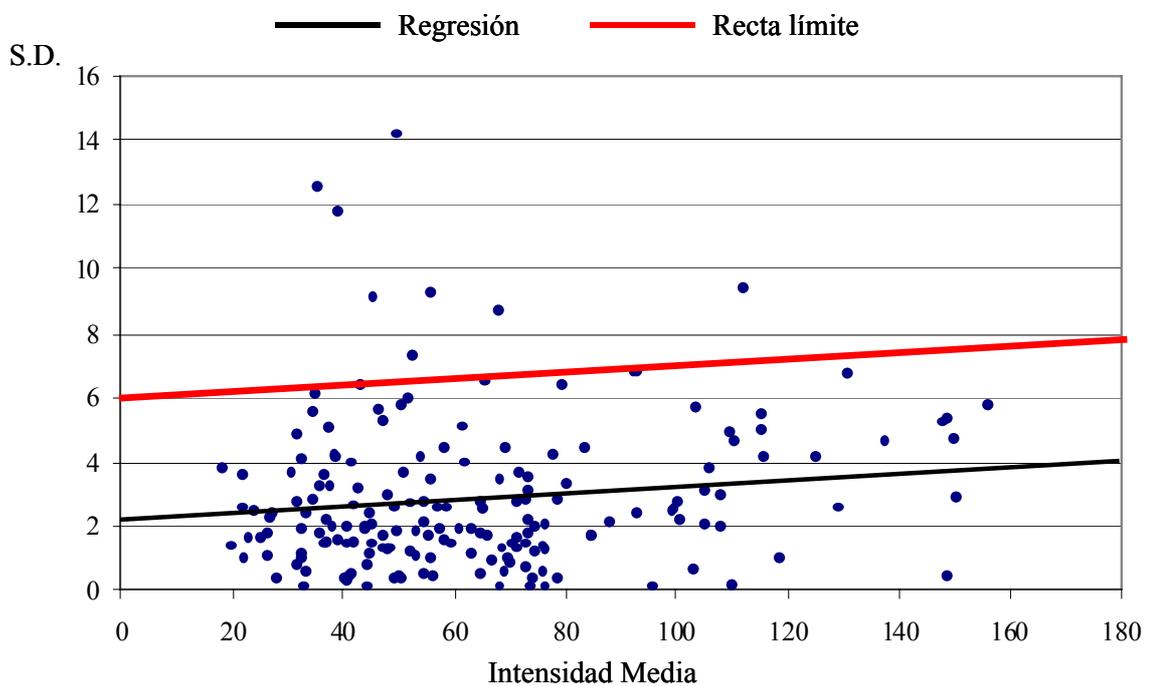


Figura 18. En la figura se representa la recta que define el límite de cambio de la técnica de AP-PCR. Esta recta se obtuvo tras analizar 45 bandas amplificadas con el *primer* Ocean en 4 muestras independientes, y establecer la relación entre la desviación estándar y la intensidad media de las mismas. Cualquier cambio de intensidad inferior al límite establecido podría ser el resultado de la variabilidad técnica. Por lo tanto, sólo se consideraron aquellos cambios superiores a este límite.

4.2.2.2 Análisis de los patrones de bandas.

El número total de bandas analizadas por AP-PCR fue de 175: 45 fueron amplificadas con los *primers* Ocean y D12S77, 39 con el pU6 y 46 con el *primer* Blue.

En la Figura 19 se muestra un ejemplo de los patrones de bandas obtenidos y de la aplicación del límite de cambio para determinar el número de alteraciones en cada una de las variantes celulares. El GDF se ha calculado comparando cada una de las variantes analizadas con respecto a una que se tomaba como referencia.

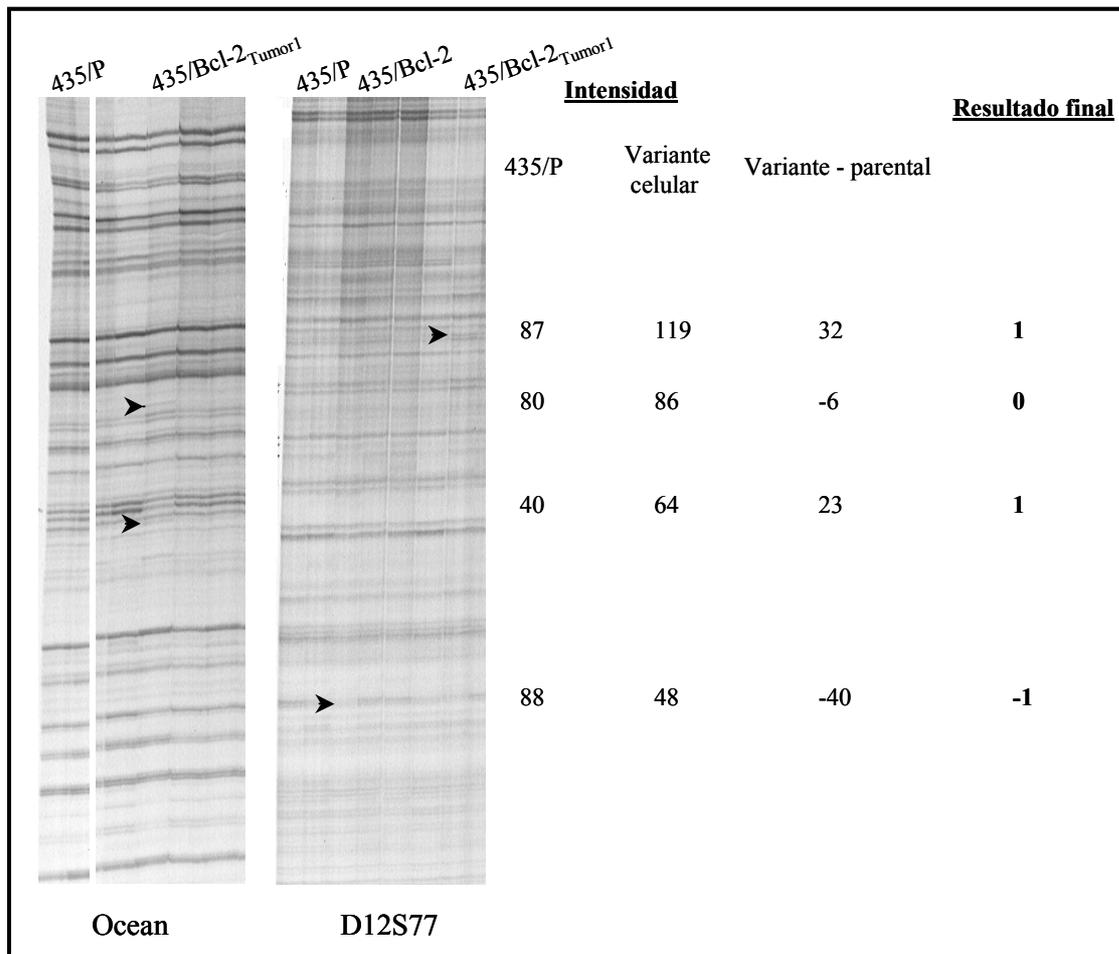


Figura 19. Patrones de AP-PCR obtenidos con los *primers* Ocean y D12S77. Para las bandas marcadas mediante una flecha se muestra su intensidad y el resultado final en forma de 1 (aumento de intensidad), -1 (pérdida de intensidad) y 0 (sin cambio), tras haber aplicado el límite de cambio de la técnica. Las bandas de cada una de las variantes celulares analizadas se comparan con relación a una que se toma como referencia. En el ejemplo de la figura, la intensidad de cada una de las bandas está comparada respecto a la línea parental 435/P.

4.2.3 Análisis global del daño genómico en el modelo experimental.

Una vez analizadas todas las líneas celulares mediante AP-PCR, se calculó el daño genómico de cada una de ellas en relación con la línea parental MDA-MB 435, de la que derivan todas en último término. Se observó como todas las variantes celulares analizadas presentaban diferencias en mayor o menor grado, tanto a nivel de ganancias (GF) como de pérdidas (LF) con respecto a la línea parental. La Figura 20 muestra la representación del GF y del LF para cada una de las muestras, sin que se puedan apreciar diferencias debidas a la sobreexpresión de genes antiapoptóticos (Bcl-2 o Bcl-x_L), la procedencia tumoral o metastática de las células el órgano de procedencia de las metástasis (pulmón, hueso y ganglios linfáticos) o la generación de las variantes en los sucesivos pases *in vivo/in vitro*.

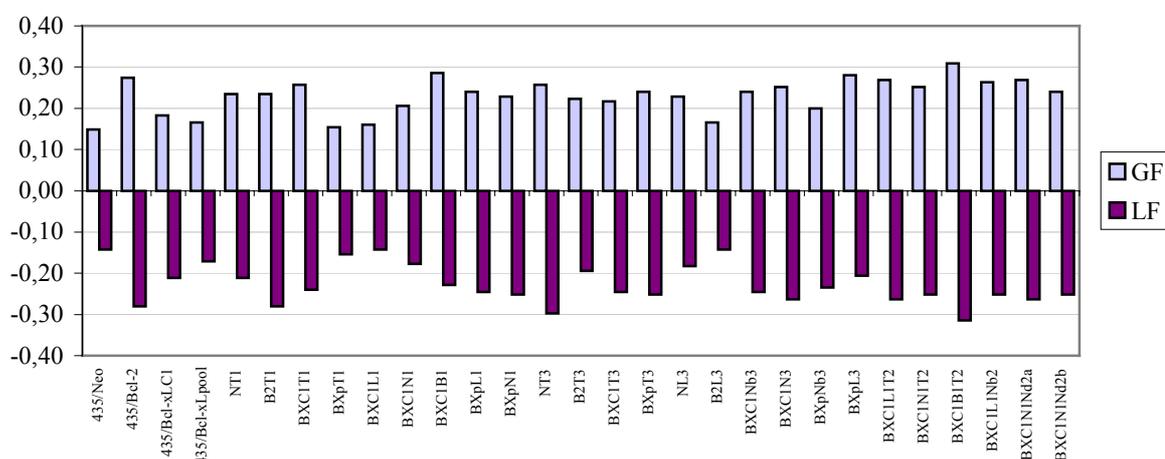


Figura 20 Representación del daño genómico, en forma de ganancias (GF) y pérdidas (LF) de intensidad de las bandas analizadas en las diferentes variantes celulares estudiadas, tomando como referencia la línea parental (435/P) de la que originariamente todas proceden.

Dada la dificultad de interpretar los resultados comparando todas las líneas con respecto a línea parental, se decidió agrupar las variantes celulares según su generación y compararlas respecto a la línea celular de procedencia inmediatamente anterior. Así, se compararon por un lado las líneas transfectadas respecto a la línea de origen 435/P y por otro lado las diferentes variantes celulares respecto al tumor de origen, en el caso de las derivadas de tumores ortotópicos y de metástasis originadas por el tumor; o comparando cada uno de los tumores con relación a la generación anterior.

De esta manera, el análisis del GDF nos permitió evaluar el número de alteraciones generadas en cada una de las líneas celulares como consecuencia de cada manipulación experimental: inhibición de apoptosis mediante la sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-x_L, inducción de tumores, inducción de metástasis y perpetuación de células en sucesivos pases *in vivo/in vitro*.

El análisis mediante AP-PCR permite estudiar las diferencias de las variantes que comparamos respecto a una línea que se toma como referencia, pero no da información acerca de las características de las variaciones que se detectan. Por ese motivo, para cada una de las líneas celulares se calcularon y dibujaron árboles de divergencia clonal, que proporcionan una estima del grado de heterogeneidad que hay entre las diferentes muestras, así como su distribución según los parentescos más probables deducidos por el programa.

Para analizar el grado de divergencia, se consideraron algoritmos que tenían en cuenta únicamente el número de cambios significativos, es decir, aquellos cambios superiores al límite de variabilidad de la técnica, independientemente de su magnitud. Las bandas sin cambio se identificaron con un "0", las ganancias con "+1" y las pérdidas con "-1". Estos datos se utilizaron para calcular los árboles de divergencia clonal, permitiendo complementar la información proporcionada por el GDF.

4.2.4 Daño genómico asociado a la sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L.

Al comparar el número de alteraciones en las líneas transfectadas respecto a la línea parental, las líneas transfectadas con genes antiapoptóticos: 435/Bcl-2 (GF=0,27 y LF=-0,28), 435/Bcl-x_L C1 (GF=0,18 y LF=-0,21) y 435/Bcl-x_L pool (GF=0,17, LF=-0,17), tenían un número de alteraciones mayor que las células control 435/Neo (GF=0,15 y LF=-0,14), tanto a nivel de ganancias como de pérdidas (Figura 21). Además, se observó que los transfectantes con el gen *bcl-2* presentaban más alteraciones que los transfectantes con *bcl-x_L*. Estas diferencias se mantenían de forma reiterada en las diferentes generaciones de variantes celulares analizadas.

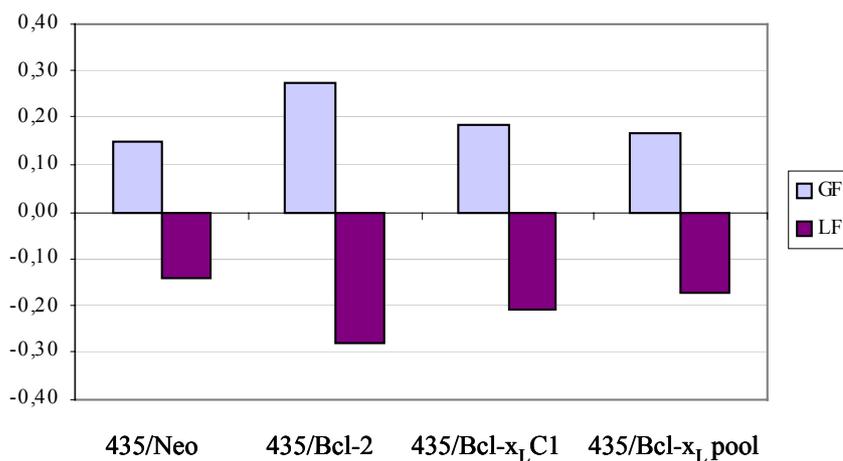


Figura 21 Representación gráfica del daño genómico (GF y LF) en las líneas transfectadas con el gen control (435/Neo) y con los dos genes antiapoptóticos Bcl-2 (435/Bcl-2) y Bcl-x_L (435/Bcl-x_L C1 y 435/Bcl-x_L pool), tomando como referencia la línea parental (435/P).

El árbol de divergencia permitió corroborar los resultados anteriores, al tiempo que aportaba información acerca del posible parentesco entre las líneas. Al analizar el árbol se podía ver que los transfectantes con genes antiapoptóticos tenían una distancia media respecto a la línea parental superior a los transfectantes con *neo*, siendo las alteraciones detectadas en la línea transfectada con *bcl-2* las que presentaban una mayor distancia con relación a la línea parental. Además, las líneas correspondientes a los transfectantes con *bcl-2* y *bcl-x_L* compartían un mismo origen, mientras que la línea transfectada con el gen control tenía un origen independiente (Figura 22).

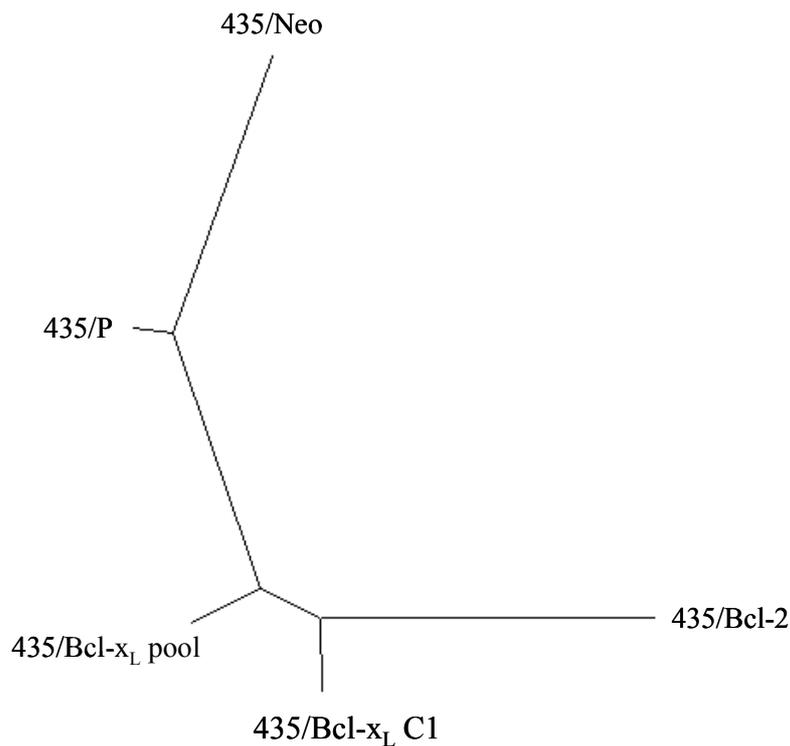


Figura 22. Árbol filogenético obtenido a partir de los resultados de AP-PCR, se muestran las relaciones que aparecen al comparar los diferentes transfectantes con respecto a la línea parental 435/P. La escala utilizada se indica en la parte superior.

4.2.5 Selección celular inducida por la inhibición del proceso apoptótico: efecto de la variabilidad genética sobre la tumorigénesis y la progresión metastática.

Con el propósito de ver si a lo largo del proceso de selección experimental al que se habían sometido las células, con los sucesivos pases *in vivo/in vitro*, se incrementaba el número de alteraciones, se compararon las variantes celulares obtenidas en cada generación con relación a las variantes de la generación anterior, tanto para tumores y metástasis obtenidos con los transfectantes (435/Bcl-2, 435/Bcl-x_L), como con los obtenidos con el control (435/Neo).

Por ese motivo se compararon los cambios genéticos de las variantes celulares derivadas de la tercera generación respecto a las derivadas de la primera generación, y los de las líneas derivadas de la primera generación respecto a los transfectantes. El análisis del acúmulo de alteraciones genéticas a lo largo de las diferentes generaciones se hizo de forma independiente para las líneas celulares procedentes de tumores y de metástasis.

4.2.5.1 Análisis del daño genómico en variantes tumorales.

Como se ha dicho anteriormente, los tumores de la tercera generación (435/Neo_{Tumor3}, 435/Bcl-2_{Tumor3}, 435/Bcl-x_L C1_{Tumor3} y 435/Bcl-x_L pool_{Tumor3}) se compararon tomando como referencia el correspondiente tumor de la primera generación (435/Neo_{Tumor1}, 435/Bcl-2_{Tumor1}, 435/Bcl-x_L C1_{Tumor1} y 435/Bcl-x_L pool_{Tumor1}), y los tumores derivados del primer implante se compararon respecto al transfectante (435/Neo, 435/Bcl-2, 435/Bcl-x_L C1 y 435/Bcl-x_L pool) del que se obtuvieron originariamente.

Al analizar el daño genómico, en forma de ganancias y pérdidas, en las variantes tumorales se observó como en líneas generales, independientemente del gen con el que estaban transfectadas, a medida que pasaban las generaciones el número de alteraciones aumentaba. Los tumores de la tercera generación tenían un número de alteraciones mayor que los tumores obtenidos en la primera generación (Figura 23): 435/Neo (435/Neo_{Tumor1} GF=0,20 y LF=-0,22; 435/Neo_{Tumor3} GF=0,28 y LF=-0,37) y 435/Bcl-x_L (435/Bcl-x_L C1_{Tumor1} GF=0,1 y LF=-0,07; 435/Bcl-x_L C1_{Tumor3} GF=0,12 y LF=-0,16 y 435/Bcl-x_L pool_{Tumor1} GF=0,11 y LF=-0,09; 435/Bcl-x_L pool_{Tumor3} GF=0,17 y LF=-0,19). Exceptuando el caso de los tumores 435/Bcl-2, donde el número de alteraciones se mantenía estable (435/Bcl-2_{Tumor1} GF=0,33 y LF=-0,23; 435/Bcl-2_{Tumor3} GF=0,27 y LF=-0,26).

Además, se seguía observando un comportamiento diferencial entre los transfectantes con los dos genes antiapoptóticos. Las variantes tumorales derivadas de la línea transfectada con *bcl-2* tenían un número de alteraciones mayor que las variantes tumorales derivadas de los transfectantes con *bcl-x_L*.

También es importante destacar que las variantes tumorales derivadas de la línea 435/Neo presentaban un número de alteraciones claramente superior a las variantes tumorales con sobreexpresión de genes antiapoptóticos.

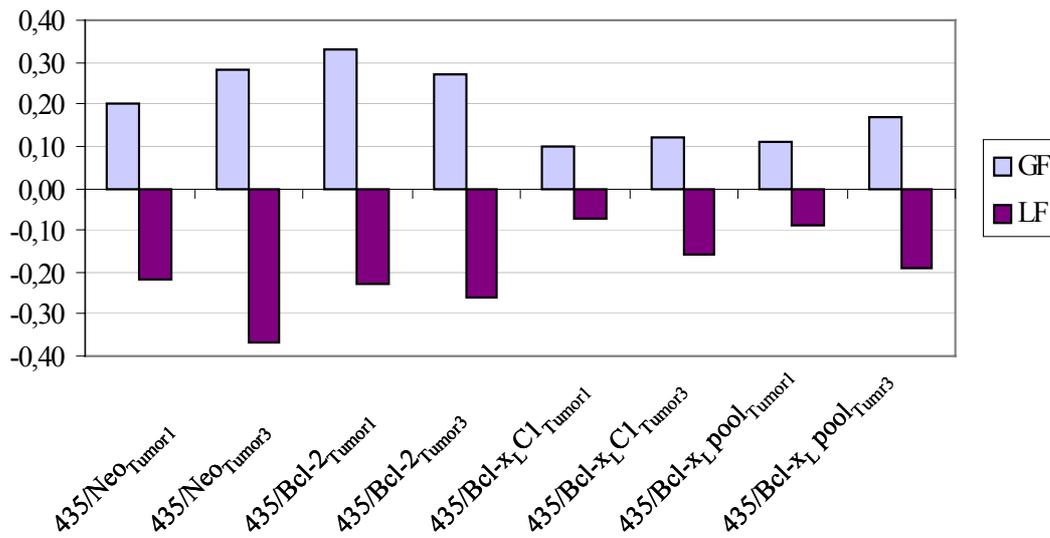


Figura 23. Representación del daño genómico (GF y LF) detectado en variantes tumorales de diferentes generaciones al ser comparadas respecto a una variante anterior. Así, los tumores derivados de la primera generación (Tumor1) de implantes se compararon *versus* la correspondiente línea transfectada, y los tumores de la tercera generación (Tumor3) *versus* los de la primera.

4.2.5.2 Análisis del daño genómico en variantes metastáticas.

Para estudiar si en las variantes metastáticas se había inducido un acúmulo de alteraciones con el paso de las generaciones, de una forma similar a la acontecida con los tumores, se analizaron las líneas celulares derivadas de metástasis pulmonares. Las comparaciones se hicieron respecto al tumor de su misma generación.

Los resultados obtenidos indican que en todas las metástasis pulmonares, había un aumento de alteraciones genéticas con respecto al tumor (435/NeO_{Lung3} GF=0,25 y LF=-0,22; 435/Bcl-2_{Lung3} GF=0,17 y LF=-0,14), y el número de alteraciones aumentaba a medida que avanzaba el proceso de selección (435/Bcl-x_L pool_{Lung1} GF=0,13 y LF=-0,09; 435/Bcl-x_L pool_{Lung3} GF=0,2 y LF=-0,11) (Figura 24).

También resulta interesante destacar que en este caso, al igual que sucedía con las variantes tumorales, la metástasis pulmonar derivada del transfectante con el gen control tenía un número de alteraciones mayor que las metástasis derivadas de los transfectantes con genes antiapoptóticos.

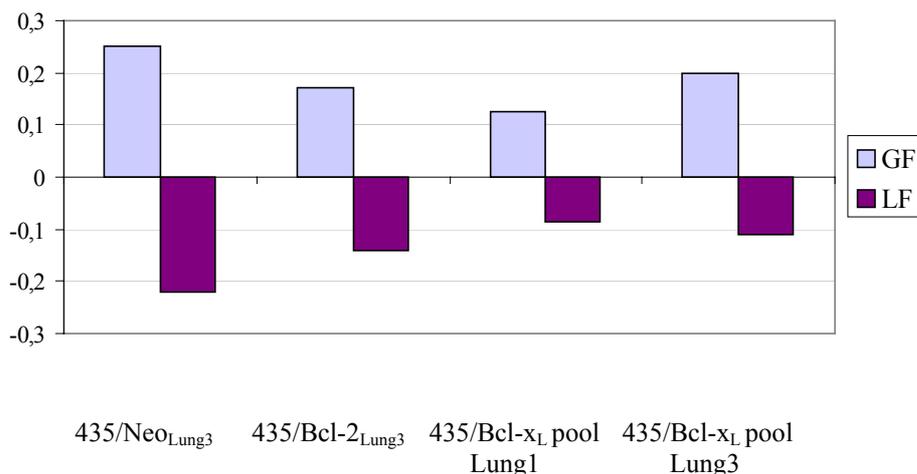


Figura 24. Representación del daño genómico (GF y LF) en variantes celulares derivadas de metástasis pulmonares obtenidas de los diferentes transfectantes, cada una de ellas está comparada en relación con su tumor de origen.

4.2.6 Relación entre daño genético y capacidad tumorigénica y metastática.

Con el fin de correlacionar el efecto que las alteraciones genéticas detectadas tienen sobre la capacidad tumorigénica y metastática de estas líneas celulares *in vivo*, los resultados de AP-PCR se evaluaron con respecto a la cuantificación del volumen tumoral y el número de metástasis de los ratones (Tesis Y. Fernández).

Capacidad tumorigénica.

La progresión de los tumores que sobreexpresaban proteínas antiapoptóticas y los tumores control, a partir de los cuales se derivaron las líneas analizadas por AP-PCR, era diferente. Independientemente de la generación, el volumen de los tumores 435/Neo era siempre inferior al de los tumores 435/Bcl-2 y 435/Bcl-x_L, aunque aumentaba progresivamente, y en paralelo, a lo largo de las generaciones. En todos los casos la aparición de los mismos tenía un periodo de latencia inferior.

El día de la exéresis, la media \pm error estándar de los tumores del primer implante expresado en mm³ fue de $89,83 \pm 4,98$ para los tumores 435/Bcl-2, $98,03 \pm 5,21$ para los 435/Bcl-x_L C1, $110,50 \pm 5,21$ para los 435/Bcl-x_L pool y $71,79 \pm 6,08$ para los 435/Neo. Siendo estas diferencias estadísticamente significativas (*Kruskal-Wallis*, $p=0,019$) (Figura 25 a).

En el tercer implante, el crecimiento de los tumores 435/Bcl-2 y 435/Bcl-x_L también fue ligeramente superior al de los tumores 435/Neo. La media \pm error estándar del volumen expresada en mm³ fue de 127,72 \pm 11,21 para los tumores 435/Bcl-2 T2, 166,87 \pm 9,51 para los 435/Bcl-x_L T2, 166,10 \pm 25,61 para los 435/Bcl-x_L pool T2 y 96,20 \pm 12,11 para los 435/Neo T2. Siendo estas diferencias estadísticamente significativas (*Kruskal-Wallis*, $p=0,027$) (Figura 25 b).

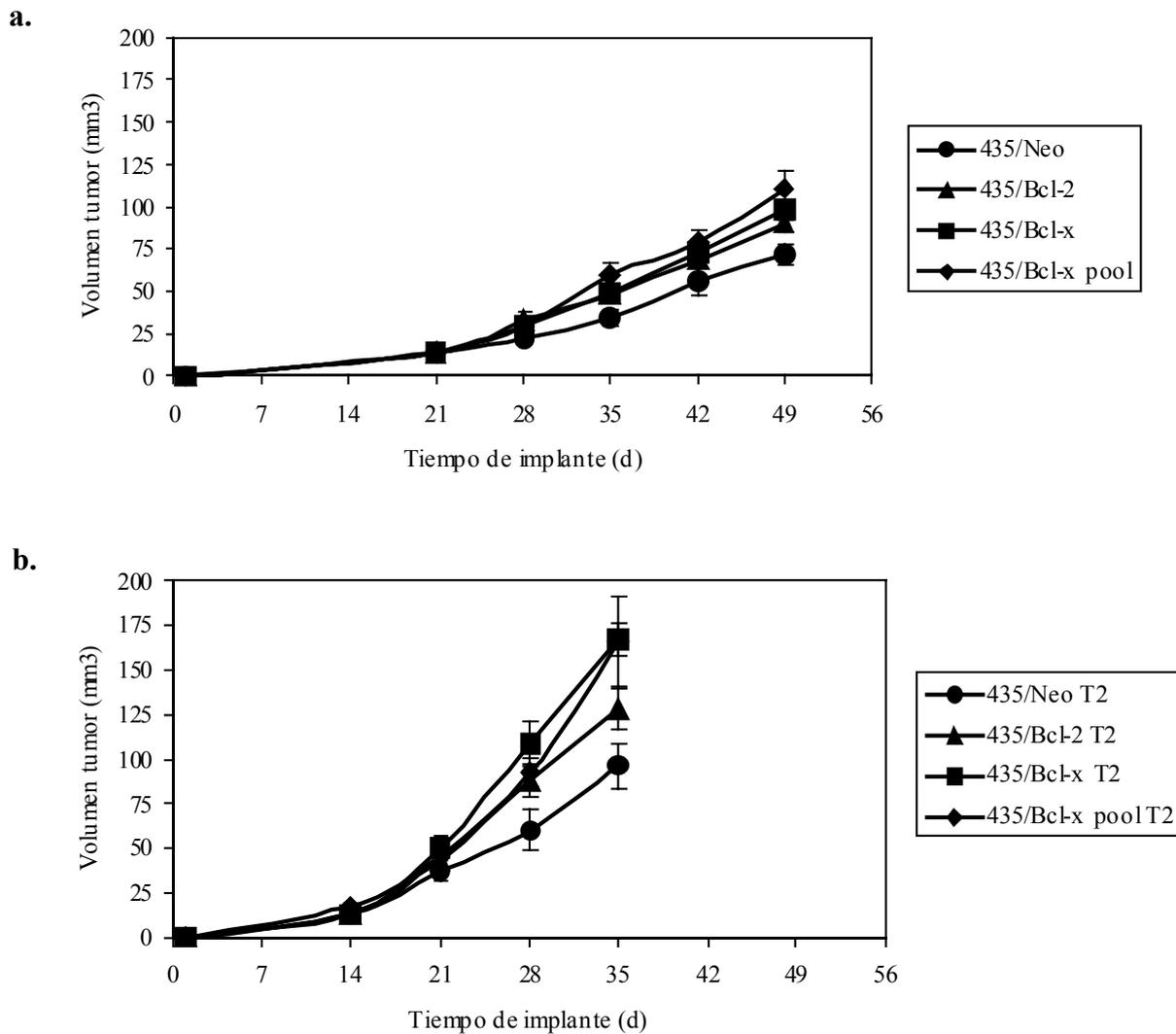


Figura 25. Capacidad tumorigénica de las líneas analizadas mediante AP-PCR. **a.** Seguimiento del crecimiento de los tumores tras el primer implante ortotópico en el animal de experimentación. **b.** Seguimiento del crecimiento de los tumores tras el tercer implante ortotópico. Los resultados indican la media del volumen del tumor \pm error estándar.

Capacidad metastática.

El número y el tamaño de las metástasis de los ratones con tumores 435/Bcl-2 y 435/Bcl-x_L, era superior al número de metástasis de los ratones con tumores 435/Neo. Estas diferencias aumentaban a lo largo de las generaciones (Figura 26).

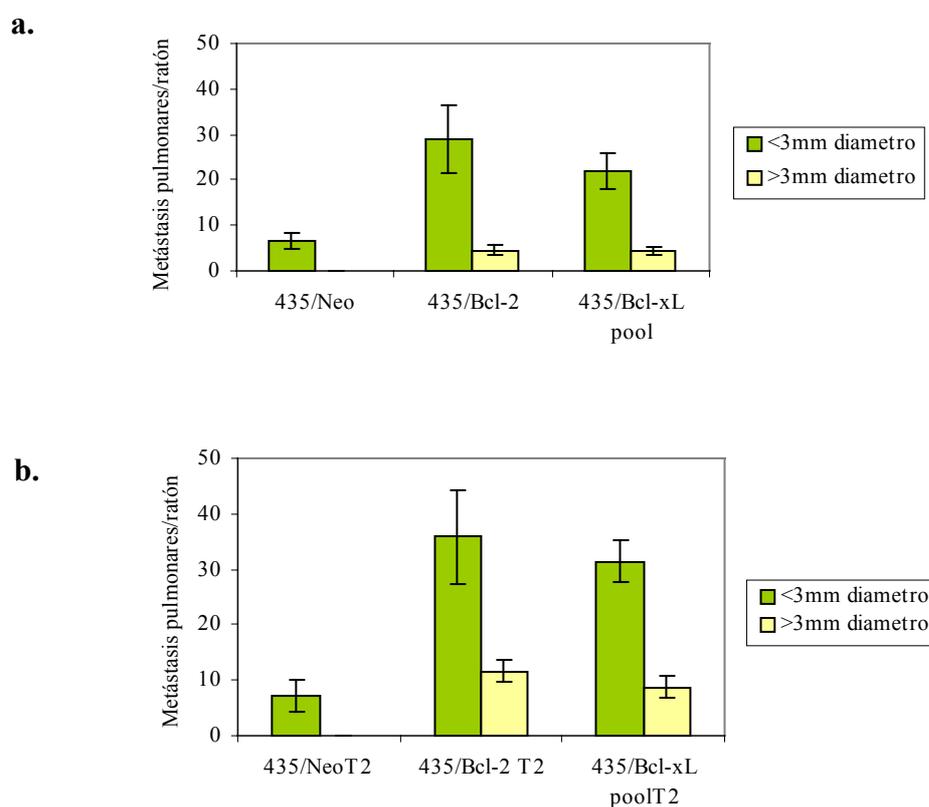


Figura 26. Incidencia de metástasis pulmonares obtenidas de tumores derivados de los transfectantes 435/Neo, 435/Bcl-2 y 435/Bcl-x_L pool tras el primer (a) y tercer (b) implante en el animal de experimentación. La gráfica muestra la media del número de metástasis pulmonares obtenidas en cada animal, separadas en ≤ 3 mm y > 3 mm.

La media \pm error estándar del número de metástasis pulmonares ≤ 3 mm y > 3 mm obtenidas tras el primer implante ortotópico de células fue de $29,00 \pm 7,56$ y $4,5 \pm 1,04$ para los tumores 435/Bcl-2, $22,00 \pm 3,85$ y $4,4 \pm 0,98$ para los 435/Bcl-x_L pool y $6,60 \pm 1,81$ para los 435/Neo, que no llegaron a formar metástasis > 3 mm. Siendo las diferencias en el número de metástasis por ratón estadísticamente significativas entre los grupos, tanto para metástasis ≤ 3 mm (*Kruskal-Wallis*, $p=0,025$) como en las > 3 mm (*Kruskal-Wallis*, $p=0,004$) (Figura 26 a).

La media \pm error estándar del número de metástasis pulmonares ≤ 3 mm y > 3 mm obtenidas tras el tercer implante ortotópico de células fue de $35,80 \pm 8,60$ y $11,60 \pm 1,96$ para los tumores 435/Bcl-2 T2, $31,4 \pm 3,80$ y $8,80 \pm 2,08$ para los 435/Bcl-x_L pool T2 y $7,25 \pm 2,87$ para los 435/Neo T2, que no indujeron metástasis > 3 mm. Siendo las diferencias en el número de metástasis por ratón estadísticamente significativas entre los grupos, tanto para metástasis ≤ 3 mm (*Kruskal-Wallis*, $p=0,004$) como en las > 3 mm (*Kruskal-Wallis*, $p=0,002$) (Figura 26 b).

4.2.7 Análisis del acúmulo de alteraciones en variantes metastáticas con diferente organoespecificidad.

La mayor ubicuidad de metástasis que originaban los tumores 435/Bcl-x_L hizo que ya en la primera generación, a partir de la línea 435/Bcl-x_L C1 y 435/Bcl-x_L pool se obtuvieran metástasis en pulmón, en hueso y en ganglios linfáticos: 435/Bcl-x_L C1_{Lung1}, 435/Bcl-x_L C1_{Bone1} y 435/Bcl-x_L C1_{Node1}, 435/Bcl-x_L pool_{Lung1} y 435/Bcl-x_L pool_{Node1}.

Se analizó la relación entre la localización de las metástasis y el número de alteraciones genéticas. El GDF de cada una de las variantes metastáticas, en relación con el tumor de su misma generación, puso de manifiesto que en función del órgano de origen el número de alteraciones era diferente (Figura 27). Así, las metástasis ganglionares derivadas de los 2 transfectantes con Bcl-x_L, tenían un GDF similar (435/Bcl-x_L C1_{Node1} GF=0,07 y LF=-0,08; 435/Bcl-x_L pool_{Node1} GF=0,06 y LF=-0,09), y menor que el de las metástasis pulmonares (435/Bcl-x_L C1_{Lung1} GF=0,13 y LF=-0,14; 435/Bcl-x_L pool_{Lung1} GF=0,13 y LF=-0,09).

En el caso de las metástasis óseas inducidas por los tumores 435/Bcl-x_L C1, se observó como el número de alteraciones era intermedio (435/Bcl-x_L C1_{Bone1} GF=0,09 y LF=-0,10) entre lo que sucedía en ganglio y en pulmón.

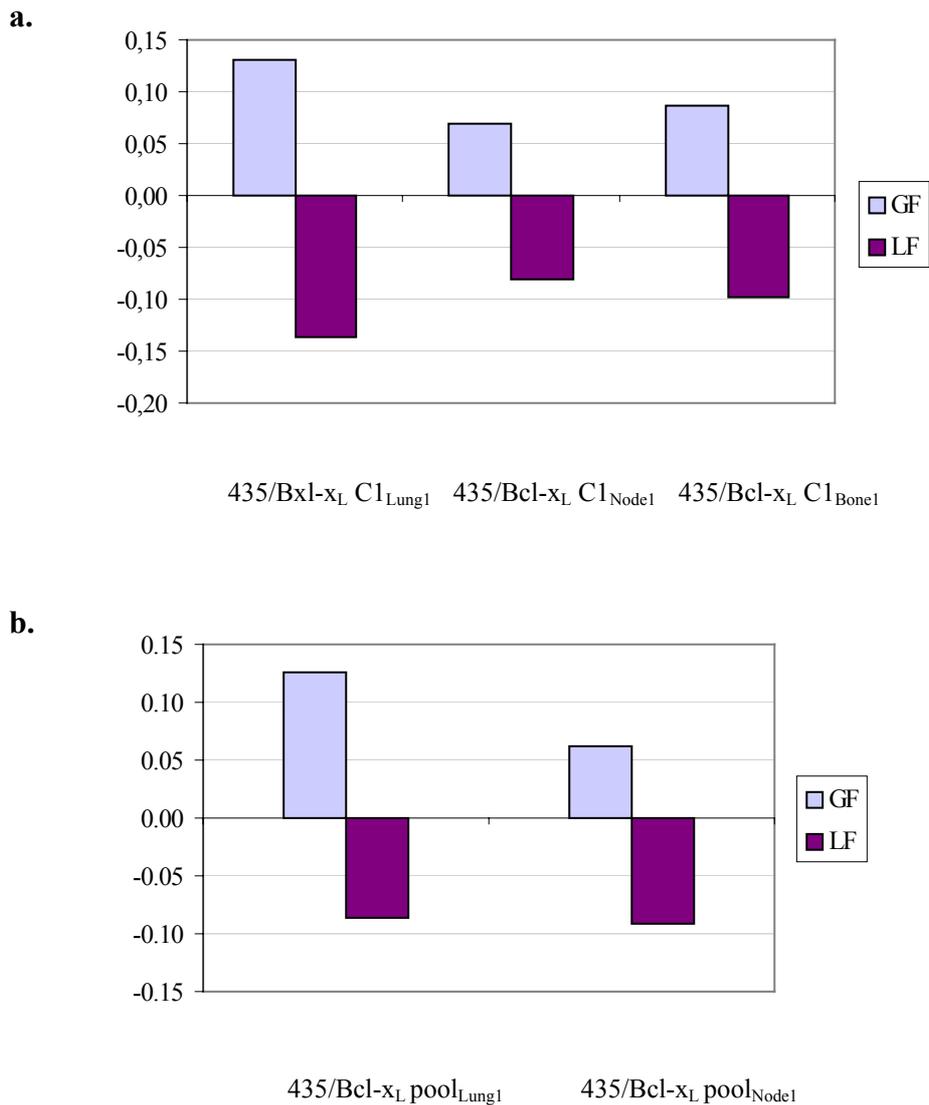


Figura 27. Análisis del daño genómico en variantes metastáticas con diferente organoespecificidad. **a.** GF y LF en metástasis pulmonar (435/Bcl-xL C1Lung1), ganglionar (435/Bcl-xL C1Node1) y ósea (435/Bcl-xL C1Bone1), comparadas respecto al tumor 435/Bcl-xL C1Tumor1. **b.** GF y LF en metástasis pulmonar (435/Bcl-xL poolLung1) y ganglionar (435/Bcl-xL poolNode1) comparadas respecto al tumor 435/Bcl-xL poolTumor1.

Los árboles filogenéticos permitieron analizar el grado de similitud de las alteraciones genéticas, poniéndose de manifiesto que las metástasis pulmonares y ganglionares eran en realidad las más parecidas entre sí, ya que compartían un mismo origen y además estaban más alejadas tanto en relación con el tumor como con la metástasis ósea (Figura 28).

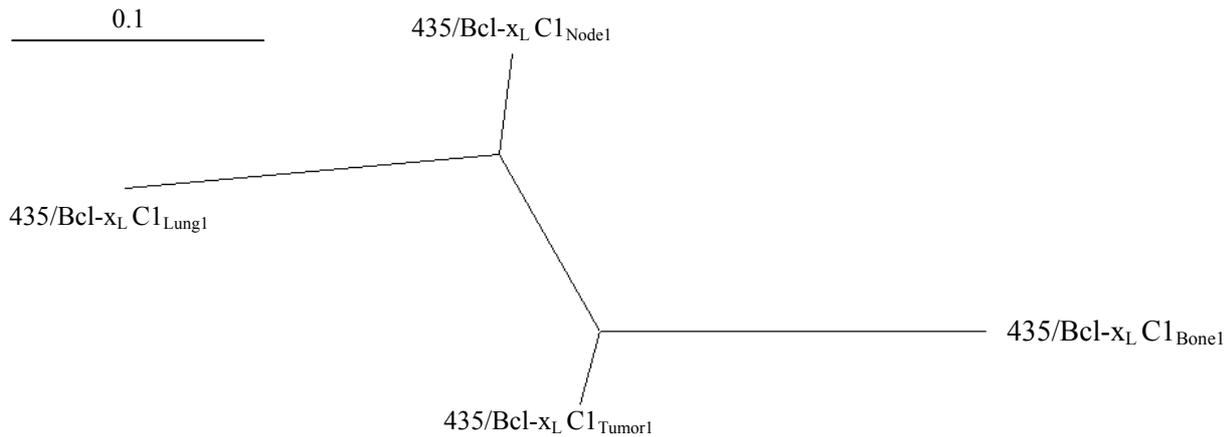


Figura 28. Árbol filogenético calculado a partir de los resultados de AP-PCR. Se muestran las relaciones obtenidas al comparar las variantes metastásicas procedentes de pulmón, hueso y ganglios en relación con el tumor (435/ Bcl-x_L C1_{Tumor1}). La escala utilizada se indica en la parte superior.

4.2.7.1 Selección de variantes metastásicas con diferente organoespecificidad.

Una vez visto que en función del órgano diana las metástasis presentaban mayor o menor variabilidad genética respecto al tumor de origen, se analizó si los cambios existentes en las diferentes generaciones de metástasis aumentaban y si se mantenía el grado de similitud entre ellas. Se utilizó en cada caso el tumor de la primera generación como punto de comparación. Se incluyeron las metástasis originadas por los tumores 435/Bcl-x_L C1 de la primera generación (435/Bcl-x_L C1_{Lung1}, 435/Bcl-x_L C1_{Node1} y 435/Bcl-x_L C1_{Bone1}), 4 metástasis ganglionares de segunda y tercera generación (435/Bcl-x_L C1_{Node3}, 435/Bcl-x_L C1_{Nodeback3}, 435/Bcl-x_L C1_{Node1nodedors2a} y 435/Bcl-x_L C1_{Node1nodedors2b}) y una metástasis pulmonar (435/Bcl-x_L C1_{Lung1Nodeback2}),

En la Figura 29 se representan el GF y el LF de cada una de estas variantes metastásicas y se observa como a lo largo del proceso de selección que se había seguido, la metástasis pulmonar presentaba un mayor número de alteraciones genéticas, una tendencia que aumentaba a medida que transcurrían las generaciones (435/Bcl-x_L C1_{Lung1} GF=0,13 y LF=-0,14; 435/Bcl-x_L C1_{Lung1Nodeback2} GF=0,20 y LF=-0,22).

Las metástasis ganglionares tenían un número de alteraciones menor al observado en las metástasis pulmonares, apreciándose como iba en aumento a lo largo de las sucesivas generaciones (435/Bcl-x_L C1_{Node1} GF=0,07 y LF=-0,08; 435/Bcl-x_L C1_{Node3} GF=0,09 y LF=-

0,11; 435/Bcl-x_L C1_{Nodeback3} GF=0,14 y LF=-0,17; 435/Bcl-x_L C1_{Node1nodedors2a} GF=0,13 y LF=-0,14; 435/Bcl-x_L C1_{Node1nodedors2b} GF=0,09 y LF=-0,10).

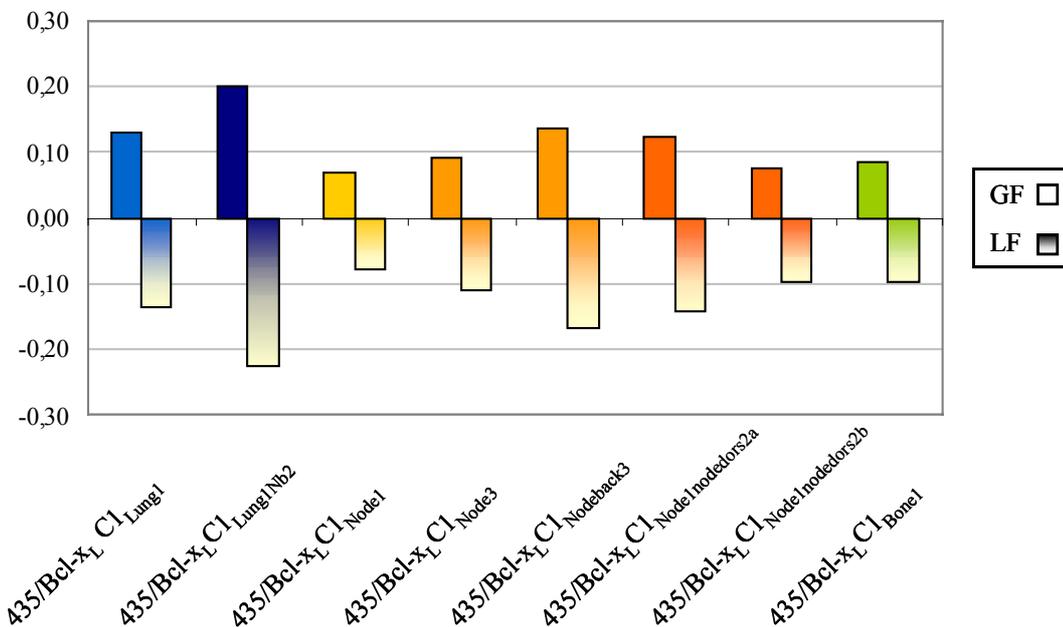


Figura 29. Representación gráfica del daño genómico en variantes metastáticas con diferente organoespecificidad derivadas de la línea 435/Bcl-x_L C1. En azul se muestran metástasis pulmonares, en naranja metástasis ganglionares y en verde la metástasis ósea. El incremento en la gradación de colores indica la progresiva selección de variantes a lo largo del proceso de progresión tumoral.

Aunque en este caso resultaba más difícil establecer un grado de parentesco, el árbol de divergencia clonal nos permitía ver la proximidad genética de las metástasis pulmonares y ganglionares en la distribución en la que estas aparecían (Figura 30).

Al realizar este tipo de análisis se incluyeron también los tumores de la primera (435/Bcl-x_L C1_{Tumor1}) y la tercera generación (435/Bcl-x_L C1_{Tumor3}), poniéndose de manifiesto en el árbol filogenético una mayor similitud entre ellos, al estar ubicados en una rama independiente con relación a las metástasis. En el caso de los tumores se observaba como, al igual que sucedía con las variantes metastáticas, la inestabilidad genética también aumentaba con el proceso de selección.

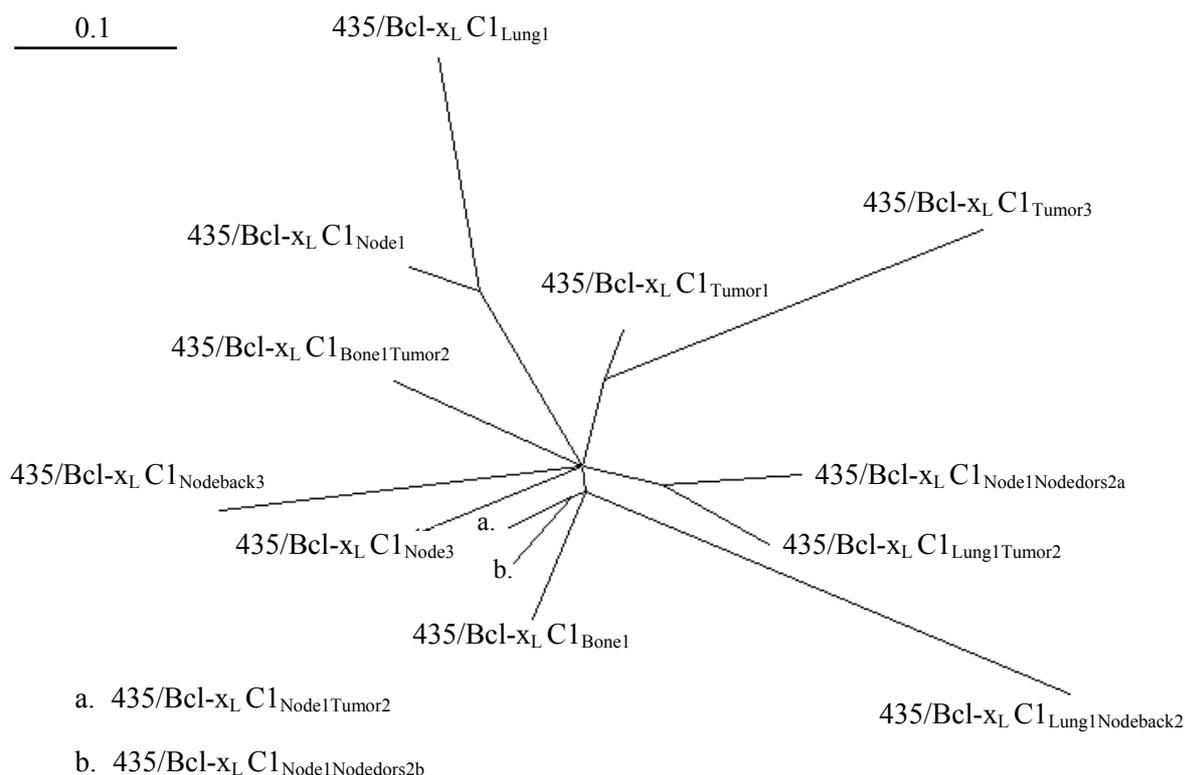


Figura 30. Árbol filogenético obtenido a partir de los resultados de AP-PCR, que muestra la relación existente entre variantes tumorales y metastáticas de diferente generación y con diferente organoespecificidad. Todas estas variantes derivan de la línea 435/Bcl-x_L C1. La escala utilizada se indica en la parte superior.

El análisis de las variantes metastáticas derivadas de la línea 435/Bcl-x_L pool coincidió con lo expuesto anteriormente. El número de alteraciones, tanto a nivel de ganancias como de pérdidas indicaba que a medida que avanzaba el proceso de selección aumentaba la inestabilidad genética, tanto en metástasis ganglionares como pulmonares, ya que independientemente del órgano de origen, las metástasis derivadas de la tercera generación tenían más alteraciones (435/Bcl-x_L pool_{Lung3} GF=0,25 y LF=-0,23; 435/Bcl-x_L pool_{Nodeback3} GF=0,18 y LF=-0,18) que las derivadas de la primera (435/Bcl-x_L pool_{Lung1} GF=0,13 y LF=-0,09; 435/Bcl-x_L pool_{Node1} GF=0,06 y LF=-0,09). Además, se seguía observando que las metástasis pulmonares presentaban un mayor número de alteraciones con relación al tumor (Figura 31).

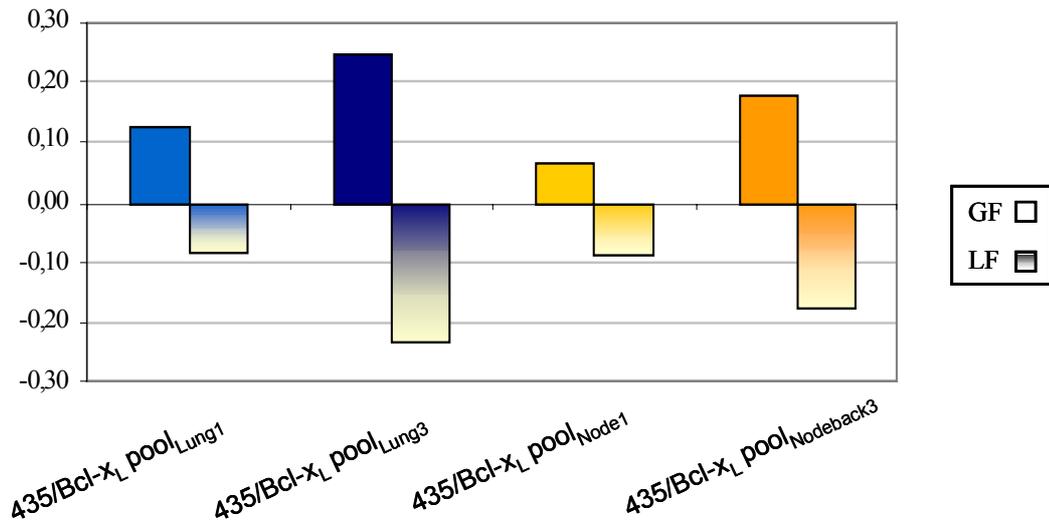


Figura 31. Análisis del daño genómico en variantes metastáticas con diferente organoespecificidad derivadas de la línea 435/Bcl-x_L pool. En azul se indican metástasis pulmonares y en naranja metástasis ganglionares. El incremento en la gradación de colores indica la selección de variantes a lo largo del proceso de progresión tumoral.

Al realizar el árbol de divergencia tomando como referencia el tumor de la primera generación (435/Bcl-x_L pool_{Tumor1}), se pudo ver como las líneas derivadas de las metástasis pulmonar y ganglionar de la primera generación comparten un mismo origen, y las metástasis de la tercera generación (435/Bcl-x_L pool_{Lung3} y 435/Bcl-x_L pool_{Nodeback3}) presentaban un mayor número de alteraciones genéticas, siendo la pulmonar la que tenía un mayor grado de divergencia (Figura 32).

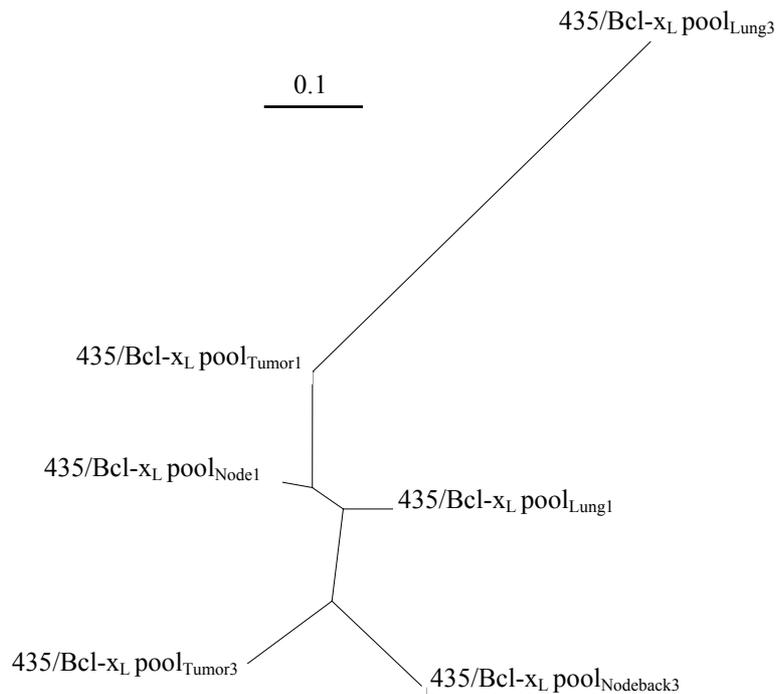


Figura 32. Árbol filogenético que muestra la relación existente entre variantes tumorales y metastáticas de diferente generación y con diferente organoespecificidad, todas ellas derivadas de la línea 435/Bcl-xL pool. La escala utilizada se indica en la parte superior.

4.2.8 Clasificación mediante *clusters* de los cambios genéticos detectados por AP-PCR.

Ya que el análisis mediante árboles de divergencia indicaba que las alteraciones genéticas de las variantes celulares que sobreexpresaban genes antiapoptóticos eran diferentes a las alteraciones de las variantes obtenidas con el gen control (Figura 22), se decidió analizar las bandas de AP-PCR mediante *clusters* para ver si existía alguna distribución específica del tipo de alteraciones relacionadas con la sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-x_L en las células. Para realizar estos análisis se incluyeron todas las bandas de AP-PCR de todas las variantes celulares estudiadas. Las muestras se ordenaron de forma que en la parte inicial del *cluster* estaban ubicadas todas las líneas derivadas del transfectante con el gen control, es decir: 435/Neo, 435/Neo_{Tumor1}, 435/Neo_{Tumor3} y 435/Neo_{Lung3}, y a continuación las variantes 435/Bcl-2 y 435/Bcl-x_L.

Como se puede apreciar en la Figura 33 hay zonas de reagrupamiento diferente en 3 regiones del *cluster*. Hay dos zonas donde en los transfectantes con el gen control predomina el color verde (pérdidas de intensidad), mientras que en esta área del *cluster* para las variantes que sobreexpresan Bcl-2 o Bcl-x_L el color predominante es el rojo (ganancias de intensidad). Y hay una tercera región, situada al final del *cluster*, donde en los transfectantes con el gen

control predomina el color rojo, mientras que, en la misma área del *cluster*, las variantes que sobreexpresan Bcl-2 o Bcl-x_L no han sufrido cambios de intensidad.

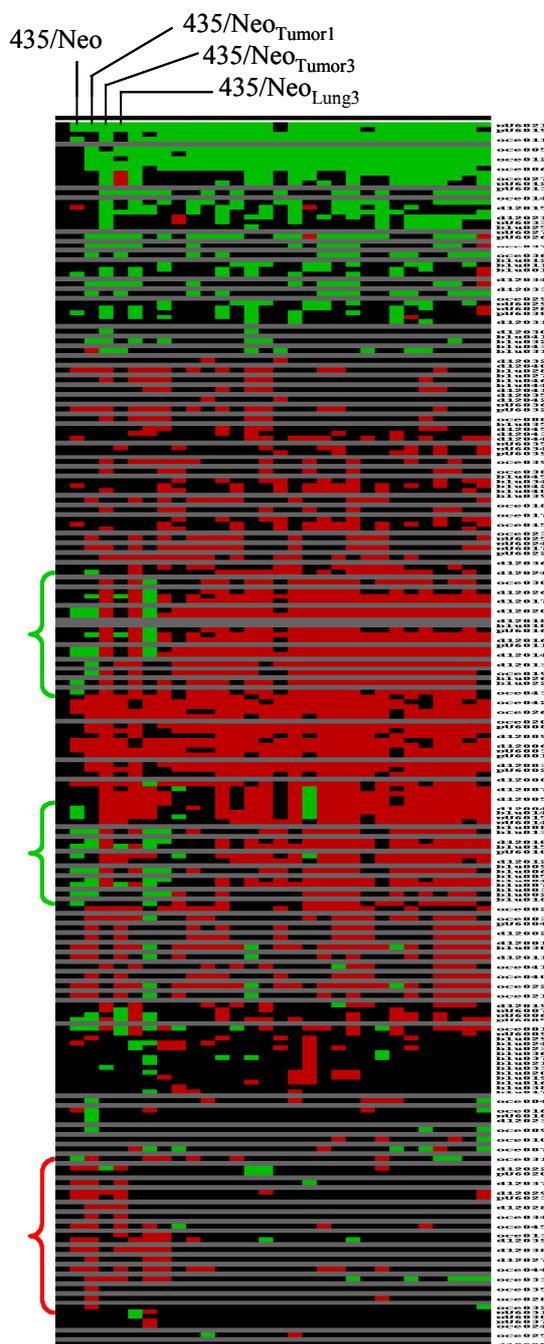


Figura 33. Análisis mediante *clusters* de los resultados obtenidos de los experimentos de AP-PCR. En horizontal están situadas todas las líneas celulares analizadas, y en vertical se indica el nombre de las bandas de AP-PCR. Las variantes derivadas de los transfectantes con el gen control están situadas en la parte inicial, indicándose el nombre de cada una de ellas, en el resto se incluyen todas las líneas celulares derivadas de los transfectantes con Bcl-2 y Bcl-x_L. En el lateral izquierdo se indican las 3 regiones cuyo comportamiento difiere entre los transfectantes con el gen control (435/Neo, 435/Neo_{Tumor1}, 435/Neo_{Tumor3} y 435/Neo_{Lung3}) y los transfectantes con genes antiapoptóticos.

4.3 Expresión génica diferencial en variantes metastáticas con diferente organoespecificidad.

4.3.1 Evaluación de las hibridaciones del *array*.

La membrana de *Research Genetics* se hibridó, alternativamente, con 7 µg de RNA total de cada una de las líneas celulares. Una vez realizadas todas las hibridaciones, se llevó a cabo el análisis de la membrana mediante el *software Pathways*. Este programa permite analizar cada hibridación de forma independiente, pudiéndose visualizar la intensidad de cada uno de los *spots* del *array* en escala de grises y obtener una distribución de los puntos en función de su intensidad. En la Figura 34 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos.

Del análisis de cada una de las hibridaciones se obtuvo una hoja de cálculo con toda la información referente al *array*.

Para efectuar el análisis de las distintas hibridaciones con el *software*, se recomendaba que las intensidades de cada una fueran lo más similares posible. Inicialmente se hicieron para cada una de las hibridaciones dos exposiciones de la membrana, una de 17 h y otra de 24 h, cuyas intensidades totales se indican a continuación:

17 h	24 h
435/Bcl-x _L C1 _{Tumor1} : 41.649,77	435/Bcl-x _L C1 _{Tumor1} : 59.055
435/Bcl-x _L C1 _{Node3} : 57.371,12	435/Bcl-x _L C1 _{Node3} : 91.037,46
435/Bcl-x _L C1 _{Lung1} : 83.337,74	435/Bcl-x _L C1 _{Lung1} : 101.479
435/Bcl-x _L C1 _{Bone1} : 70.590,99	435/Bcl-x _L C1 _{Bone1} : 101.273,19
435/Bcl-x _L C1 _{Node1} : 59.482,16	435/Bcl-x _L C1 _{Node1} : 92.277,68

Para decidir que valores utilizar para realizar el posterior análisis estadístico se compararon los datos obtenidos de cada una de las dos exposiciones, y como en términos generales no había grandes diferencias se decidió trabajar con los datos obtenidos tras 17 h de exposición de la membrana ya que la intensidad global era menor.

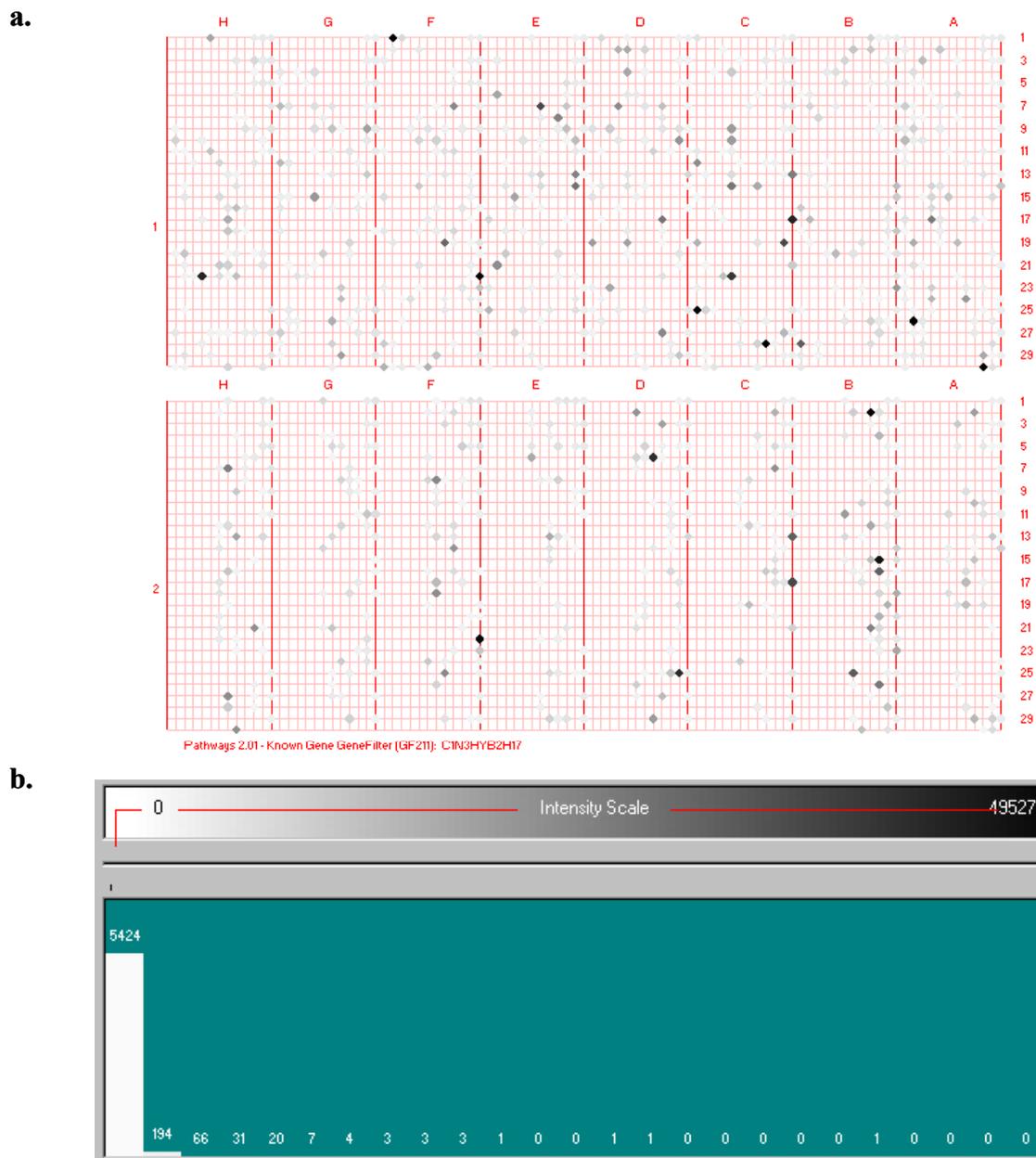


Figura 34. Imagen obtenida con el *software Pathways* tras analizar cada una de las hibridaciones de forma independiente, en la figura se muestran los resultados obtenidos con la muestra 435/Bcl-X_L C1_{Node3}. **a.** Representación del *array* indicándose en escala de grises la intensidad de cada uno de los puntos presentes en la membrana. **b.** Distribución de los puntos en función de la intensidad detectada.

Una vez analizada cada hibridación de forma independiente, se hicieron comparaciones dos a dos, que podían ser visualizadas mediante una escala de falso color rojo y verde que permite ver la intensidad del *array* en su conjunto (Ver Material y métodos 3.3.4 *Comparing*). Este tipo de análisis tiene en cuenta la diferente intensidad de cada punto en cada una de las

hibridaciones y además permite agruparlos en función de su intensidad mediante un histograma. En la Figura 35 se muestra un ejemplo de las imágenes obtenidas.

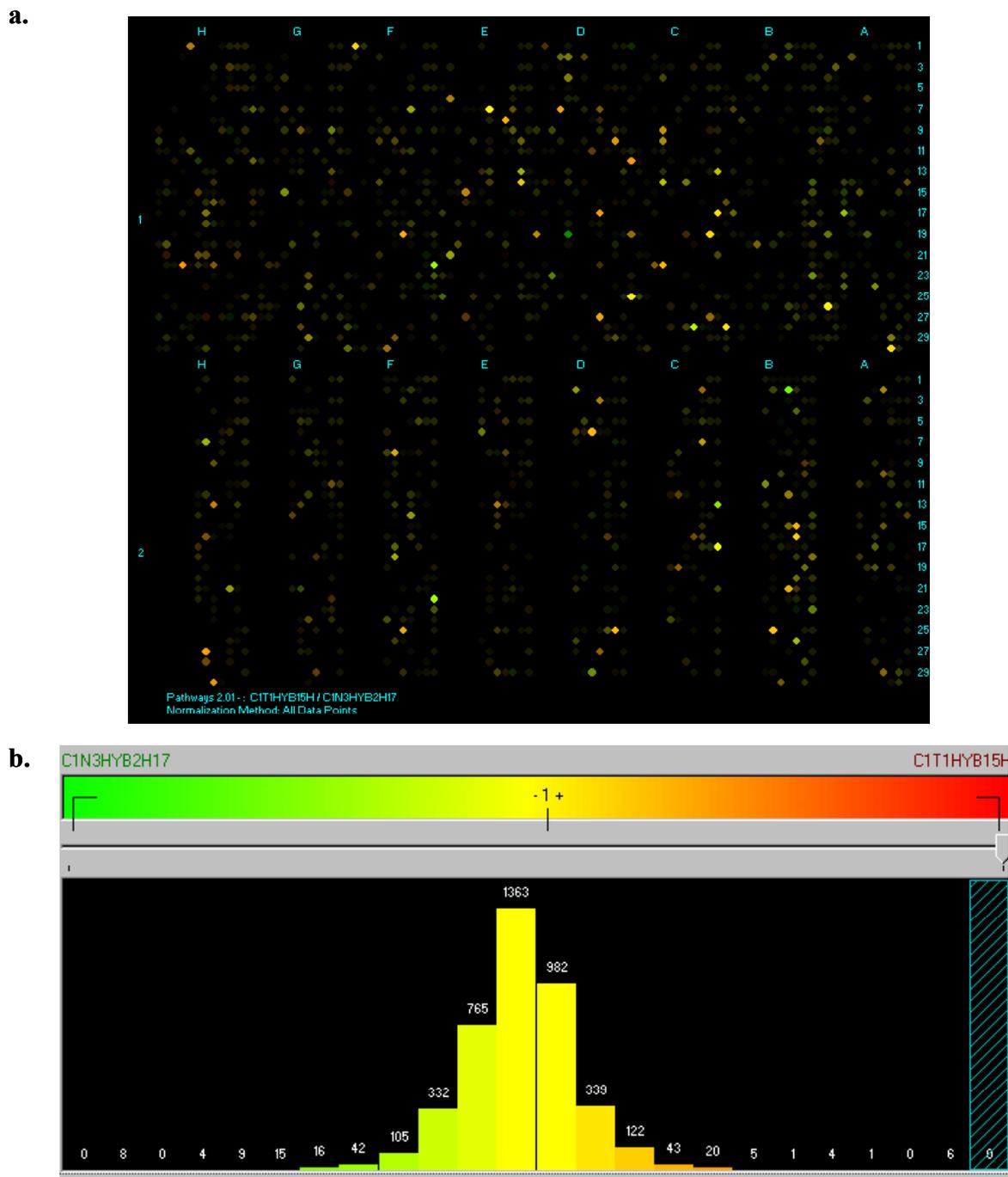


Figura 35. Imagen obtenida al comparar dos hibridaciones independientes del *array* con el *software Pathways*. **a.** Representación del *array* indicándose en escala de falso color rojo-verde la intensidad de cada uno de los puntos. En la figura se muestra la comparación entre el tumor 435/Bcl-x_L C1_{Tumor1} y la metástasis 435/Bcl-x_L C1_{Nodc3}. **b.** Distribución de los puntos en función de la intensidad detectada.

A pesar de que el programa permitía comparar las hibridaciones dos a dos normalizando previamente las intensidades de los puntos, nos pareció más apropiado realizar el análisis de los datos de forma independiente, ya que en la normalización llevada a cabo por el *software* no sabíamos exactamente los criterios ni las fórmulas utilizadas.

4.3.2 Análisis de los datos procedentes del *array*.

El análisis de datos se llevó a cabo con el programa SPSS. Toda la información de interés, como las intensidades crudas de cada uno de los puntos del *array* para las 5 hibridaciones realizadas, así como el nombre de cada uno de los genes, su localización en el *array* y su categoría, es decir si correspondía a un control positivo (CPos), a un *housekeeping gene* (HKG), o a uno de los genes conocidos incluidos (*Data points*), se transfirió a este programa.

El análisis se hizo partiendo de las intensidades crudas de cada uno de los puntos. Se sustrajo en primer lugar el valor del *background* y a continuación se llevó a cabo la normalización utilizando dos métodos alternativos. Una vez normalizado se compararon los niveles de expresión entre las diferentes muestras estudiadas. A continuación se explica detalladamente cada uno de los pasos seguidos.

Sustracción del *background*

El primer paso en el análisis de datos fue restar el *background* a las intensidades crudas de cada uno de los puntos. Este proceso no modificaba el valor general del *array* ya que se trataba de un valor único, que variaba para cada una de las hibridaciones, permitiendo así eliminar aquellos valores cuya intensidad fuera menor que 0.

Normalización.

Una vez eliminado el *background*, el siguiente paso necesario para poder comparar las diferentes hibridaciones entre si era llevar a cabo un proceso de normalización de los datos. La normalización se hizo utilizando dos métodos alternativos, uno basado en la media de los *Data points* y otro en la media de los controles positivos. En ambos casos la formula utilizada fue la siguiente:

$$\text{Normalización} = \frac{\text{intensidad cruda}}{\text{* intensidad cruda}} \times 2000$$

* *data points / controles positivos*

Para detectar genes diferencialmente expresados en metástasis con relación al tumor de origen, se calcularon ratios en las que el valor de cada metástasis normalizado se dividía por el valor del tumor normalizado.

Los resultados obtenidos según los dos métodos de normalización se indican por separado para las 3 categorías de *spots* que hay en el *array*: CPos, HKG y Data points.

TIPO		N	Mínimo	Máximo	Media	S.D.
CPos	B1T1= B1CPos/T1CPos	192	,62	1,44	1,0004	,1178
	L1T1= L1CPos/T1CPos	192	,78	1,35	1,0049	8,80E-02
	N1T1= N1CPos/T1CPos	192	,80	1,41	1,0015	8,86E-02
	N3T1= N3CPos/T1CPos	192	,72	1,41	1,0060	9,30E-02
Data	B1T1= B1CPos/T1CPos	3964	,14	5,66	1,0885	,3653
	L1T1= L1CPos/T1CPos	3964	,03	138,29	4,5264	7,9559
	N1T1= N1CPos/T1CPos	3964	,00	5,96	1,3125	,4258
	N3T1= N3CPos/T1CPos	3964	,02	5,87	1,0302	,3445
HKG	B1T1= B1CPos/T1CPos	168	,40	2,10	1,0212	,2751
	L1T1= L1CPos/T1CPos	168	,57	21,01	2,0836	2,7539
	N1T1= N1CPos/T1CPos	168	,37	3,10	1,3396	,3496
	N3T1= N3CPos/T1CPos	168	,53	2,77	1,0745	,2556

Tabla 20. Resultados obtenidos tras la normalización basada en los controles positivos. Los resultados se muestran por separado para las 3 categorías de puntos presentes en el *array*: controles positivos (CPos), Data y *housekeeping genes* (HKG). En cada caso se indica la ratio (B1T1, L1T1, N1T1 y N3T1) obtenida tras dividir el valor de cada una de las metástasis normalizado (B1CPos, L1CPos, N1CPos, N3CPos) entre el valor del tumor normalizado (T1CPos). N indica el número de genes en cada una de las categorías, también se indica el valor mínimo, máximo, la media, así como la desviación estándar (S.D.) para cada una de las ratios calculadas. B1= 435/Bcl-x_L C1_{Bone1}, L1= 435/Bcl-x_L C1_{Lung1}, N1= 435/Bcl-x_L C1_{Node1}, N3= 435/Bcl-x_L C1_{Node3} y T1= 435/Bcl-x_L C1_{Tumor1}.

Cuando se normalizó según los controles positivos (Tabla 20), la media de las ratios obtenidas en el grupo de CPos era próxima a 1, y la mayor variabilidad se encontró en las ratios de los

Data points, observándose en este grupo que las ratios correspondientes a la metástasis ósea y a una de las metástasis ganglionar tenían una media próxima a 1, mientras que la correspondiente a la metástasis pulmonar era de 4,52.

TIPO		N	Mínimo	Máximo	Media	S.D.
CPos	B1T1= B1Data/T1Data	192	,59	1,38	,9601	,1130
	L1T1= L1Data/T1Data	192	,30	,53	,3925	3,44E-02
	N1T1= N1Data/T1Data	192	,62	1,09	,7757	6,86E-02
	N3T1= N3Data/T1Data	192	,76	1,48	1,0524	9,73E-02
Data	B1T1= B1Data/T1Data	3964	,13	5,43	1,0446	,3506
	L1T1= L1Data/T1Data	3964	,01	54,01	1,7678	3,1073
	N1T1= N1Data/T1Data	3964	,00	4,62	1,0166	,3298
	N3T1= N3Data/T1Data	3964	,02	6,14	1,0776	,3603
HKG	B1T1= B1Data/T1Data	168	,38	2,02	,9801	,2640
	L1T1= L1Data/T1Data	168	,22	8,20	,8138	1,0756
	N1T1= N1Data/T1Data	168	,28	2,40	1,0376	,2708
	N3T1= N3Data/T1Data	168	,56	2,90	1,1240	,2674

Tabla 21. Resultados obtenidos tras la normalización basada en los Data. Los resultados se muestran por separado para las 3 categorías de puntos presentes en el *array*: controles positivos (CPos), *Data* y *housekeeping genes* (HKG). En cada caso se indica la ratio (B1T1, L1T1, N1T1 y N3T1) obtenida tras dividir el valor de cada una de las metástasis normalizado (B1Data, L1Data, N1Data, N3Data) entre el valor del tumor normalizado (T1Data). N indica el número de genes en cada una de las categorías, también se indica el valor mínimo, máximo, la media, así como la desviación estándar (S.D.) para cada una de las ratios calculadas. B1= 435/Bcl-x_L C1_{Bone1}, L1= 435/Bcl-x_L C1_{Lung1}, N1= 435/Bcl-x_L C1_{Node1}, N3= 435/Bcl-x_L C1_{Node3} y T1= 435/Bcl-x_L C1_{Tumor1}.

Al normalizar utilizando la media de los Data points (Tabla 21), el promedio de las ratios para este grupo de genes seguía estando próxima a 1, observándose una mayor variabilidad en las ratios correspondientes a los controles positivos. Con esta normalización se seguía observando que la ratio correspondiente a la metástasis pulmonar era la que aparecía más desviada de 1, con un valor de 1,76. Esta mayor variabilidad en la metástasis pulmonar es seguramente consecuencia de algún problema en el momento de la manipulación.

Al comparar los dos métodos de normalización no existía una gran discrepancia en el número de genes detectados. Por ese motivo, se decidió utilizar la normalización basada en la media de los Data points, el grupo de genes mayoritario, ya que representaban mejor el conjunto del

array que los controles positivos. Los resultados que se muestran a continuación son los obtenidos mediante este tipo de normalización.

Comparación metástasis *versus* tumor.

Para analizar si la variabilidad genética de las células metastáticas se correspondía con una diferente expresión génica, característica del órgano en el que se habían desarrollado las metástasis, se comparó la expresión génica de cada una de ellas: pulmón, hueso y ganglio en relación con el tumor.

En la Figura 36 se muestran las gráficas obtenidas al comparar los valores normalizados de cada una de las metástasis con relación al tumor. En las dos metástasis ganglionares analizadas, y en la metástasis ósea, la mayoría de los genes representados en el *array* aparecían en la diagonal, es decir se expresaban de forma similar en el tumor y la metástasis, y sólo en algunos casos diferían sus valores. Por el contrario, existe una gran dispersión de valores entre las células de la metástasis pulmonar y las células del tumor, corroborándose los resultados obtenidos al analizar las ratios metástasis/tumor en los cálculos de normalización.

4.3.3 Determinación de los cambios de expresión.

El último paso de los análisis realizados consistió en tomar logaritmos en base 2 de todas las ratios metástasis/tumor, lo que permitía interpretar los resultados de forma más clara.

Para considerar que un gen presentaba diferencias de expresión entre la metástasis y el tumor, se estableció como criterio que la ratio obtenida al comparar las intensidades respectivas fuera superior a 2 (sobrexpresión) o inferior a -2 (infraexpresión). Como trabajábamos en logaritmo en base 2, se consideró cambio de expresión cuando las ratios de las intensidades eran superiores a 1 ($\log_2 \text{ratio} \geq 1$) o inferiores a -1 ($\log_2 \text{ratio} \leq -1$).

Además se estableció un tercer parámetro para restringir los valores que considerábamos de interés, este criterio fue el de valorar únicamente aquellos puntos cuya intensidad al restar de cada una de las metástasis el valor del tumor fuera superior a 10 veces el *background*. De esta manera se eliminaban puntos que por su baja intensidad eran más susceptibles de error.

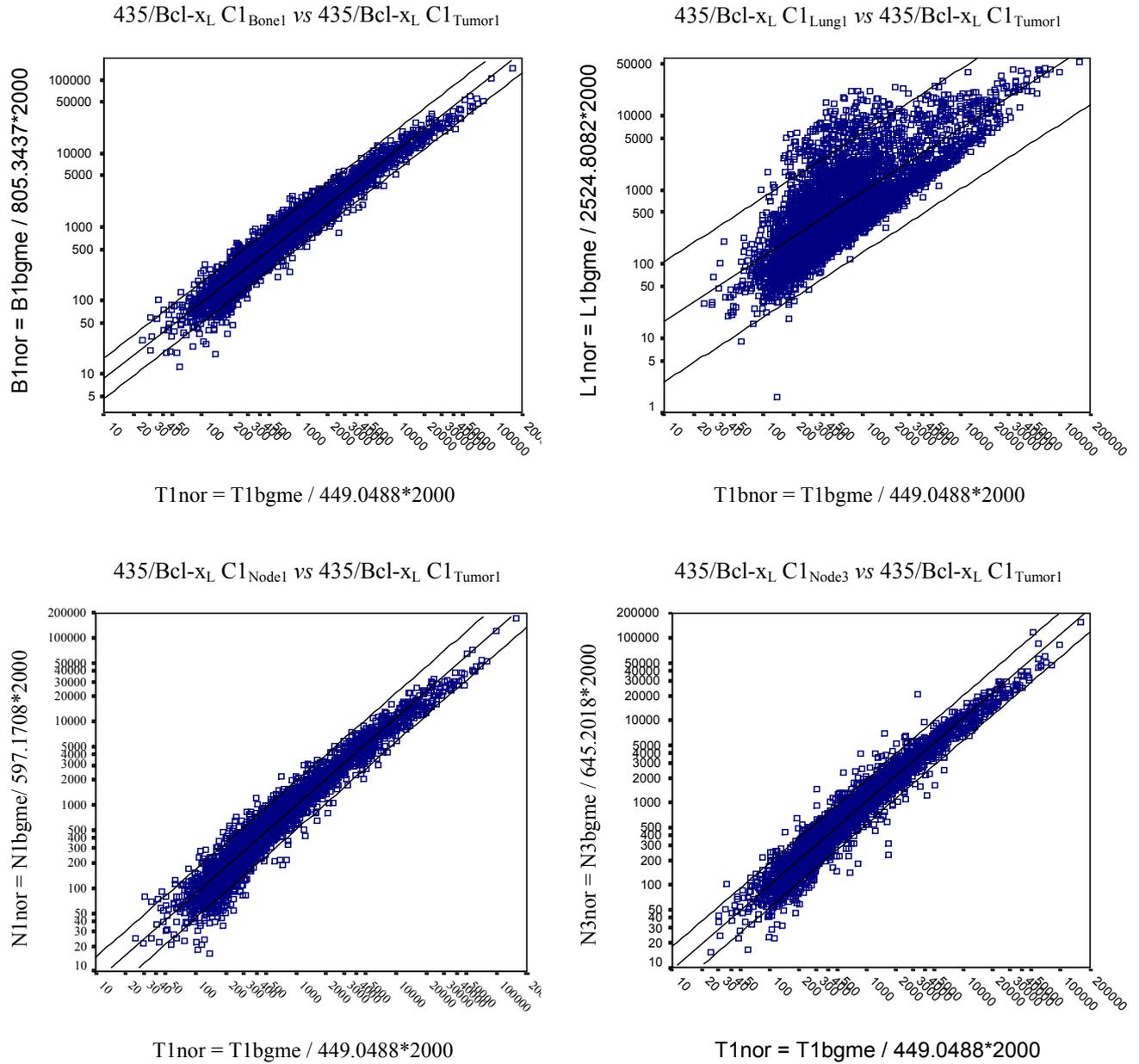


Figura 36. Representación gráfica de la comparación de los valores normalizados de cada una de las metástasis en relación con el valor normalizado del tumor ($T1_{nor}$). La normalización se hizo restando previamente el *background* ($T1_{bgme}$) y aplicando para cada hibridación la fórmula que se indica sobre cada uno de los ejes. En cada una de las gráficas se representan la recta de regresión con el intervalo de confianza del 95%. $B1 = 435/Bcl-x_L C1_{Bone1}$, $L1 = 435/Bcl-x_L C1_{Lung1}$, $N1 = 435/Bcl-x_L C1_{Node1}$, $N3 = 435/Bcl-x_L C1_{Node3}$ y $T1 = 435/Bcl-x_L C1_{Tumor1}$.

En la Figura 37 se representan las ratios metástasis/tumor *versus* el valor del tumor normalizado, aplicando los criterios establecidos para determinar los cambios de expresión. En las gráficas se puede observar que en la metástasis ósea y en las dos metástasis ganglionares el número de genes detectados como diferencialmente expresados, con un valor de \log_2 ratio metástasis/tumor superior a 1 e inferior a -1 , y una intensidad 10 veces superior al *background*, es muy inferior al número de genes que se encuentran diferencialmente expresados en la metástasis pulmonar, la cual presenta una mayor dispersión de valores.

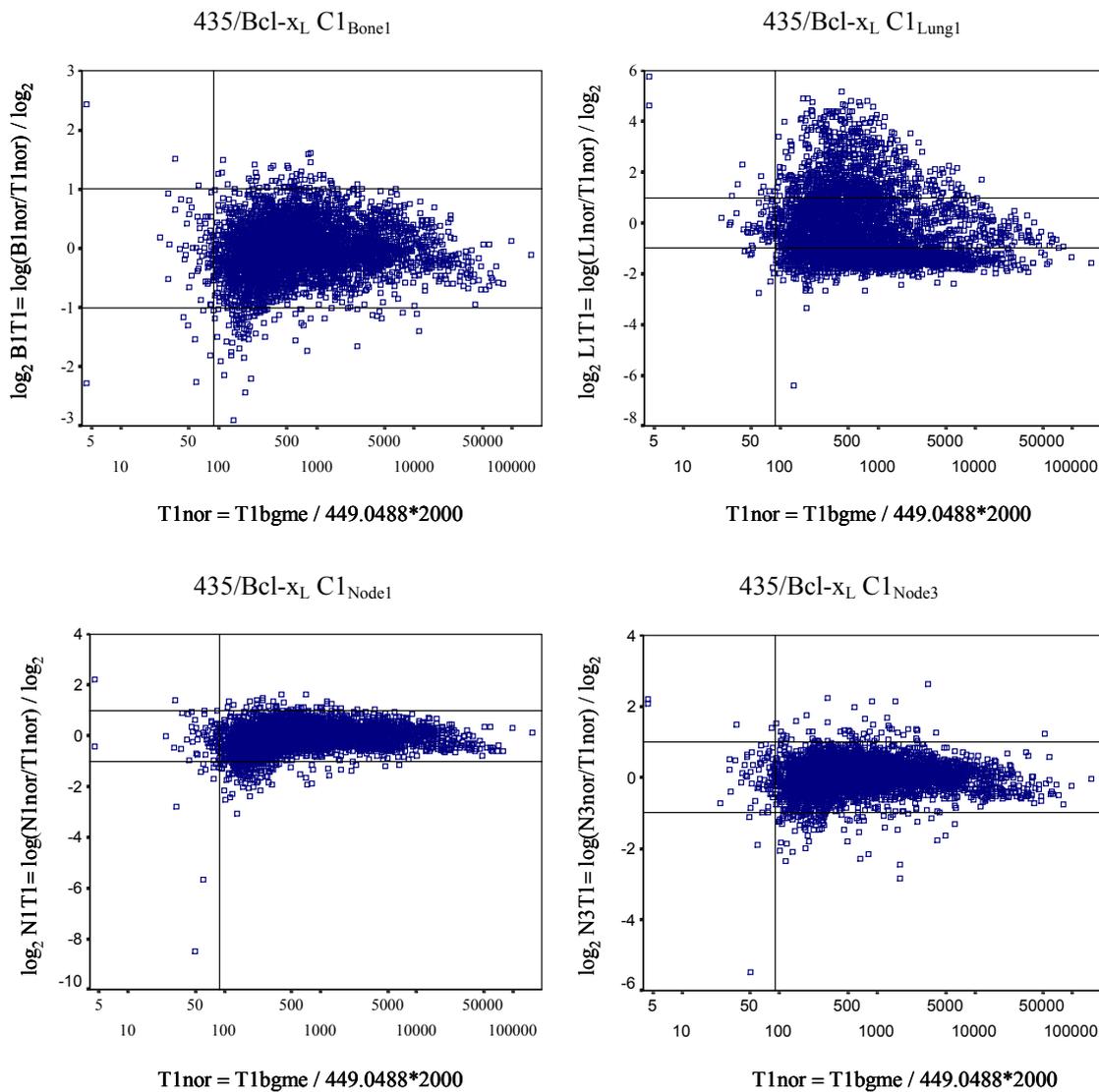


Figura 37. Representación gráfica obtenida al comparar las ratios metástasis/tumor en \log_2 respecto al valor del tumor normalizado. Sobre cada uno de los ejes se indican las fórmulas utilizadas para obtener los valores que se representan. Sólo se consideraron como cambios reales aquellas ratios de intensidad cuyo \log_2 era superior a 1 o inferior a -1 (líneas paralelas al eje de abscisas) y superiores a 10 veces el *background* (línea perpendicular al eje de abscisas). B1= 435/Bcl-x_L C1_{Bone1}, L1= 435/Bcl-x_L C1_{Lung1}, N1= 435/Bcl-x_L C1_{Node1}, N3= 435/Bcl-x_L C1_{Node3} y T1= 435/Bcl-x_L C1_{Tumor1}.

Siguiendo estos criterios se determinó que genes aparecían diferencialmente expresados en cada una de las metástasis.

4.3.3.1 Identificación de genes diferencialmente expresados.

➤ Genes asociados a actividad metastática:

La detección de genes asociados a la actividad metastática de las células se hizo evaluando aquellos que aparecían sobreexpresados (\log_2 ratio ≥ 1) e infraexpresados (\log_2 ratio ≤ -1) respecto al tumor, en las cuatro variantes metastáticas que se habían analizado: dos de ganglio, una de pulmón y una de hueso. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 22, donde se observa que sólo ocho genes sufrían variaciones en todas las metástasis, dos de ellos sobreexpresados: el colágeno tipo VI α_2 , componente de la matriz extracelular, y un componente de la membrana plasmática que cataliza el transporte de monocarboxilatos como lactato. Los genes infraexpresados en su mayoría son factores de transcripción: TAF-172 que se une a las cajas TATA coactivando junto con otros factores la transcripción, la proteína zinc finger 5 que actúa como represor transcripcional de c-myc y de promotores de timidina quinasa, y el factor de transcripción para la α_1 -fetoproteína. Hay que destacar también como infraexpresados un precursor de la quimiotaxina 2 leucocitaria y el receptor de membrana LCR1 acoplado a proteína G.

Tabla 22. Genes diferencialmente expresados en las 4 líneas metastáticas analizadas.

Genes asociados a actividad metastática	
<u>Genes sobreexpresados</u> (\log_2 ratio ≥ 1)	<u>Genes infraexpresados</u> (\log_2 ratio ≤ -1)
Receptores y proteínas de membrana	
*Monocarboxilate transporter (MCT3)	*Antígeno de membrana específico de próstata *Probable G protein-coupled receptor LCR1
Sistema inmune	
	* <i>H. sapiens</i> mRNA for LECT2 precursor
Proteínas nucleares, factores de transcripción y traducción	
	* α_1 -fetoprotein transcription factor (hFTF) *TBP-associated factor 172 (TAF-172) *Human mRNA for zinc finger 5 protein
Matriz extracelular, citoesqueleto y moléculas de adhesión	
*Colágeno, tipo VI α_2	

➤ Genes asociados a metástasis ganglionar:

En el caso de la metástasis ganglionar donde se disponía de 2 muestras independientes se analizó que genes aparecían diferencialmente expresados en cada una de las líneas celulares en relación con el tumor. En las células 435/Bcl-x_L C1_{Node1} había un total de 36 genes sobreexpresados y 28 infraexpresados que afectan a distintas funciones celulares (Tabla 23). Algunos de ellos están relacionados con los mecanismos de apoptosis, o con la maquinaria bioquímica celular, y otros forman parte del citoesqueleto, membrana celular o núcleo. También destaca un grupo de genes implicados en los mecanismos de respuesta inmune. La otra metástasis ganglionar, 435/Bcl-x_L C1_{Node3}, presentaba 49 genes sobreexpresados y 25 genes infraexpresados con una distribución similar en cuanto a funciones celulares (Tabla 24).

Para establecer que genes variaban de forma consistente en las dos metástasis ganglionares se compararon estos resultados entre sí. En la Figura 38 se representan las ratios metástasis/tumor correspondientes a estas dos líneas celulares. Los puntos situados en el cuadrante superior derecho son aquellos que aparecen sobreexpresados ($\log_2 \text{ratio} \geq 1$) en las dos metástasis ganglionares, y los que están situados en el cuadrante inferior izquierdo corresponden a genes cuya expresión es inferior a -1 ($\log_2 \text{ratio} \leq -1$) en las dos muestras analizadas.

El número de genes que variaban en las dos metástasis ganglionares (Tabla 25) y podían considerarse consistentemente asociados a este fenotipo se reducía a 5 genes sobreexpresados y 6 infraexpresados, de los cuales, específicos para la metástasis ganglionar y que no habían aparecido en las otras metástasis eran: el receptor de la fibronectina, implicado en la adhesión celular y cuya activación se relaciona con proliferación y apoptosis, la apolipoproteína D que participa en el metabolismo lipoproteico y una lactato deshidrogenasa que interviene en la glicólisis anaeróbica de células testiculares y células germinales.

Tabla 23. Genes detectados como sobre e infraexpresados en la línea celular 435/Bcl-x_L C1_{Node1} en relación con el tumor 435/Bcl-x_L C1_{Tumor1}.

<u>Genes sobreexpresados (ratio log₂ ≥ 1)</u>	<u>Genes infraexpresados (ratio log₂ ≤ -1)</u>
Receptores y proteínas de membrana	
* <i>H. sapiens</i> creatine transporter mRNA	*Prostate-especific membrane antigen
*Monocarboxylate transporter (MCT3) mRNA	*Probable G protein-coupled receptor LCR1 homolog
*Delayed-rectifier K ⁺ channel α subunit (KCNS1)	*Interleukin 10 receptor
*Ankyrin	*Human occludin mRNA
*Hybrid receptor gp250 precursor mRNA	*Membrane metallo-endopeptidase (CALLA, CD10)
* <i>H. sapiens</i> macrophage receptor MARCO	
*Mitochondrial ADP/ADT translocator mRNA	
Apoptosis	
* <i>H. sapiens</i> TWEAK mRNA	*Putative DNA binding protein A20
*Bcl-2 binding component 6 (bbc6) mRNA	
Sistema inmune	
*S100 calcium-binding protein A8 (calgranulin A)	*Interleukin 8
* <i>H. sapiens</i> tapasin (NGS-17) mRNA,	*Human Toll-like receptor 3 (TLR3) mRNA
*Immunoglobulin-related 14.1 protein precursor	*Monocyte chemotactic protein 3 precursor
	*HKR-T1
	* <i>H. sapiens</i> mRNA for LECT2 precursor
Proteínas nucleares, factores de transcripción y traducción	
*Human CREB-binding protein (CBP) mRNA	*Human mRNA for zinc finger 5 protein
*V-ski avian sarcoma viral oncogene homolog	*α1-fetoprotein transcription factor (hFTF) mRNA
*mRNA for hepatocyte nuclear factor 4 γ	*TBP-associated factor 172 (TAF-172) mRNA
*Ran binding protein 2 (RanBP2alpha)	
*GATA-binding protein 3	
Enzimas y proteínas de la maquinaria bioquímica celular	
*Testis-specific lactate dehydrogenase (LDHC4, LDHX)	*Ribonuclease L (2',5'oligoadenylate)
* <i>H. sapiens</i> adenosine triphosphatase mRNA,	*Hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2
*Hydroxysteroid sulfotransferase SULT2B1a (HSST2)	* <i>H. sapiens</i> mRNA for protein kinase, Dyrk3
*Tyrosine hydroxylase	*Human (ard-1) mRNA
*Putative tumor suppressor protein unspliced form (Fus2)	*mRNA for peroxisomal acyl-CoA oxidase
*Visinin-like	*Human p37NB mRNA
*Human protein-tyrosine phosphatase mRNA	*Adenosine monophosphate deaminase 1 (isoform M)
*Apolipoprotein D	* <i>H. sapiens</i> mRNA for ESM-1 protein
*Apolipoprotein C-IV	*Paired basic amino acid cleaving system 4
*Glutathione-S-transferase pi-1	*Human mRNA for nel-related protein
	* <i>H. sapiens</i> mRNA for alkB protein homolog
Matriz extracelular, citoesqueleto y moléculas de adhesión	
*Human tastin mRNA	*Fibromodulin
*Collagen, type VI, alpha	
*(clone ch13lambda7) alpha-tubulin mRNA	
*Human p190-B (p190-B) mRNA	
*Integrin β1 (fibronectin receptor, antigen CD29)	
Otros	
*Human ets domain protein ERF mRNA	* <i>H. sapiens</i> mRNA for Mox-2
* <i>H. sapiens</i> HKL1 mRNA	*V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
*BRCA2 region, mRNA sequence CG006	
* <i>H. sapiens</i> EMX1 mRNA	

Tabla 24. Genes detectados como sobre e infraexpresados en la línea celular 435/Bcl-x_L C1_{Node3} en relación con el tumor 435/Bcl-x_L C1_{Tumor1}.

Genes diferencialmente expresados en 435/Bcl-x_L C1_{Node3}	
<u>Genes sobreexpresados (ratio log₂ ≥ 1)</u>	<u>Genes infraexpresados (ratio log₂ ≤ -1)</u>
Receptores y proteínas de membrana	
*Receptor protein-tyrosine kinase EDDR1	* <i>H. sapiens</i> phospholipid scramblase mRNA
*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	*Estrogen receptor
*Monocarboxylate transporter (MCT3) mRNA	*Prostate-specific membrane antigen
*Diastrophic dysplasia (sulfate transporter)	*mRNA (ocular albinism type 1 related)
*Tumor-associated antigen L6	*Excitatory amino acid transporter 1
*Basic fibroblast growth factor (bFGF) receptor	*Probable G protein-coupled receptor LCR1 homolog
*Low-density lipoprotein receptor precursor	
*Syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan)	
Apoptosis	
*Hematopoietic lineage cell specific protein	
*E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3	
Sistema inmune	
*Macrophage stimulating 1 (hepatocyte Growth F. like)	* <i>H. sapiens</i> mRNA for LECT2 precursor
*Human MOP1 mRNA	
*Monocyte chemoattractant protein-4 precursor (MCP-4)	
Proteínas nucleares, factores de transcripción y traducción	
*Histone H1D	*TBP-associated factor 172 (TAF-172) mRNA
*Human neuronal PAS2 (NPAS2) mRNA	*p300/CBP-associated factor (P/CAF) mRNA
*Histone 2A-like protein (H2A/l) mRNA	*α1-fetoprotein transcription factor (hFTF) mRNA
* <i>H. sapiens</i> histone H2A.2 mRNA	* <i>H. sapiens</i> ring finger protein (FXY) mRNA
*Zinc finger protein 43 (HTF6)	*Microphthalmia-associated transcription factor
*Ribonucleotide reductase M2 polypeptide	*Human mRNA for zinc finger 5 protein
*Putative RNA binding protein (RBP56)	*Human RNA binding protein Etr-3 mRNA
*P55-c-FOS proto-oncogene protein	
Enzimas y proteínas de la maquinaria bioquímica celular	
*Human mRNA for reticulocalbin	*5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase precursor
*Testis-specific lactate dehydrogenase (LDHC4, LDHX)	*mRNA for fatty acid binding protein
*IEX-1	*Human MXI1 mRNA
*Cytochrome P450, subfamily IIA	*Human syntaxin 7 mRNA
*Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT)	*mRNA for glutamine cyclotransferase
*Apolipoprotein D	*Synuclein, α (non A4 component of amyloid precursor)
*Human follistatin gene	*Lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)
*5' nucleotidase (CD73)	*Tyrosinase (oculocutaneous albinism IA)
*Sodium/myo-inositol cotransporter (SLC5A3)	*mRNA for skeletal muscle-specific calpain
*N-chimaerin	
*Arginyl-tRNA synthetase	
* <i>H. sapiens</i> mRNA for dihydropyrimidinase	
*Dihydrodiol dehydrogenase	
*Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic	
*Glycogen synthase 1 (muscle)	
*Human PH-20 homolog (LUCA2) mRNA	
*Prob. trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase	
Matriz extracelular, citoesqueleto y moléculas de adhesión	
*Collagen, type VI, alpha 2	*Gene for neurofilament subunit M (NF-M)
*Capping protein (actin filament), gelsolin-like	*Lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
*Adducin 2 (beta) {alternative products}	
*Integrin, alpha 6	
*Integrin β1 (fibronectin recept. β polypeptide Ag CD29)	
* <i>H. sapiens</i> Jagged 1 (HJ1) mRNA	
*Collagen, type VI, alpha 1	
*Vascular cell adhesion molecule 1	
Otros	
* <i>H. sapiens</i> CAGH3 mRNA	
*Prion protein (p27-30) (Creutzfeld-Jakob disease)	
*Human mRNA for RTP	

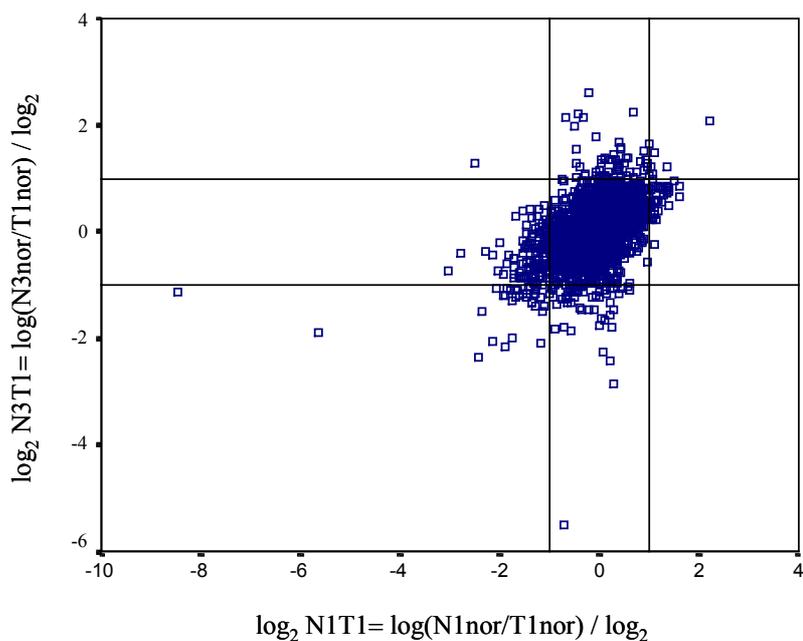


Figura 38 Genes diferencialmente expresados en metástasis ganglionares. Sobre cada uno de los ejes se representa la ratio metástasis/tumor en \log_2 , indicándose en cada caso la fórmula utilizada, así como las líneas correspondientes a los límites de 1 y -1 establecidos. El cuadrante superior derecho e inferior izquierdo muestran aquellos genes cuya ratio en \log_2 es superior a 1 e inferior a -1 respectivamente, en las dos muestras analizadas. N1= 435/Bcl-x_L C1_{Node1} y N3= 435/Bcl-x_L C1_{Node3}.

Tabla 25. Genes diferencialmente expresados en las 2 muestras de metástasis ganglionar analizadas.

Genes asociados a metástasis ganglionar

Genes sobreexpresados (\log_2 ratio ≥ 1)

Genes infraexpresados (\log_2 ratio ≤ -1)

Receptores y proteínas de membrana

*Monocarboxilate transporter (MCT3)

*Antígeno de membrana específico de próstata

*Probable G protein-coupled receptor LCR1

Sistema inmune

**H. sapiens* mRNA for LECT2 precursor

Proteínas nucleares, factores de transcripción y traducción

*TBP-associated factor 172 (TAF-172)

* α 1-fetoprotein transcription factor (hFTF)

*Human mRNA for zinc finger 5 protein

Enzimas y proteínas de la maquinaria bioquímica celular

*Testis-specific lactate dehydrogenase

*Apolipoprotein D

Matriz extracelular, citoesqueleto y moléculas de adhesión

*Colágeno, tipo VI α 2

*Integrin β 1 (fibronectin receptor, antigen CD29)

➤ Genes asociados a metástasis ósea:

En el caso de la metástasis ósea, donde sólo se disponía de una muestra lo primero que se hizo fue determinar que valores del \log_2 ratio metástasis/tumor eran superiores a 1 e inferiores a -1. Con esta comparación se obtuvieron 58 genes sobreexpresados y 18 genes infraexpresados, respecto al tumor de origen.

Para facilitar la selección de genes candidatos se comparó la ratio metástasis ósea/tumor con las ratios correspondientes a las dos metástasis ganglionares. De esta forma se determinó que genes se expresaban diferencialmente en hueso y no en ganglio, es decir se seleccionaron genes cuyo \log_2 ratio fuera superior a 1 en hueso e inferior en ganglio (n=37), y genes con \log_2 ratio inferior a -1 en hueso y superior en ganglio (n=13). Con estos criterios, y teniendo en cuenta que sólo se consideraron genes con una intensidad 10 veces superior al *background*, se intentó acotar el número de genes posiblemente relacionados con metástasis ósea. En la Tabla 26 se clasifican los genes detectados como diferencialmente expresados según su función.

➤ Genes asociados a metástasis pulmonar:

Para determinar genes potencialmente asociados a metástasis pulmonar se determinó que valores del \log_2 ratio metástasis/tumor eran superiores a 1 e inferiores a -1. Se obtuvieron 778 genes sobreexpresados y 1091 genes infraexpresados.

Dado el gran número de genes cuya expresión había cambiado en la metástasis pulmonar respecto al tumor, y puesto que no se disponía de replicas de la muestra, tan sólo se utilizó esta información para complementar la derivada de las otras metástasis y así determinar genes potencialmente asociados a la actividad metastática de las líneas celulares.

Tabla 26. Genes detectados como sobre e infraexpresados en la línea celular 435/Bcl-x_L C1_{Bone1} en relación con el tumor 435/Bcl-x_L C1_{Tumor1}.

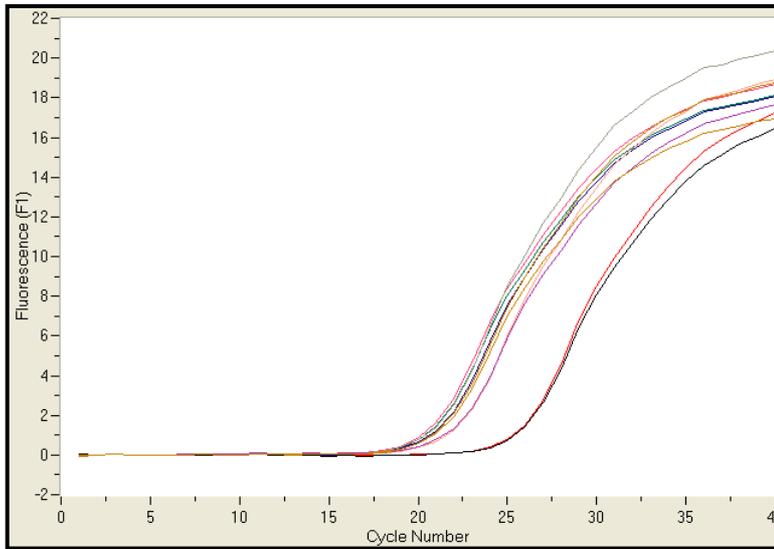
Genes diferencialmente expresados en 435/Bcl-x_L C1_{Bone1}	
<u>Genes sobreexpresados (ratio log₂ ≥ 1)</u>	<u>Genes infraexpresados (ratio log₂ ≤ -1)</u>
Receptores y proteínas de membrana	
* <i>H. sapiens</i> creatine transporter	*Prostate-specific membrane antigen
*Adrenergic, beta, receptor kinase 1	*Tetraspanin Tspan-5 (TSPAN-5) gene
*Mitochondrial capsule selenoprotein	*Probable G protein-coupled receptor LCR1 homolog
*Human triadin mRNA	
*5-hydroxytryptamine 2B receptor	
*Human retinal protein (HRG4) mRNA	
* <i>H. sapiens</i> dynamin (DNM) mRNA	
*Epidermal growth factor receptor	
*Peroxisome proliferator activated receptor	
*Chloride channel 4	
*Monocarboxylate transporter (MCT3)	
*Delayed-rectifier K ⁺ channel α subunit (KCNS1)	
*Ankyrin G	
Apoptosis	
*Cytoplasmic antiproteinase 2 (CAP2)	* <i>H. sapiens</i> TFAR19 mRNA
* <i>H. sapiens</i> mRNA for FAST kinase	*CC3 (CC3) mRNA, complete cds
* <i>H. sapiens</i> TWEAK mRNA	
* <i>H. sapiens</i> Munc13 mRNA	
Sistema inmune	
*Complement component C2	*mRNA for LECT2 precursor
*Natural killer cells protein 4 precursor	
*Macrophage stimulating 1 (hepatocyte GF-like)	
*Class I histocompatibility antigen-like protein	
*CX3C chemokine precursor	
Proteínas nucleares, factores de transcripción y traducción	
*Human ets domain protein ERF mRNA	*COP9 homolog (HCOP9) mRNA
*Tax interaction protein 40 mRNA	*TBP-associated factor 172 (TAF-172)
*GATA-binding protein 3	*Human mRNA for zinc finger 5 protein
*Ran binding protein 2 (RanBP2alpha)	*Eukaryotic initiation factor 4AI
*TTAGGG repeat binding factor 2 (hTRF2)	*Translational initiation factor 2B (eIF2- β)
*Retinoic acid-inducible endogenous retroviral DNA	* α 1-fetoprotein transcription factor (hFTF)
Enzimas y proteínas de la maquinaria bioquímica celular	
* <i>H. sapiens</i> mRNA for RIT protein	*ATP synthase γ -subunit (H-type)
*Small proline-rich protein 1B (cornifin)	*Ornithine decarboxylase antizyme
*Tyrosine hydroxylase	*Dihydrodiol dehydrogenase
*Pancreatic polypeptide	*Ser-thr protein kinase PK428 mRNA
* <i>H. sapiens</i> prostaticin mRNA	
*Superoxide dismutase 3, extracellular	
*GRB-7 SH2 domain protein (esophagus carcinoma)	
*Apolipoprotein C-IV	
*Heat shock 70 KD protein 1	
*Small proline rich protein (sprII), clone 1292	
*Human PH-20 homolog (LUCA2) mRNA	
*L-3-phosphoserine-phosphatase homologue	
*Creatine kinase B	
*Putative tumor suppressor protein unspliced form (Fus2)	
*NADH:ubiquinone oxidoreductase 15 kDa IP subunit	
*GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein	
*53K isoform of Type II (PIPK)	
Matriz extracelular, citoesqueleto y moléculas de adhesión	
*Colágeno, tipo VI, alpha2	*Actin depolymerizing factor
* <i>H. sapiens</i> , alpha-1 (VI) collagen	*Lamin A
*Human p190-B (p190-B) mRNA	
*Human tasin mRNA	
*Vascular cell adhesion molecule 1	
Otros	
* <i>H. sapiens</i> HKL1 mRNA	
*Spinocerebellar ataxia 2	
* <i>H. sapiens</i> mRNA for HYA22	
*BRCA2 region, mRNA sequence CG006	
* <i>H. sapiens</i> mRNA for ITBA1 protein	
* <i>H. sapiens</i> EMX1 mRNA	
*Excision repair cross-complementing rodent repair	

4.3.4 Comprobación mediante PCR a tiempo real de los niveles de expresión de algunos de los genes seleccionados mediante el análisis del *array*.

Mediante PCR a tiempo real se comprobó la expresión de 5 genes detectados como diferencialmente expresados mediante el análisis del *array*.

En las 5 muestras estudiadas (435/Bcl-x_L C1_{Tumor1}, 435/Bcl-x_L C1_{Lung1}, 435/Bcl-x_L C1_{Bone1}, 435/Bcl-x_L C1_{Node1} y 435/Bcl-x_L C1_{Node3}), se valoró la expresión de Integrina β 1, Apolipoproteína D, Receptor LCR1 acoplado a proteína G (*Probable G protein-coupled receptor LCR1 homolog*), *Heat shock* 70 kDa proteína 1 y el Componente C2 del complemento. La expresión de Ciclofilina, un gen considerado como *housekeeping*, se utilizó como gen control para evaluar las variaciones en la expresión de los genes analizados.

Para la cuantificación se considera el número de ciclo en que se inicia la amplificación de cada uno de los productos de PCR (*crossing point*). Este método se basa en la premisa de que a mayor cantidad de cDNA inicial en una muestra, menor es el número de ciclos de PCR necesarios para iniciar la amplificación (Morrison et al., 1998), tal y como se representa en la Figura 39.

Integrina $\beta 1$ 

- 435/Bcl-x_L C1_{Tumor1}
- 435/Bcl-x_L C1_{Bone1}
- 435/Bcl-x_L C1_{Lung1}
- 435/Bcl-x_L C1_{Node1}
- 435/Bcl-x_L C1_{Node3}

Ciclofilina

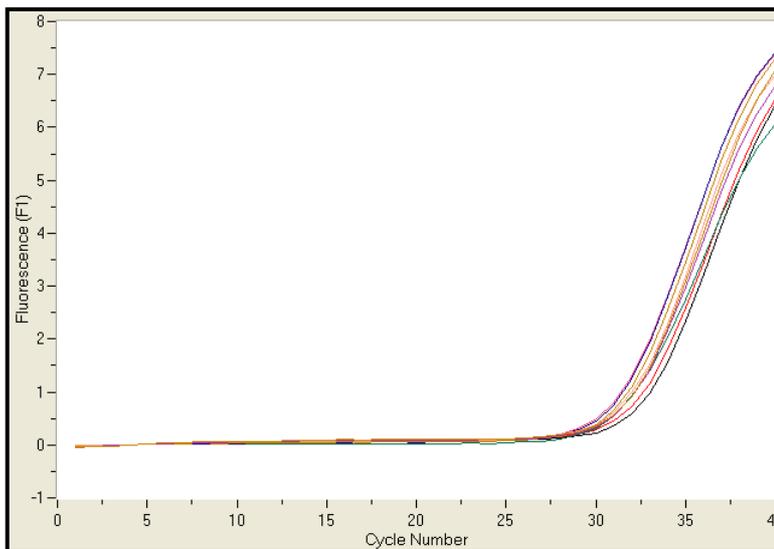


Figura 39. Ejemplos de los perfiles de amplificación obtenidos, para cada una de las muestras por duplicado, al utilizar las secuencias correspondientes a Integrina $\beta 1$ y Ciclofilina. Las gráficas muestran la emisión de fluorescencia, una vez sustraído el *background*, en función del número de ciclos. El *crossing point* de cada uno de los productos de PCR corresponde al número de ciclo en que se inicia la amplificación.

La especificidad de los productos de PCR se valoró monitorizando la adquisición de la curva de *melting* (Figura 40).

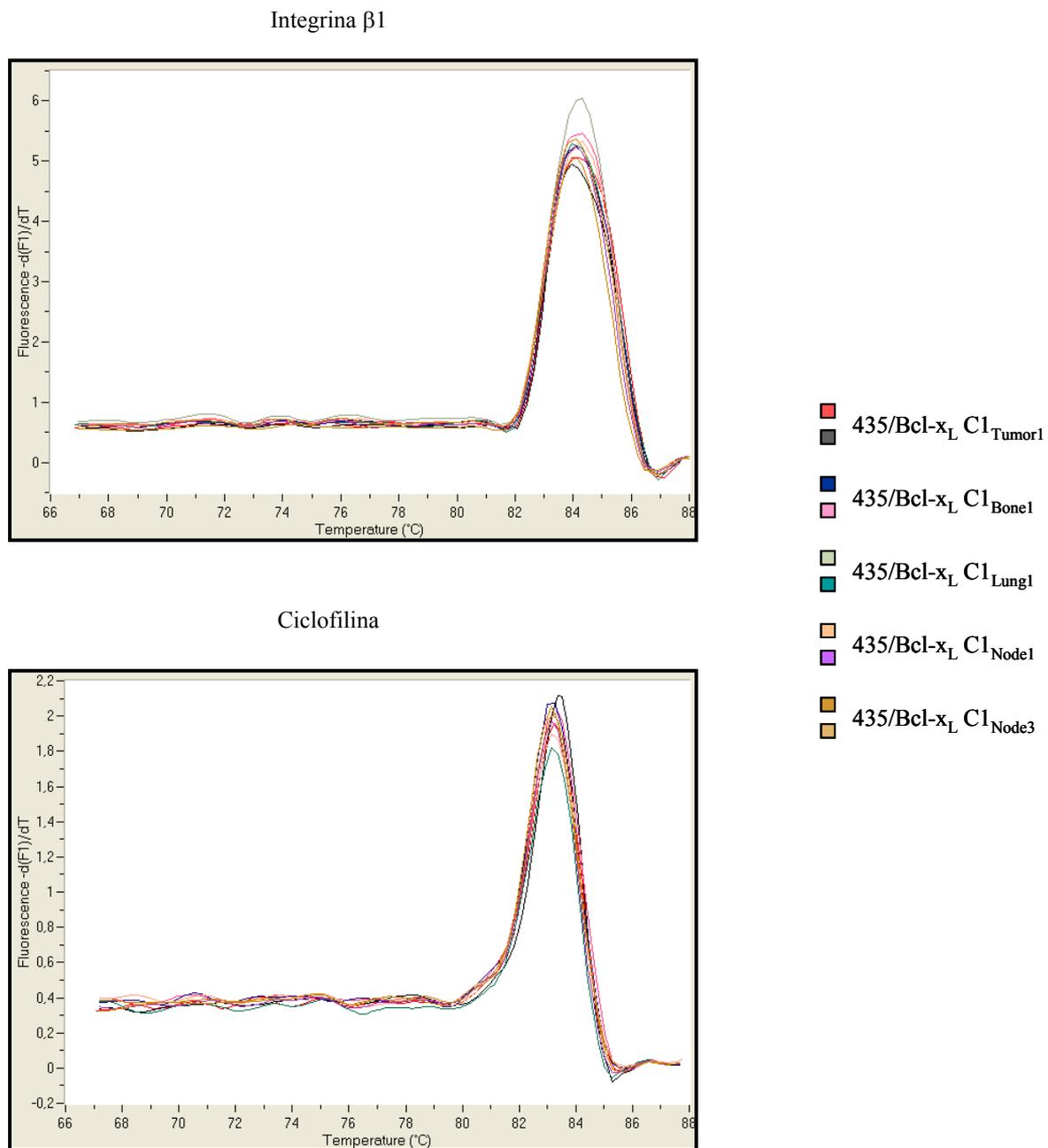


Figura 40. En la figura se representa un ejemplo de las curvas de *melting* obtenidas para la Integrina $\beta 1$ y la Ciclofilina. La detección de un único pico de amplificación indica la presencia de un producto de PCR mayoritario.

Para cada muestra se calculó una ratio entre el *crossing point* de cada uno de los genes estudiados y la Ciclofilina. En la Tabla 28 se muestran las ratios obtenidas, resultado de analizar por duplicado cada uno de los genes estudiados.

Tabla 28. Ratios obtenidas para cada uno de los genes estudiados en relación con los valores de ciclofilina. Las ratios se indican para cada una de las muestras estudiadas y son el resultado de analizar cada uno de los genes por duplicado.

	Integrina/ ciclofilina	Apolipoproteína D/ ciclofilina	Proteína G/ ciclofilina	Heat shock 70 kDa/ ciclofilina	C2 complemento/ ciclofilina
435/Bcl-x_L C1_{Tumor1}	0,84	0,90	1,35	1,12	0,77
435/Bcl-x_L C1_{Lung1}	0,66	0,98	1,73	1,45	0,88
435/Bcl-x_L C1_{Bone1}	0,64	0,95	1,89	1,38	0,93
435/Bcl-x_L C1_{Node1}	0,67	1,02	1,81	1,27	0,80
435/Bcl-x_L C1_{Node3}	0,69	1,06	1,87	1,48	0,78

Los resultados del análisis de la expresión de **integrina** indican que el *crossing point* es inferior en todas las metástasis (435/Bcl-x_L C1_{Lung1}=0,66; 435/Bcl-x_L C1_{Bone1}=0,64; 435/Bcl-x_L C1_{Node1}=0,67 y 435/Bcl-x_L C1_{Node3}=0,69) que en el tumor (435/Bcl-x_L C1_{Tumor1}), con un valor de 0,84, por tanto el nivel de expresión de este gen es superior en las metástasis en comparación con el tumor, aunque no hay diferencias entre ellas.

En el caso del **receptor LCR1** acoplado a proteína G, las ratios obtenidas en todas las metástasis son superiores (435/Bcl-x_L C1_{Lung1}=1,73; 435/Bcl-x_L C1_{Bone1}=1,89; 435/Bcl-x_L C1_{Node1}=1,81 y 435/Bcl-x_L C1_{Node3}=1,87) al valor obtenido en el tumor (435/Bcl-x_L C1_{Tumor1}=1,35). Estos resultados indicarían que este gen presenta un mayor nivel de expresión en el tumor que en las metástasis analizadas, por tanto reproduciría la infraexpresión asociada a la metástasis que se había observado en el *array*.

El análisis de los niveles de **apolipoproteína D** y componente **C2** del complemento muestra que en términos generales no existen diferencias en los valores de las ratios obtenidas para las diferentes muestras analizadas, no pudiendo validar el resultado del *array*.

En el caso de la **heat shock** 70 kDa proteína 1 la ratio obtenida para el tumor es de 1,12, y en el caso de la metástasis pulmonar estudiada (435/Bcl-x_L C1_{Lung1}) y una de las metástasis ganglionares estudiadas (435/Bcl-x_L C1_{Node3}) las ratios son superiores, siendo de 1,45 y 1,48 respectivamente, lo cual indicaría que el nivel de expresión de este gen es superior en el tumor que en las mencionadas metástasis, contrariamente a lo esperado.

V. Discusión

La apoptosis es un mecanismo fisiológico de muerte celular altamente conservado, y regulado por una compleja red de moléculas tanto inductoras como inhibidoras, que mantienen un delicado equilibrio entre ellas permitiendo conservar la homeostasis de los tejidos. La desregulación de la apoptosis está implicada en numerosas patologías, entre ellas el cáncer (Reed, 1999 a).

La glándula mamaria es uno de los órganos cuyo desarrollo está gobernado por cambios dinámicos en los perfiles de expresión de miembros de la familia de Bcl-2 que regulan la apoptosis. La influencia que las hormonas tienen en el proceso de apoptosis de las células del epitelio mamario y la desregulación de moléculas que controlan el ciclo de muerte celular, han sido ampliamente estudiados como elementos determinantes en el proceso de progresión tumoral del cáncer de mama (Kumar et al., 2000).

Alteraciones en la regulación de la apoptosis pueden contribuir a la carcinogénesis al alargar el periodo de supervivencia celular, ya que favorecerían la expansión de células neoplásicas por un mecanismo independiente al de la división celular (Altieri, 2001). Además, la desregulación de la muerte celular programada actuaría sobre el proceso de progresión tumoral creando un ambiente permisivo para la inestabilidad genética y la acumulación de mutaciones. Estas disfunciones pueden favorecer el crecimiento celular independiente de factores de crecimiento u hormonas, la supervivencia independiente del anclaje, reducir la dependencia de nutrientes y oxígeno, o conferir resistencia a fármacos y a radiación ionizante, entre otras ventajas (Reed, 1999 b).

La detección de múltiples alteraciones genéticas en las células tumorales, ya sea por fallos en el proceso de síntesis del DNA, o bien por fallos en los sistemas de reparación del material genético, hizo que se propusiera la existencia de un mecanismo subyacente de inestabilidad genética (Cahill et al., 1999). La heterogeneidad celular resultante es lo que permitiría que el proceso de progresión tumoral avance, mediante la selección de aquellas subpoblaciones celulares mejor adaptadas al entorno tumoral en que se encuentran (Sirivatanauksorn et al., 1999; Breivik, 2001).

En condiciones normales, las múltiples alteraciones genéticas presentes en las células tumorales, muchas de ellas afectando a genes críticos para la viabilidad celular, inducirían la muerte de la célula por apoptosis. Por lo tanto, la existencia de fallos en las vías que inducen

muerte celular puede ser uno de los mecanismos que contribuya a la inestabilidad genética propia de las células tumorales (Loeb y Loeb, 2000), permitiendo la supervivencia de células con alteraciones genéticas que podrían conferirles una ventaja selectiva, y así favorecer el proceso de progresión tumoral.

Como resultado del acúmulo de alteraciones genéticas que caracteriza el proceso de progresión tumoral, las células cancerosas sufren cambios a nivel de expresión génica en genes esenciales para mantener el funcionamiento normal de la célula (Zhang, 1999).

Teniendo en cuenta lo expuesto, en esta tesis nos planteamos la hipótesis de que la inestabilidad genética junto con la pérdida de apoptosis tienen un papel en el proceso de progresión tumoral del cáncer de mama. Con este motivo se estudió por un lado la existencia de un tipo concreto de inestabilidad, como es la inestabilidad de microsátélites, y por otro, se analizó el efecto que la sobreexpresión de moléculas antiapoptóticas tenía sobre el acúmulo de alteraciones genéticas en la progresión metastática de las células. Finalmente se decidió estudiar mediante la técnica de *microarrays* los posibles cambios de expresión génica responsables de la variabilidad metastática del cáncer de mama.

5.1 Asociación entre el *status* de apoptosis y la presencia de inestabilidad de microsátélites en carcinomas ductales infiltrantes de mama.

Existen numerosas evidencias de que la capacidad de las células tumorales para resistir señales apoptóticas es un factor importante en la progresión de los tumores (Reed, 1999 b; McCormick, 1999).

En estudios previos de nuestro grupo se observó que en carcinomas ductales de mama de estadio T₁, en ausencia de mutaciones de p53, la pérdida de apoptosis se correlacionaba con la presencia de metástasis en ganglios linfáticos (Sierra et al., 1996). La pérdida de apoptosis observada, era debida mayoritariamente a la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Sierra et al., 1998). En un 15% de tumores, negativos por IHQ tanto para Bcl-2 como para Bax, la ausencia de apoptosis podría ser debida a alteraciones en la proteína proapoptótica Bax, cuya expresión se ha visto reducida en aproximadamente un tercio de los tumores de mama metastáticos, asociándose a un peor pronóstico de las pacientes, mayor supervivencia celular y malignización de los tumores (Krajewski et al., 1995).

La mutación descrita en el gen *bax* (Rampino et al., 1997), afecta a una región de 8 guaninas consecutivas situadas en el tercer exón del gen e induce cambios en la pauta de lectura (*frameshift*), generándose un codón *stop* que conduce a la inactivación de la proteína por truncamiento de la misma. Esta alteración, inicialmente evidenciada en tumores con inestabilidad en las secuencias de microsátélites, pertenecientes al síndrome de Lynch, como colon, estomago y endometrio (Yamamoto et al., 1997; Ouyang et al., 1998; Ottini et al., 1998; Simms et al., 1998), así como en líneas celulares derivadas de leucemias y linfomas (Brimmell et al., 1998; Meijerink et al., 1998), nos hizo suponer que podría ser la responsable de la pérdida de apoptosis detectada en los tumores en los que tanto Bcl-2 como Bax eran negativos por IHQ.

5.1.1 Estudio de la existencia de mutaciones *frameshift* y del nivel de expresión de Bax.

Al estudiar si la pérdida de función de la proteína Bax podía ser debida a la existencia de mutaciones *frameshift*, ninguna de las muestras analizadas presentó alteraciones en la secuencia de 8 guaninas situada en el tercer exón del gen *bax*. Estos resultados estaban en concordancia con lo descrito en diferentes trabajos en los que se analizaba la presencia de esta

mutación en cáncer de mama (Walsh et al., 1998; Schmitt et al., 1999; Minobe et al., 1999). Aunque hasta el momento no se han descrito mutaciones que afecten a esta región del gen *bax* en tumores de mama, no se puede descartar su existencia en otras regiones del gen.

En nuestras muestras, al analizar los niveles de expresión de la proteína mediante western blot, se observó que en algunos casos había una disminución de su expresión que podría ser consecuencia de otro tipo de mutaciones.

Los resultados obtenidos sugieren que en cáncer de mama, al igual que sucede en otros tipos de tumores como páncreas, las mutaciones *frameshift* del gen *bax* no serían críticas en la etiopatogenia y el proceso de progresión tumoral de esta enfermedad.

En base a estos resultados, podríamos decir que en el carcinoma ductal infiltrante de mama sería Bcl-2 y no Bax quien regula mayoritariamente la disminución de apoptosis observada en los tumores. En concordancia con esto, se ha descrito que la pérdida parcial de función de la proteína Bax era inefectiva en la regulación de la apoptosis en el epitelio mamario, siendo la ganancia de función de Bcl-2 más efectiva que la disminución de Bax en reducir los niveles de apoptosis en estas células (Schorr et al., 1999; Shilkaitis et al., 2000). Por otra parte, y dado que se conoce que p53 es uno de los reguladores de la expresión de Bax (Simms et al., 1998), la inactivación de p53, algo que sucede frecuentemente en tumores de mama de alto grado, podría ser la responsable de la disminución de los niveles de la proteína Bax.

5.1.2 Análisis de la existencia de inestabilidad de microsatélites.

En cáncer de mama, a diferencia de lo que sucede en otros tumores como colon, el porcentaje global de tumores inestables es bajo, y varía considerablemente en función de las series estudiadas entre 0% y 30% (Paulson et al., 1996; Walsh et al., 1998; Minobe et al., 1999; Formantici et al., 1999). La variación en la incidencia de esta alteración depende del grupo de tumores analizados, el tipo de marcador utilizado, así como del criterio seguido para determinar cuando una muestra es inestable. Todos estos factores, junto con el alto grado de polimorfismo de las secuencias de microsatélites, hacen que en algunos tipos de tumores, entre los que se encuentra el cáncer de mama, la tasa de inestabilidad sea variable, y por lo tanto resulta difícil establecer el efecto que tiene en esta patología.

Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la existencia de inestabilidad de microsátélites y la pérdida de apoptosis en los tumores analizados. Como resultado de la mayor supervivencia celular se podría ver favorecida esta alteración.

Existen numerosas evidencias en la literatura de la relación entre pérdida de apoptosis e incremento de inestabilidad genética en las células tumorales (Wiese et al., 2002). La sobreexpresión de Bcl-2, que se asocia a la pérdida de apoptosis en la serie de tumores analizados, está implicada en fallos de los sistemas de reparación del material genético que contribuirían a aumentar la tasa de mutagénesis (Liu et al., 1997). De forma más genérica, Bcl-2 es capaz de conferir resistencia a diferentes agentes genotóxicos, como radiación ultravioleta, rayos γ o estrés oxidativo, y por lo tanto favorecería la supervivencia de células con daño genético, inducido por cualquiera de estos agentes, promoviendo la inestabilidad genética (Saintigny et al., 2001).

En nuestro caso, utilizamos 5 marcadores de microsátélites cuya utilidad para este tipo de análisis ya había sido previamente descrita en tumores colorrectales (González-García et al., 2000). De esta forma pretendíamos evitar posibles problemas derivados de la elección de los marcadores, ya que características como la longitud (mononucleótidos, dinucleótidos o trinucleótidos mayoritariamente), el tipo de bases que componen la repetición, el número de repeticiones, o la composición de bases de la región flanqueante influyen en la tasa de mutación de los microsátélites (Sturzeneker et al., 2000).

Sólo se consideraron inestables aquellas muestras que presentaron alteraciones con un mínimo del 40% de los marcadores analizados, los mismos criterios que se utilizan para valorar el cáncer colorrectal, que es donde está mejor establecida este tipo de alteración (Boland et al., 1998). Siguiendo estos criterios, detectamos inestabilidad en un 11,6% de los carcinomas ductales infiltrantes analizados, una cifra similar a la descrita por otros autores (Wooster et al., 1994; Dillon et al., 1997; Schmitt et al., 1999).

Dos formas de inestabilidad: mononucleótidos y dinucleótidos.

La inestabilidad detectada en los tumores analizados afectaba solamente a las secuencias de dinucleótidos. No se encontró ninguna alteración en las dos mononucleótidos analizados, al igual que tampoco se detectó ninguna alteración en el mononucleótido (G)₈ del gen *bax*.

En tumores gástricos también se ha detectado inestabilidad en dinucleótidos en ausencia de inestabilidad en mononucleótidos (Ottini et al., 1998). Estos resultados sugerirían la posible existencia de dos vías independientes para controlar la estabilidad de mono- y dinucleótidos.

En cáncer colorrectal, por el contrario, se ha establecido la existencia de dos tipos de inestabilidad de microsatélites, uno que afecta mayoritariamente a las secuencias mononucleotídicas y que parece ser indicativa de una forma más severa de inestabilidad (*high-frequency* MI), y otro tipo que induciría inestabilidad tan sólo en secuencias de dinucleótidos, considerada una forma más moderada de inestabilidad (*low-frequency* MI) (Boland et al., 1998; Perucho, 1999).

Con respecto a las características clínico-patológicas de los tumores, en nuestra serie no se observó correlación entre la incidencia de inestabilidad de microsatélites y el tamaño del tumor, la presencia de ganglios linfáticos afectados, el grado histológico, la edad o el *status* hormonal de las pacientes. Sin embargo, algunos autores han descrito una asociación entre la existencia de inestabilidad de microsatélites en los tumores y la afectación de ganglios linfáticos (De Marchis et al., 1997; Contegiacomo et al., 1995). Estas discrepancias hacen que se desconozca la relevancia que esta alteración puede tener en el proceso de progresión del cáncer de mama. Algunos estudios proponen un papel predominante en etapas tempranas de la progresión (Yee et al., 1994; Walsh et al., 1998), mientras que en otros casos se le atribuye una mayor relevancia en etapas más avanzadas de la carcinogénesis (Arzimanoglou et al., 1998).

La inestabilidad de microsatélites tampoco se asociaba con el *status* de la proteína p53, estos resultados coinciden con lo expuesto por Formantici en 1999, que tampoco encuentran ningún tipo de asociación entre la presencia de inestabilidad de microsatélites en tumores de mama y alteraciones en el gen supresor de tumor p53. A diferencia de lo descrito en mama, en tumores gástricos y colorrectales existe una asociación inversa entre p53 y la existencia de inestabilidad de microsatélites (Rampino et al., 1997). Los tumores MI⁺ se caracterizan por la ausencia, en la mayoría de casos de mutaciones en p53 (Simms et al., 1998). Estas diferencias entre tumores de mama y colorrectales sugerirían la existencia de dos vías independientes de progresión.

5.2 Acúmulo de alteraciones genéticas asociadas a la inhibición de la apoptosis en la progresión metastática del cáncer de mama.

Los resultados obtenidos en la primera parte del trabajo indicaban que existía una asociación entre la pérdida de apoptosis observada en los tumores y la existencia de un tipo concreto de inestabilidad, como es la inestabilidad de microsátélites. Para corroborar si la pérdida de apoptosis se podía asociar de forma genérica a la existencia de inestabilidad en el cáncer de mama, en la siguiente parte del trabajo se estudiaron las alteraciones que se establecían en un modelo experimental con células provenientes de carcinoma de mama humana en las que la apoptosis se inhibía mediante la sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L, para analizar posteriormente el efecto que dichas alteraciones podían tener en el proceso de progresión metastática de los tumores.

Para evaluar la inestabilidad genética se analizó mediante AP-PCR el número de alteraciones genéticas en las diferentes variantes celulares. Sin embargo, el simple hecho de que los tumores presenten un número elevado de alteraciones genéticas (daño genómico), no quiere decir que sean genéticamente inestables. La inestabilidad es por definición una tasa, y por lo tanto implica un aumento en la frecuencia de mutaciones, mientras que la existencia de mutaciones es un estado, no necesariamente causado por la inestabilidad genómica (Lengauer et al., 1998). Por lo tanto, en realidad no se puede determinar el nivel de inestabilidad genética de un tumor basándose únicamente en el número de alteraciones que éste tiene (Cahill et al., 1999). Pese a esto, y dado que los tumores presentan un número de alteraciones muy superior a lo explicable por la tasa de mutación normal de la célula, se acepta que las alteraciones genéticas detectadas son consecuencia de un mecanismo subyacente de inestabilidad genética. Por lo tanto, la medida global del daño genómico se puede utilizar como una estima representativa de la inestabilidad genética.

En este estudio se ha utilizado el GDF como medida del daño genómico, un índice obtenido mediante los experimentos de AP-PCR y que permite valorar la fracción de daño genómico en las diferentes variantes celulares analizadas. La AP-PCR es una técnica que de forma cuantitativa y reproducible permite detectar ganancias y pérdidas en la intensidad relativa de las bandas de una variante celular, en relación con una que se toma como referencia (Peinado et al., 1992).

La naturaleza arbitraria de la AP-PCR permite obtener un índice del daño genómico ponderado, ya que los fragmentos amplificados están distribuidos a lo largo de todo el genoma, de forma que los cromosomas más grandes están representados por un número de bandas mayor que los cromosomas más pequeños, esto hace de la **AP-PCR** una **técnica apropiada para obtener una estima global del daño genómico**, ya que variaciones entre las muestras, representan variaciones en los niveles relativos del DNA patrón. El *fingerprint* que se obtiene como resultado de la amplificación por AP-PCR se considera un cariotipo molecular del tumor y se llama amplotipo, ya que representa tanto las ganancias como las pérdidas alélicas (Arribas et al., 1999).

Los cambios más frecuentemente observados son los cambios en la intensidad de las bandas, que reflejan alteraciones en la composición alélica. Una disminución en la intensidad de una banda reflejaría pérdidas alélicas, lo cual podría ser debido a una deleción heterocigótica o a una translocación en un alelo que implique parte de la banda. Un incremento en la intensidad de una banda es consecuencia de una duplicación o multiplicación alélica. El límite inferior de detección de amplificaciones por AP-PCR sería al nivel de trisomías o tetrasomías, aunque muchas veces es difícil estimar el grado exacto de amplificación de una banda (Perucho et al., 1995).

La desaparición de una banda probablemente indica una deleción en homocigosis, mientras que una nueva banda podría ser resultado de una translocación o una mutación en el sitio de unión del *primer*. Las variaciones en el tamaño son indicativas de inserciones o deleciones en el DNA. Según el tamaño de la inserción o la deleción que afecta a la banda, habrá o no, amplificación (Navarro y Jorcano, 1999).

En nuestro caso tan sólo se han detectado cambios en la intensidad de las bandas analizadas, ya sea en forma de ganancias o de pérdidas de intensidad.

5.2.1 Sobreexpresión de moléculas antiapoptóticas y aumento del daño genómico.

Los resultados obtenidos ponen en evidencia que la sobreexpresión de genes antiapoptóticos induce un mayor número de alteraciones genéticas, ya que las células transfectadas con Bcl-2 o Bcl-x_L tienen un GDF mayor. En este sentido podríamos decir que la sobreexpresión de estas proteínas que inhiben apoptosis contribuyen a la inestabilidad genética que caracteriza a las células tumorales.

Existen numerosos indicios de que alteraciones en las vías normales de inducción de apoptosis generan inestabilidad genética en las células tumorales. Se ha demostrado que la sobreexpresión de Bcl-2 en la línea celular pro-mielocítica HL-60 era capaz de atenuar no sólo el proceso de muerte celular, sino también uno de los mecanismos de reparación del DNA (Liu et al., 1997). En concreto, la sobreexpresión de esta molécula antiapoptótica disminuía de forma significativa el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos en células irradiadas con UV, contribuyendo a fijar el daño no reparado y aumentar la tasa de mutagénesis. También se ha descrito que tanto Bcl-2 como Bcl-x_L son capaces de inhibir la vía de recombinación mediada por la proteína RAD51. La inhibición de este mecanismo de reparación del DNA inducía un aumento de 2.5 veces sobre la tasa de mutagénesis normal establecida por célula y por generación (Saintigny et al., 2001). Por otro lado, la recombinación inducida por la rotura de doble cadena de DNA (DSB: DNA *double-strand breaks*) es entre 3 y 4 veces superior en células que sobreexpresan la molécula antiapoptótica Bcl-x_L. Algunos de los efectos tanto de Bcl-2 como de Bcl-x_L sobre la reparación del DNA sólo se han detectado en presencia de mutaciones de p53, este hecho sugiere la existencia de mecanismos de cooperación entre estas proteínas (Wiese et al., 2002). Puesto que las células 435 tienen p53 mutado, la atenuación de la reparación del DNA por la sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-x_L podría ser un mecanismo plausible que explicaría el aumento de inestabilidad que estas moléculas inducen.

Los resultados también indican que el comportamiento de los dos genes antiapoptóticos es diferente, ya que la sobreexpresión de Bcl-2 era la que inducía un mayor número de alteraciones, tanto a nivel de ganancias como de pérdidas alélicas, y el acúmulo de alteraciones genéticas que se establece en las variantes celulares 435/Bcl-2 es superior al de las variantes 435/Bcl-x_L.

Los niveles de expresión de Bcl-2 y Bcl-x_L no siempre van en paralelo. Un ejemplo de esto es que en cáncer de mama la sobreexpresión de Bcl-2 se asocia a tumores de bajo grado histológico, mientras que Bcl-x_L se encuentra preferentemente en tumores de alto grado histológico (Sierra et al., 1998).

La sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-x_L no sólo es capaz de inducir un mayor número de alteraciones genéticas en las células transfectadas, sino que el tipo de alteraciones en estas líneas es diferente al de las células transfectadas con *neo*. Los resultados obtenidos al hacer el análisis filogenético de las líneas transfectadas con respecto a la línea parental, a partir de la

que originalmente se obtuvieron, indicaban que los transfectantes con genes antiapoptóticos tenían un parentesco más cercano, originado por una mayor similitud de las alteraciones genéticas detectadas por AP-PCR, mientras que las alteraciones de la línea transfectada con *neo* presentaban un mayor grado de divergencia, indicando que el tipo de alteraciones detectadas era diferente.

5.2.2 Acúmulo de alteraciones genéticas durante el proceso de progresión tumoral del cáncer de mama.

La inhibición del proceso de muerte celular puede permitir que la existencia de mutaciones se mantenga en las células afectadas y en toda su progenie, y de esta forma contribuir a la progresión tumoral (Wiese et al., 2002).

El análisis del GDF en las variantes tumorales y metastáticas analizadas evidenciaba que los sucesivos pases *in vivo/in vitro* seleccionaban células con más alteraciones que los transfectantes con los que se inducía el primer tumor. Este fenómeno era compartido por las células que sobreexpresaban Bcl-2 y Bcl-x_L y las células control. Así globalmente, tras el primer implante ortotópico, las variantes tumorales tenían más alteraciones que los transfectantes a partir de los que se derivaron, y las de la tercera generación tenían más alteraciones que las de la primera.

En todos los casos las metástasis tenían un GDF mayor que los tumores a través de los cuales se habían generado. Esto nos hace concluir que, independientemente a la sobreexpresión de genes antiapoptóticos, el proceso metastático lleva asociado un aumento en el número de alteraciones genéticas.

Cabe resaltar que el reagrupamiento mediante *clusters* de los resultados obtenidos al analizar las bandas de AP-PCR mostraba la presencia de al menos 3 zonas donde las alteraciones tenían una distribución común para las variantes tumorales y metastáticas de los transfectantes 435/Bcl-2 y 435/Bcl-x_L, diferentes a las variantes tumorales y metastáticas obtenidas con el control, predominando de forma alternativa las ganancias o las pérdidas de intensidad.

Como conclusión podríamos decir que a consecuencia de los distintos pases *in vivo/in vitro*, si bien se consigue una variabilidad genética, con aumento del daño genético en las células que sobreexpresan genes antiapoptóticos y en las células control, estas alteraciones están localizadas en distintas zonas cuando se comparan entre sí.

Existen otras evidencias que asocian el acúmulo de alteraciones con el desarrollo y la progresión del cáncer de mama. Se ha descrito que la frecuencia de pérdidas de heterocigosis (LOH) era superior en las metástasis que en los correspondientes tumores primarios (Hampl et al., 1999). Estos resultados sugieren que el aumento de inestabilidad genética detectado en las metástasis favorecía la progresión tumoral. También la frecuencia de alteraciones que muestra el análisis de LOH en los cromosomas 3p, 13q, 16q y 17, así como la amplificación del oncogen *erbB2*, era superior en los tumores de mama con afectación ganglionar que en los no metastáticos (Sato et al., 1991). Por otro lado, el análisis mediante hibridación genómica comparada (CGH) de tumores primarios de mama y sus correspondientes metástasis muestra que el número de alteraciones detectadas exclusivamente en metástasis era superior al detectado en los tumores (Nishizaki et al., 1997). Todos estos trabajos indican que, **en cáncer de mama el acúmulo de alteraciones genéticas va en paralelo con el incremento de malignidad.**

Un tipo concreto de inestabilidad, como es **la inestabilidad** cromosómica mediada por roturas de doble cadena (DSB) **contribuye de forma determinante a la progresión del cáncer de mama** (Shen et al., 2000). Estos autores han descrito que la proporción de *loci* con LOH aumentaba a medida que progresaba el tumor, y de forma secuencial se detectaban alteraciones en *loci* implicados en mantener la estabilidad del genoma, lo cual podría favorecer el acúmulo de otras alteraciones y la progresión hacia un fenotipo de mayor malignidad. Por otro lado, trabajos recientes han mostrado la implicación de la sobreexpresión de la molécula antiapoptótica *Bcl-x_L* en la conversión génica inducida por DSB, relacionando así la pérdida de apoptosis con el incremento de inestabilidad (Wiese et al., 2002).

La inestabilidad genética característica de las células tumorales puede ser debida a diferentes factores. En tumores primarios de mama, al igual que en otros tipos de tumores, se ha demostrado que la pérdida de función de *p53*, contribuye a incrementar la inestabilidad genética y el acúmulo de diferentes alteraciones (Eyfjörd et al., 1995). En células de cáncer de mama fallos en los mecanismos de replicación del DNA (Sekowski et al., 1998), y defectos tanto estructurales como funcionales en el centrosoma pueden contribuir a segregaciones cromosómicas anómalas y a aneuploidía induciendo inestabilidad (Lingle et al., 1998). También, la pérdida de adhesión de las células tumorales podría incidir sobre la inestabilidad

genética, como consecuencia de la disminución de algunos de los *checkpoints* del ciclo celular, encargados de detectar daño en el DNA (Tlsty, 1998).

La asociación entre acúmulo de alteraciones genéticas y progresión tumoral no se limita sólo a los tumores de mama. Estudios en melanoma mediante CGH, comparando el número de desequilibrios genéticos entre tumores primarios y metástasis, mostraban que el número medio de cambios genéticos era de 6,3 en los tumores primarios y de 7,8 en las metástasis, asociándose el acúmulo de múltiples alteraciones genéticas a una mayor agresividad (Balázs et al., 2001). De la misma forma, en la progresión del carcinoma bronquial el número de alteraciones cromosómicas también aumenta significativamente desde las lesiones premalignas hasta las de grado más avanzado, evidenciando así el acúmulo de daño genómico (Thiberville et al., 1995).

El hecho de que en diferentes tipos de tumores el acúmulo de alteraciones genéticas se asocie con el proceso de progresión tumoral refuerza la teoría propuesta inicialmente por Foulds, de que el cáncer es un proceso *multistep* caracterizado por la acumulación sucesiva de alteraciones que favorecen el crecimiento y la progresión (Yokota, 2000).

Finalmente, nuestros resultados indican que no hay diferencias en cuanto a ganancias (GF) y pérdidas (LF) de material genético, ya que en términos generales, el daño genómico se da en ambos sentidos. Esta misma tendencia se ha descrito en tumores de próstata, donde el incremento de inestabilidad genética que se asocia a la progresión tumoral implica tanto ganancias como pérdidas (Alers et al., 2000), a diferencia de los sarcomas en los que predominan las ganancias de material genético sobre las pérdidas (Popov et al., 2001).

5.2.3 Relación entre inestabilidad genética y capacidad tumorigénica y metastática.

La tumorigénesis de las células, al igual que la inestabilidad genética, aumenta con los sucesivos pases *in vivo/in vitro*. Se acorta el período de aparición del tumor tras el implante ortotópico de las células en el segundo y tercer implante respecto al primero, aumentando finalmente el volumen de los tumores. Podríamos decir que la inestabilidad genética se correlaciona con una mayor capacidad tumorigénica, en las células que expresan proteínas antiapoptóticas y en el control.

Las diferencias que existen entre las células que sobreexpresan Bcl-2 y Bcl-x_L y las células control en cuanto a tumorigénesis se evidencia ya en el primer implante. De forma que la inhibición de la apoptosis sería importante para el desarrollo inicial del tumor y los sucesivos pases seleccionarían células que ya han adquirido mayor capacidad proliferativa o mejor adaptadas al crecimiento ortotópico.

Curiosamente, la actividad metastática de los tumores sólo se incrementa en aquellos que sobreexpresan Bcl-2 o Bcl-x_L, haciéndose evidente en el primer implante y aumentando progresivamente en los sucesivos pases *in vivo/in vitro*. La capacidad metastática de los tumores control no varía significativamente en las distintas generaciones.

Esto indicaría que sólo una parte de las alteraciones detectadas por AP-PCR implican realmente una ventaja selectiva para la célula tumoral e intervienen en el fenotipo metastático, no siendo el número de alteraciones proporcional al efecto biológico que puede producirse sobre la metástasis, ya que las variantes tumorales con mayor incidencia de tumores y metástasis no son las que presentan un mayor número de alteraciones

En este sentido, tampoco la inestabilidad de microsatélites que detectamos en el grupo de carcinomas ductales infiltrantes se asociaba con la presencia de metástasis ganglionares en las pacientes; ni con otros parámetros clínico-patológicos clásicos de progresión, como son, el grado histológico de los tumores o la edad de las pacientes.

Existen otros estudios en los que la inestabilidad genética no se correlaciona con un incremento del potencial metastático. En un modelo de melanoma murino se describió que una línea altamente metastática, capaz de inducir 10 veces más metástasis pulmonares y otra pobremente metastática, tenían el mismo grado de inestabilidad cromosómica. En ese mismo trabajo los autores describieron líneas con una marcada diferencia de inestabilidad cromosómica, pero con el mismo potencial metastático (Kendal et al., 1987).

Esta falta de correlación también podría ser debida a la existencia de alteraciones a nivel de expresión génica o bien alteraciones de tipo epigenético no detectadas con la técnica utilizada. En este sentido los resultados de Phillips y colaboradores demuestran que al intentar correlacionar los cambios de expresión detectados por *microarrays* con la presencia de desequilibrios cromosómicos, sólo un 50% de los genes desregulados mapaban en regiones cromosómicas afectadas (Phillips et al., 2001).

De todas las alteraciones presentes en un tumor algunas son aleatorias (*random*), mientras que otras son no aleatorias (*non-random*), y son las que realmente determinan el proceso de progresión tumoral (Hashimoto et al., 2001).

Puesto que el análisis mediante *clusters* mostraba la presencia de al menos 3 zonas donde el tipo de alteraciones presentes en las líneas transfectadas con los genes antiapoptóticos y con el gen control eran divergentes, predominando de forma alternativa las ganancias o las pérdidas de intensidad, se podría especular que la sobreexpresión de genes antiapoptóticos es capaz de conferir de entrada alguna ventaja selectiva, favoreciendo el crecimiento y posterior expansión clonal, mientras que en el caso de los transfectantes con *neo* las alteraciones detectadas serían aleatorias y con una menor repercusión biológica.

El análisis filogenético de variantes tumorales y metastáticas derivadas de la línea 435/Bcl-x_L C1, mostraba que los tumores aparecían en una rama independiente a la de las metástasis. Estos resultados indican que el tipo de alteraciones detectadas en los tumores difiere del detectado en las metástasis, sugiriendo que el fenotipo metastático se asocia a la adquisición de determinadas alteraciones genéticas. De hecho, en cáncer de mama se han detectado alteraciones genéticas específicas de metástasis, como la pérdida de heterocigosis en el cromosoma 16q, indicando la posible existencia de algún gen supresor en ese *locus* (Lindblom et al., 1993). De la misma manera, la familia de genes *nm23* está implicada directamente en suprimir la actividad metastática de las células tumorales. La pérdida de expresión de Nm23 se asocia con una mayor agresividad de los tumores de mama, ya que se correlaciona con menor supervivencia y presencia de metástasis ganglionares (Hartsough et al., 2001). También en tumores de próstata se ha detectado una correlación entre la presencia de determinadas alteraciones genéticas y el fenotipo metastático (Akers et al., 2000).

La inestabilidad es, como ya se ha dicho fuente de heterogeneidad, una característica de los tumores que permite la selección y posterior crecimiento de aquellos linajes celulares mejor adaptados al entorno tumoral en que se encuentran (Nowell, 1986). La divergencia encontrada entre los transfectantes y el tumor, y posteriormente entre los tumores y las metástasis indicarían que la selección clonal se da a lo largo de todo el proceso metastático, y que tanto, a nivel tumoral como en la propia metástasis, la heterogeneidad existente se traduce en la selección de aquellos clones mejor adaptados. Estos resultados también muestran que en el

proceso de progresión metastática hay un incremento de inestabilidad genética sesgada, probablemente por ese proceso de selección que culminará en el fenotipo metastático.

En este contexto, la sobreexpresión de genes antiapoptóticos podría actuar a través del aumento de la supervivencia celular como desencadenante de una mayor inestabilidad, o incidir en una mejor adaptación al microentorno, en los dos casos con resultado final de aumentar la habilidad metastática de las células.

5.2.4 Variabilidad genética y localización de las metástasis.

La variabilidad intratumoral y los diferentes perfiles moleculares que caracterizan al cáncer de mama podrían ser resultado de la heterogeneidad genética producida por la inestabilidad genética, propia de las células tumorales (Sirivatanauksorn et al., 1999). Esta heterogeneidad clonal es la que detectamos al analizar el daño genómico (GDF) en las diferentes variantes celulares, tanto tumorales como metastáticas, en relación con la línea parental, poniendo de manifiesto la gran variabilidad genética existente. En un momento dado, estas variantes celulares pueden desarrollar una ventaja proliferativa favoreciéndose la expansión de un clon genéticamente mejor adaptado (Heppner y Miller, 1998). Esta ventaja de crecimiento se puede dar en las etapas tempranas, por lo que el incremento de alteraciones genéticas que detectamos a medida que avanza el proceso de selección, tanto en tumores como en metástasis, podría ser resultado de una expansión clonal en etapas iniciales y, como resultado final de esta selección puede desarrollarse el fenotipo metastático de los tumores.

Los tumores sólidos inducen la aparición de metástasis en órganos distantes de forma selectiva (Morikawa et al., 1988). La organoespecificidad del proceso metastático podría estar determinado por las características oncogénicas de las células y las interacciones que se establecen entre las células tumorales y el microentorno del órgano diana (Ree et al., 1999).

Pulmón, hueso y ganglios linfáticos, son algunos de los órganos en los que preferentemente metastatiza el cáncer de mama. En las células metastáticas de distinto órgano de procedencia, el análisis del daño genómico indicaba que, de forma reiterada a lo largo del proceso de selección, la relación entre las alteraciones genéticas del tumor y las metástasis cambiaba, en función del órgano en el que se habían desarrollado las metástasis. Así, las metástasis

pulmonares presentaban un mayor número de alteraciones genéticas respecto al tumor de origen, mientras que las ganglionares eran las que divergían menos. En el caso en que se obtuvo metástasis ósea, el daño genómico era intermedio al detectado en pulmón y ganglio.

El análisis filogenético de todas estas metástasis mostraba un mayor grado de parentesco entre la metástasis pulmonar y ganglionar, que con la metástasis ósea, con la que compartían menos alteraciones. La mayor similitud desde el punto de vista filogenético indica que el tipo de alteraciones son más parecidas entre si, y por lo tanto que algunos de los cambios genéticos que facilitan la metástasis pulmonar y ganglionar son comunes.

Las diferentes alteraciones genéticas que muestran las variantes metastáticas respecto al tumor, podría ser debido a la particular presión selectiva ejercida por el microentorno en cada uno de los órganos diana. De hecho, la colonización metastática en el órgano diana está influenciada por la comunicación entre las células tumorales circulantes y factores del propio órgano. Un ejemplo de esto son las quimioquinas, factores de crecimiento (*growth factor-like molecules*) que se unen a receptores acoplados a proteína G, utilizadas por los leucocitos para alcanzar órganos específicos (Liotta y Kohn, 2001). Recientemente, se ha demostrado como células de cáncer de mama podrían emplear estas moléculas para metastatizar de forma específica en órganos distantes (Muller et al, 2001).

El microentorno tumoral se caracteriza por ser una zona hipóxica, con pH ácido, y bajos niveles de glucosa y de otros nutrientes. Estas y otras condiciones metabólicas podrían favorecer la inestabilidad genética, aumentando la tasa de daño en el DNA (Reynols et al., 1996). Todas estas coincidencias ambientales ejercerían una presión selectiva sobre las células tumorales, de modo que sólo crecerían aquellas variantes celulares con un determinado *background* genético que pudiera adaptarse mejor al microentorno (Rubin, 2001).

5.3 Expresión génica diferencial entre variantes metastáticas con distinta localización.

Los resultados obtenidos tras analizar el daño genómico mediante AP-PCR, mostraban una variabilidad genética de las metástasis relacionada con el órgano de procedencia, tanto por el

número de alteraciones detectadas como por la naturaleza de las mismas. Los análisis filogenéticos mostraban además que el tipo de alteraciones detectadas en tumores y metástasis parecía ser diferente. Por esos motivos, decidimos estudiar que cambios en la expresión génica eran relevantes para determinar la organoespecificidad de las metástasis.

Para ello, analizamos mediante *arrays* la expresión diferencial que presentaban las variantes metastáticas de pulmón, hueso y ganglio respecto a las células del tumor, y entre sí. Seleccionamos las células del tumor 435/Bcl-x_L C1 y sus variantes metastáticas para este estudio, porque representaban la mayor diversidad metastática con la que contábamos.

Estos análisis se hicieron mediante *microarrays*, una técnica que permite realizar estudios de expresión diferencial a gran escala, analizando simultáneamente la expresión de miles de genes. En nuestro caso se valoró la expresión de cerca de 4000 genes humanos conocidos.

Esta tecnología está todavía en desarrollo, por lo que quedan muchos aspectos por mejorar y consensuar entre los diferentes laboratorios. Algunas de estas cuestiones son de carácter técnico y otras hacen referencia a la infraestructura bioinformática necesaria para analizar de forma apropiada la información generada ya que, en gran medida, el resultado final depende del tratamiento estadístico de los datos. El hecho de que se trate de una técnica todavía muy novel hace que no estén bien definidas las estrategias a seguir, y los criterios y el método de análisis utilizados varían en función de los trabajos.

¿Cuál es el criterio para considerar que un gen está diferencialmente expresado?, en algunos casos el criterio seguido es muy estricto, seleccionando de entrada genes con una ratio de 10, y en función de los resultados obtenidos van disminuyendo la magnitud de la ratio (Nacht et al., 1999; Trenkle et al., 1998). En otros trabajos los autores trabajaban directamente con ratios de 1.5 (Walker y Rigley, 2000). Nosotros establecimos como criterio para considerar que un gen estaba sobreexpresado una ratio igual o superior a 2 ($\log_2 \geq 1$), y para seleccionar genes infraexpresados una ratio igual o inferior a -2 ($\log_2 \leq -1$) (Dopazo et al., 2001). De todas formas, no existe un criterio claro sobre cual debe ser la ratio que delimita la existencia de genes diferencialmente expresados, ya que la fiabilidad de las ratios escogidas depende de los valores absolutos de intensidad, y también puede variar entre *spots* debido a la diferente eficacia de hibridación a lo largo del *array* (Brazma y Vilo, 2000).

Una vez establecidos los criterios para determinar que genes habían modificado su expresión, decidimos eliminar los puntos que por su baja intensidad podían ser más susceptibles de error,

seleccionando sólo aquellos cuya intensidad, al restar de cada una de las metástasis el valor del tumor, fuera 10 veces superior al *background* de la membrana (Walker y Rigley, 2000).

En nuestro caso, la utilización de este tipo de tecnología nos ha permitido seleccionar un grupo de genes potencialmente asociados a actividad metastática y organoespecificidad de las metástasis. Siendo necesario utilizar una técnica alternativa para confirmar los resultados obtenidos, disponer de varias réplicas del experimento para eliminar falsos positivos y negativos, así como validar los resultados en muestras humanas.

5.3.1 Identificación de genes asociados a la actividad metastática de las células.

Los genes asociados a actividad metastática serían aquellos que aparecían diferencialmente expresados, respecto al tumor de origen, en las cuatro variantes metastáticas analizadas. Interpretaríamos esta variabilidad como cambios que por su persistencia, serían importantes en la adquisición del fenotipo metastático.

Entre estos genes, hay que diferenciar los que encontramos **sobreexpresados** como es el caso del colágeno tipo VI $\alpha 2$. Este gen, localizado en el cromosoma 21q22.3, codifica una de las tres cadenas de colágeno tipo VI, que forman los filamentos de colágeno en el tejido conjuntivo. Se encuentra principalmente en tejido muscular, cartílago, trabéculas óseas, piel y cerebro. El producto de este gen contiene diferentes dominios de unión a proteínas de la matriz extracelular, por lo que está implicado en la organización de los componentes de la matriz (<http://genome-www.stanford.edu>).

El colágeno tipo VI $\alpha 2$ se ha relacionado con el proceso de progresión tumoral, aunque según el tipo de tumor su nivel de expresión varía. Mientras que las células de melanoma lo sobreexpresan (Daniels et al., 1996; Van Duinen et al., 1994), en fibrosarcomas no se detecta expresión (Trueb y Odermatt, 2000). En el caso del cáncer de mama, se ha descrito que la expresión de esta molécula estaba incrementada en el estroma de carcinomas de mama masculinos (Magro, et al., 1994). Queda por determinar el papel que esta molécula tiene en la progresión metastática del cáncer de mama. Como integrante de la matriz extracelular, se le ha supuesto una acción en el mantenimiento de la estructura del tejido conectivo, en este sentido sería interesante analizar su función en los procesos de migración, anclaje y adaptación de las células tumorales a otros tejidos.

Trabajos recientes de análisis de expresión diferencial mediante *arrays* han descrito la presencia de este gen en los patrones de expresión de células de epitelio mamario sometidas *in vitro* a distintos tratamientos (Perou et al., 1999), y entre los genes analizados en un *array* con el que definían patrones de expresión de una colección de 60 líneas celulares humanas (Ross et al., 2000).

La otra molécula que encontramos consistentemente sobreexpresada en todas las metástasis es el gen MCT3. Este gen, localizado en el cromosoma 22q12.3-q13.2 pertenece a una familia de transportadores de monocarboxilato (*proton-coupled monocarboxilate transporter*) que se expresan en hueso, membrana sinovial, placenta y colon. También se ha descrito expresión en el epitelio pigmentado de la retina (Yoon et al., 1999). La proteína se integra en la membrana plasmática y cataliza el transporte rápido a través de la misma de monocarboxilatos como lactato, piruvato, ácidos derivados de leucina, valina e isoleucina, y cuerpos cetónicos (<http://genome-www.stanford.edu>). Los monocarboxilatos juegan un papel central en el metabolismo celular y la comunicación metabólica entre tejidos (Halestrap y Price, 1999). Su expresión diferencial se ha evidenciado utilizando la técnica de *microarrays* para catalogar distintos carcinomas (Su et al., 2001) y tejidos normales (Su et al., 2002), aunque de momento se desconoce el papel que esta proteína podría tener en cáncer, y más específicamente en la actividad metastática de las células de cáncer de mama.

Algunos de los genes detectados como **infraexpresados** están implicados en el control de la transcripción, es el caso del factor 172 asociado a TBP (TAF-172), la *zinc finger 5 protein* (ZF5) y el factor de transcripción para la α 1-fetoproteína.

El factor TBP es un componente del complejo proteico que coordina las actividades de transcripción iniciadas por la RNA polimerasa II. El gen localizado en el cromosoma 6q27, codifica una proteína de unión a la caja TATA, y forma complejos proteicos con los factores asociados a TBP (TAFs), es por lo tanto un componente central de la maquinaria de transcripción eucarita (Van Der Knaap et al., 2000). El factor TAF-172 mediante la energía de la hidrólisis del ATP induce la liberación del factor TBP del DNA (Chicca et al., 1998). La especificidad de la transcripción es debida en parte a los diferentes factores TAF, así TAF-172 no sólo activa la transcripción a través de polimerasa III, sino que también inhibe la unión de

TBP a la caja TATA, reprimiendo la transcripción inducida por la polimerasa II (Taggart et al., 1992).

Es de suponer que alteraciones en la expresión de esta proteína tenga repercusiones en el control transcripcional de gran cantidad de genes. En *Saccharomyces cerevisiae* el homólogo de TAF-172, Mot-1, activa y reprime la transcripción por un mecanismo ATPasa-dependiente afectando a un 3% de genes en células *in vitro*, la mayoría de ellos infraexpresados. De estos, el 77% están relacionados con los mecanismos de respuesta al estrés y esporulación (Dasgupta et al., 2002). La infraexpresión de TAF-172 en células metastáticas podría implicar una activación transcripcional de diversos genes.

TAF-172 se ha encontrado infraexpresado en los patrones de expresión obtenidos mediante *arrays* para catalogar células epiteliales y carcinomas de mama (Perou et al., 1999), además se ha descrito que algunos de los genes de las proteínas TAF mapan frecuentemente en regiones cromosómicas alteradas en neoplasias humanas (Van Der Knaap et al., 2000).

El otro factor de transcripción que aparece infraexpresado en todas las metástasis es la *zinc finger 5 protein (ZF5)*. Este gen localizado en el cromosoma 18pter-p11.2, codifica un factor de transcripción altamente conservado que contiene 5 dedos de Zn en su extremo N-terminal (Cathomen et al., 2001), expresado en tejido conectivo, cóclea, hueso, útero y endometrio.

ZF5 se describió inicialmente como un represor transcripcional del promotor murino de *c-myc* (Yanagidani et al., 2000), posteriormente se ha visto que también está implicado en la represión del promotor HSV timidina quinasa, y la activación del virus HIV (Numoto et al., 1999).

La expresión diferencial de este gen se ha observado en *microarrays* de DNA en los que se analizaban cambios de expresión de macrófagos humanos en respuesta a diferentes bacterias (Richmond et al., 2002). La identificación mediante *arrays* de genes asociados a linfomas de células B ha dado como resultado las variaciones en este gen cuya infraexpresión se detecta principalmente en células B de sangre periférica activadas (Alizadeh et al., 2000).

Aunque proteínas de dedos de zinc se han descrito diferentemente expresadas en carcinomas incluido el de mama, ésta en concreto no la hemos encontrado referenciada en las bases de datos. Dado que actúa como un represor del oncogen *c-myc*, que se encuentra amplificado o sobrepresado en más del 50% de los carcinomas de mama, y que nuestras células son portadoras de dicha amplificación, un análisis más profundo puede ser de gran interés para establecer la causa-efecto de esta asociación.

También detectamos como infraexpresado el factor de transcripción de la α 1-fetoproteína, localizado en el cromosoma 1q32.1 (Galarneau et al., 1998), el cual está implicado en la regulación de genes de la ruta de biosíntesis de ácidos biliares (Del Castillo y Gil, 2000). La proteína se localiza en el hipotálamo, hígado, bazo, músculo esquelético, páncreas y glándulas adrenales. Su función molecular está ligada a la transcripción con actividad específica en hígado, pancreas y desarrollo embrionario (<http://genome-www.stanford.edu>).

Se encuentra infraexpresado en las células de cáncer de mama de origen humano HBA y en algunas células epiteliales y de cáncer de mama de pacientes analizadas mediante *microarrays* (Perou et al., 1999). No obstante, desconocemos la función que puede tener en la progresión de la enfermedad.

La pérdida de expresión de estos factores de transcripción afectará a todos aquellos genes que estén bajo su control de transcripción, y esto podría tener relevancia dentro del proceso tumoral. Particularmente la infraexpresión de factores inhibidores de la transcripción podría ser un mecanismo a través del cual multitud de genes se activen, pudiendo estar implicados en el remodelamiento de la cromatina previo al inicio de la transcripción (Fry y Peterson, 2002).

Otro de los genes que detectamos como infraexpresado en las variantes metastáticas, y que posteriormente se confirmó mediante PCR cuantitativa, fue el receptor LCR1 acoplado a proteína G (*G protein-coupled receptor LCR1 homolog*), también conocido como CXCR4. Este gen localizado en el cromosoma 2q21, se expresa en linfocitos T, leucocitos de sangre periférica, bazo, timo, placenta, hígado, corazón o cerebro (Wong et al., 1996). Bioquímicamente, la proteína funciona como un receptor para el ácido lisofosfatídico que interviene en la señalización intercelular, activando fosfolipasa C, actúa sobre la reorganización de la actina del citoesqueleto, estimula la proliferación celular e inhibe las uniones intercelulares GAP (Fukushima y Chun, 2001).

El receptor de quimioquinas CXCR4 tras unión de su ligando induce un aumento de los niveles intracelulares de calcio. Promueve la hematopoyesis, la vascularización y la diferenciación neuronal. En humanos se ha visto la expresión embrionaria de este receptor en corazón y en vasos sanguíneos en desarrollo, sugiriendo que este sistema de señalización podría participar en la migración de precursores endoteliales durante la angiogénesis embrionaria, y en la migración y proliferación de células endoteliales durante la neoangiogénesis en adultos (Devic et al., 1999).

Müller (2001) subrayó la importancia de las quimioquinas en la localización organoespecífica de la metástasis del cáncer de mama. En comparación a las células del epitelio normal, las células cancerosas tenían una dotación del receptor CXCR4 superior, y la quimioquina CXCL12 que lo reconoce se libera en grandes cantidades sólo en médula ósea, hígado y pulmón, lo que condicionaría la distribución final en los diferentes órganos. La quimioquinas se unen de forma específica al receptor, y esta unión desplaza a la proteína G del receptor al espacio intracelular, iniciándose la cascada de señalización que causa la adhesión específica de las células (Murphy, 2001). De forma que una combinación de quimioquina, receptor de quimioquina y moléculas de adhesión formarían un código temporo-espacial que determina la migración y el destino celular.

Los experimentos de *microarrays* que detectan variaciones en la expresión de este gen, lo encuentran infraexpresado en linfocitos T activados y algún linfoma, aunque en la mayoría no hay modificaciones. La sobreexpresión la evidencian en linfocitos T quiescentes activados (Alizadeh et al., 2000). También Su (2001) reporta tanto infra como sobreexpresión en las líneas derivada de cáncer de mama y colon, e infraexpresión en todos los tumores de próstata, y cáncinomas de pulmón. En una colección de diversos tejidos humanos, los mismos autores (Su et al., 2002), describen una infraexpresión de este gen en cerebro, y una clara sobreexpresión en extractos de células sanguíneas, sin que se detecten variaciones consistentes en otros tejidos. Esto hace pensar en que la expresión de estas proteínas puede tener cierta especificidad de tejido.

El gen LECT2 (*leukocyte cell-derived chemotoxin 2*) detectado como infraexpresado, mapa en la región 5q31.1-q32, una región donde se localizan numerosos genes de citoquinas como IL-4, IL-5 e IL-9. Su función está ligada a la actividad quimiotáctica de los neutrófilos, el crecimiento y la diferenciación de células mieloides, expresándose de forma específica en el hígado fetal y testículo (Yamagoe et al., 1998). También mediante *arrays* se detecta una clara sobreexpresión de LECT2 en hígado fetal y menor en testículo (Su et al., 2002). Es un regulador positivo de la proliferación de condrocitos durante el desarrollo del esqueleto, habiéndose relacionado con el ciclo celular y el proceso de reparación tras daño genético en numerosos tipos celulares (Nagai et al., 1998).

La proteína LECT2 es sintetizada por los hepatocitos, y su expresión disminuye a medida que avanza el proceso de progresión tumoral hepática (Uchida et al., 1999), esto estaría en concordancia con los resultados que hemos obtenido. En carcinoma de mama la expresión

varia, y los experimentos de *microarray* muestran tanto aumentos como disminuciones de la expresión (Su et al., 2001).

El interés de esta proteína en el fenotipo metastático de las células podría estar relacionado directamente con su capacidad quimiotáctica sobre los neutrófilos. Recientemente se ha descrito un mecanismo de migración transendotelial *in vitro* de células derivadas de cáncer de mama con capacidad metastática, MDA MB-231, en el cual los neutrófilos mediarían la extravasación de las células tumorales actuando como portadores para atravesar el endotelio (Wu et al., 2001). En este trabajo los autores evidencian una unión a través de moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1), sobrepresado en las células 231, y CD18 y CD11b en la membrana de los neutrófilos. Una hipótesis para futura comprobación podría ser la acción quimiotáctica de moléculas como LECT2 durante la vehiculización de las células, y relacionar la disminución de su expresión con el anclaje y crecimiento del proceso metastático ya consumado.

El antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) lo detectamos infraexpresado en todas las variantes metastáticas analizadas. Este gen localizado en el cromosoma 19q13.41, se conoce también con el nombre de kallikrein 3. Su función enzimática reside en actuar sobre las uniones lys-arg y arg-ser. Actúa en los procesos de coagulación sanguínea y en el sistema renina-angiotensina. Se localiza en las células sanguíneas y hematopoiéticas, epitelio prostático, lesiones metastáticas de carcinoma de próstata y en menor proporción en mama. Esta ubicación se ve refrendada por los experimentos de *microarrays* para catalogar leucemias mieloides (Golub et al., 1999), y en los estudios de expresión diferencial de tumores epiteliales y tejidos humanos (Su et al., 2001; Su et al., 2002), donde se pone de manifiesto tanto sobreexpresión, infraexpresión o ausencia de cambios en cáncer de mama.

Esta proteína transmembranal altamente expresada en algunos adenocarcinomas metastáticos o pobremente diferenciados (Uchida et al., 2001), no es un marcador específico de próstata sino que se expresa también en otros tejidos. En cáncer de mama se han descrito tanto aumentos (Beckett et al., 1999) como disminuciones (Miller et al., 2001). Resulta interesante el hecho de que se haya reportado una disminución de los niveles de PSMA en el fluido recogido de lavados ductales, obtenidos en controles rutinarios para diagnóstico precoz de cáncer de mama, en mujeres menopausicas que habían desarrollado la enfermedad (Sauter et al., 2001). Estos resultados estarían más en consonancia con la disminución de expresión que encontramos en las metástasis, aunque no podamos evaluar su significado.

5.3.2 Identificación de genes relacionados con la organoespecificidad en ganglio.

El criterio de organoespecificidad lo definimos en base a que las variaciones de expresión detectadas en uno de los ganglios analizados fueran reproducibles en el otro ganglio y a su vez, no fueran compartidas con las otras metástasis analizadas, pulmón y hueso. Poniéndose de manifiesto que entre los genes **sobreexpresados** en las dos metástasis ganglionares están la Integrina $\beta 1$ y la Apolipoproteína D.

La expresión de Integrina $\beta 1$ se confirmó mediante PCR cuantitativa, por lo que técnicamente es el gen que tiene más verosimilitud de estar sobreexpresado en relación a la actividad metastática en ganglio. Se trata de un gen localizado en el cromosoma 10p11.2 que codifica una de las subunidades del receptor de la fibronectina, también conocido como CD29.

Las integrinas son una gran familia de proteínas hetodiméricas formadas por subunidades α y β de las que se han descrito, respectivamente, al menos 18 y 8 subunidades distintas. La proteína codificada por el gen detectado en el *array* es una subunidad β de la que se conocen cinco variantes, originadas por *splicing* alternativo del mRNA que afecta al extremo carboxiterminal de la proteína (Plow et al., 2000). Estos receptores de membrana están implicados en procesos tanto de adhesión como de migración celular. El ensamblaje con el ligando es capaz de activar vías de señalización intracelulares, induciendo reorganización del citoesqueleto, fosforilación y activación de distintos genes (Danker et al., 1998; Hughes y Pfaff, 1998; Giacotti y Ruoslahti, 1999). Está descrita su participación en procesos de embriogénesis, reparación de tejidos, respuesta inmune y progresión metastática de las células tumorales.

Diferentes integrinas, entre ellas la $\beta 1$ juegan un papel importante tanto en el desarrollo de la glándula mamaria como en la carcinogénesis, ya que se ha demostrado que las células tumorales con alteraciones en la expresión de integrinas tienen una mayor capacidad de adhesión (Huang e Ip, 2001). Existen diferentes dominios citoplasmáticos de integrina $\beta 1$ y cada uno de ellos controla la expresión de diferentes genes diana, entre los que se encontrarían BRCA2, gen supresor de tumor, directamente implicado en la susceptibilidad al cáncer de mama. Se han descrito disminuciones de expresión de BRCA2 en células que expresan $\beta 1$, sin que esto influya en la capacidad de adhesión de las mismas (Moro et al., 2001).

La integrina $\beta 1$ se internaliza en las células de cáncer de mama por una vía de endocitosis caveola-like, y esta internalización va acompañada de una rápida expansión celular debido a reorganizaciones del citoesqueleto (Furtak et al., 2001). La integrina-linked quinasa (ILK) se une al dominio citoplasmático de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 3$ de integrina, promoviendo el crecimiento independiente de anclaje. La sobreexpresión de ILK activa directamente el gen ciclina D1 en las células epiteliales de mama y eleva los niveles de la proteína ciclina D1 induciendo proliferación (D'Amico et al., 2000). Recientemente se ha reportado que la unión de $\beta 1$ a ligandos de la matriz extracelular, inhibe apoptosis al activar la vía de señalización fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt/protein quinasa B (Tian et al., 2002). Entre estos ligandos se encuentra el colágeno VI (Jongewaard et al., 2002), sobreexpresado también en las células 435. Una hipótesis a analizar en el futuro podría ser la acción sinérgica de estas proteínas en el proceso de anclaje y proliferación de las células metastáticas.

La sobreexpresión de Integrina $\beta 1$ se ha asociado a la presencia de metástasis ganglionares en melanoma (Hieken et al., 1996) y también en cáncer colorrectal (Fujita et al., 1995). Nuestros resultados indicarían la implicación de esta proteína en las metástasis ganglionares de cáncer de mama.

La diseminación metastática de las células tumorales, depende entre otros factores de la adhesión de las células tumorales al endotelio vascular seguido de una extravasación a los tejidos circundantes. Al estudiar la capacidad de adhesión de la línea de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB 231, se observó que en los lugares de unión intercelular del endotelio se concentraba la expresión de integrina $\beta 1$, sugiriendo por tanto que estas moléculas están implicadas en el arresto y posterior migración de las células tumorales a través del endotelio vascular (Price et al., 1996). La unión de integrina $\beta 1$ a sus ligandos es capaz de inhibir la liberación de citocromo C desde el espacio mitocondrial, inhibiendo la apoptosis inducida por fármacos como paclitaxel o vincristina en células de cáncer de mama MDA-MB 231 y MDA-MB 435 (Aoudjit y Vuori, 2001). También en este sentido se ha descrito una disminución de integrina $\beta 1$ en la apoptosis inducida por tamoxifen en células MCF-7 que expresan el receptor de estrógenos (Huang y Ip, 2001). Estos resultados indican que esta integrina podría contribuir a la resistencia hormonal y quimioterápica del cáncer de mama. Existen algunos trabajos en los que el incremento de expresión de integrina $\beta 1$ se correlaciona con una menor invasividad de las células de cáncer de mama MCF-7 (Cos et al., 1998), mientras que en otros casos la menor adhesividad de estas células se atribuye a una disminución de los niveles de esta integrina (Suzuki y Takahashi, 1999).

En cuanto a la presencia de este gen en otros estudios de expresión diferencial, Ross (2000) en su catalogación de líneas celulares de diferentes tejidos muestra tanto infraexpresión como sobreexpresión en algunas células derivadas de cáncer de mama. Perou (1999) en su estudio de líneas celulares, células epiteliales y carcinomas de mama describe infraexpresión generalizada de $\beta 1$ en las líneas celulares y no variación o sobreexpresión en las muestras de carcinoma estudiadas.

Otro gen sobreexpresado en las dos metástasis ganglionares es la Apolipoproteína D (apoD), localizado en el cromosoma 3q26.2-qter. La proteína es un componente de las lipoproteínas de alta densidad de 29 kDa, que no guarda mucha similitud con las secuencias de otras apolipoproteínas, pero tiene una gran homología con la proteína de unión a retinol y la α_2 microglobulina. Se expresa en sistema nervioso periférico, cartílago y tejido adiposo. Esta glicoproteína implicada en el transporte de lípidos a través del plasma sanguíneo es capaz de unir colesterol y progesterona, aunque no está claro que estos sean sus ligandos fisiológicos (Rassart et al., 2000). Su expresión se ha relacionado con cáncer de mama, aunque no está claro que papel tendría en la progresión tumoral, ya que en algunos casos se ha asociado con el grado de diferenciación de los tumores, pero no con el resto de características patológicas o la presencia de metástasis (Diez-Itza et al., 1994; Sgroi et al., 1999), mientras que en tumores de mama masculinos su expresión se correlacionaba con la presencia de ganglios linfáticos (Serra et al., 1999). El tratamiento de las células de cáncer de mama T-47D con 1,25-dihidroxitamina D3 es capaz de inducir de forma tiempo y dosis dependiente la expresión de apoD. El aumento de expresión de esta glicoproteína va acompañado de inhibición del crecimiento celular y cambios morfológicos de las células (Lopez-Boado et al., 1997).

También se ha referenciado en experimentos de *arrays*, su infraexpresión o la no variación en líneas celulares derivadas de cáncer de mama (Ross et al., 2000). Mientras que en la mayoría de carcinomas de mama se encuentra sobreexpresado, al contrario de lo que sucede en carcinomas de colon, pulmón u ovario (Su et al., 2001).

Por último, encontramos sobreexpresada en las metástasis ganglionares la lactato deshidrogenasa C que interviene en la glicolisis anaeróbica de las células. Se expresa en condiciones normales en un 65% de las células germinales de testículo. Están bien caracterizados el potencial autoantigénico de algunos de sus epítomos en procesos autoinmunes testiculares (Gupta y Chaturvedi, 2000), pero no se le conoce implicación en procesos neoplásicos. De hecho no ha sido referenciada su expresión en otros experimentos

que utilizan la metodología de *arrays* para la clasificación de tumores, y entre la colección de tejidos normales analizados, solo se encuentra sobreexpresado en testículos y traquea (Su et al., 2002).

Las dos metástasis ganglionares analizadas no difieren en cuanto al tipo de genes detectados como infraexpresados con respecto a las metástasis de pulmón y hueso, ya que se observa la disminución de PSA, TAF-172, proteína de dedo de zinc 5, receptor LCR1 acoplado a proteína G, factor de transcripción para la α 1-fetoproteína y el precursor para LECT2, que fueron catalogadas como específicas de metástasis.

5.3.3 Genes potencialmente asociados a metástasis ósea y pulmonar.

Entre los genes detectados como **sobreexpresados** en la metástasis ósea, la mayoría corresponden a proteínas de membrana (receptores, transportadores y proteínas estructurales), y enzimas y proteínas de la maquinaria bioquímica celular. El resto corresponden mayoritariamente a proteínas nucleares y elementos relacionados con el sistema inmune.

El componente C2 del complemento lo hemos detectado como sobreexpresado en metástasis ósea. La síntesis de este gen puede ser estimulada por los interferones α , β y γ (Lappin et al., 1990). De momento no se ha descrito la implicación de esta molécula en la progresión metastática del cáncer de mama.

La expresión de heat shock 70 kDa, otro de los genes que encontramos sobreexpresados se ha asociado con proliferación tumoral, metástasis y resistencia a agentes quimioterápicos (Korneeva et al., 2000).

El gen de la creatina kinasa B detectado como sobreexpresado cataliza la fosforilación de creatina y se ha visto que es inducible por estrógenos tanto en el tracto reproductor femenino de ratas como en tumores humanos de mama (Wang et al., 2001).

El factor de transcripción GATA-binding protein 3 se ha descrito como diferencialmente expresado en tumores de mama receptores de estrógenos positivos (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001).

De entre los genes detectados como **infraexpresados** en la metástasis ósea, la mayoría corresponden a factores que intervienen en el control tanto de la transcripción como de la

traducción, también se detectan numerosos enzimas y algunos genes relacionados con la muerte celular por apoptosis.

Uno de los genes implicados en el control de la traducción es el factor de inicio de traducción eucariota 4AI, implicado en el inicio de la síntesis proteica en células de mamíferos (Li et al., 2001). También se detectó como infraexpresado el gen TFAR19 (*TF-1 cell apoptosis related gene-19*). Este gen tiene un patrón de expresión ubicuo y está sobreexpresado en las células tumorales que entran en apoptosis. La sobreexpresión de este gen en células tumorales induce apoptosis en ausencia de factores de crecimiento (Liu et al., 1999). La pérdida de expresión de este gen, junto con la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-x_L podría facilitar la metástasis.

La lamina nuclear es una compleja red de filamentos intermedios. La Lamina A es uno de sus componentes, su expresión está asociada a procesos de diferenciación, pero también está alterada en números tipos de tumores. En términos generales existe una correlación inversa entre la expresión de esta molécula y la actividad proliferativa. La infraexpresión de este gen podría facilitar la progresión tumoral ya que los carcinomas de piel de célula basal negativos para la expresión de Lamina A eran altamente proliferativos (Venables et al., 2001)

Otro de los genes detectados como infraexpresados es CC3, un gen supresor de metástasis. La carencia de este gen se ha detectado en líneas de carcinoma de célula pequeña de pulmón altamente metastáticas y también en líneas de melanoma murino. La pérdida de este gen confiere resistencia frente a señales de inducción de apoptosis y de esta forma favorece la supervivencia celular en el proceso metastático (Whitman et al., 2000)

Dada la dispersión de los resultados obtenidos en el análisis de la metástasis pulmonar, no se ha seleccionado ningún gen potencialmente asociado a este tipo de metástasis. Los datos generados sólo se han utilizado para completar el análisis de las otras variantes metastáticas y así determinar genes asociados a la actividad metastática global de las líneas celulares analizadas.

Aunque algún proceso relacionado con la hibridación de la membrana podría ser el causante, no podemos justificar estos resultados sólo por el procedimiento técnico ya que el orden de las hibridaciones, tumor, ganglio (Node₃), pulmón, hueso y ganglio (Node₃), nos permite descartar el mal estado de la membrana en las hibridaciones siguientes.

Las diferencias obtenidas entre los resultados del *array* y la PCR cuantitativa demuestran la importancia de realizar los análisis de expresión diferencial utilizando varias replicas, para así poder descartar falsos positivos y falsos negativos. Este porcentaje de errores en nuestro caso no se ha podido descartar al tener una única medida. De todas formas, el porcentaje de coincidencia entre técnicas, aún y teniendo replicas del experimento de *microarrays* es variable, ya que si bien en algunos casos la coincidencia es prácticamente del 100% (Zhou et al., 2002), en otros casos es de aproximadamente un 60% de los genes estudiados (Dong et al., 2002).

En todas las metástasis analizadas hemos detectado genes implicados en el crecimiento celular, tanto moléculas relacionadas con la síntesis de proteínas como de ácidos nucleicos, receptores para factores de crecimiento, y proteínas y enzimas de la maquinaria bioquímica de la célula. Todos estos genes pueden contribuir a regular el crecimiento celular.

No encontramos diferencialmente expresados oncogenes, ciclinas u otras proteínas específicas de ciclo celular. Perou (1999) en su estudio de expresión diferencial en células epiteliales de mama y en cáncer de mama, describe variaciones en genes relacionados con la progresión del ciclo celular, ciclinas y antígeno de proliferación (Ki-67). En otros trabajos de expresión diferencial que se han hecho en líneas celulares se han detectado genes implicados en proliferación, como pueden ser factores de iniciación, represores transcripcionales, factores de *splicing* y proteínas directamente implicadas en el control del ciclo celular como son las ciclinas (Ross et al., 2000). Los genes relacionados con mal pronóstico en cáncer de mama, según el análisis de clasificación mediante *arrays*, incluyen genes que regulan ciclo celular, invasión, metástasis y angiogénesis, encontrándose sobreexpresados ciclina E, metaloproteinasas MMP9, o el receptor para el factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF. Sin embargo, genes relacionados con cáncer de mama y con implicaciones directas en proliferación como pueden ser ciclina D1 y c-myc no se detectan alterados (van't Veer et al., 2002).

En las diferencias que pueden observarse entre las distintas clasificaciones de genes diferencialmente expresados habría que considerar que los estudios se hacen a nivel transcripcional, y las alteraciones no detectadas podrían darse a nivel proteico.

En la mayoría de estos trabajos, los patrones de expresión comparan células normales y células tumorales, o tumores entre sí. En nuestro estudio, el nivel de comparación entre tumor

y metástasis pone en evidencia que los genes cuya expresión varía participan en funciones celulares relacionadas con la adhesión, migración, metabolismo o control de la transcripción y la traducción, más que en proliferación celular o invasión. Estos resultados realzan la importancia de la comunicación intercelular y la supervivencia celular frente al estrés que supone la adaptación a un nuevo microentorno, como factores críticos en el éxito del desarrollo de las metástasis.

Existen numerosos trabajos que demuestran la aplicabilidad de la técnica de *microarrays* al estudio del cáncer de mama. En primer lugar, ha permitido estudiar los perfiles de expresión génica asociados a diferentes estadios del proceso de progresión tumoral (Nacht et al, 1999; Sgroi et al., 1999; Jiang et al., 2002). También se ha utilizado para estudiar vías de señalización, permitiendo conocer los genes que se activan de forma específica y las posibles interacciones con otras vías. En este sentido el análisis de los genes activados por TRAIL, un receptor de muerte celular de la familia del TNF, reveló que algunos de los genes activados estaban relacionados con la vía de señalización del interferón (Kumar-Sinha et al., 2002). Analizar no sólo la expresión individual de cada uno de los genes, sino también las posibles interacciones entre ellos permite establecer el perfil transcripcional asociado a cada tipo celular en particular (Khan et al., 1999; Golub, 2001). Esto resulta de interés, ya que una determinada combinación de genes puede causar transformación maligna, mientras que de forma individual la expresión de cada uno de ellos quizá no tenga repercusión fenotípica (Szallasi, 1998; Newton et al., 2001). Esta técnica también ha permitido estudiar los perfiles de metilación existentes en tumores de mama, y clasificarlos basándose en la presencia o no de receptores de estrógenos (Yan et al., 2001). Además, el análisis del perfil transcripcional de los tumores de mama tiene implicaciones directas sobre la elección del tratamiento, permitiendo escoger terapias más específicas para cada tipo de tumor en función de su perfil molecular y así mejorar su respuesta (Lonning et al., 2001; Ellis et al., 2002).

Identificar genes que se expresan de forma diferencial a lo largo del proceso de progresión tumoral ayudará a conocer mejor la biología de los tumores, así como los cambios que determinan su evolución hacia fenotipos más agresivos y con capacidad metastática, con el objetivo final de precisar la terapia más adecuada para cada paciente.

VI. Conclusiones

1. La inestabilidad de microsatélites en el cáncer de mama, se asocia a inhibición de apoptosis en las células del tumor.
2. La pérdida de apoptosis detectada en los carcinomas ductales infiltrantes de mama no es una consecuencia de mutaciones *frameshift* en el gen proapoptótico *bax*.
3. A lo largo del proceso de progresión tumoral hay un incremento de inestabilidad genética que podría permitir la selección de las células y el crecimiento posterior de los linajes celulares mejor adaptados al microentorno del órgano, contribuyendo a la heterogeneidad tumoral.
4. La sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas puede inducir un incremento de alteraciones genéticas en las células que se traduce en mayor tumorigenicidad, mayor capacidad metastática y mayor ubicuidad.
5. Solamente algunas de las alteraciones detectadas serían realmente responsables (*non-random*) del fenotipo tumoral y metastático, mientras que las otras serían aleatorias (*random*) y no implicarían una ventaja selectiva para la célula tumoral. Así en las células control los cambios no se traducen en aumentos significativos de la actividad tumorigénica y metastática, y por otro lado, estas actividades aumentan de forma similar en los transfectantes Bcl-2 y Bcl-x_L, aunque la sobreexpresión de Bcl-2 se asocia globalmente a un mayor acúmulo de alteraciones genéticas que la sobreexpresión de Bcl-x_L.
6. El análisis filogenético y mediante *clusters* indica que el tipo de alteraciones genéticas que se suceden bajo la represión de la apoptosis son distintas que las que resultan de la selección experimental.
7. Existe variabilidad genética en las células tumorales, en aumento, a medida que avanza el proceso de selección, siendo distintas las alteraciones durante la selección tumoral que en la selección metastática.
8. La variabilidad genética de las metástasis indica que el proceso de selección es distinto dependiendo del órgano de origen, pudiendo ser debida a la presión selectiva ejercida por el microentorno o a la heterogeneidad secundaria a la progresión tumoral.

9. El análisis de expresión diferencial nos ha permitido detectar genes distintamente representados en las metástasis respecto al tumor, en función del órgano de origen.

10. Los genes que prevalecen diferencialmente expresados entre metástasis ganglionar, ósea y pulmonar y con respecto al tumor es un número reducido. Por lo que cabría suponer que esos genes comunes intervienen en la actividad metastática general de nuestras células y el resto de variaciones podría deberse a la idiosincrasia de la selección, ya sea a las alteraciones genéticas, al microentorno o a la suma de las dos.

11. Común a todas las metástasis destacamos la infraexpresión de genes relacionados con la regulación de la maquinaria transcripcional y quimioquinas. Y el receptor de la fibronectina sería el gen que podríamos asociar a la organoespecificidad metastática en ganglio de forma más probable por haber aparecido en dos metástasis ganglionares distintas.

La sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-x_L podría conferir de entrada una ventaja selectiva a las células tumorales ya que con un menor número de alteraciones genéticas se favorece el proceso de progresión metastática, mientras que las alteraciones detectadas en el control, aun siendo más numerosas, serían más aleatorias y con menor repercusión biológica.

VII. Bibliografía

- Adami, H.O., Signorello, L.B. and Trichopoulos, D., Towards an understanding of breast cancer etiology. *Semin Cancer Biol*, 8, 255-62. (1998).
- Adams, J.M. and Cory, S., The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281, 1322-6. (1998).
- Adams, J.M. and Cory, S., Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci*, 26, 61-6. (2001).
- Alers, J.C., Rochat, J., Krijtenburg, P.J., Hop, W.C., Kranse, R., Rosenberg, C., Tanke, H.J., Schroder, F.H. and van Dekken, H., Identification of genetic markers for prostatic cancer progression. *Lab Invest*, 80, 931-42. (2000).
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J.I., Yang, L., Marti, G.E., Moore, T., Hudson, J., Jr., Lu, L., Lewis, D.B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W.C., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Armitage, J.O., Warnke, R., Staudt, L.M. and et al., Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403, 503-11. (2000).
- Alpan, R.S., Sparvero, S. and Pardee, A.B., Identification of mRNAs differentially expressed in quiescence or in late G1 phase of the cell cycle in human breast cancer cells by using the differential display method. *Mol Med*, 2, 469-78. (1996).
- Altieri, D.C., The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med*, 7, 542-7. (2001).
- Anbazhagan, R., Fujii, H. and Gabrielson, E., Microsatellite instability is uncommon in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 5, 839-44. (1999).
- Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermoud, J.J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R. and Martinou, J.C., Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*, 277, 370-2. (1997).
- Antonsson, B. and Martinou, J.C., The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res*, 256, 50-7. (2000).
- Aoudjit, F. and Vuori, K., Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*, 20, 4995-5004. (2001).
- Aquilina, G. and Bignami, M., Mismatch repair in correction of replication errors and processing of DNA damage. *J Cell Physiol*, 187, 145-54. (2001).
- Aragane, H., Sakakura, C., Nakanishi, M., Yasuoka, R., Fujita, Y., Taniguchi, H., Hagiwara, A., Yamaguchi, T., Abe, T., Inazawa, J. and Yamagishi, H., Chromosomal aberrations in colorectal cancers and liver metastases analyzed by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer*, 94, 623-9. (2001).
- Arribas, R., Capella, G., Tortola, S., Masramon, L., Grizzle, W.E., Perucho, M. and Peinado, M.A., Assessment of genomic damage in colorectal cancer by DNA fingerprinting: prognostic applications. *J Clin Oncol*, 15, 3230-40. (1997).

- Arribas, R., Risques, R.A., Gonzalez-Garcia, I., Masramon, L., Aiza, G., Ribas, M., Capella, G. and Peinado, M.A., Tracking recurrent quantitative genomic alterations in colorectal cancer: allelic losses in chromosome 4 correlate with tumor aggressiveness. *Lab Invest*, 79, 111-22. (1999).
- Arzimanoglou, II, Gilbert, F. and Barber, H.R., Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer*, 82, 1808-20. (1998).
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M., Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-8. (1998).
- Averboukh, L., Liang, P., Kantoff, P.W. and Pardee, A.B., Regulation of S100P expression by androgen. *Prostate*, 29, 350-5. (1996).
- Bai, M., Agnantis, N.J., Kamina, S., Demou, A., Zagorianakou, P., Katsaraki, A. and Kanavaros, P., In vivo cell kinetics in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res*, 3, 276-83 (2001).
- Balazs, M., Adam, Z., Treszl, A., Begany, A., Hunyadi, J. and Adany, R., Chromosomal imbalances in primary and metastatic melanomas revealed by comparative genomic hybridization. *Cytometry*, 46, 222-32. (2001).
- Bange, J., Zwick, E. and Ullrich, A., Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nat Med*, 7, 548-52. (2001).
- Barnes, D.M. and Gillett, C.E., Cyclin D1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 52, 1-15 (1998).
- Bassett, D.E., Eisen, M.B. and Boguski, M.S., Gene expression informatics--it's all in your mine. *Nat Genet*, 21, 51-5. (1999).
- Battaglia, F., Scambia, G., Rossi, S., Panici, P.B., Bellantone, R., Polizzi, G., Querzoli, P., Negrini, R., Iacobelli, S., Crucitti, F. and et al., Epidermal growth factor receptor in human breast cancer: correlation with steroid hormone receptors and axillary lymph node involvement. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 24, 1685-90. (1988).
- Beckett, M.L., Cazares, L.H., Vlahou, A., Schellhammer, P.F. and Wright, G.L., Jr., Prostate-specific membrane antigen levels in sera from healthy men and patients with benign prostate hyperplasia or prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 5, 4034-40. (1999).
- Beenken, S.W., Grizzle, W.E., Crowe, D.R., Conner, M.G., Weiss, H.L., Sellers, M.T., Krontiras, H., Urist, M.M. and Bland, K.I., Molecular biomarkers for breast cancer prognosis: coexpression of c- erbB-2 and p53. *Ann Surg*, 233, 630-8. (2001).
- Benachenhou, N., Guiral, S., Gorska-Flipot, I., Labuda, D. and Sinnott, D., Frequent loss of heterozygosity at the DNA mismatch-repair loci hMLH1 and hMSH3 in sporadic breast cancer. *Br J Cancer*, 79, 1012-7. (1999).
- Bergh, J., Clinical studies of p53 in treatment and benefit of breast cancer patients. *Endocr Relat Cancer*, 6, 51-9. (1999).

- Berglund, H., Olerenshaw, D., Sankar, A., Federwisch, M., McDonald, N.Q. and Driscoll, P.C., The three-dimensional solution structure and dynamic properties of the human FADD death domain. *J Mol Biol*, 302, 171-88. (2000).
- Bertucci, F., Houlgatte, R., Benziene, A., Granjeaud, S., Adelaide, J., Tagett, R., Loriod, B., Jacquemier, J., Viens, P., Jordan, B., Birnbaum, D. and Nguyen, C., Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum Mol Genet*, 9, 2981-91. (2000).
- Bhattacharyya, N., Chen, H.C., Grundfest-Broniatowski, S. and Banerjee, S., Alteration of hMSH2 and DNA polymerase beta genes in breast carcinomas and fibroadenomas. *Biochem Biophys Res Commun*, 259, 429-35. (1999).
- Bieche, I. and Lidereau, R., Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 14, 227-51. (1995).
- Bohle, A.S. and Kalthoff, H., Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Langenbecks Arch Surg*, 384, 133-40. (1999).
- Boland, C.R., Thibodeau, S.N., Hamilton, S.R., Sidransky, D., Eshleman, J.R., Burt, R.W., Meltzer, S.J., Rodriguez-Bigas, M.A., Fodde, R., Ranzani, G.N. and Srivastava, S., A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*, 58, 5248-57. (1998).
- Boland, C.R. and Ricciardiello, L., How many mutations does it take to make a tumor? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 14675-7. (1999).
- Brazma, A. and Vilo, J., Gene expression data analysis. *FEBS Lett*, 480, 17-24. (2000).
- Breivik, J. and Gaudernack, G., Genomic instability, DNA methylation, and natural selection in colorectal carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*, 9, 245-54. (1999).
- Breivik, J., Don't stop for repairs in a war zone: Darwinian evolution unites genes and environment in cancer development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 5379-81. (2001).
- Brentnall, T.A., Microsatellite instability. Shifting concepts in tumorigenesis. *Am J Pathol*, 147, 561-3. (1995).
- Brimmell, M., Mendiola, R., Mangion, J. and Packham, G., BAX frameshift mutations in cell lines derived from human haemopoietic malignancies are associated with resistance to apoptosis and microsatellite instability. *Oncogene*, 16, 1803-12. (1998).
- Brown, P.O. and Botstein, D., Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet*, 21, 33-7. (1999).
- Bundred, N.J., Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 27, 137-42. (2001).

Bunz, F., Fauth, C., Speicher, M.R., Dutriaux, A., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Lengauer, C., Targeted inactivation of p53 in human cells does not result in aneuploidy. *Cancer Res*, 62, 1129-33. (2002).

Burger, A.M., Zhang, X., Li, H., Ostrowski, J.L., Beatty, B., Venanzoni, M., Papas, T. and Seth, A., Down-regulation of T1A12/mac25, a novel insulin-like growth factor binding protein related gene, is associated with disease progression in breast carcinomas. *Oncogene*, 16, 2459-67. (1998).

Cahill, D.P., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Lengauer, C., Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol*, 9, M57-60. (1999).

Cailleau, R., Olive, M. and Cruciger, Q.V., Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, 14, 911-5. (1978).

Calin, G.A., Gafa, R., Tibiletti, M.G., Herlea, V., Becheanu, G., Cavazzini, L., Barbanti-Brodano, G., Nenci, I., Negrini, M. and Lanza, G., Genetic progression in microsatellite instability high (MSI-H) colon cancers correlates with clinico-pathological parameters: A study of the TGRbetaR2, BAX, hMSH3, hMSH6, IGFIR and BLM genes. *Int J Cancer*, 89, 230-5. (2000).

Cathomen, T., Stracker, T.H., Gilbert, L.B. and Weitzman, M.D., A genetic screen identifies a cellular regulator of adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 14991-6. (2001).

Celis, J.E., Kruhoffer, M., Gromova, I., Frederiksen, C., Ostergaard, M., Thykjaer, T., Gromov, P., Yu, J., Palsdottir, H., Magnusson, N. and Orntoft, T.F., Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Lett*, 480, 2-16. (2000).

Chicca, J.J., 2nd, Auble, D.T. and Pugh, B.F., Cloning and biochemical characterization of TAF-172, a human homolog of yeast Mot1. *Mol Cell Biol*, 18, 1701-10. (1998).

Chow, M. and Rubin, H., Clonal selection versus genetic instability as the driving force in neoplastic transformation. *Cancer Res*, 60, 6510-8. (2000).

Claij, N. and te Riele, H., Microsatellite instability in human cancer: a prognostic marker for chemotherapy? *Exp Cell Res*, 246, 1-10. (1999).

Coleman, W.B. and Tsongalis, G.J., The role of genomic instability in human carcinogenesis. *Anticancer Res*, 19, 4645-64. (1999).

Compagni, A. and Christofori, G., Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Br J Cancer*, 83, 1-5. (2000).

Contegiacomo, A., Palmirotta, R., De Marchis, L., Pizzi, C., Mastranzo, P., Delrio, P., Petrella, G., Figliolini, M., Bianco, A.R., Frati, L. and et al., Microsatellite instability and pathological aspects of breast cancer. *Int J Cancer*, 64, 264-8. (1995).

- Cos, S., Fernandez, R., Guezmes, A. and Sanchez-Barcelo, E.J., Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res*, 58, 4383-90. (1998).
- Crompton, M., The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, 341, 233-49. (1999).
- Dahiya, R. and Deng, G., Molecular prognostic markers in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 52, 185-200 (1998).
- D'Amico, M., Hulit, J., Amanatullah, D.F., Zafonte, B.T., Albanese, C., Bouzahzah, B., Fu, M., Augenlicht, L.H., Donehower, L.A., Takemaru, K., Moon, R.T., Davis, R., Lisanti, M.P., Shtutman, M., Zhurinsky, J., Ben-Ze'ev, A., Troussard, A.A., Dedhar, S. and Pestell, R.G., The integrin-linked kinase regulates the cyclin D1 gene through glycogen synthase kinase 3beta and cAMP-responsive element-binding protein-dependent pathways. *J Biol Chem*, 275, 32649-57. (2000).
- Daniels, K.J., Boldt, H.C., Martin, J.A., Gardner, L.M., Meyer, M. and Folberg, R., Expression of type VI collagen in uveal melanoma: its role in pattern formation and tumor progression. *Lab Invest*, 75, 55-66. (1996).
- Danker, K., Gabriel, B., Heidrich, C. and Reutter, W., Focal adhesion kinase pp125FAK and the beta 1 integrin subunit are constitutively complexed in HaCaT cells. *Exp Cell Res*, 239, 326-31. (1998).
- Dasgupta, A., Darst, R.P., Martin, K.J., Afshari, C.A. and Auble, D.T., Mot1 activates and represses transcription by direct, ATPase-dependent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 2666-71. (2002).
- De Marchis, L., Contegiacomo, A., D'Amico, C., Palmirotta, R., Pizzi, C., Ottini, L., Mastranzo, P., Figliolini, M., Petrella, G., Amanti, C., Battista, P., Bianco, A.R., Frati, L., Cama, A. and Mariani-Costantini, R., Microsatellite instability is correlated with lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*, 3, 241-8. (1997).
- Deininger, M.H., Weller, M., Streffer, J. and Meyermann, R., Antiapoptotic Bcl-2 family protein expression increases with progression of oligodendroglioma. *Cancer*, 86, 1832-9. (1999).
- Del Bufalo, D., Biroccio, A., Leonetti, C. and Zupi, G., Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line. *Faseb J*, 11, 947-53. (1997).
- del Castillo-Olivares, A. and Gil, G., Alpha 1-fetoprotein transcription factor is required for the expression of sterol 12alpha -hydroxylase, the specific enzyme for cholic acid synthesis. Potential role in the bile acid-mediated regulation of gene transcription. *J Biol Chem*, 275, 17793-9. (2000).
- Demicheli, R., Retsky, M.W., Swartzendruber, D.E. and Bonadonna, G., Proposal for a new model of breast cancer metastatic development. *Ann Oncol*, 8, 1075-80. (1997).

Deng, G., Chen, L.C., Schott, D.R., Thor, A., Bhargava, V., Ljung, B.M., Chew, K. and Smith, H.S., Loss of heterozygosity and p53 gene mutations in breast cancer. *Cancer Res*, 54, 499-505. (1994).

DeRisi, J.L., Iyer, V.R. and Brown, P.O., Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278, 680-6. (1997).

Devic, E., Rizzoti, K., Bodin, S., Paquereau, L., Knibiehler, B. and Audigier, Y., [Expression of a new family of receptors similar to CXC chemokine receptors in endothelial cell precursors]. *Pathol Biol (Paris)*, 47, 330-8. (1999).

Diez-Itza, I., Vizoso, F., Merino, A.M., Sanchez, L.M., Tolivia, J., Fernandez, J., Ruibal, A. and Lopez-Otin, C., Expression and prognostic significance of apolipoprotein D in breast cancer. *Am J Pathol*, 144, 310-20. (1994).

Dillon, E.K., de Boer, W.B., Papadimitriou, J.M. and Turbett, G.R., Microsatellite instability and loss of heterozygosity in mammary carcinoma and its probable precursors. *Br J Cancer*, 76, 156-62 (1997).

Dong, Y., Ganther, H.E., Stewart, C. and Ip, C., Identification of molecular targets associated with selenium-induced growth inhibition in human breast cells using cDNA microarrays. *Cancer Res*, 62, 708-14. (2002).

Dopazo, J., Zanders, E., Dragoni, I., Amphlett, G. and Falciani, F., Methods and approaches in the analysis of gene expression data. *J Immunol Methods*, 250, 93-112. (2001).

Dowsett, M., Cooke, T., Ellis, I., Gullick, W.J., Gusterson, B., Mallon, E. and Walker, R., Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how? *Eur J Cancer*, 36, 170-6. (2000).

Duesberg, P., Rasnick, D., Li, R., Winters, L., Rausch, C. and Hehlmann, R., How aneuploidy may cause cancer and genetic instability. *Anticancer Res*, 19, 4887-906. (1999).

Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. and Trent, J.M., Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*, 21, 10-4. (1999).

Duval, A. and Hamelin, R., Mutations at Coding Repeat Sequences in Mismatch Repair-deficient Human Cancers: Toward a New Concept of Target Genes for Instability. *Cancer Res*, 62, 2447-54. (2002).

Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. and Botstein, D., Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 14863-8. (1998).

Ellis, M., Davis, N., Coop, A., Liu, M., Schumaker, L., Lee, R.Y., Srikanthana, R., Russell, C.G., Singh, B., Miller, W.R., Stearns, V., Pennanen, M., Tsangaris, T., Gallagher, A., Liu, A., Zwart, A., Hayes, D.F., Lippman, M.E., Wang, Y. and Clarke, R., Development and validation of a method for using breast core needle biopsies for gene expression microarray analyses. *Clin Cancer Res*, 8, 1155-66. (2002).

- Engers, R. and Gabbert, H.E., Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol*, 126, 682-92. (2000).
- Evan, G.I. and Vousden, K.H., Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411, 342-8. (2001).
- Eyford, J.E., Thorlacius, S., Steinarsdottir, M., Valgardsdottir, R., Ogmundsdottir, H.M. and Anamthawat-Jonsson, K., p53 abnormalities and genomic instability in primary human breast carcinomas. *Cancer Res*, 55, 646-51. (1995).
- Fernandez, Y., Espana, L., Manas, S., Fabra, A. and Sierra, A., Bcl-xL promotes metastasis of breast cancer cells by induction of cytokines resistance. *Cell Death Differ*, 7, 350-9. (2000).
- Fidler, I.J., Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol*, 12, 89-96. (2002).
- Formantici, C., Orlandi, R., Ronchini, C., Pilotti, S., Ranzani, G.N., Colnaghi, M.I. and Menard, S., Absence of microsatellite instability in breast carcinomas with both p53 and c-erbB-2 alterations. *J Pathol*, 187, 424-7. (1999).
- Fox, S.B. and Harris, A.L., The epidermal growth factor receptor in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2, 131-41. (1997).
- Fry, C.J. and Peterson, C.L., Transcription. Unlocking the gates to gene expression. *Science*, 295, 1847-8. (2002).
- Fujita, S., Watanabe, M., Kubota, T., Teramoto, T. and Kitajima, M., Alteration of expression in integrin beta 1-subunit correlates with invasion and metastasis in colorectal cancer. *Cancer Lett*, 91, 145-9. (1995).
- Fukushima, N. and Chun, J., The LPA receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 64, 21-32. (2001).
- Furtak, V., Hatcher, F. and Ochieng, J., Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 289, 845-50. (2001).
- Galarneau, L., Drouin, R. and Belanger, L., Assignment of the fetoprotein transcription factor gene (FTF) to human chromosome band 1q32.11 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 82, 269-70 (1998).
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S.A., Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119, 493-501. (1992).
- Gentile, M., Wiman, A., Thorstenson, S., Loman, N., Borg, A. and Wingren, S., Deletion mapping of chromosome segment 11q24-q25, exhibiting extensive allelic loss in early onset breast cancer. *Int J Cancer*, 92, 208-13. (2001).
- Giancotti, F.G. and Ruoslahti, E., Integrin signaling. *Science*, 285, 1028-32. (1999).
- Golub, T.R., Genome-wide views of cancer. *N Engl J Med*, 344, 601-2. (2001).

Gómez Navarro, J. and Curiel, D.T., Biología de las metástasis, *Oncología Clínica. 1. Fundamentos y patología general*, pp. 35-62, McGraw Hill-Interamericana (1998).

Gonzalez-Garcia, I., Moreno, V., Navarro, M., Marti-Rague, J., Marcuello, E., Benasco, C., Campos, O., Capella, G. and Peinado, M.A., Standardized approach for microsatellite instability detection in colorectal carcinomas. *J Natl Cancer Inst*, 92, 544-9. (2000).

Granville, D.J., Carthy, C.M., Hunt, D.W. and McManus, B.M., Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest*, 78, 893-913. (1998).

Gray, J.W. and Collins, C., Genome changes and gene expression in human solid tumors. *Carcinogenesis*, 21, 443-52. (2000).

Green, D.R. and Reed, J.C., Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-12. (1998).

Gross, A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J., BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 13, 1899-911. (1999).

Gupta, G.S. and Chaturvedi, G., Regulation of immune functions by sperm-specific LDH and its differences with somatic isozyme in primary and secondary lymphocyte cultures. *Am J Reprod Immunol*, 44, 160-9. (2000).

Halestrap, A.P. and Price, N.T., The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J*, 343 Pt 2, 281-99. (1999).

Hampl, M., Hampl, J.A., Reiss, G., Schackert, G., Saeger, H.D. and Schackert, H.K., Loss of heterozygosity accumulation in primary breast carcinomas and additionally in corresponding distant metastases is associated with poor outcome. *Clin Cancer Res*, 5, 1417-25. (1999).

Hanahan, D. and Weinberg, R.A., The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70. (2000).

Harrington, E.A., Fanidi, A. and Evan, G.I., Oncogenes and cell death. *Curr Opin Genet Dev*, 4, 120-9. (1994).

Hart, I.R., Perspective: tumour spread--the problems of latency. *J Pathol*, 187, 91-4. (1999).

Hartsough, M.T., Clare, S.E., Mair, M., Elkahloun, A.G., Sgroi, D., Osborne, C.K., Clark, G. and Steeg, P.S., Elevation of breast carcinoma Nm23-H1 metastasis suppressor gene expression and reduced motility by DNA methylation inhibition. *Cancer Res*, 61, 2320-7. (2001).

Hartwell, L.H. and Kastan, M.B., Cell cycle control and cancer. *Science*, 266, 1821-8. (1994).

Hashimoto, Y., Oga, A., Kawauchi, S., Furuya, T., Shimizu, N., Nakano, T., Imae, Y., Yamashita, H. and Sasaki, K., Amplification of 3q26 approximately qter correlates with tumor progression in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 129, 52-6. (2001).

Hellman, S., Darwin's clinical relevance. *Cancer*, 79, 2275-81. (1997).

- Heppner, G.H. and Miller, F.R., The cellular basis of tumor progression. *Int Rev Cytol*, 177, 1-56 (1998).
- Hetts, S.W., To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *Jama*, 279, 300-7. (1998).
- Heyer, L.J., Kruglyak, S. and Yooseph, S., Exploring expression data: identification and analysis of coexpressed genes. *Genome Res*, 9, 1106-15. (1999).
- Hieken, T.J., Ronan, S.G., Farolan, M., Shilkaitis, A.L. and Das Gupta, T.K., Beta 1 integrin expression: a marker of lymphatic metastases in cutaneous malignant melanoma. *Anticancer Res*, 16, 2321-4. (1996).
- Hippo, Y., Yashiro, M., Ishii, M., Taniguchi, H., Tsutsumi, S., Hirakawa, K., Kodama, T. and Aburatani, H., Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with high metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. *Cancer Res*, 61, 889-95. (2001).
- Hirano, A., Emi, M., Tsuneizumi, M., Utada, Y., Yoshimoto, M., Kasumi, F., Akiyama, F., Sakamoto, G., Haga, S., Kajiwara, T. and Nakamura, Y., Allelic losses of loci at 3p25.1, 8p22, 13q12, 17p13.3, and 22q13 correlate with postoperative recurrence in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 7, 876-82. (2001).
- Holmgren, L., O'Reilly, M.S. and Folkman, J., Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med*, 1, 149-53. (1995).
- Holmgren, L., Szeles, A., Rajnavolgyi, E., Folkman, J., Klein, G., Ernberg, I. and Falk, K.I., Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood*, 93, 3956-63. (1999).
- Hsu, Y.T., Wolter, K.G. and Youle, R.J., Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3668-72. (1997).
- Huang, P. and Oliff, A., Signaling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy. *Trends Cell Biol*, 11, 343-8. (2001).
- Huang, R.Y. and Ip, M.M., Differential expression of integrin mRNAs and proteins during normal rat mammary gland development and in carcinogenesis. *Cell Tissue Res*, 303, 69-80. (2001).
- Hughes, P.E. and Pfaff, M., Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol*, 8, 359-64. (1998).
- Ingvarsson, S., Molecular genetics of breast cancer progression. *Semin Cancer Biol*, 9, 277-88. (1999).
- Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D. and Perucho, M., Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, 363, 558-61. (1993).
- Jaattela, M., Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res*, 248, 30-43. (1999).

Jackson, A.L. and Loeb, L.A., The mutation rate and cancer. *Genetics*, 148, 1483-90. (1998 a).

Jackson, A.L. and Loeb, L.A., On the origin of multiple mutations in human cancers. *Semin Cancer Biol*, 8, 421-9. (1998 b).

Jiang, F., Desper, R., Papadimitriou, C.H., Schaffer, A.A., Kallioniemi, O.P., Richter, J., Schraml, P., Sauter, G., Mihatsch, M.J. and Moch, H., Construction of evolutionary tree models for renal cell carcinoma from comparative genomic hybridization data. *Cancer Res*, 60, 6503-9. (2000).

Jiang, Y., Harlocker, S.L., Molesh, D.A., Dillon, D.C., Stolk, J.A., Houghton, R.L., Repasky, E.A., Badaro, R., Reed, S.G. and Xu, J., Discovery of differentially expressed genes in human breast cancer using subtracted cDNA libraries and cDNA microarrays. *Oncogene*, 21, 2270-82. (2002).

Jongewaard, I.N., Lauer, R.M., Behrendt, D.A., Patil, S. and Klewer, S.E., Beta 1 integrin activation mediates adhesive differences between trisomy 21 and non-trisomic fibroblasts on type VI collagen. *Am J Med Genet*, 109, 298-305. (2002).

Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. and Reed, J.C., Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 4997-5002. (1998).

Kane, M.F., Loda, M., Gaida, G.M., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H., Jessup, J.M. and Kolodner, R., Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*, 57, 808-11. (1997).

Karrison, T.G., Ferguson, D.J. and Meier, P., Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Natl Cancer Inst*, 91, 80-5. (1999).

Kelekar, A., Chang, B.S., Harlan, J.E., Fesik, S.W. and Thompson, C.B., Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL. *Mol Cell Biol*, 17, 7040-6. (1997).

Kelekar, A. and Thompson, C.B., Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol*, 8, 324-30. (1998).

Kendal, W.S., Wang, R.Y., Hsu, T.C. and Frost, P., Rate of generation of major karyotypic abnormalities in relationship to the metastatic potential of B16 murine melanoma. *Cancer Res*, 47, 3835-41. (1987).

Khan, J., Saal, L.H., Bittner, M.L., Chen, Y., Trent, J.M. and Meltzer, P.S., Expression profiling in cancer using cDNA microarrays. *Electrophoresis*, 20, 223-9. (1999).

Khanna, C., Khan, J., Nguyen, P., Prehn, J., Caylor, J., Yeung, C., Trepel, J., Meltzer, P. and Helman, L., Metastasis-associated differences in gene expression in a murine model of osteosarcoma. *Cancer Res*, 61, 3750-9. (2001).

- Kim, H. and Muller, W.J., The role of the epidermal growth factor receptor family in mammary tumorigenesis and metastasis. *Exp Cell Res*, 253, 78-87. (1999).
- Kirschmann, D.A., Seftor, E.A., Nieva, D.R., Mariano, E.A. and Hendrix, M.J., Differentially expressed genes associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 55, 127-36. (1999).
- Kittiniyom, K., Gorse, K.M., Dalbague, F., Lichy, J.H., Taubenberger, J.K. and Newsham, I.F., Allelic loss on chromosome band 18p11.3 occurs early and reveals heterogeneity in breast cancer progression. *Breast Cancer Res*, 3, 192-8 (2001).
- Korneeva, I., Bongiovanni, A.M., Girotra, M., Caputo, T.A. and Witkin, S.S., IgA antibodies to the 27-kDa heat-shock protein in the genital tracts of women with gynecologic cancers. *Int J Cancer*, 87, 824-8. (2000).
- Korsmeyer, S.J., Regulators of cell death. *Trends Genet*, 11, 101-5. (1995).
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W. and Reed, J.C., Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res*, 53, 4701-14. (1993).
- Krajewski, S., Blomqvist, C., Franssila, K., Krajewska, M., Wasenius, V.M., Niskanen, E., Nordling, S. and Reed, J.C., Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res*, 55, 4471-8. (1995).
- Krajewski, S., Krajewska, M., Turner, B.C., Pratt, C., Howard, B., Zapata, J.M., Frenkel, V., Robertson, S., Ionov, Y., Yamamoto, H., Perucho, M., Takayama, S. and Reed, J.C., Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 6, 29-40. (1999).
- Kroemer, G., Zamzami, N. and Susin, S.A., Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*, 18, 44-51. (1997).
- Kuerbitz, S.J., Plunkett, B.S., Walsh, W.V. and Kastan, M.B., Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 7491-5. (1992).
- Kumar, R., Vadlamudi, R.K. and Adam, L., Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocr Relat Cancer*, 7, 257-69. (2000).
- Kumar-Sinha, C., Varambally, S., Sreekumar, A. and Chinnaiyan, A.M., Molecular cross-talk between the TRAIL and interferon signaling pathways. *J Biol Chem*, 277, 575-85. (2002).
- Kurose, K., Hoshaw-Woodard, S., Adeyinka, A., Lemeshow, S., Watson, P.H. and Eng, C., Genetic model of multi-step breast carcinogenesis involving the epithelium and stroma: clues to tumour-microenvironment interactions. *Hum Mol Genet*, 10, 1907-13. (2001).
- Kymionis, G.D., Dimitrakakis, C.E., Konstadoulakis, M.M., Arzimanoglou, I., Leandros, E., Chalkiadakis, G., Keramopoulos, A. and Michalas, S., Can expression of apoptosis genes,

bcl-2 and bax, predict survival and responsiveness to chemotherapy in node-negative breast cancer patients? *J Surg Res*, 99, 161-8. (2001).

Ladeda, V., Adam, A.P., Puricelli, L. and Bal de Kier Joffe, E., Apoptotic cell death in mammary adenocarcinoma cells is prevented by soluble factors present in the target organ of metastasis. *Breast Cancer Res Treat*, 69, 39-51. (2001).

Lappin, D.F., Birnie, G.D. and Whaley, K., Modulation by interferons of the expression of monocyte complement genes. *Biochem J*, 268, 387-92. (1990).

Lee, J.H. and Welch, D.R., Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res*, 57, 2384-7. (1997).

Leek, R.D., Kaklamanis, L., Pezzella, F., Gatter, K.C. and Harris, A.L., bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumours and in situ cancer. *Br J Cancer*, 69, 135-9. (1994).

Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B., Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, 386, 623-7. (1997).

Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B., Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396, 643-9. (1998).

Li, H. and Yuan, J., Deciphering the pathways of life and death. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 261-6. (1999).

Li, W., Ross-Smith, N., Proud, C.G. and Belsham, G.J., Cleavage of translation initiation factor 4AI (eIF4AI) but not eIF4AII by foot-and-mouth disease virus 3C protease: identification of the eIF4AI cleavage site. *FEBS Lett*, 507, 1-5. (2001).

Liao, D.J. and Dickson, R.B., c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 7, 143-64. (2000).

Lindblom, A., Rotstein, S., Skoog, L., Nordenskjold, M. and Larsson, C., Deletions on chromosome 16 in primary familial breast carcinomas are associated with development of distant metastases. *Cancer Res*, 53, 3707-11. (1993).

Lingle, W.L., Lutz, W.H., Ingle, J.N., Maihle, N.J. and Salisbury, J.L., Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2950-5. (1998).

Liotta, L.A. and Kohn, E.C., The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, 411, 375-9. (2001).

Liu, H., Wang, Y., Zhang, Y., Song, Q., Di, C., Chen, G., Tang, J. and Ma, D., TFAR19, a novel apoptosis-related gene cloned from human leukemia cell line TF-1, could enhance apoptosis of some tumor cells induced by growth factor withdrawal. *Biochem Biophys Res Commun*, 254, 203-10. (1999).

- Liu, Y., Naumovski, L. and Hanawalt, P., Nucleotide excision repair capacity is attenuated in human promyelocytic HL60 cells that overexpress BCL2. *Cancer Res*, 57, 1650-3. (1997).
- Lockhart, D.J. and Winzeler, E.A., Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, 405, 827-36. (2000).
- Loeb, K.R. and Loeb, L.A., Genetic instability and the mutator phenotype. Studies in ulcerative colitis. *Am J Pathol*, 154, 1621-6. (1999).
- Loeb, K.R. and Loeb, L.A., Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*, 21, 379-85. (2000).
- Loeb, L.A., Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res*, 51, 3075-9. (1991).
- Loeb, L.A., A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*, 61, 3230-9. (2001).
- Loeffler, M. and Kroemer, G., The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*, 256, 19-26. (2000).
- Lonning, P.E., Sorlie, T., Perou, C.M., Brown, P.O., Botstein, D. and Borresen-Dale, A.L., Microarrays in primary breast cancer--lessons from chemotherapy studies. *Endocr Relat Cancer*, 8, 259-63. (2001).
- Lopez-Boado, Y.S., Puente, X.S., Alvarez, S., Tolviva, J., Binderup, L. and Lopez-Otin, C., Growth inhibition of human breast cancer cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is accompanied by induction of apolipoprotein D expression. *Cancer Res*, 57, 4091-7. (1997).
- Lowe, S.W. and Lin, A.W., Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21, 485-95. (2000).
- Madden, S.L., Galella, E.A., Zhu, J., Bertelsen, A.H. and Beaudry, G.A., SAGE transcript profiles for p53-dependent growth regulation. *Oncogene*, 15, 1079-85. (1997).
- Magro, G., Lanzafame, S. and Colombatti, A., Immunohistochemical staining patterns of type VI collagen in the normal, hyperplastic, and neoplastic adult male breast. *Pathologica*, 86, 142-5. (1994).
- Mahony, M.C., Swanlund, D.J., Billeter, M., Roberts, K.P. and Pryor, J.L., Regional distribution of 5alpha-reductase type 1 and type 2 mRNA along the human epididymis. *Fertil Steril*, 69, 1116-21. (1998).
- Malkhosyan, S., Rampino, N., Yamamoto, H. and Perucho, M., Frameshift mutator mutations. *Nature*, 382, 499-500. (1996).
- McCormick, F., Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol*, 9, M53-6. (1999).
- McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P. and Korsmeyer, S.J., bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*, 57, 79-88. (1989).

Meijerink, J.P., Mensink, E.J., Wang, K., Sedlak, T.W., Sloetjes, A.W., de Witte, T., Waksman, G. and Korsmeyer, S.J., Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood*, 91, 2991-7. (1998).

Mendez, O., Manas, S., Peinado, Fabra, A., Escobedo, A., Moreno, A. and Sierra, A., Microsatellite instability is associated with the loss of apoptosis in ductal breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*, 65, 171-7. (2001).

Mettlin, C., Global breast cancer mortality statistics. *CA Cancer J Clin*, 49, 138-44. (1999).

Miller, M.K., Unger, P.D. and Bleiweiss, I.J., Immunohistochemical analysis of prostate specific antigen in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 68, 111-6. (2001).

Minn, A.J., Boise, L.H. and Thompson, C.B., Expression of Bcl-xL and loss of p53 can cooperate to overcome a cell cycle checkpoint induced by mitotic spindle damage. *Genes Dev*, 10, 2621-31. (1996).

Minn, A.J., Kettlun, C.S., Liang, H., Kelekar, A., Vander Heiden, M.G., Chang, B.S., Fesik, S.W., Fill, M. and Thompson, C.B., Bcl-xL regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and - independent mechanisms. *Embo J*, 18, 632-43. (1999).

Minobe, K., Bando, K., Fukino, K., Soma, S., Kasumi, F., Sakamoto, G., Furukawa, K., Higuchi, K., Onda, M., Nakamura, Y. and Emi, M., Somatic mutation of the PTEN/MMAC1 gene in breast cancers with microsatellite instability. *Cancer Lett*, 144, 9-16. (1999).

Mirza, A.N., Mirza, N.Q., Vlastos, G. and Singletary, S.E., Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg*, 235, 10-26. (2002).

Miyashita, T. and Reed, J.C., Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80, 293-9. (1995).

Moriishi, K., Huang, D.C., Cory, S. and Adams, J.M., Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 9683-8. (1999).

Morikawa, K., Walker, S.M., Nakajima, M., Pathak, S., Jessup, J.M. and Fidler, I.J., Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res*, 48, 6863-71. (1988).

Moro, L., Fornaro, M., Steger, C.A. and Languino, L.R., Regulation of MCP-3 and BRCA2 mRNA expression levels by beta(1) integrins. *Exp Mol Pathol*, 70, 239-47. (2001).

Morrison, T.B., Weis, J.J. and Wittwer, C.T., Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24, 954-8, 960, 962. (1998).

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., Barrera, J.L., Mohar, A., Verastegui, E. and Zlotnik,

- A., Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410, 50-6. (2001).
- Murphy, P.M., Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med*, 345, 833-5. (2001).
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. and Dixit, V.M., An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem*, 273, 2926-30. (1998).
- Nacht, M., Ferguson, A.T., Zhang, W., Petroziello, J.M., Cook, B.P., Gao, Y.H., Maguire, S., Riley, D., Coppola, G., Landes, G.M., Madden, S.L. and Sukumar, S., Combining serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer. *Cancer Res*, 59, 5464-70. (1999).
- Nagai, H., Hamada, T., Uchida, T., Yamagoe, S. and Suzuki, K., Systemic expression of a newly recognized protein, LECT2, in the human body. *Pathol Int*, 48, 882-6. (1998).
- Nathanson, K.N., Wooster, R. and Weber, B.L., Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat Med*, 7, 552-6. (2001).
- Nau, G.J., Richmond, J.F., Schlesinger, A., Jennings, E.G., Lander, E.S. and Young, R.A., Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 1503-8. (2002).
- Naumov, G.N., MacDonald, I.C., Weinmeister, P.M., Kerkvliet, N., Nadkarni, K.V., Wilson, S.M., Morris, V.L., Groom, A.C. and Chambers, A.F., Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy. *Cancer Res*, 62, 2162-8. (2002).
- Navarro, J.M. and Jorcano, J.L., The use of arbitrarily primed polymerase chain reaction in cancer research. *Electrophoresis*, 20, 283-90. (1999).
- Newton, M.A., Kendzierski, C.M., Richmond, C.S., Blattner, F.R. and Tsui, K.W., On Differential Variability of Expression Ratios: Improving Statistical Inference about Gene Expression Changes from Microarray Data. *J Comput Biol*, 8, 37-52. (2001).
- Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A., Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, 22, 299-306. (1997).
- Nishizaki, T., DeVries, S., Chew, K., Goodson, W.H., 3rd, Ljung, B.M., Thor, A. and Waldman, F.M., Genetic alterations in primary breast cancers and their metastases: direct comparison using modified comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 19, 267-72. (1997).
- Nowell, P.C., The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194, 23-8. (1976).
- Nowell, P.C., Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res*, 46, 2203-7. (1986).

Numoto, M., Yokoro, K. and Koshi, J., ZF5, which is a Kruppel-type transcriptional repressor, requires the zinc finger domain for self-association. *Biochem Biophys Res Commun*, 256, 573-8. (1999).

Ohmiya, N., Matsumoto, S., Yamamoto, H., Baranovskaya, S., Malkhosyan, S.R. and Perucho, M., Germline and somatic mutations in hMSH6 and hMSH3 in gastrointestinal cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Gene*, 272, 301-13. (2001).

Orr-Weaver, T.L. and Weinberg, R.A., A checkpoint on the road to cancer. *Nature*, 392, 223-4. (1998).

Ottini, L., Falchetti, M., D'Amico, C., Amorosi, A., Saieva, C., Masala, G., Frati, L., Cama, A., Palli, D. and Mariani-Costantini, R., Mutations at coding mononucleotide repeats in gastric cancer with the microsatellite mutator phenotype. *Oncogene*, 16, 2767-72. (1998).

Ouyang, H., Furukawa, T., Abe, T., Kato, Y. and Horii, A., The BAX gene, the promoter of apoptosis, is mutated in genetically unstable cancers of the colorectum, stomach, and endometrium. *Clin Cancer Res*, 4, 1071-4. (1998).

Paku, S., Dome, B., Toth, R. and Timar, J., Organ-specificity of the extravasation process: an ultrastructural study. *Clin Exp Metastasis*, 18, 481-92 (2001).

Paulson, T.G., Wright, F.A., Parker, B.A., Russack, V. and Wahl, G.M., Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. *Cancer Res*, 56, 4021-6. (1996).

Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Velazquez, A. and Perucho, M., Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10065-9. (1992).

Peltomaki, P., Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet*, 10, 735-40. (2001).

Percesepe, A., Kristo, P., Aaltonen, L.A., Ponz de Leon, M., de la Chapelle, A. and Peltomaki, P., Mismatch repair genes and mononucleotide tracts as mutation targets in colorectal tumors with different degrees of microsatellite instability. *Oncogene*, 17, 157-63. (1998).

Perou, C.M., Jeffrey, S.S., van de Rijn, M., Rees, C.A., Eisen, M.B., Ross, D.T., Pergamenschikov, A., Williams, C.F., Zhu, S.X., Lee, J.C., Lashkari, D., Shalon, D., Brown, P.O. and Botstein, D., Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 9212-7. (1999).

Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslén, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning, P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O. and Botstein, D., Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747-52. (2000).

- Perroteau, I., Salomon, D., DeBortoli, M., Kidwell, W., Hazarika, P., Pardue, R., Dedman, J. and Tam, J., Immunological detection and quantitation of alpha transforming growth factors in human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat*, 7, 201-10 (1986).
- Perucho, M., Welsh, J., Peinado, M.A., Ionov, Y. and McClelland, M., Fingerprinting of DNA and RNA by arbitrarily primed polymerase chain reaction: applications in cancer research. *Methods Enzymol*, 254, 275-90 (1995).
- Perucho, M., Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. *Nat Med*, 2, 630-1. (1996).
- Perucho, M., Cáncer del fenotipo mutador de microsatélites. *Investigación y Ciencia*, Junio, 46-55 (1998).
- Perucho, M., Correspondence re: C.R. Boland et al., A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 58: 5248-5257, 1998. *Cancer Res*, 59, 249-56. (1999).
- Phillips, J.L., Hayward, S.W., Wang, Y., Vasselli, J., Pavlovich, C., Padilla-Nash, H., Pezullo, J.R., Ghadimi, B.M., Grossfeld, G.D., Rivera, A., Linehan, W.M., Cunha, G.R. and Ried, T., The consequences of chromosomal aneuploidy on gene expression profiles in a cell line model for prostate carcinogenesis. *Cancer Res*, 61, 8143-9. (2001).
- Plow, E.F., Haas, T.A., Zhang, L., Loftus, J. and Smith, J.W., Ligand binding to integrins. *J Biol Chem*, 275, 21785-8. (2000).
- Ponder, B.A., Cancer genetics. *Nature*, 411, 336-41. (2001).
- Popov, P., Virolainen, M., Tukiainen, E., Asko-Scjljavaara, S., Huuhtanen, R., Knuutila, S. and Tarkkanen, M., Primary soft tissue sarcoma and its local recurrence: genetic changes studied by comparative genomic hybridization. *Mod Pathol*, 14, 978-84. (2001).
- Price, E.A., Coombe, D.R. and Murray, J.C., beta-1 Integrins mediate tumour cell adhesion to quiescent endothelial cells in vitro. *Br J Cancer*, 74, 1762-6. (1996).
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J.C. and Perucho, M., Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*, 275, 967-9. (1997).
- Rassart, E., Bedirian, A., Do Carmo, S., Guinard, O., Sirois, J., Terrisse, L. and Milne, R., Apolipoprotein D. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 185-98. (2000).
- Ree, A.H., Tvermyr, M., Engebraaten, O., Rooman, M., Rosok, O., Hovig, E., Meza-Zepeda, L.A., Bruland, O.S. and Fodstad, O., Expression of a novel factor in human breast cancer cells with metastatic potential. *Cancer Res*, 59, 4675-80. (1999).
- Reed, J.C., Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*, 387, 773-6. (1997).
- Reed, J.C., Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*, 17, 2941-53. (1999 a).

- Reed, J.C., Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol*, 11, 68-75. (1999 b).
- Reynolds, T.Y., Rockwell, S. and Glazer, P.M., Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res*, 56, 5754-7. (1996).
- Ross, D.T., Scherf, U., Eisen, M.B., Perou, C.M., Rees, C., Spellman, P., Iyer, V., Jeffrey, S.S., Van de Rijn, M., Waltham, M., Pergamenschikov, A., Lee, J.C., Lashkari, D., Shalon, D., Myers, T.G., Weinstein, J.N., Botstein, D. and Brown, P.O., Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet*, 24, 227-35. (2000).
- Ross, D.W., Cancer: the emerging molecular biology. *Hosp Pract (Off Ed)*, 35, 63-4, 67-74. (2000).
- Rubin, H., Selected cell and selective microenvironment in neoplastic development. *Cancer Res*, 61, 799-807. (2001).
- Russo, J., Yang, X., Hu, Y.F., Bove, B.A., Huang, Y., Silva, I.D., Tahin, Q., Wu, Y., Higgy, N., Zekri, A. and Russo, I.H., Biological and molecular basis of human breast cancer. *Front Biosci*, 3, D944-60. (1998).
- Russo, J., Hu, Y.F., Yang, X. and Russo, I.H., Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 27, 17-37 (2000).
- Sager, R., Expression genetics in cancer: shifting the focus from DNA to RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 952-5. (1997).
- Saintigny, Y., Dumay, A., Lambert, S. and Lopez, B.S., A novel role for the Bcl-2 protein family: specific suppression of the RAD51 recombination pathway. *Embo J*, 20, 2596-607. (2001).
- Salvesen, G.S. and Dixit, V.M., Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 91, 443-6. (1997).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., Molecular cloning. A Laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989).
- Sato, T., Akiyama, F., Sakamoto, G., Kasumi, F. and Nakamura, Y., Accumulation of genetic alterations and progression of primary breast cancer. *Cancer Res*, 51, 5794-9. (1991).
- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., Thompson, C.B. and Fesik, S.W., Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, 275, 983-6. (1997).
- Sauter, E.R. and Diamandis, E.P., Prostate-specific antigen levels in nipple aspirate fluid. *J Clin Oncol*, 19, 3160. (2001).

- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. and Peter, M.E., Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J*, 17, 1675-87. (1998).
- Schaich, M., Illmer, T., Seitz, G., Mohr, B., Schakel, U., Beck, J.F. and Ehninger, G., The prognostic value of Bcl-XL gene expression for remission induction is influenced by cytogenetics in adult acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 86, 470-7. (2001).
- Schendel, S.L., Xie, Z., Montal, M.O., Matsuyama, S., Montal, M. and Reed, J.C., Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 5113-8. (1997).
- Schirmacher, V., T-cell immunity in the induction and maintenance of a tumour dormant state. *Semin Cancer Biol*, 11, 285-95. (2001).
- Schlegel, J., Vogt, T., Munkel, K. and Ruschoff, J., DNA fingerprinting of mammalian cell lines using nonradioactive arbitrarily primed PCR (AP-PCR). *Biotechniques*, 20, 178-80. (1996).
- Schmitt, F.C., Soares, R., Gobbi, H., Milanezzi, F., Santos-Silva, F., Cirnes, L., Costa, C. and Seruca, R., Microsatellite instability in medullary breast carcinomas. *Int J Cancer*, 82, 644-7. (1999).
- Schnitt, S.J., Breast cancer in the 21st century: new opportunities and new challenges. *Mod Pathol*, 14, 213-8. (2001).
- Schorr, K., Li, M., Bar-Peled, U., Lewis, A., Heredia, A., Lewis, B., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J., Jager, R., Weiher, H. and Furth, P.A., Gain of Bcl-2 is more potent than bax loss in regulating mammary epithelial cell survival in vivo. *Cancer Res*, 59, 2541-5. (1999).
- Scott, K.A. and Walker, R.A., Lack of cyclin E immunoreactivity in non-malignant breast and association with proliferation in breast cancer. *Br J Cancer*, 76, 1288-92 (1997).
- Sekowski, J.W., Malkas, L.H., Schnaper, L., Bechtel, P.E., Long, B.J. and Hickey, R.J., Human breast cancer cells contain an error-prone DNA replication apparatus. *Cancer Res*, 58, 3259-63. (1998).
- Serra Diaz, C., Vizoso, F., Lamelas, M.L., Rodriguez, J.C., Gonzalez, L.O., Baltasar, A. and Medrano, J., Expression and clinical significance of apolipoprotein D in male breast cancer and gynaecomastia. *Br J Surg*, 86, 1190-7. (1999).
- Sgroi, D.C., Teng, S., Robinson, G., LeVangie, R., Hudson, J.R. and Elkahlon, A.G., In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression. *Cancer Res*, 59, 5656-61. (1999).
- Shen, C.Y., Yu, J.C., Lo, Y.L., Kuo, C.H., Yue, C.T., Jou, Y.S., Huang, C.S., Lung, J.C. and Wu, C.W., Genome-wide search for loss of heterozygosity using laser capture microdissected tissue of breast carcinoma: an implication for mutator phenotype and breast cancer pathogenesis. *Cancer Res*, 60, 3884-92. (2000).

Shilkaitis, A., Graves, J., Mehta, R.R., Hu, L., You, M., Lubet, R., Steele, V., Kelloff, G. and Christov, K., Bcl-2 and Bax are differentially expressed in hyperplastic, premalignant, and malignant lesions of mammary carcinogenesis. *Cell Growth Differ*, 11, 437-45. (2000).

Siegel, R.M., Martin, D.A., Zheng, L., Ng, S.Y., Bertin, J., Cohen, J. and Lenardo, M.J., Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J Cell Biol*, 141, 1243-53. (1998).

Sierra, A., Lloveras, B., Castellsague, X., Moreno, L., Garcia-Ramirez, M. and Fabra, A., Bcl-2 expression is associated with lymph node metastasis in human ductal breast carcinoma. *Int J Cancer*, 60, 54-60. (1995).

Sierra, A., Castellsague, X., Tortola, S., Escobedo, A., Lloveras, B., Peinado, M.A., Moreno, A. and Fabra, A., Apoptosis loss and bcl-2 expression: key determinants of lymph node metastases in T1 breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2, 1887-94. (1996).

Sierra, A., Castellsague, X., Coll, T., Manas, S., Escobedo, A., Moreno, A. and Fabra, A., Expression of death-related genes and their relationship to loss of apoptosis in T1 ductal breast carcinomas. *Int J Cancer*, 79, 103-10. (1998).

Sierra, A., Castellsague, X., Escobedo, A., Moreno, A., Drudis, T. and Fabra, A., Synergistic cooperation between c-Myc and Bcl-2 in lymph node progression of T1 human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*, 54, 39-45. (1999).

Silvestrini, R., Veneroni, S., Daidone, M.G., Benini, E., Boracchi, P., Mezzetti, M., Di Fronzo, G., Rilke, F. and Veronesi, U., The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 86, 499-504. (1994).

Simms, L.A., Radford-Smith, G., Biden, K.G., Buttenshaw, R., Cummings, M., Jass, J.R., Young, J., Meltzer, S.J. and Leggett, B.A., Reciprocal relationship between the tumor suppressors p53 and BAX in primary colorectal cancers. *Oncogene*, 17, 2003-8. (1998).

Sirivatanauksorn, Y., Sirivatanauksorn, V., Bhattacharya, S., Davidson, B.R., Dhillon, A.P., Kakkar, A.K., Williamson, R.C. and Lemoine, N.R., Evolution of genetic abnormalities in hepatocellular carcinomas demonstrated by DNA fingerprinting. *J Pathol*, 189, 344-50. (1999).

Sjostrom, J., Blomqvist, C., von Boguslawski, K., Bengtsson, N.O., Mjaaland, I., Malmstrom, P., Ostenstadt, B., Wist, E., Valvere, V., Takayama, S., Reed, J.C. and Saksela, E., The Predictive Value of bcl-2, bax, bcl-xL, bag-1, fas, and fasL for Chemotherapy Response in Advanced Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 8, 811-6. (2002).

Slee, E.A., Adrain, C. and Martin, S.J., Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6, 1067-74. (1999).

Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Eystein Lonning, P. and Borresen-Dale, A.L., Gene expression patterns of breast

- carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10869-74. (2001).
- Steeg, P.S. and Zhou, Q., Cyclins and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 52, 17-28 (1998).
- Strasser, A., Dr. Josef Steiner Cancer Research Prize Lecture: the role of physiological cell death in neoplastic transformation and in anti- cancer therapy. *Int J Cancer*, 81, 505-11. (1999).
- Sturzeneker, R., Bevilacqua, R.A., Haddad, L.A., Simpson, A.J. and Pena, S.D., Microsatellite instability in tumors as a model to study the process of microsatellite mutations. *Hum Mol Genet*, 9, 347-52. (2000).
- Su, A.I., Welsh, J.B., Sapinoso, L.M., Kern, S.G., Dimitrov, P., Lapp, H., Schultz, P.G., Powell, S.M., Moskaluk, C.A., Frierson, H.F., Jr. and Hampton, G.M., Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures. *Cancer Res*, 61, 7388-93. (2001).
- Su, A.I., Cooke, M.P., Ching, K.A., Hakak, Y., Walker, J.R., Wiltshire, T., Orth, A.P., Vega, R.G., Sapinoso, L.M., Moqrich, A., Patapoutian, A., Hampton, G.M., Schultz, P.G. and Hogenesch, J.B., Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 4465-70. (2002).
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. and Kroemer, G., Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397, 441-6. (1999).
- Suzuki, K. and Takahashi, K., Reduced substratum adhesion and decreased expressions of 1 and 4 integrins in human breast cancer cells with a property of anchorage- independent growth. *Int J Oncol*, 14, 897-904. (1999).
- Szallasi, Z., Bioinformatics. Gene expression patterns and cancer. *Nat Biotechnol*, 16, 1292-3. (1998).
- Taggart, A.K., Fisher, T.S. and Pugh, B.F., The TATA-binding protein and associated factors are components of pol III transcription factor TFIIB. *Cell*, 71, 1015-28. (1992).
- Thiberville, L., Payne, P., Vielkinds, J., LeRiche, J., Horsman, D., Nouvet, G., Palcic, B. and Lam, S., Evidence of cumulative gene losses with progression of premalignant epithelial lesions to carcinoma of the bronchus. *Cancer Res*, 55, 5133-9. (1995).
- Thompson, C.B., Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-62. (1995).
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y., Caspases: enemies within. *Science*, 281, 1312-6. (1998).

Tian, B., Lessan, K., Kahm, J., Kleidon, J. and Henke, C., beta 1 Integrin Regulates Fibroblast Viability during Collagen Matrix Contraction through a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Protein Kinase B Signaling Pathway. *J Biol Chem*, 277, 24667-75. (2002).

Tlsty, T.D., Cell-adhesion-dependent influences on genomic instability and carcinogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 10, 647-53. (1998).

Tomlinson, I.P., Novelli, M.R. and Bodmer, W.F., The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14800-3. (1996).

Tomlinson, I. and Bodmer, W., Selection, the mutation rate and cancer: ensuring that the tail does not wag the dog. *Nat Med*, 5, 11-2. (1999).

Tortola, S., Marcuello, E., Risques, R.A., Gonzalez, S., Aiza, G., Capella, G. and Peinado, M.A., Overall deregulation in gene expression as a novel indicator of tumor aggressiveness in colorectal cancer. *Oncogene*, 18, 4383-7. (1999).

Trenkle, T., Welsh, J., Jung, B., Mathieu-Daude, F. and McClelland, M., Non-stoichiometric reduced complexity probes for cDNA arrays. *Nucleic Acids Res*, 26, 3883-91. (1998).

Trueb, B. and Odermatt, B.F., Loss of type VI collagen in experimental and most spontaneous human fibrosarcomas. *Int J Cancer*, 86, 331-6. (2000).

Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E. and Croce, C.M., The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*, 229, 1390-3. (1985).

Tsujimoto, Y. and Shimizu, S., Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett*, 466, 6-10. (2000).

Uchida, A., O'Keefe, D.S., Bacich, D.J., Molloy, P.L. and Heston, W.D., In vivo suicide gene therapy model using a newly discovered prostate-specific membrane antigen promoter/enhancer: a potential alternative approach to androgen deprivation therapy. *Urology*, 58, 132-9. (2001).

Uchida, T., Nagai, H., Gotoh, K., Kanagawa, H., Kouyama, H., Kawanishi, T., Mima, S., Yamagoe, S. and Suzuki, K., Expression pattern of a newly recognized protein, LECT2, in hepatocellular carcinoma and its premalignant lesion. *Pathol Int*, 49, 147-51. (1999).

Uhr, J.W., Tucker, T., May, R.D., Siu, H. and Vitetta, E.S., Cancer dormancy: studies of the murine BCL1 lymphoma. *Cancer Res*, 51, 5045s-5053s. (1991).

Van Der Knaap, J.A., Van Den Boom, V., Kuipers, J., Van Eijk, M.J., Van Der Vliet, P.C. and Timmers, H.T., The gene for human TATA-binding-protein-associated factor (TAFII) 170: structure, promoter and chromosomal localization. *Biochem J*, 345 Pt 3, 521-7. (2000).

Van Duinen, C.M., Fleuren, G.J. and Bruijn, J.A., The extracellular matrix in pigmented skin lesions: an immunohistochemical study. *Histopathology*, 24, 33-40. (1994).

- van 't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., Schreiber, G.J., Kerkhoven, R.M., Roberts, C., Linsley, P.S., Bernards, R. and Friend, S.H., Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415, 530-6. (2002).
- Vander Heiden, M.G. and Thompson, C.B., Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol*, 1, E209-16. (1999).
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W., Serial analysis of gene expression. *Science*, 270, 484-7. (1995).
- Venables, R.S., McLean, S., Luny, D., Moteleb, E., Morley, S., Quinlan, R.A., Lane, E.B. and Hutchison, C.J., Expression of individual lamins in basal cell carcinomas of the skin. *Br J Cancer*, 84, 512-9. (2001).
- Venkitaraman, A.R., Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108, 171-82. (2002).
- Vietor, I. and Huber, L.A., In search of differentially expressed genes and proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1359, 187-99. (1997).
- Vihinen, P. and Kahari, V.M., Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer*, 99, 157-66. (2002).
- Vogel, V.G., Breast cancer prevention: a review of current evidence. *CA Cancer J Clin*, 50, 156-70. (2000).
- Volpe, J.P., Genetic instability of cancer. Why a metastatic tumor is unstable and a benign tumor is stable. *Cancer Genet Cytogenet*, 34, 125-34. (1988).
- Walker, J. and Rigley, K., Gene expression profiling in human peripheral blood mononuclear cells using high-density filter-based cDNA microarrays. *J Immunol Methods*, 239, 167-79. (2000).
- Walsh, T., Chappell, S.A., Shaw, J.A. and Walker, R.A., Microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol*, 185, 18-24. (1998).
- Wang, F., Samudio, I. and Safe, S., Transcriptional activation of rat creatine kinase B by 17beta-estradiol in MCF-7 cells involves an estrogen responsive element and GC-rich sites. *J Cell Biochem*, 84, 156-72 (2001).
- Wang, X., The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 15, 2922-33. (2001).
- Welch, D.R. and Wei, L.L., Genetic and epigenetic regulation of human breast cancer progression and metastasis. *Endocrine-Related Cancer*, 155-197 (1998).
- Welch, D.R. and Rinker-Schaeffer, C.W., What defines a useful marker of metastasis in human cancer? *J Natl Cancer Inst*, 91, 1351-3. (1999).

Welsh, J. and McClelland, M., Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 18, 7213-8. (1990).

Welsh, J.a.M.M., *Fingerprinting Using Arbitrarily Primed PCR: Application to Genetic Mapping, population biology, Epidemiology, and Detection of Differentially Expressed RNAs.*, p. 295-303 (1994).

Whitman, S., Wang, X., Shalaby, R. and Shtivelman, E., Alternatively spliced products CC3 and TC3 have opposing effects on apoptosis. *Mol Cell Biol*, 20, 583-93. (2000).

Wiese, C., Pierce, A.J., Gauny, S.S., Jasin, M. and Kronenberg, A., Gene conversion is strongly induced in human cells by double-strand breaks and is modulated by the expression of BCL-x(L). *Cancer Res*, 62, 1279-83. (2002).

Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G. and Youle, R.J., Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*, 139, 1281-92. (1997).

Wong, M.L., Xin, W.W. and Duman, R.S., Rat LCR1: cloning and cellular distribution of a putative chemokine receptor in brain. *Mol Psychiatry*, 1, 133-40. (1996).

Wooster, R., Cleton-Jansen, A.M., Collins, N., Mangion, J., Cornelis, R.S., Cooper, C.S., Gusterson, B.A., Ponder, B.A., von Deimling, A., Wiestler, O.D. and et al., Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nat Genet*, 6, 152-6. (1994).

Wright, S.C., Zhong, J. and Larrick, J.W., Inhibition of apoptosis as a mechanism of tumor promotion. *Faseb J*, 8, 654-60. (1994).

Wu, Q.D., Wang, J.H., Condron, C., Bouchier-Hayes, D. and Redmond, H.P., Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C814-22. (2001).

Yamagoe, S., Kameoka, Y., Hashimoto, K., Mizuno, S. and Suzuki, K., Molecular cloning, structural characterization, and chromosomal mapping of the human LECT2 gene. *Genomics*, 48, 324-9. (1998).

Yamamoto, H., Sawai, H. and Perucho, M., Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res*, 57, 4420-6. (1997).

Yamasaki, H. and Mironov, N., Genomic instability in multistage carcinogenesis. *Toxicol Lett*, 112-113, 251-6. (2000).

Yan, P.S., Chen, C.M., Shi, H., Rahmatpanah, F., Wei, S.H., Caldwell, C.W. and Huang, T.H., Dissecting complex epigenetic alterations in breast cancer using CpG island microarrays. *Cancer Res*, 61, 8375-80. (2001).

Yanagidani, A., Matsuoka, M., Yokoro, K., Tanaka, H. and Numoto, M., Identification of human autoantibodies to the transcriptional repressor ZF5. *J Autoimmun*, 15, 75-80. (2000).

Yang, X., Yan, L. and Davidson, N.E., DNA methylation in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 8, 115-27. (2001).

- Yasuda, J., Navarro, J.M., Malkhosyan, S., Velazquez, A., Arribas, R., Sekiya, T. and Perucho, M., Chromosomal assignment of human DNA fingerprint sequences by simultaneous hybridization to arbitrarily primed PCR products from human/rodent monochromosome cell hybrids. *Genomics*, 34, 1-8. (1996).
- Yee, C.J., Roodi, N., Verrier, C.S. and Parl, F.F., Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Res*, 54, 1641-4. (1994).
- Yokota, J., Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21, 497-503. (2000).
- Yoon, H., Donoso, L.A. and Philp, N.J., Cloning of the human monocarboxylate transporter MCT3 gene: localization to chromosome 22q12.3-q13.2. *Genomics*, 60, 366-70. (1999).
- Yoshida, B.A., Sokoloff, M.M., Welch, D.R. and Rinker-Schaeffer, C.W., Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *J Natl Cancer Inst*, 92, 1717-30. (2000).
- Zha, H. and Reed, J.C., Heterodimerization-independent functions of cell death regulatory proteins Bax and Bcl-2 in yeast and mammalian cells. *J Biol Chem*, 272, 31482-8. (1997).
- Zhang, M., Martin, K.J., Sheng, S. and Sager, R., Expression genetics: a different approach to cancer diagnosis and prognosis. *Trends Biotechnol*, 16, 66-71. (1998).
- Zhang, M.Q., Large-scale gene expression data analysis: a new challenge to computational biologists. *Genome Res*, 9, 681-8. (1999).
- Zhou, X.P., Hoang, J.M., Li, Y.J., Seruca, R., Carneiro, F., Sobrinho-Simoes, M., Lothe, R.A., Gleeson, C.M., Russell, S.E., Muzeau, F., Flejou, J.F., Hoang-Xuan, K., Lidereau, R., Thomas, G. and Hamelin, R., Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. *Genes Chromosomes Cancer*, 21, 101-7. (1998).
- Zhou, Y., Gwadry, F.G., Reinhold, W.C., Miller, L.D., Smith, L.H., Scherf, U., Liu, E.T., Kohn, K.W., Pommier, Y. and Weinstein, J.N., Transcriptional regulation of mitotic genes by camptothecin-induced DNA damage: microarray analysis of dose- and time-dependent effects. *Cancer Res*, 62, 1688-95. (2002).