



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**Detección de células circulantes tumorales en
pacientes con cáncer de mama mediante el uso de
dos biomarcadores: Mamaglobina A y TWIST-1.
Evaluación del daño genotóxico.**

Georgina Gallucci

**Tesina para optar el título de
Licenciada en biotecnología**

**Director: Dr. Sergio Ghersevich
Co-directora: Dra. Estefania Massa**

2017

AGRADECIMIENTOS

A Sergio, por confiar en mi y guiarme en cada paso de esta etapa de formación académica. Por aportarme su conocimiento, paciencia, y calidez humana que impulsaron y motivaron el desarrollo de este trabajo.

A Estefanía, por su dedicación, predisposición y compañerismo que contribuyó en mi crecimiento, haciendo satisfactoria esta etapa formación.

A los doctores Tozzini y Capitaine Funes, por haber colaborado con este proyecto y estar siempre brindando su apoyo y motivación en la investigación.

A mi papá y mamá, por el amor infinito. Son mis pilares, sin su apoyo y contención incondicional, no hubiera sido posible lograrlo. Gracias por haberme dado la vida y acompañarme siempre.

A mis abuelos Francisco y Eddy por haberme dado todo su amor, cariño y cuidado desde que nací.

A mis padrinos Marcelo y Mónica, por siempre haberme alentando, apoyado y motivado durante la carrera. Y a mis tíos y primos, por haber sido participes de esta etapa.

A mis amigos, por los días y noches de estudio y por los miles de momentos de risas compartidos. A todos los ellos gracias por el apoyo que me brindaron siempre a seguir adelante. Sin duda, el transito por la universidad hizo que me haya encontrado con un gran capital humano.

A Paula, por la amistad incondicional que perdura a través de los años.

A Diana y Gisela, por haber sido las primeras personas que confiaron en mi y me abrieron las puertas de su laboratorio para iniciar mis primeros pasos.

A los profesores de la Facultad, que fueron motivo de inspiración en la labor científica.

Finalmente, a todas las personas que de una u otra manera colaboraron para que pueda concluir con mi trabajo de tesina.

ABREVIATURAS

bHLH: básico hélice-loop hélice

CTCs: células circulantes tumorales

DEPC: dietil pirocarbonato

DS: desvío standard

EMT: transición epitelial-mesenquimal

HER-2 neu: receptor del factor de crecimiento epidérmico

MGA: Mamaglobina A

PBS: buffer fosfato salino

RI: radiación ionizante

Rpm: revoluciones por minuto

SF: solución fisiológica

SFB: suero fetal bovino

Xg: fuerza centrífuga

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CONCEPTOS BÁSICOS ACERCA DEL CÁNCER.....	1
1.2 CANCER DE MAMA.....	4
1.3 MARCADORES PRONÓSTICOS EN EL CÁNCER DE MAMA.....	5
1.4 TECNICAS PARA LA DETECCIÓN DE CTCs.....	7
1.4.1 Métodos de enriquecimiento de CTCs.....	7
1.4.2 Detección de CTCs.....	9
1.4.2.1 Mamaglobina A.....	10
1.4.2.1.1 Rol biológico de MGA.....	12
1.4.2.1.2 MGA como marcador de cáncer de mama.....	13
1.4.2.2 TWIST-1.....	13
1.4.2.2.1 Estructura de TWIST-1.....	14
1.4.2.2.2 Mecanismo de acción de TWIST-1.....	15
1.4.2.2.3 Utilización de TWIST-1 como marcador de CTCs en cáncer de mama.....	16
1.5 GENOTOXICIDAD DE TRATAMIENTOS CONTRA EL CÁNCER.....	16
1.5.1 Tipos y causas de daños del ADN.....	16
1.5.2 Tratamientos contra el cáncer de mama.....	18
1.5.3 Efectos de los diversos agentes contra el cáncer.....	19
1.5.4 Técnicas de detección del daño en el ADN.....	21
1.5.5 Ensayo del cometa.....	22
1.5.5.1 Aplicaciones del ensayo del cometa.....	23
2. OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVOS GENERALES.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1 RESGUARDOS ÉTICOS.....	27
3.2 ORIGEN DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS.....	27
3.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE.....	27
3.4 OBTENCIÓN DE CÉLULAS NUCLEADAS A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE SANGRE.....	27
3.4.1 Método de separación utilizando Percoll.....	27

3.4.2 Método de separación utilizando Ficoll.	28
3.5 OBTENCIÓN DE ARN TOTAL	28
3.5.1 Extracción de ARN	28
3.5.2 Determinación de la concentración, pureza e integridad del ARN	29
3.5.3 Tratamiento de las muestras de ARN con ADNasa.	30
3.6 RETROTRANSCRIPCIÓN (RT).	30
3.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	31
3.7.1 PCR para el gen de la beta-actina.	31
3.7.1.1 Análisis de los productos de PCR.	32
3.8 RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA EL GEN TWIST-1.....	32
3.8.1 Obtención de ARN a partir de células MCF-7.	34
3.9 PCR EN TIEMPO REAL DEL GEN DE LA ENZIMA GLICERALDEHÍDO 3- FOSFATO DESHIDROGENASA (GADPH).....	34
3.10 PCR EN TIEMPO REAL PARA EL GEN MGA.....	35
3.10.1 Obtención de ADNc a partir de las líneas celulares T47-D y MDA-MB-468.	36
3.10.2 Obtención de ADNc a partir de una muestra de tejido de mama normal.	36
3.11 ENSAYO DEL COMETA.	37
3.11.1 Preparación de los portaobjetos.	37
3.11.2 Lisis alcalina.	38
3.11.3 Desenrollamiento alcalino y electroforesis.	38
3.11.4 Neutralización.	38
3.11.5 Análisis de los cometas	39
3.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	40
3.13 CONSENTIMIENTO INFORMADO UTILIZADO PARA LA DONACIÓN DE MUESTRA DE SANGRE HUMANA:.....	40
4. RESULTADOS	42
4.1 DETECCIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LAS MUESTRAS DE ARN.	42
4.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES.	42
4.3 DETERMINACION DE LA EXPRESION DEL GEN TWIST-1.....	43
4.3.1 Ajuste de los parámetros y optimización de la reacción de RT-PCR.	43
4.3.2 Análisis de asociación entre la expresión del gen TWIST-1 y los diferentes factores pronósticos del cáncer de mama.	46
4.4 DETERMINACION DE LA EXPRESION DEL GEN MGA.....	47
4.4.1 Análisis de asociación entre la expresión de MGA y diferentes factores pronósticos del cáncer de mama.	47

4.5 DETECCIÓN DE CTCs MEDIANTE LA COMBINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TWIST-1 Y MGA.	49
4.5.2 Análisis de asociación entre la expresión de TWIST-1/MGA y diferentes factores pronósticos del cáncer de mama.	49
4.6 ENSAYO DEL COMETA.	51
4.6.1 Análisis de asociación entre el daño en el ADN y los factores pronósticos en el cáncer de mama.	52
4.6.2 Análisis del daño en el ADN antes y después del tratamiento.	53
4.6.3 Análisis de asociación entre el daño en el ADN y la expresión de MGA y TWIST-1.	56
5. DISCUSIÓN.	57
5.1 TWIST-1.	57
5.2 MGA.	59
5.3 DETECCIÓN DE CTCs MEDIANTE LA COMBINACION DE TWIST-1 Y MGA.	60
5.4 ENSAYO DEL COMETA.	62
6. CONCLUSIONES.	66
7. BIBLIOGRAFÍA.	67

RESUMEN

El cáncer de mama se caracteriza por la diseminación temprana de células tumorales a órganos distantes, las cuales se denominan células tumorales circulantes (CTCs) y no son detectadas por métodos de diagnóstico tradicionales. En este estudio se analizó la expresión de los genes TWIST-1 y de MGA en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama para detectar las CTCs. Los resultados indicaron que el análisis combinado de la expresión de TWIST-1 y MGA aumentó la sensibilidad de la detección de las CTCs respecto del análisis de cada gen individual. La detección de CTCs podría brindar información pronóstica adicional y contribuir a personalizar el tratamiento antitumoral.

Los tratamientos convencionales contra el cáncer de mama causan lesiones en el ADN y pueden presentar efectos colaterales de distinta gravedad. En este trabajo mediante el ensayo del cometa en linfocitos de sangre periférica se halló un mayor daño en el ADN en pacientes con cáncer de mama que en donantes sanas. Además, se corroboró el aumento del daño genotóxico después del tratamiento antitumoral. Los resultados apoyan una relación entre el nivel de daño al ADN antes y después del tratamiento. El ensayo del cometa podría contribuir a la selección de la terapia para cada paciente y a prevenir o a disminuir efectos colaterales de la misma.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CONCEPTOS BÁSICOS ACERCA DEL CÁNCER.

Según hechos históricos, el cáncer no es una enfermedad de los últimos siglos, sino que desde los comienzos de la humanidad se han encontrado datos acerca de su existencia. El primer escrito hallado fue el papiro de Edwin Smith que data de 3.000 años antes de Cristo, en el cual se describe a un tumor abultado en la mama como una grave enfermedad para la cual no existía tratamiento (Breasted, 1930). A lo largo del tiempo, se han logrado grandes avances en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, aumentando la supervivencia de las pacientes.

El cáncer es esencialmente una enfermedad genética, causada por mutaciones somáticas. No surge de una única mutación, sino de una acumulación de varias mutaciones. Los tumores crecen por un proceso de evolución clonal. La primera mutación podría resultar en una limitada expansión de la progenie de una única célula. Una de estas células podría adquirir otras mutaciones, lo cual podría permitir el crecimiento de un pequeño tumor benigno. Una célula dentro de este tumor benigno luego podría experimentar nuevas mutaciones. Eventualmente, la célula acumulará un número suficiente de mutaciones para desarrollar un fenotipo maligno, lo que le permitirá invadir los tejidos circundantes y hacer metástasis a otros órganos (estas últimas propiedades distinguen tumores malignos, de tumores benignos) (Vogelstein & Kinzler, 1993).

En 1889 Stephen Paget al analizar muestras post-mortem de pacientes con cáncer de mama, encontró que en algunos órganos hay mayor predisposición al crecimiento de un tumor secundario que en otros. Paget sugirió que ciertas células tumorales (“semillas”) crecen preferencialmente en el microambiente de ciertos órganos selectos (“suelo”). Por lo tanto, la metástasis no es al azar, solo ocurre cuando la semilla y el suelo son los adecuados (Paget, 1889). Esta hipótesis de “semilla” y “suelo” ha sido relevante para el desarrollo del modelo de nicho metastásico, el cual sugiere que un microambiente adecuadamente propicio, denominado nicho pre-metastásico, debe evolucionar para que las células tumorales puedan injertarse y proliferar, dando lugar al nicho metastásico (Psaila & Lyden, 2009). La formación del nicho pre-metastásico es dirigida por células del tumor primario a través de la secreción de varios factores, tales como citoquinas y factores de crecimiento (Sceneay y col., 2013). La comunicación entre las células tumorales y las células estromales en microambientes locales y

distantes sería mediada por vesículas extracelulares secretadas por células del tumor (Becker y col., 2016). La colonización de los nichos premetastásicos y la posterior metástasis ocurren luego de varios procesos que preparan dichos sitios antes de la llegada de las células tumorales. La formación del nicho metastásico se caracteriza por presentar organotropismo, es decir, que ciertos tipos de cáncer predisponen a formar metástasis sobre ciertos órganos específicos. Se requieren además otros eventos para que la célula tumoral colonice el nicho, incluyendo efectos locales sobre el sistema inmune que permiten su supervivencia y el crecimiento del tumor, la angiogénesis/permeabilidad vascular y la linfangiogénesis (Liu & Cao, 2016).

Durante la progresión del tumor y la desdiferenciación, las células tumorales utilizan diversos mecanismos que les permiten lograr plasticidad para escapar del tumor primario, ya sea como células individuales, usando movimientos de tipo ameboide o mesenquimal, o como hojas celulares, hebras y racimos usando migración colectiva. La migración de las células tumorales es generalmente regulada por (Friedl & Wolf, 2003):

- Integrinas.
- Enzimas que degradan la matriz.
- Moléculas de adhesión célula-célula.
- Moléculas involucradas en la comunicación celular.

Las células tumorales sobrellevan cambios fenotípicos y morfológicos logrando un fenotipo mesenquimal asociado con el aumento de la motilidad celular y desarrollando un potencial invasivo. En esta transformación las células epiteliales pierden sus uniones, la polaridad apical-basal, reorganizan su citoesqueleto, experimentan modificaciones en los programas de señalización que definen la forma celular y reprograman la expresión génica; este proceso biológico se conoce como transición epitelial-mesenquimal (EMT) (Lamouille y col., 2014). Se ha identificado a esta transición como un impulsor central de la malignidad tumoral, pero además recientemente se ha descubierto que la activación de los programas EMT sirven como mecanismo principal para generar células madre tumorales, es decir, células responsables de iniciar y propagar la enfermedad (Ye & Weinberg, 2015). Aunque está claro que la EMT está involucrada en eventos metastásicos, su participación en otros eventos tales como la prevención de la apoptosis y senescencia y la contribución a la inmunosupresión pueden también ser relevantes en la progresión tumoral (Thiery y col., 2009).

El programa de EMT dota a las células epiteliales de mayor motilidad e invasividad, contribuyendo a que las células tumorales se desprendan del tumor y se liberen al torrente sanguíneo y/o a los vasos linfáticos. A estas células tumorales que pueden permanecer en circulación diseminándose por todo el cuerpo se las denomina células tumorales circulantes (CTCs). La generación de estas células incluye varios pasos (Jie y col., 2017):

- El desprendimiento de la masa tumoral.
- La invasión de la membrana basal y los tejidos circundantes.
- La entrada a los vasos sanguíneos.
- La supervivencia en circulación.

El destino de las células tumorales que se diseminan está fuertemente influenciado por las interacciones que experimentan a través del sistema circulatorio. El torrente sanguíneo representa un ambiente hostil para las CTCs al exponerse a las células *Natural killer* o a la fragmentación debido al estrés físico encontrado en el tránsito a través de la circulación (Headley y col., 2016). Además, puede ocurrir que debido a la pérdida de contacto con la matriz extracelular circundante las células tumorales en el torrente sanguíneo o en los sistemas vasculares linfáticos sobrelleven una forma de apoptosis denominada anoikis (Frisch & Screaton, 2001). En el caso en que las células tumorales lleguen a extravasar hacia el tejido parenquimal y no sean capaces de proliferar, estas células pueden morir o permanecer en un estado de latencia durante meses o décadas (Sosa y col., 2014). La mayoría de las células tumorales mueren antes de poder infiltrar un órgano distante, solo una minoría puede ser viable y tener el potencial de sobrevivir y crecer en un sitio secundario. Por lo cual, el proceso metastásico es muy ineficiente (Weiss, 1990; Sugarbaker, 1993; Obenauf & Massagué, 2015).

Para que se produzca la metástasis tumoral deben completarse exitosamente una sucesión de eventos biológicos-celulares (Figura 1). Esta serie de pasos se denomina cascada metastásica, en la cual las células epiteliales de un tumor primario experimentan las siguientes etapas (Valastyan & Weinberg, 2011):

- 1- Invasión local a través de la matriz extracelular circundante.
- 2- Intravasación en los vasos sanguíneos.
- 3- Supervivencia a los rigores del transporte a través de la circulación.
- 4- Estancamiento en la microcirculación en órganos distantes.

- 5- Extravasación en el parénquima de tejidos distantes.
- 6- Supervivencia inicialmente en estos microambientes extraños.
- 7- Reinicio de la proliferación en el tejido colonizado, generando así crecimientos neoplásicos primero microscópicos (micrometástasis) y luego macroscópicos, dando lugar a la "colonización metastásica".

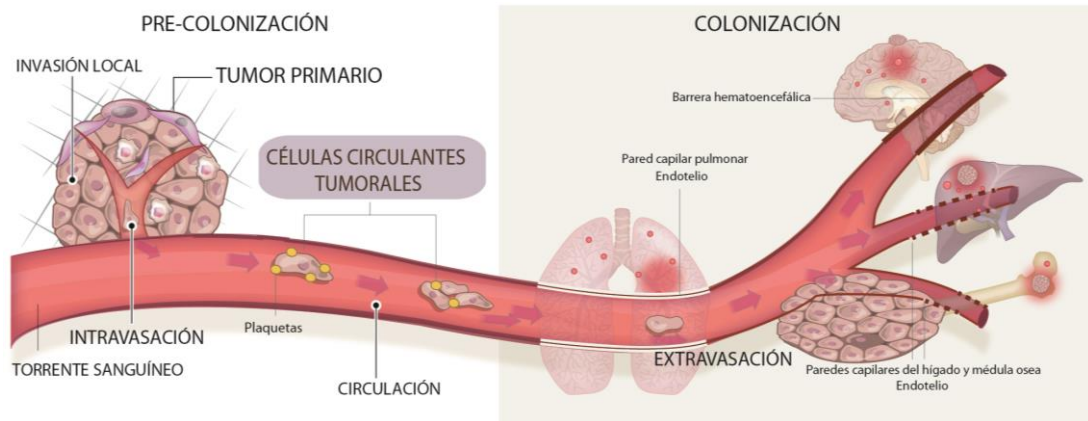


Figura 1: Esquema del proceso metastásico. Adaptado de Massagué & Obenauf, 2016.

Aunque a lo largo del tiempo se han realizado numerosos progresos para dilucidar los mecanismos moleculares y celulares que conducen a la metástasis tumoral, el 90% de la mortalidad por cáncer es atribuible a la metástasis y no a los tumores primarios. Esto se debe a que la enfermedad metastásica es en gran medida incurable debido a su naturaleza sistémica. La resección quirúrgica y la terapia adyuvante pueden curar tumores primarios, en cambio las células tumorales diseminadas resisten a los agentes terapéuticos existentes (Steeg, 2006; Gupta & Massagué, 2006). Por lo tanto, a pesar de que se han logrado importantes avances, aún se deben realizar mayores esfuerzos en desarrollar nuevos métodos de diagnóstico y estrategias terapéuticas para tratar al cáncer.

1.2 CANCER DE MAMA.

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado y la principal causa de muerte por cáncer de mujeres en el mundo. Se estimó que casi 1,7 millones de nuevos casos y 521.900 muertes por cáncer de mama han ocurrido en todo el mundo en el año 2012 (De santis y col., 2015). Un estudio epidemiológico realizado en América del sur y América central informó que Argentina, Brasil y Uruguay poseen las tasas más altas de incidencia y mortalidad del cáncer de mama estandarizadas por edad (Di Sibio y col., 2016). Según datos reportados por el Instituto Nacional del

Cáncer, en Argentina el cáncer de mama es la principal causa de mortalidad por cáncer en mujeres. Sin embargo, la mortalidad debida a esta enfermedad ha disminuido en forma sostenida y estadísticamente significativa, a un ritmo de 0,8 % anual en el periodo 2000-2011 y 2,1 % anual entre 2012 y 2014 (Instituto nacional del cáncer, 2017). La disminución de la mortalidad fue lograda gracias a la prevención, educación, asistencia y las investigaciones que fueron llevadas a cabo al haber abordado la lucha contra el cáncer como un problema de salud pública. Además de la toma de medidas preventivas, es fundamental el diagnóstico temprano del cáncer de mama, que incluye mamografías periódicas (Huñis, 2016).

1.3 MARCADORES PRONÓSTICOS EN EL CÁNCER DE MAMA.

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más común en mujeres, y tiene una alta tasa de remisión si se diagnostica en una etapa temprana. Para el diagnóstico, el tratamiento y la predicción de la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama se utilizan factores pronósticos tradicionales que incluyen la invasión de los nódulos linfáticos, el tamaño del tumor, el grado histológico y nuclear (Masood, 2005; Andreopoulou & Hortobagyi, 2008). Entre los biomarcadores estándares que se utilizan en la clínica para tomar decisiones terapéuticas se encuentran los receptores de estrógeno, progesterona y el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (Her-2) (Taneja y col., 2010). En la actualidad se pueden determinar también biomarcadores moleculares y perfiles de expresión génica o proteica de los tumores con fines pronósticos.

Con la determinación de estos factores pronósticos y biomarcadores no se puede obtener demasiada información de lesiones metastásicas que podrían albergar las pacientes con cáncer de mama en el momento del diagnóstico (Weigel & Dowsett, 2010). Además, estos biomarcadores no pueden reflejar la heterogeneidad del cáncer de mama que ha sido descripta a niveles intratumorales, e intra e intermetástasis (Ulaner y col., 2016). La heterogeneidad intratumoral, es decir la diversidad clonal de las células tumorales con diferente potencial de progresión, está directamente asociada a la invasión tumoral, la recaída y la metástasis (Gerashchenko y col., 2013). Basándose en estas consideraciones, no sería suficiente caracterizar el tumor primario como objetivo terapéutico, sino que también es fundamental identificar las células tumorales que pueden desprenderse del tumor primario y diseminarse por el torrente sanguíneo. La

detección temprana de estas células podría ser esencial para desarrollar y seleccionar formas más eficientes de tratamientos sistémicos (Pantel & Brakenhoff, 2004).

La metástasis es probablemente causada por el esparcimiento de células tumorales ocultas en sangre durante la fase temprana de la enfermedad. Por lo cual, el tratamiento del cáncer de mama metastásico requiere el monitoreo de la carga de células tumorales para determinar la respuesta al tratamiento y para esto se continúan evaluando a nuevos biomarcadores (Dawson y col., 2013). La comprensión de las características biológicas de la metástasis se ha obstaculizado durante mucho tiempo por las dificultades para estudiar las lesiones metastásicas en los pacientes y por la ausencia de métodos fiables para aislar las células metastásicas durante la progresión de la enfermedad. Dado que a partir de los tumores se desprenden las células que darán origen a las metástasis, el análisis de las CTCs, el ADN circulante del tumor y los exosomas derivados de ellos permiten la caracterización del tumor por medios mínimamente invasivos. A las muestras de sangre utilizadas para este fin a menudo se las denomina biopsias "líquidas". De hecho, numerosos estudios han descrito como se puede extraer información molecular sobre los tumores primarios a partir de estos componentes en sangre (Perakis & Speicher, 2017). Incluso, se ha sugerido que las CTCs también pueden colonizar su tumor original, en un proceso que se llama "auto-siembra de tumores", acelerando el crecimiento tumoral, la angiogénesis y el reclutamiento estromal. La auto-siembra del tumor podría explicar la recidiva local causada por la siembra de células diseminadas después de una escisión tumoral ostensiblemente completa (Kim y col., 2009).

La extensa literatura publicada durante los últimos años apoya firmemente el rol clave de las CTCs en la formación de metástasis. La detección de las CTCs podría proporcionar una estratificación de riesgo más precisa para la toma de decisiones terapéuticas posteriores, o incluso ayudar a adaptar terapias adicionales, convencionales o dirigidas, para erradicar estas células antes que se manifieste una metástasis (Alunni-Fabbroni y col., 2014). Consecuentemente, se ha demostrado mediante un estudio de meta-análisis que la presencia de las CTCs es un indicador útil de la eficiencia de las terapias para el cáncer de mama, lo cual puede ayudar a los médicos a tomar decisiones para cada paciente, brindándoles una terapia personalizada (Yan y col., 2017). Sin embargo, la aplicación del estudio de las CTCs en el contexto clínico aún presenta desafíos en su validación analítica y en su utilidad clínica. Los avances recientes en

métodos especializados para el aislamiento de CTCs, permitirían mejorar el manejo clínico de los pacientes con cáncer (Gkountela y col., 2016).

1.4 TECNICAS PARA LA DETECCIÓN DE CTCs.

El descubrimiento de las CTCs por el patólogo australiano John Ashworth en 1869 tomó algún tiempo en ser aceptada, debido al gran desafío técnico de estudiar células tumorales dentro de un contexto de ~5 millones de células mononucleares presentes en 1 mL de sangre entera (Ashworth, 1869; Paterlini-Brechot & Benali, 2007). En la década pasada se han realizado numerosos esfuerzos para desarrollar metodologías con suficiente sensibilidad y especificidad que permitan la identificación de estas células (Pantel y col., 2009). Debido a que las CTCs se encuentran en muy baja concentración comparada con las demás células de la sangre, es evidente que se necesita una etapa de enriquecimiento antes de proceder con su detección. Por lo tanto, su identificación y caracterización requieren métodos analíticos extremadamente sensibles y específicos (Alix-Panabières & Pantel, 2014).

1.4.1 Métodos de enriquecimiento de CTCs.

Las CTCs pueden ser enriquecidas mediante dos tipos de métodos que se basan en las diferentes propiedades biológicas o físicas de las células tumorales y las células hematopoyéticas normales.

Los métodos de enriquecimiento basados en propiedades biológicas utilizan características de las células tumorales a través de la expresión diferencial de marcadores específicos en la superficie de las células. Para aislar las CTCs los métodos de afinidad basados en anticuerpos detectan antígenos específicos sobre la superficie de las células tumorales epiteliales o de las células hematopoyéticas (Shahneh, 2013). Se han desarrollado técnicas de enriquecimiento que capturan las CTCs utilizando partículas magnéticas conjugadas a anticuerpos monoclonales contra proteínas asociadas a las células tumorales y que no son expresadas por otros componentes normales circulantes en sangre (Magbanua & Park, 2013). Se aplican dos tipos de estrategias: el enriquecimiento por selección positiva o por selección negativa.

El enriquecimiento mediante selección positiva utiliza anticuerpos contra marcadores específicos de las células tumorales para identificarlas y distinguirlas de los leucocitos. Entre los marcadores más comúnmente utilizados se hallan marcadores epiteliales como la citoqueratina (CK, proteínas del citoesqueleto) (Braun y col., 2000)

y la glicoproteína transmembrana EpCAM (molécula de adhesión celular) presentes en las células epiteliales (Ao y col., 2016) como así también marcadores mesenquimales (Fehm y col., 2005, Pantel y col., 2008). Entre los equipos disponibles comercialmente que utilizan este sistema se encuentran el Sistema Cell Search (Veridex LLC) aprobado por la FDA y la plataforma microfluída CTC chip (mediada por anticuerpos EpCAM) (Nagrath y col., 2007). El Sistema Cell Search™ utiliza partículas de hierro cubiertas con anticuerpos EpCAM para extraer las CTCs, posteriormente las identifica con anticuerpos marcados con fluorescencia contra CK 8, 18 y 19 y finalmente las tiñe con un colorante nuclear fluorescente (Riethdorf y col., 2007).

En cambio, en el enriquecimiento por selección negativa se eliminan las células normales (Lustberg y col., 2012), por depleción de leucocitos utilizando anticuerpos CD45 (Lara y col., 2004). La selección negativa tiene la capacidad de permitir la detección de células tumorales epiteliales que no presentan un fenotipo clásico (Liu y col., 2011) y de adquirir células intactas (Hyun y col., 2013).

Existen otros tipos de enriquecimiento de CTCs que se basan en las diferentes propiedades físicas de las células tumorales y las células hematopoyéticas normales. Este tipo de método es de particular interés ya que tiene el potencial de aumentar el rendimiento y permitir el análisis de fenotipos raros de CTCs ya que de otro modo no podría lograrse (Harouaka y col., 2013). Estas propiedades físicas incluyen a:

(i) Densidad celular: se genera un gradiente de densidad, con el cual es posible separar las CTCs y las células mononucleares de las células rojas y granulocitos. Para esto hay reactivos comerciales como el Ficoll-Paque® (Rosenberg y col., 2002) o el OncoQuick™ (Gertler y col., 2003, Müller y col., 2005).

(ii) Tamaño celular: se pueden aislar CTCs utilizando filtros especiales como el filtro comercial ISET (aislamiento de células epiteliales tumorales por el tamaño) (Vona y col., 2000) o un microfiltro tridimensional en el que se eluyen las CTCs y las células hematopoyéticas grandes pueden ser retenidas por los poros de los filtros (Zheng y col., 2011).

(iii) Propiedades eléctricas: estas propiedades pueden ser explotadas para separar (Becker y col., 1995) las células tumorales de las normales. ApoStream™ es un equipo que consiste en un canal de microflujo para aislar CTC utilizando dielectroforesis (Gupta y col., 2012).

(iv) Deformabilidad: se basa en la diferencia de las propiedades elásticas entre las células tumorales y las células normales. Se pueden utilizar distintas técnicas como

la microscopia de fuerza atómica (Rosenbluth, 2006) o un sistema de aspiración por micropeta automatizada (Mohammadalipour y col., 2012; Mak & Erickson, 2013). Incluso se ha diseñado un equipo de microflujo que separa las CTCs combinando dos propiedades: el tamaño y la deformabilidad de las células (Tan y col., 2010, Bhagat y col., 2011).

1.4.2 Detección de CTCs.

La investigación de CTCs en sangre periférica de pacientes con tumores epiteliales sólidos (como, por ejemplo, cáncer de mama, próstata, pulmón y colon) es muy prometedora y muchas tecnologías se han desarrollado durante los últimos años. Sin embargo, la detección y caracterización molecular de las CTCs siguen siendo técnicamente desafiantes. Se requieren métodos analíticos extremadamente sensibles y específicos, que suelen ser una combinación de procedimientos complejos de enriquecimiento y detección (Alix-Panabières & Pantel, 2014). Después del enriquecimiento, la fracción de CTCs por lo general todavía contiene un número sustancial de leucocitos, por lo cual deben ser identificadas por un método que permita distinguir las células tumorales de las células sanguíneas normales a nivel de una única célula (Pantel & Alix-Panabières, 2012). Para resolver esta problemática, se han desarrollado y diseñado varias estrategias para lograr la detección de CTCs, basándose en la identificación de proteínas o ARNm específicos de las células tumorales.

La detección de CTC mediante el análisis de proteínas utiliza el principio básico de inmunotinción con anticuerpos contra proteínas de interés. Han sido desarrollados sistemas que combinan el enriquecimiento inmunomagnético y la detección para mejorar la identificación de CTCs. Ejemplos de ellos son el sistema CellSearch®, la plataforma microfluída CTC-chip mencionada anteriormente, el ensayo EPISPOT (EPithelial ImmunoSPOT) que detecta solo células vivas (Ramírez y col., 2014) y el sistema de análisis de imágenes Ariol system (Deng y col., 2008). Otros ejemplos, son las plataformas de detección de CTCs que aplican distintas técnicas como espectroscopía Raman (SERS, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy) (Wang y col., 2011) o citometría de flujo (Cruz y col., 2005). Otra metodología de detección innovadora es la técnica de impresión por láser que localiza células marcadas con inmunofluorescencia (FAST, Fiber-optic array scanning technology), que detecta y aísla CTCs en un solo paso reduciendo la posibilidad de perder células (Krivacic y col.,

2004). Esta técnica ha sido utilizada para monitorear CTCs en la sangre periférica de pacientes con cáncer de mama en estadio IV (Hsieh y col., 2006).

Una alternativa a las técnicas de detección basadas en proteínas son los métodos fundamentados en la detección de ácidos nucleicos, tales como los ensayos cuantitativos de retrotranscripción seguida por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Barok & Szollosi, 2011) y la hibridización *in situ* (ISH) (Ortega y col., 2015). Estas técnicas altamente sensibles se basan en la diferencia de expresión génica entre las células tumorales y las células normales de la sangre (Andergassen y col., 2016).

La técnica de RT-PCR ha sido ampliamente usada para la detección de CTCs en sangre periférica en distintos tipos de cáncer (Masuda y col., 2005; Iinuma y col., 2006; Xi y col., 2007). En varios estudios se determinó la expresión, por ejemplo, de antígeno prostático específico en cáncer de próstata (Mejean y col., 2000), receptor del factor de crecimiento epidérmico (HER-2neu) (Barberis y col., 2008) en cáncer de mama y mucina 1 en cáncer de colorectal (Hardingham y col., 2000). Asimismo, se ha descrito la detección simultánea de seis genes en pacientes con cáncer de mama por PCR (Markou y col., 2011). Otro método de detección de CTCs basado en ARN que se encuentra disponible comercialmente, es el AdnaTest™ (AdnaGen), el cual utiliza RT-PCR para identificar células que expresan genes tumorales específicos después de que las células fueron capturadas inmunomagnéticamente (Andreopoulou y col., 2012).

1.4.2.1 Mamaglobina A.

El gen de mamaglobina A (MGA) sería particularmente relevante en la biología del cáncer de mama, debido a que se demostró que MGA se expresa principalmente en la glándula mamaria. Además, la expresión de MGA se encuentra aumentada en la mayoría de los tumores mamaros en comparación con el tejido mamario no maligno (Fleming & Watson, 2000). La especificidad mamaria con la cual se expresa MGA permite utilizarla como un marcador efectivo para determinar una enfermedad metastásica oculta derivada de un cáncer de mama primario, y también en la detección de CTCs (Corradini y col., 2001; Ferro y col., 2010; Ceballos y col., 2011).

En 1994, Watson y col. analizaron los cambios cuantitativos de expresión génica que se producen en un tejido mamario maligno en comparación con controles de tejido mamario normal (Watson & Fleming, 1994). Tiempo después, identificaron un nuevo ADNc proveniente de un adenocarcinoma mamario humano y diferencialmente expresado en varias líneas celulares de carcinoma mamario, al cual lo llamaron

mamaglobina. La expresión de esta proteína es principalmente restringida a la glándula mamaria adulta. En un análisis realizado con biopsias de tumores de mama se halló que los niveles del ARNm de mamaglobina en algunos casos aumentaron al menos 10 veces respecto al tejido normal de mama (Watson & Fleming, 1996). El gen de mamaglobina humano se localiza en la banda q13 del cromosoma 11, una región genómica frecuentemente amplificada en la neoplasia de mama (Watson y col., 1998). Este gen codifica una glicoproteína de 93 aminoácidos con un peso molecular aproximadamente de 10-kDa. Tiene dos sitios de glicosilación unidos a N, ambos ligados a cadenas de carbohidratos. Esta proteína es miembro de una pequeña familia de proteínas denominadas uteroglobinas (Watson & Fleming, 1996). Dentro de esta familia de proteínas se encuentran más de 20 miembros, todos son proteínas diméricas pequeñas, secretadas por tejido epitelial. Los miembros de la familia humana (proteína de la célula Clara, lipofilinas A y B, lacriglobina, mamaglobina y linfoglobina) están localizados en el cromosoma 11q12.2 en una zona que abarca no más de 400 kbp (Figura 2) (Ni y col., 2000).

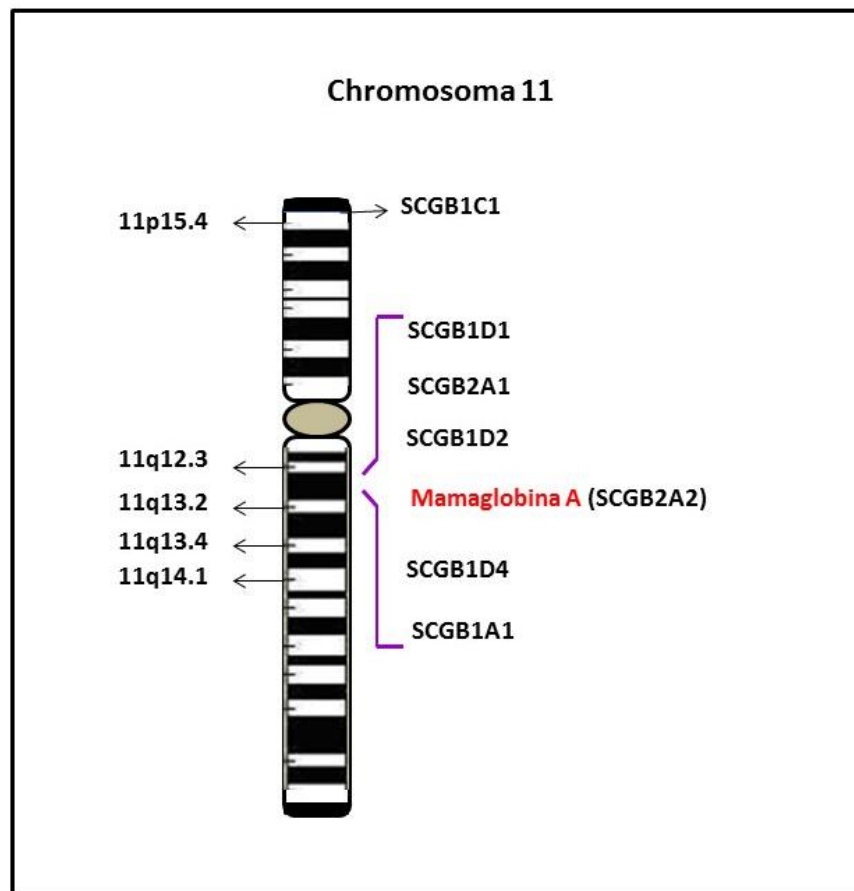


Figura 2: Localización en el cromosoma 11 del gen Mamaglobina A.

Se encontró que mamaglobina está presente en tejido mamario en dos formas principales con pesos moleculares de aproximadamente 18 y 25 kDa. Ambas formas fueron detectadas más frecuentemente en carcinomas mamarios que en fibroadenomas o en tejidos de mama normal (O'Brien y col., 2005). La primera proteína mamaglobina encontrada se denominó mamaglobina A (MGA). Además, se ha identificado otro miembro de la familia que posee una alta homología con MGA, y se denominó mamaglobina B. A pesar de la similitud de secuencia primaria y proximidad en el cromosoma, MGA y mamaglobina B difieren en su patrón de expresión, tanto en un tejido no maligno como en uno neoplásico (Becker y col., 1998).

A lo largo del tiempo se ha reportado que MGA también se expresa en varios tipos de carcinomas ginecológicos (Hagemann y col., 2013), glándulas sudoríparas normales y en el carcinoma de dichas glándulas (Sjödín y col., 2003a). Incluso, se observó la expresión de ARNm de MGA en células epiteliales endometriales en cultivo (Kao y col., 2002). Mediante inmunohistoquímica se encontró que MGA se expresa en tejidos endometriales y endocervicales tanto benignos como malignos (Onuma y col., 2008). Otro estudio donde se analizó la expresión de la familia de secretoglobinas (lipofilina A, B, C, mamaglobina y uteroglobulina) reveló que estas proteínas se expresan en tejidos de pulmón normales y neoplásicos y en líneas celulares de cáncer de pulmón (Sjödín y col., 2003b).

1.4.2.1.1 Rol biológico de MGA.

En la actualidad, existe una extensa investigación que correlaciona los perfiles de expresión de MGA con la patogénesis del cáncer de mama, pero poco se conoce acerca del rol biológico de la misma. Los altos niveles de expresión de MGA en células de cáncer de mama sugieren que podría estar relacionada con la tumorigénesis. Los niveles de expresión del ARNm de MGA son más altos en células tumorales no invasivas que en células invasivas y la sobreexpresión de MGA en éstas últimas reduce la migración e invasión celular, sugiriendo que MGA puede estar involucrada en el control de la metástasis (Koh y col., 2014). Un grupo de investigación encontró que la expresión de MGA activa vías de señalización mediada por la vía de quinasas activadas por mitógenos (MAPK: p38, JNK, y ERK), la quinasa de adhesión focal (FAK), las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y NFκB (Picot y col., 2016). Se ha propuesto que MGA regularía la transición celular de características epiteliales a mesenquimales y

modularía los niveles de expresión de los genes Snail, Twist y ZEB1. También se observó que en las células de cáncer de mama la expresión de MGA podría conferir sensibilidad a la apoptosis inducida por fármacos anticancerígenos, es decir que aumentaría la quimiosensibilidad (Picot y col., 2016).

1.4.2.1.2 MGA como marcador de cáncer de mama.

Watson y Fleming fueron los primeros en establecer la utilidad clínica de MGA como un marcador tumoral de mama (Watson & Fleming, 1996). Se demostró que la expresión de MGA está principalmente restringida a la glándula mamaria. La especificidad con la cual se expresa MGA puede ser un marcador efectivo para determinar una enfermedad metastásica oculta derivada de un cáncer de mama primario (Fleming & Watson, 2000).

Se ha propuesto la detección de MGA en sangre mediante un ensayo de ELISA, dado que los pacientes que sobre-expresan la proteína en tejido tumoral exhibirían un aumento en la cantidad de proteína en suero (Galvis-Jiménez y col., 2013).

Hay muchos estudios que correlacionan la expresión de MGA con el pronóstico en el cáncer de mama. Hay estudios que asocian a los niveles elevados de MGA en el tejido tumoral a un buen pronóstico de la enfermedad y fenotipos de cáncer menos agresivos (Núñez-Villar y col., 2003, Roncella y col., 2006).

1.4.2.2 TWIST-1.

Debido a que numerosos estudios han demostrado que las células tumorales metastásicas experimentan un proceso de EMT, esta característica puede ser aprovechada para diferenciar las células tumorales de las normales (Voulgari & Pintzas, 2009). Durante el proceso de EMT, las células aumentan la movilidad, permitiendo el desarrollo de un fenotipo invasivo (Lamouille y col., 2014). Este cambio en el comportamiento y la diferenciación celular estaría mediado principalmente por tres familias de factores de transcripción que dirigen la EMT, Snail, Twist y Zeb (Garg, 2013; Ansieau y col., 2014). Estas modificaciones en la reprogramación génica durante la EMT pueden ser utilizadas para la detección de CTCs (Paterlini-Brechot & Benali, 2007). Uno de los genes involucrados en la EMT, TWIST-1 codifica una proteína que actúa como un factor de transcripción que desempeña papeles esenciales en múltiples etapas del desarrollo embrionario y contribuye significativamente a la metástasis tumoral (Zhu y col., 2016).

Las proteínas TWIST son factores de transcripción que comprenden a TWIST-1 (202 aminoácidos) y a TWIST-2 (160 aminoácidos) (Barnes y col., 2009). El gen TWIST-1 está localizado en el cromosoma 7p21 (Figura 3) y contiene dos exones y un intrón; solo el exón 1 codifica para la proteína (Bourgeois y col., 1996). Inicialmente, TWIST-1 fue identificado en *Drosophila* como un gen cigótico crucial para la correcta gastrulación y formación del mesodermo. Se observó que embriones mutantes en TWIST-1 gastrulan anormalmente, no forman ninguna capa germinal mesodérmica y mueren al final de la embriogénesis. El análisis través del árbol filogenético reveló que TWIST puede tener un papel común en la diferenciación del mesodermo (Castanon y col., 2002). Wang y col. estudiaron la expresión del ARNm de TWIST-1 en varios tejidos humanos. Hallaron que en placenta se encuentra la mayor expresión de TWIST-1, en la porción fetal que deriva del mesodermo. En menor medida se expresa en el músculo esquelético y corazón y débilmente en riñones y páncreas. No se encontró expresión en cerebro, el cual es un tejido derivado del ectodermo, o en pulmón e hígado, derivados del endodermo. Estos resultados revelaron que TWIST-1 es expresado preferencialmente en tejidos derivados del mesodermo (Wang y col., 1997).

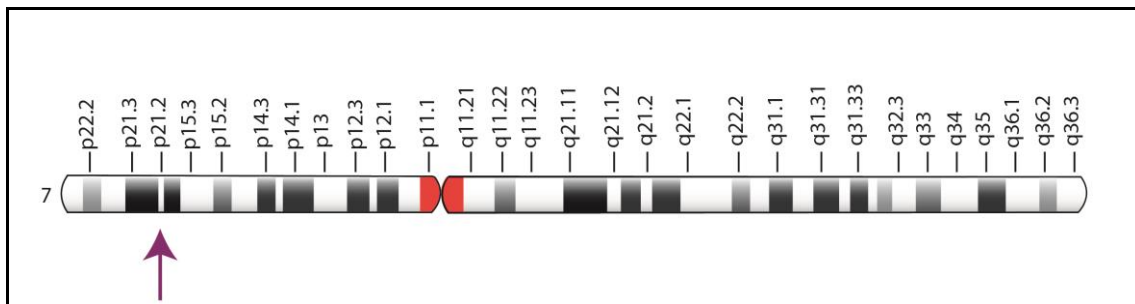


Figura 3: Localización cromosómica del gen TWIST-1 en el brazo corto del cromosoma 7 en la posición 21.1.

1.4.2.2.1 Estructura de TWIST-1.

Las proteínas hélice-bucle-hélice (HLH) forman una gran superfamilia de factores de transcripción diméricos que se encuentran en casi todos los eucariotas. Los miembros de esta superfamilia tienen dos dominios altamente conservados y funcionalmente distintos. La secuencia de la proteína humana TWIST-1 muestra tres regiones: la región N-terminal (1-108 residuos), el dominio básico hélice-bucle-hélice bHLH (residuos 109-163) y la región C-terminal (contiene una caja-Twist comprendida entre los residuos 164-202) (Figura 4) (Maia y col., 2012). Se ha demostrado como TWIST-1, a través de las diferentes regiones de la proteína, puede interactuar con un gran conjunto de factores de transcripción y otras proteínas, para modular su actividad,

otorgándole la posibilidad de ser una proteína multifuncional. El extremo amino terminal tiene un dominio básico, el cual se une al ADN en una secuencia consenso llamada E-box (Figura 5). El dominio HLH facilita la interacción con otras proteínas para formar complejos de homo y heterodímeros (Jones, 2004).

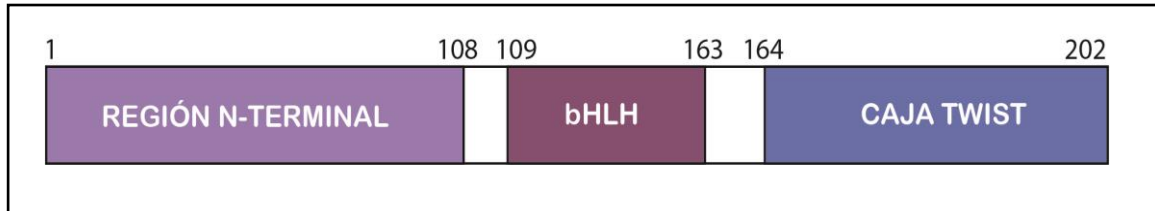


Figura 4: Estructura de la proteína TWIST-1. La proteína TWIST-1 está comprendida por 202 aminoácidos, posee un dominio hélix-bucle-hélix básico (bHLH).

1.4.2.2.2 Mecanismo de acción de TWIST-1.

Para regular la transcripción TWIST-1 emplearía mecanismos directos e indirectos. Se une a secuencias conservadas E-box del ADN encontradas en las regiones regulatorias de los genes blancos y recluta co-activadores o co-represores.

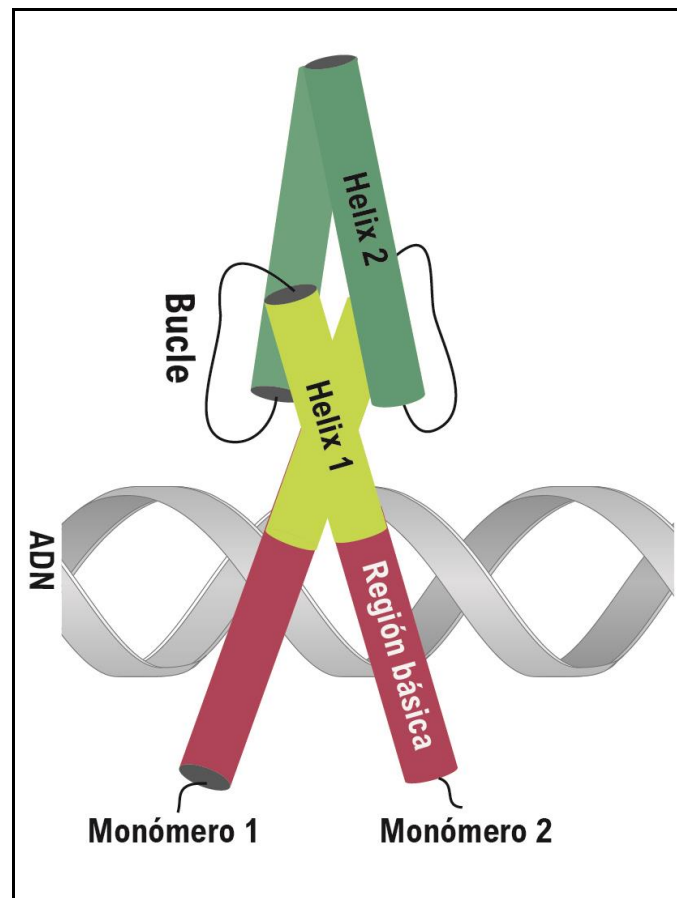


Figura 5: Representación de la posible estructura de la proteína TWIST actuando como factor de transcripción. La proteína se dimeriza para formar un complejo que se une al ADN.

Además, puede secuestrar moduladores de proteínas E e interferir con la función de activadores/represores a través de interacciones proteína-proteína. De este modo puede regular la expresión génica en varios contextos, tales como la miogénesis, la osteogénesis, el sistema inmune y el cáncer (Franco y col., 2011). Se ha revelado que la caja TWIST-1 cumple un rol esencial en la actividad transcripcional y en la inducción de la metástasis *in vivo* con una fuerte asociación al comportamiento agresivo del tumor (Gajula y col., 2013).

1.4.2.2.3 Utilización de TWIST-1 como marcador de CTCs en cáncer de mama.

Se sabe que la EMT contribuye a la diseminación de células tumorales mediante varios mecanismos, incluyendo la liberación de CTCs del tumor primario y la formación de metástasis distantes (Alix-Panabières y col., 2017). Se ha reportado que las CTCs de pacientes con de cáncer de mama pueden expresar TWIST-1 (Kallergi y col., 2011). Por lo tanto, varios grupos de investigación han planteado el uso de la determinación de la expresión de TWIST-1 como marcador molecular en pacientes con cáncer de mama (Markou y col., 2011), a partir de biopsias de tejido mamario, muestras de médula ósea (Tjensvoll y col., 2010) o de sangre periférica.

1.5 GENOTOXICIDAD DE TRATAMIENTOS CONTRA EL CÁNCER.

1.5.1 Tipos y causas de daños del ADN.

El ADN es la molécula más grande que puede acumular lesiones mediante diversos mecanismos (Cannan & Pederson, 2016). Esta molécula está bajo constante ataque de fuentes endógenas y exógenas que son perjudiciales (Figura 6 A).

En la figura 6 B se muestran los daños más comúnmente encontrados en el ADN y los principales factores endógenos y exógenos que los producen.

El metabolismo libera compuestos que modifican las bases del ADN incluyendo a las especies reactivas del oxígeno, especies reactivas del nitrógeno, especies reactivas del carbonilo, productos de la peroxidación de lípidos y agentes alquilantes, entre otros (De Bont & van Larebeke, 2004). Una de las principales fuentes endógenas que modifican las bases del ADN son las especies reactivas del oxígeno, siendo la guanina la base mayormente atacada. No solo ocasionan modificaciones en las bases, sino que también producen otras lesiones, tales como la ruptura de la hebra de ADN, el entrecruzamiento inter e intra hebra y entrecruzamiento ADN-proteína (Jena, 2012). Otros compuestos que causan modificaciones de las bases son los agentes metilantes, ya

sean extracelulares o intracelulares, atacan diferentes posiciones de las bases o del esqueleto de los ácidos nucleicos conduciendo a daños citotóxicos y/o cancerígenos (Zheng y col., 2014).

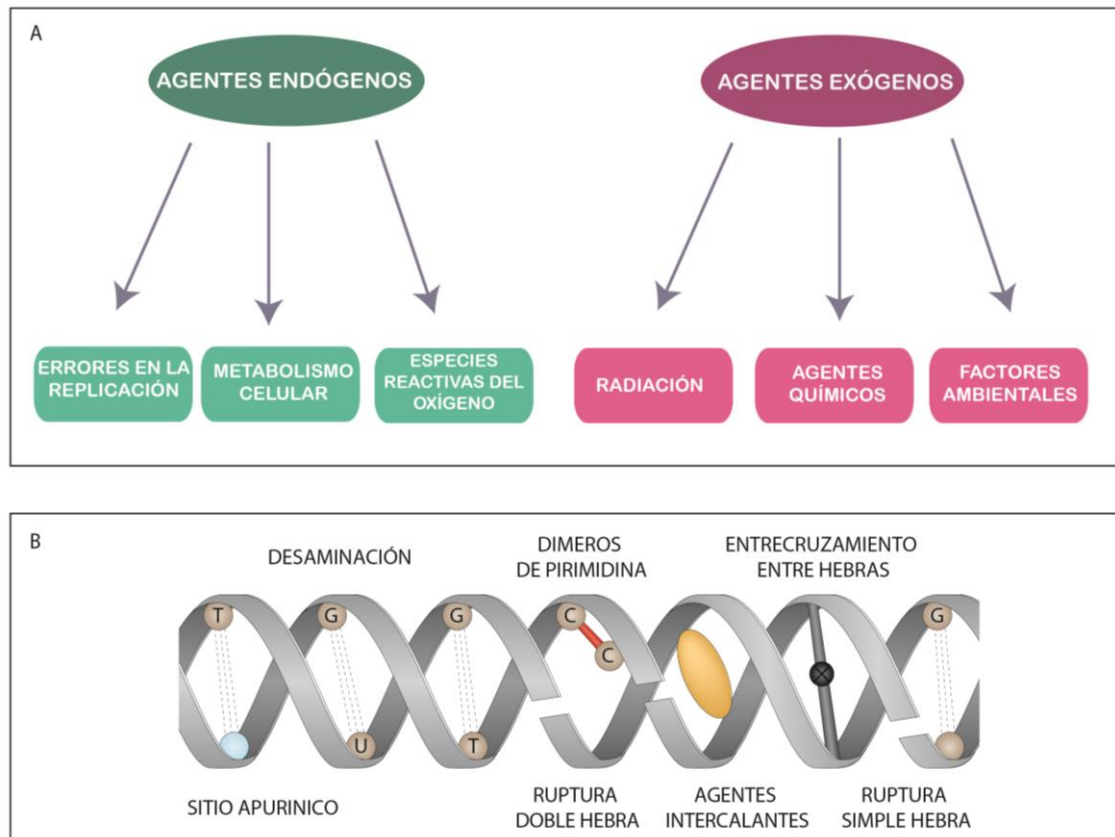


Figura 6: A- Fuentes endógenas y exógenas que causan lesiones en el ADN. B- posibles daños en ADN causados directamente o indirectamente por los diferentes mutágenos.

Entre los factores exógenos que producen modificaciones de las bases se encuentran ciertos productos químicos y la radiación ionizante. La radiación ultravioleta (UV-B: 280-315 nm) es uno de los poderosos agentes que puede inducir una variedad de lesiones de ADN mutagénicas y citotóxicas, como los dímeros de ciclobutano-pirimidina, y la ruptura de la cadena de ADN (Rastogi y col., 2010).

(i) Desaminación de bases en el ADN: depurinización y depimiridinación.

Espontáneamente por día una célula pierde alrededor de 10^4 bases nitrogenadas en los nucleótidos que constituyen el ADN, resultando en la formación de sitios apurínicos y apirimidínicos. Otro tipo de alteraciones que sufre el ADN es la pérdida de grupos amino en sus bases nitrogenadas (Lindahl, 1993).

(ii) Ruptura de la doble y simple hebra.

La ruptura de la hebra de ADN puede producirse por la exposición a agentes exógenos como la radiación y ciertos agentes químicos, como así también por procesos

endógenos, incluyendo errores en la replicación y la reparación del ADN (Cannan & Pederson, 2016). Además, puede ser causada por estrés mecánico en los cromosomas y producirse como intermediario en varios eventos biológicos tales como el desarrollo de células linfoides (Jackson, 2002). Entre los promotores de este tipo de daño al ADN se encuentran los metales pesados, tales como cadmio, arsénico y níquel, que inhibirían ciertas proteínas críticas de diferentes vías de reparación del ADN (Morales y col., 2016).

(iii) Entrecruzamiento intra e inter hebra.

Entre los daños más graves al ADN se encuentra el entrecruzamiento de las hebras, siendo muy perjudicial para las células en división, ya que inducen mutaciones, reordenamientos cromosómicos y la muerte celular, debido a que se bloquea la separación de la hebra de ADN imposibilitando la transcripción y la replicación (Dronkert & Kanaar, 2001; Deans & West, 2011). Estos entrecruzamientos son originados por varios agentes exógenos o endógenos que inducen a la formación de enlaces covalentes entre la misma cadena (entrecruzamiento intracadenas) o entre cadenas opuestas. Existen ciertos fármacos antitumorales bifuncionales tales como cisplatino, mitomicina C o las mostazas de nitrógeno que inducen este entrecruzamiento (Ho & Schärer, 2010).

(iv) Unión ADN-proteínas.

Entre otros tipos de daños se encuentran las uniones ADN-proteínas que se forman cuando las proteínas celulares quedan atrapadas covalentemente en las hebras del ADN tras la exposición a diversos agentes endógenos, medioambientales y quimioterapéuticos. Las radiaciones ionizantes, también pueden producir dichas uniones (Nakano y col., 2016). Las uniones ADN-proteínas interfieren con la progresión de la replicación y la maquinaria de transcripción y por consiguiente dificultan la expresión fiel de la información genética, contribuyendo potencialmente a la mutagénesis y a la carcinogénesis (Tretyakova y col., 2015).

1.5.2 Tratamientos contra el cáncer de mama.

Existen varias formas de tratar el cáncer de mama. El tratamiento depende del tipo y del estadio en el cual la paciente se encuentra. Existen dos tipos de tratamientos:

1.5.2.1- Tratamientos locales: están dirigidos principalmente al tumor. Entre ellos se incluye: la extirpación del tumor y la terapia de radiación en el área del mismo. En la cirugía se puede extraer solo la porción de la mama que contiene el tumor o

extraer toda la mama (mastectomía). En cambio, la radioterapia utiliza rayos de alta energía (como los rayos-x) o partículas que destruyen principalmente las células tumorales. El efecto de este tratamiento se debe a varios mecanismos, el más importante es el daño al ADN, que activa una serie de cascadas de señalización de respuesta al daño y reparación del ADN que controlan el arresto del ciclo celular, la reparación del ADN y el destino de la célula (Santivasi & Xia, 2014). La radiación ionizante (RI) actúa directamente sobre las moléculas y/o indirectamente produciendo especies reactivas del oxígeno que conducen a una variedad de lesiones, entre ellas la ruptura de la doble hebra del ADN, principal responsable de la muerte celular (Barcellos-Hoff y col., 2005). En cambio, si la célula sobrevive y la lesión no es reparada correctamente, las rupturas de la doble hebra contribuyen a la aberración cromosomal, que puede conducir a distintas enfermedades, incluido el cáncer (Vignard y col., 2013).

1.5.2.2- Tratamientos sistémicos: se utilizan fármacos, que se administran por vía oral o directamente al torrente sanguíneo, llegando a las células tumorales en cualquier parte del cuerpo. Se pueden usar varios tipos diferentes de fármacos dependiendo del tipo de cáncer de mama, y pueden administrarse de manera combinada, entre ellos se encuentran los agentes quimioterápicos. La quimioterapia puede ser aplicada: (1) antes de la extirpación quirúrgica de un tumor, denominada quimioterapia neoadyuvante (Masood y col., 2016) (2) después de la cirugía primaria para eliminar las potenciales micrometastasis, llamada terapia adjuvante (Chew, 2001).

1.5.3 Efectos de los diversos agentes contra el cáncer.

Muchos agentes citotóxicos usados en el tratamiento para el cáncer ejercen sus efectos a través de su capacidad directa o indirecta para dañar al ADN y así causar la muerte celular. Los principales tipos de daños al ADN que estos ocasionan incluyen la ruptura de las hebras (doble o simple hebra), cruzamientos (inter e intra hebra, entrecruzamiento DNA-proteína) e interferencia con el metabolismo y síntesis ADN (Pallis & Karamouzis, 2010). Los mecanismos de acción de la mayoría de las drogas quimioterapéuticas funcionan bloqueando las etapas de la síntesis del ADN, sus nucleótidos precursores o atacando la integridad del ADN. Estas drogas alcanzan su mayor efectividad si las células tumorales se exponen durante la fase de síntesis del ciclo celular. Aunque algunas drogas (ej. alcaloides y taxanos) directamente bloquean las células durante la mitosis, en cambio otras (ej. agentes alcalinizantes) actúan durante otras fases del ciclo celular (Chabner & Jay Loeffler, 2015).

En el tratamiento de radioterapia se expone el tumor a RI, la cual afecta a la estructura del ADN induciendo la ruptura de la doble hebra. Como efecto secundario se generan especies reactivas del oxígeno que también inducen a varios daños en el ADN. Otro de los efectos nocivos que ocasiona la RI es la formación de aductos en el ADN que causan la obstrucción de la capacidad de reparación del ADN. Esto favorecería el deterioro celular aun con bajos niveles de RI. Colectivamente, todos estos daños inducen la muerte celular (Spitz y col., 2004). Por lo tanto, a pesar de que las especies reactivas producidas por la RI son beneficiosas para reducir a las células tumorales también pueden ejercer varios efectos fisiológicos perjudiciales sobre las células somáticas, tales como el envejecimiento, la inestabilidad genética y la mutagenicidad, la lisis de las membranas y muerte celular, la disfunción mitocondrial, y aun la carcinogénesis. Es importante destacar que los efectos de la RI dependen principalmente de la dosis, calidad y periodo de acción en el cual la RI actúa (Islam, 2017).

En la figura 7, se detallan los diferentes tratamientos contra el cáncer y las lesiones que causan en el ADN.

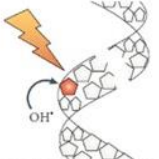

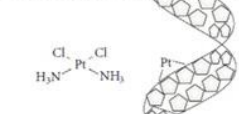
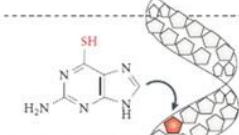
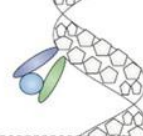

Tratamientos contra el cáncer		Lesiones tóxicas
A- Radioterapia y radiomimetics		Rupturas dobles y simple hebra Bases dañadas
B- Alquiladores monofuncionales		Bases dañadas Lesiones en la replicación Aductos de ADN voluminoso
C- Alquiladores bifuncionales		Ruptura doble hebras Entrecruzamiento ADN Lesiones de replicación Aductos de ADN voluminosos
D- Antimetabolitos		No caracterizado Daño de bases Lesiones en la replicación
E- Inhibidores de topoisomerasa		Rupturas simple y dobles hebras Lesiones de replicación
F- Inhibidores de la replicación		Rupturas doble hebra Lesiones de replicación

Figura 7: Principales lesiones en el ADN causadas por los diferentes agentes antitumorales. (Adaptado de Helleday y col., 2008).

En base a lo mencionado previamente, el tratamiento de quimioterapia podría inducir a las células normales, que son especialmente sensibles a los agentes quimiotóxicos, a iniciar el proceso de tumorigénesis. Entre ellas se encuentran las células de la médula ósea, folículos capilares y células epiteliales del tracto gastrointestinal. Los pacientes supervivientes tienen mayor riesgo a desarrollar cánceres hematológicos secundarios como leucemia y linfomas (Vega-Stromberg, 2003). También, se registró evidencia de que hay un aumento de riesgo a padecer malignidades secundarias asociadas con la radioterapia o la quimioterapia en el cáncer de mama, particularmente en mujeres tratadas después de la menopausia (Zhang, y col., 2011). Consecuentemente, el uso de quimio y radioterapia puede llegar a una relación costo-beneficio adversa en donde se presentan malignidades relacionadas con la terapia.

La elección de una terapia requiere un enfoque individualizado con un equilibrio integral de la eficacia, el perfil de toxicidad y las preferencias individuales para alcanzar los objetivos de extender la supervivencia y mejorar la calidad de vida en el paciente con cáncer. Por lo tanto, se necesitan biomarcadores predictivos para personalizar el tratamiento anti-tumoral e identificar para un dado paciente la terapia precisa con los que tiene más probabilidades de beneficiarse disminuyendo los efectos colaterales (Hernandez-Aya & Ma, 2016).

1.5.4 Técnicas de detección del daño en el ADN.

Existen diversas técnicas para determinar el daño en el ADN, las cuales dependen del tipo de daño que se desea medir. Las distintas aproximaciones metodológicas se encuentran detalladas en la tabla 1.

Dentro de las técnicas mencionadas en la tabla 1, el ensayo del cometa es una técnica con importantes ventajas y beneficios para determinar el daño al ADN al ser una técnica relativamente rápida, versátil, confiable y de bajo costo comparadas con las demás (Glei y col., 2016).

TECNICA		TIPO DE DAÑO	
Ensayo rápido del halo		Ruptura de la doble hebra ADN	Sestili, 2009
HPLC-MC		Daño oxidativo de las bases	Cadet y col., 2003
Sonda fluorescente al infrarrojo cercano		Sitiosapurínicos/apirimidínicos	Condie y col., 2015
Prueba <i>in vitro</i> del micronúcleo		Daño genotóxico en células interfásicas	Doherty, 2012
Espectroscopia magnética nuclear de protones (RMN 1H)		Alteración de metabolitos relacionados al daño del ADN	Li y col., 2017
Ensayo de PCR cuantitativa		Mide el daño del ADN usando la amplificación de largos blancos en el ADN.	Furda y col., 2014.
Ensayo TUNEL		Cuantificación del daño al ADN causado por apoptosis.	Kyrylkova y col., 2012.
Ensayo del cometa	Condiciones alcalinas	Detecta rupturas simple hebra del ADN, sitios lábiles al álcali, entrecruzamientos ADN-ADN/ADN-PROTEINA, sitios incompletos de reparación por escisión.	Pu y col., 2015
	Condiciones neutras	Detecta rupturas doble hebra del ADN	Wojewódzka y col., 2002

Tabla 1: Métodos utilizados para evaluar el daño genotóxico. HPLC-MS: cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.

1.5.5 Ensayo del cometa.

En 1984, Ostling y Johanson fueron los primeros en introducir el método de electroforesis en microgel para medir las rupturas del ADN simple hebra de células de mamíferos, causadas por diferentes dosis de irradiación (Ostling & Johanson, 1984). Tiempo después en 1988, Singh y col., demostraron que realizando la técnica bajo condiciones alcalinas se obtiene mayor sensibilidad de detección de daño en el ADN, incluyendo rupturas simple y doble hebra y regiones alteradas fácilmente por álcali, tales como sitiosapurínicos, apirimidínicos, y fosfotriésteres. Cuando las células son tratadas con álcalis a un pH mayor a 12 las mismas se lisan, el ADN liberado comienza a desenrollarse y luego se expone al campo eléctrico en una cuba de electroforesis. Las moléculas de ADN nuclear más libres cargadas negativamente migran hacia el ánodo.

La técnica posteriormente se optimizó utilizando una solución de lisado y tinciones específicas para ADN. Si se utiliza una tinción fluorescente las imágenes de

las células analizadas por este método presentan una forma parecida a la de un cometa, con una cabeza fluorescente brillante y una cola (Olive y col., 1990). Desde entonces, el ensayo del cometa ha ganado una gran popularidad y ha evolucionado como una técnica estándar para la evaluación del daño en el ADN.

A lo largo de los años, han surgido constantemente modificaciones e innovaciones en el protocolo conduciendo a una diversidad de variantes en el ensayo del cometa. Por ejemplo, en una de las variantes se agregó un paso en el cual el ADN es incubado con una endonucleasa específica que reconoce las bases oxidadas y las remueve introduciendo rupturas adicionales en el ADN, reflejando específicamente el daño oxidativo (Collins & Dusinská, 2002).

Otro ejemplo, es el ensayo del cometa en combinación con la técnica de hibridación *in situ* fluorescente que permite la evaluación de la distribución del daño del ADN en el genoma entero de la célula (Hovhannisyan y col., 2010).

Una de las más recientes modificaciones del ensayo del cometa, es una variante que permite evaluar simultáneamente las rupturas doble y simple hebra en espermatozoides humanos. En donde se realiza el ensayo de cometa de cola perpendicular bidimensional (2T-cometa). Dando lugar a una cola de cometa bidimensional. Es un método innovador de evaluación de la integridad del ADN espermático, que tendría importantes implicaciones para estudiar la fertilidad masculina y la patología andrológica (Cortés-Gutiérrez y col., 2017).

1.5.5.1 Aplicaciones del ensayo del cometa.

El ensayo puede ser aplicado para determinar el daño genotóxico en diferentes modelos que incluyen desde el ser humano hasta bacterias (Dhawan y col., 2009). En la literatura se pueden encontrar varios trabajos publicados en donde se aplica esta técnica a organismos muy diversos (Mouchet y col., 2005; Solanky & Haydel, 2012; Santos y col., 2015; Park y col., 2016; Augustyniak y col., 2016; Burella y col., 2017).

El campo de aplicación también es muy amplio: pruebas de agentes genotóxicos (Moller, 2005), evaluación de drogas anticancerígenas (Hassan y col., 2016), ecotoxicología (Haile y col., 2016), detección de deficiencias en la reparación del ADN (Alapetite y col., 1996) y medición de la reparación del daño en ADN (Azqueta y col., 2014). Entre las múltiples aplicaciones que tiene el ensayo, una de la más frecuentemente utilizada es el biomonitoreo de daños en el ADN en sangre periférica humana ya sean ocasionados por agentes ambientales y/u ocupacionales, como así también aplicable al monitoreo de los tratamientos contra el cáncer. En la práctica

clínica, esta técnica también puede ser utilizada para la evaluar el daño del ADN en células espermáticas provenientes de individuos infértiles (Lewis & Agbaje, 2008).

Muchos estudios han demostrado que esta técnica es una herramienta útil para evaluar el daño del ADN en diferentes tipos celulares en respuesta a agentes genotóxicos, tales como la radiación, reactivos químicos y drogas antineoplásicas (Kang y col., 2013). En la práctica clínica, no se considera el efecto genotóxico que los tratamientos para el cáncer ocasionan en los pacientes y si esto afecta a la respuesta al tratamiento (Awwad, 2005). La evaluación del nivel de daño genotóxico resultaría especialmente relevante para el tratamiento del cáncer contribuyendo a detectar pacientes extremadamente sensibles a los agentes genotóxicos utilizados en los tratamientos y tal vez predecir efectos colaterales excesivos en respuesta a los mismos. De este modo, se podría adecuar el tipo de tratamiento contra el cáncer que reciba cada paciente y obtenerse mejores resultados.

En distintos estudios se ha mostrado al ensayo del cometa como una potencial herramienta para la evaluación de los niveles de daño en el ADN en pacientes con diversos tipos de cáncer (Kopjar y col., 2002; Palyvoda y col., 2003). Desde el punto de vista práctico, el ensayo del cometa sería adecuado para su uso en un entorno clínico puesto que se analizan linfocitos de sangre periférica, y la obtención de una muestra de sangre es menos invasiva que la extracción de una muestra de tejido y más fácil y rápida de recolectar (Faust y col., 2004).

2. OBJETIVOS

Más del 90% de las muertes en pacientes con cáncer se atribuyen al proceso de metástasis. Una de las estrategias para prevenir las muertes por cáncer de mama sería la detección y la eliminación de las células que se desprenden del tumor primario hacia la circulación antes de la presentación de los síntomas clínicos. La detección de estas CTCs tiene un potencial valor clínico ya que podría utilizarse como un marcador pronóstico del estado de la enfermedad.

Entre los tratamientos contra el cáncer que se utilizan actualmente se encuentran la quimio y la radioterapia. Estos tratamientos no solo se dañan el ADN de las células tumorales sino también de células normales. Por lo tanto, se puede pensar que la respuesta y efectos colaterales de estos tratamientos en parte dependerían de la sensibilidad de cada paciente a las lesiones producidas en el ADN. Por esto, planteamos detectar en las pacientes el grado de daño genotóxico antes del tratamiento.

2.1 OBJETIVOS GENERALES.

El objetivo de este estudio será detectar CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama mediante la determinación de la expresión de los genes TWIST-1 y MGA, utilizando la técnica RT-PCR en tiempo real. Otro de los propósitos de estudio fue evaluar mediante el ensayo del cometa los niveles de daño genotóxico de células nucleadas de sangre periférica en pacientes con cáncer de mama y en mujeres donantes sanas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Para cumplir con el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Obtener muestras de sangre de pacientes con cáncer de mama y donantes sanas como control. Recolectar y registrar los datos clínicos de las pacientes.
- Establecer las condiciones experimentales para la determinación de la expresión de los genes TWIST-1 y MGA mediante la técnica RT-PCR en tiempo real.
- Analizar los resultados de la determinación de los niveles de expresión de ambos genes y correlacionarlos con los factores pronósticos para el cáncer de mama.
- Evaluar los niveles de daño basales en el ADN en linfocitos de pacientes con cáncer de mama y en donantes sanas mediante el ensayo del cometa, como así

también analizar el daño del ADN antes y después del tratamiento anti-tumoral en algunas de estas pacientes.

- Correlacionar los resultados obtenidos de daño en el ADN con los factores pronósticos para el cáncer de mama.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 RESGUARDOS ÉTICOS.

El presente trabajo fue aprobado por los Comités de Bioética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR), de la Facultad de Ciencias Médicas (UNR) y del Hospital Provincial del Centenario, Rosario. Además, se obtuvo el consentimiento informado de todas las pacientes y donantes sanas (véase en sección 3.13).

3.2 ORIGEN DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS.

A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos utilizados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Inc. o Merck SAIC, y fueron de la mayor pureza disponible.

3.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE.

Se utilizaron muestras de sangre venosa extraídas de pacientes con cáncer de mama del Servicio de Patología Mamaria del Hospital Provincial Centenario y de donantes voluntarias sanas. La extracción de las muestras se efectuó previamente a cualquier intervención invasiva o quirúrgica. En algunas pacientes se realizó una segunda extracción dentro de los 12 +/- 2 meses de haber finalizado con el tratamiento terapéutico de quimioterapia y/o radioterapia. A cada paciente y donante sana se le extrajo 5 mL de sangre periférica en dos tubos comerciales que contienen el anticoagulante heparina (2,5 ml/tubo).

3.4 OBTENCIÓN DE CÉLULAS NUCLEADAS A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE SANGRE.

A partir de las muestras de sangre, se obtuvieron las células nucleadas mediante dos métodos de separación descritos a continuación.

3.4.1 Método de separación utilizando Percoll.

La preparación de las soluciones de Percoll se adaptó del manual de instrucciones de Amersham Biosciences. Se prepararon gradientes de densidad en tubos de 15 mL estériles, colocando 3 mL de Percoll al 70 % (capa inferior; densidad: 1,090 g/mL) y luego 3 mL de Percoll al 60 % (capa superior; densidad: 1,075 g/mL), preparados a partir de una solución stock de Percoll al 90 % [9 mL Percoll y 1 mL

tampón fosfato salino 10x, (PBS 10x, Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU.)). Las muestras de 2,5 mL sangre heparinizada se diluyeron con solución fisiológica (SF: NaCl 0,9% P/V) hasta un volumen final de 5 mL y se adicionaron suavemente por encima del gradiente utilizando una pipeta pasteur estéril. Luego, se centrifugaron a $2.200 \times g$ durante 20 min. Se recuperaron las células de la interfase en el Percoll por aspiración con pipeta pasteur, se colocaron en tubos de 15 mL limpios y se realizó un primer lavado agregando 5 mL de PBS 1X centrifugando a $2.200 \times g$ durante 10 min. Finalmente, después de un segundo lavado, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células nucleadas en PBS.

3.4.2 Método de separación utilizando Ficoll.

Se preparó una solución de Ficoll (Fluka Biochemika, Suecia) disolviendo 10 g en 150 mL de PBS 1X. La solución se ajustó con densímetro a una densidad de 1,077 g/mL agregando Triyosom C (Gobbi Novag S.A, Wilde, Buenos Aires, Argentina) y se esterilizó por autoclavado. Luego, a 2,5 mL de las muestras de sangre heparinizada se le agregó 1 mL de SF y se adicionó suavemente por la pared de un tubo de 15 mL estéril, conteniendo 3 mL de la solución de Ficoll evitando que ambas soluciones se mezclen. Se centrifugó a $2.200 \times g$ durante 20 min y se tomó la capa de células nucleadas desde la interfase en el Ficoll con una pipeta pasteur estéril, colocándolas en un tubo de 15 mL estéril. Al tubo se le agregó 5 mL de PBS 1x realizándose un primer lavado y se centrifugó a $2.200 \times g$ durante 10 min. Luego se realizó un segundo lavado, se descartó el sobrenadante y como resultado se obtuvieron las células nucleadas que fueron resuspendidas en PBS.

3.5 OBTENCIÓN DE ARN TOTAL.

3.5.1 Extracción de ARN.

Para extraer el ARN total de las células aisladas se utilizó el reactivo comercial TRIZOL (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE UU) según las indicaciones del fabricante. Al pellet de células previamente aisladas por alguno de los métodos de separación, se le agregó un 1 mL del reactivo TRIZOL pipeteando reiteradamente para lograr la disrupción de las células y se mantuvo durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se trasvasó el contenido a un tubo Eppendorf estéril de 1,5 mL y se agregaron 200µl de cloroformo, se agitó enérgicamente para que las fases se mezclen y se incubó

durante 3 min a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se precipitó el ARN con 500µL de alcohol isopropílico. Se incubó 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4°C. Consecutivamente, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet en 1 mL de etanol 75% v/v en H₂O suplementada con dietilpircarbonato (H₂O-DEPC). Luego, se agitó brevemente en un vortex y se centrifugó a 8000 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se descartó y se dejó secar el pellet durante 5-10 min, dejando los tubos abiertos. Por último, se disolvió el pellet en 15 µL de H₂O-DEPC realizando pipeteos suaves. Las muestras de ARN se almacenaron a -70°C hasta su utilización.

3.5.2 Determinación de la concentración, pureza e integridad del ARN.

La concentración y la pureza de las muestras de ARN se estimaron mediante mediciones de absorbancia (Abs) a 260 y 280 nm utilizando un espectrofotómetro (Jenway 6705, Dunmow, Essex, UK). Para la lectura de la Abs se realizaron diluciones 1/75 de las muestras en H₂O-DEPC. Una vez obtenidos los resultados de las mediciones se calcularon las concentraciones de ARN, considerando que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 µg/mL de ARN y luego se multiplicó por el factor de dilución. La determinación de la pureza de ARN de las muestras se estimó con la relación de Abs 260/Abs 280 nm, considerando una pureza adecuada a una relación mayor a 1,7.

La determinación de la integridad del ARN se efectuó mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio. Se utilizaron geles de agarosa al 1% p/v en una solución del buffer TBE 1x, preparada a partir de buffer TBE 5x (1,1 M Tris, 900 mM ácido bórico, 25 mM EDTA, pH 8,3) con una concentración de Bromuro de Etidio (ICN, Biomedicals Inc, Aurora, Ohio, USA) igual a 0,4 µg/mL. Para cada muestra se analizó 1,5 µg de ARN en una solución de siembra 1x preparada a partir de una solución de siembra 5x (glicerol, EDTA, azul de bromofenol, Xylene Cyanol y H₂O DEPC), y se calentaron durante 30 min a 60°C. Inmediatamente después se colocó la muestra en un baño de hielo y luego se sembró en el gel. La electroforesis se llevó a cabo utilizando un voltaje de 60 V durante 1 h en solución TBE 1x. Transcurrido dicho tiempo, se extrajo el gel de la cuba electroforética y se visualizaron las bandas de ARN en un transiluminador UV (UVI tec, Cambridge, MA, USA). De este modo, se procedió al análisis de la integridad del ARN mediante la observación de las bandas correspondientes a las subunidades del ARN ribosomal (ARNr) 28s y 18s. Se considera

que el ARN total se encuentra intacto si se visualizan en el gel dos bandas perfectamente definidas, pertenecientes al ARNr 28s/18s.

3.5.3 Tratamiento de las muestras de ARN con ADNasa.

El ARN aislado se utiliza para la retrotranscripción de los ADNc correspondientes. Es posible que el ARN aislado esté contaminado con ADN genómico, el cual podría ser amplificado al utilizar luego el ADNc en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) obteniéndose así productos falsos positivos. Por lo tanto, antes de convertir el ARN a ADNc se tratan las muestras con la enzima ADNasa que tiene la capacidad de degradar los restos de ADN genómico que dichas muestras podrían contener.

Brevemente, se mezclan 2 µg de ARN con 2 unidades de DNasa RQ1 libre de RNasa (Promega, Madison, EEUU) y 2 L del buffer de reacción RQ1 Dnasa libre de DNasa 10X completando con H₂O-DEPC hasta obtener un volumen final de 10 µL, y se incuba la reacción durante 30 min a 37°C. Luego, para detener la reacción se agrega 1 µL de solución Stop RQ1 DNasa. Finalmente, se calienta a 65°C por 15 min para inactivar la DNasa. Entre los sucesivos pasos se mantiene la muestra en un baño de hielo con el fin de disminuir la degradación del ARN.

Dado que el objetivo final es la amplificación del ADNc se debe tener en cuenta la concentración de Mg²⁺ que se adiciona en cada etapa del proceso ya que puede afectar la actividad de la polimerasa, causando un efecto inhibitorio en la reacción y una disminución en la eficiencia y sensibilidad del ensayo. Por lo tanto, es necesario tener en cuenta que la mezcla de reacción de la PCR en tiempo real también posee una concentración de Mg²⁺ determinada. Para evitar acumulación de exceso de Mg²⁺ se modificó el protocolo sugerido por el fabricante de la enzima ADNasa, utilizando el buffer de la enzima de transcripción reversa usada en el paso de síntesis del ADNc en lugar del buffer de la reacción de la ADNasa para disminuir la concentración de Mg²⁺ final.

3.6 RETROTRANSCRIPCIÓN (RT).

Para la RT se utilizó la enzima transcriptasa reversa M-MLV del Virus de la Leucemia Murina Moloney (Invitrogen, Carlsbad, EEUU) que sintetiza la hebra complementaria (ADNc) del ARNm en presencia de Oligo dT₁₅ (Biodynamics, Buenos

Aires, Argentina) como cebador. Se partió de 2 µg de ARN y se agregó 1 µL de Oligo dT₁₅ (500 µg/mL) y 1 µL de una solución 10 mM que contiene los 4 desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP): dATP, dGTP, dTTT y dCTP (Invitrogen, Carlsbad, EEUU). Esta mezcla de reacción se incubó en un baño termostatzado a 65°C durante 5 min. Una vez finalizada la incubación, al tubo de la reacción rápidamente se lo colocó en un recipiente con hielo. Luego, se agregaron 4 µL de Buffer First strand 5x [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3), KCl 375 mM y MgCl₂ 15 mM] y se adicionaron 2 µl de ditiotreitól (DTT 100 mM) y 1µl de H₂O-DEPC. Los reactivos se preincubaron 2 min a 37°C. A continuación, se agregó 1 µL de la enzima M-MLV (200 U/µl), se homogeneizó y se incubó a 37°C por 50 min. Por último, se inactivó la reacción, calentando a 70°C durante 15 min. Concluida la retrotranscripción se almacenaron las muestras de ADNc a -70°C.

3.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

3.7.1 PCR para el gen de la beta-actina.

Para corroborar que la reacción de RT de una dada muestra fue exitosa, se realizó la amplificación del transcripto del gen de beta-actina como control, ya que dicho gen se expresa en general en forma constitutiva en la mayoría de los tejidos.

Como molde se partió de 2 µL de los productos generados en las reacciones de RT. Para esta PCR se emplearon las siguientes concentraciones finales de los reactivos: 0,7 µM de cada cebador (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) para el gen beta-actina, 200 µM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 1,5 unidades de la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), en un volumen final de 25 µL, completando con agua libre de nucleasas. Para preparar las mezclas de reacción se trabajó en baño de hielo.

El par de cebadores utilizado se detalla a continuación:

Directo: 5´ CGG AAC CGC TCA TTG CC 3´

Reverso: 5´ ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA 3´.

Para la reacción de PCR se utilizaron las condiciones de reacción sugeridas en www.genelink.com, mediante un termociclador MJ Research PTC-100 (programa "ACTI"):

- 2 min a 95°C.
- Seguido de 30 ciclos de tres etapas de:
 - ✓ 30 seg a 94°C
 - ✓ 30 seg a 55°C
 - ✓ 1 min a 72°C
- 7 min a 72°C.

3.7.1.1 Análisis de los productos de PCR.

Se prepararon geles de agarosa al 2% p/v en solución TBE 1x, con una concentración final de bromuro de etidio de 0,4 µg/mL. Se mezclaron 8 µL de los productos de PCR del punto **3.7.1** con 2 µL de solución de siembra 5x, en un volumen final de 10 µL y se sembraron en cada calle. La corrida electroforética se llevó a cabo utilizando un voltaje de 60 V durante 1 h en solución TBE 1x.

En cada gel además de las muestras, en una de las calles se sembró el marcador de peso molecular de ADN (CienMarker 100-1000 pb, Biodynamics, Buenos Aires, Argentina). Finalizada la electroforesis, las bandas se visualizaron por fluorescencia en un transiluminador UV. La aparición de una banda de 289 pb indicó la presencia del ADNc de beta-actina.

3.8 RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA EL GEN TWIST-1.

Para determinar la expresión relativa del ARNm del gen TWIST-1 (GenBank accession number NM-000474) se utilizó la técnica RT-PCR en tiempo real. Con el objetivo de lograr la cuantificación relativa del ARNm del gen TWIST-1 en las muestras de las pacientes y las donantes se utilizaron cebadores descritos anteriormente en el trabajo publicado por Tjensvoll y col. (Tjensvoll y col., 2010).

Las secuencias de los cebadores se describen a continuación:

TWIST-1 Directo: 5'- CTC ACG AGC GGC TCA GCT AC-3'.

TWIST-1 Reverso: 5'-CTG GAA ACA ATG ACA TCT AGG TC-3'.

Los sitios de unión de los cebadores se localizan en los límites exón-exón para prevenir la amplificación de ADN genómico que podría hallarse en la muestra. Las secuencias de los cebadores fueron analizadas con el programa BLAST (del término inglés: “Basic Local Assignment Tool”) para validar su especificidad, asegurando que solo se genere como único producto de la amplificación el fragmento del gen de interés.

Para la reacción de amplificación, se utilizaron 2 μL de ADNc como molde, en presencia de 1 μM de ambos cebadores para el gen TWIST-1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) y 5 μL de una mezcla de reacción comercial 2x (Productos Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina) obteniéndose un volumen final de 10 μl . Los reactivos fueron mantenidos en baño de hielo hasta la amplificación. La detección del producto de la amplificación se realizó a través del fluoróforo Sybr Green que posee la capacidad de unirse al ADN doble hebra emitiendo señal de fluorescencia a 522nm. Además, para detectar posibles productos inespecíficos en cada uno de los ensayos se incluyó un control negativo en el cual se reemplazó el ADNc por 2 μL de H₂O estéril (calidad miliQ).

Las condiciones de termociclado fueron las siguientes:

- 10 min a 95°C
seguido de 40 ciclos:
- 15 seg a 95°C
- 1 min a 57°C
- 30 seg a 72°C.

Luego de los 40 ciclos se realizó una curva de desnaturalización. De esta curva se puede conocer si existe la formación de productos inespecíficos, tales como la formación de dímeros entre cebadores o contaminación ocasionada por la manipulación de las muestras en el laboratorio. Todas las reacciones de PCR en tiempo real desarrolladas en este trabajo se realizaron en un termociclador StepOne Real-time PCR (Applied Biosystem, EEUU).

El programa de la curva de desnaturalización incluye 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C seguido por una rampa de temperatura que comprende desde los 60°C a 95°C incrementando 0,3°C cada 0,1 min.

Para validar la especificidad de los cebadores se realizó un ensayo de RT-PCR en tiempo real en el cual se utilizó como molde ADNc aislado de la línea celular MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7), una línea celular de adenocarcinoma de mama humano que expresa en alta cantidad al gen TWIST-1 comparado con la expresión de otras líneas celulares.

3.8.1 Obtención de ARN a partir de células MCF-7.

Las células MCF-7 fueron cedidas por el Dr. Mauricio Menacho. Para obtener cultivos de estas células, las mismas se incubaron en placas de Petri de 10 cm de diámetro en medio DMEM: F12 + 10% suero fetal bovino (SFB) y penicilina/estreptomicina a 37°C en pCO₂ 5%. Una vez llegado a un crecimiento en confluencia de las células, se realizaron varios lavados con PBS 1x con el fin de eliminar los restos de medio que pudieran quedar e interferir en los pasos posteriores. Luego se adicionó TRIZOL y las células se recolectaron de la placa de cultivo utilizando una espátula estéril para luego comenzar con la extracción de ARN previamente descrita en el ítem 3.5.1. Una vez obtenido el ARN, se realizó la RT siguiendo los pasos informados en el ítem 3.6 para obtener el correspondiente ADNc.

3.9 PCR EN TIEMPO REAL DEL GEN DE LA ENZIMA GLICERAL-DEHÍDO 3-FOSFATO DESHIDROGENASA (GADPH).

Para cuantificar el nivel de expresión del gen TWIST-1 se utilizó el método comparativo de delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak & Schmittgen, 2001) para el cual se requirió realizar la determinación de la expresión de un gen de referencia, como control interno de la muestra a examinar. Para ello, se seleccionó como referencia al gen de la enzima GADPH.

Para llevar a cabo la reacción de amplificación de este gen se utilizó la siguiente secuencia de cebadores en base a los datos descriptos en el trabajo publicado por Hamidinia y col. (Hamidinia y col., 2015):

GADPH Directo: 5'GCAAGAGCACAAGAGGAAGA 3'.

GADPH Reverso: 5'ACTGTGAGGAGGGGAGATTC 3'.

Se mezclaron 2 µL del ADNc, 5 µL de la mezcla de reacción comercial 2x (Productos Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina) y 0,5 µM de ambos cebadores (Invitrogen) alcanzando un volumen final de 10 µL. Las condiciones del programa de la reacción fueron las mismas que se utilizaron para el gen TWIST-1 (ver arriba), dando la posibilidad de determinar la expresión de ambos genes en un mismo ensayo.

Una vez sometidas las muestras a la reacción de amplificación por PCR en tiempo real se obtuvo de cada paciente un valor relativo de la cantidad de transcripto para los genes TWIST-1 y GADPH (control). La información registrada está dada en valores de ciclo umbral o Ct ("Cycle threshold"), en donde se define Ct como el número mínimo de ciclos requeridos para que la señal de fluorescencia pase la línea de umbral,

por encima de la fluorescencia de fondo. En el Ct, se genera una cantidad detectable de producto de amplificación durante la fase exponencial temprana de la reacción. Por lo tanto, el valor de Ct es inversamente proporcional a la cantidad de producto de amplificación generado en la reacción (más bajo el valor de Ct, mayor cantidad de producto amplificado).

Utilizando el método comparativo de delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), se determinó en cada una de las muestras de las pacientes los cambios en la expresión del gen TWIST-1 relativos al nivel de expresión máximo en el grupo control de donantes sanas, ambas expresiones relativizadas previamente al gen de referencia GADPH (Schmittgen & Livak, 2008). El nivel de expresión de TWIST-1 en el grupo control de donantes sanas se estableció mediante un intervalo de referencia de valores: valor promedio \pm 2DS, con un intervalo de confianza del 95% (Wellek y col., 2014). La expresión de TWIST-1 en las pacientes se estimó en relación a la máxima expresión del gen correspondiente al intervalo de referencia de las muestras de las donantes sanas. Mediante el siguiente cálculo se obtuvieron los resultados por cada paciente:

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ = cambio del nivel de expresión del gen TWIST-1 en pacientes con cáncer de mama relativo al gen control endógeno GADPH comparado con la máxima expresión del gen en el grupo control.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{control}} - \Delta Ct_{\text{pacientes}}$$

$$\Delta Ct_{\text{control Máximo}} = \text{promedio} (Ct_{\text{TWIST-1}} - Ct_{\text{GADPH}}) - 2DS$$

$$\Delta Ct_{\text{pacientes}} = Ct_{\text{TWIST-1}} - Ct_{\text{GADPH}}$$

3.10 PCR EN TIEMPO REAL PARA EL GEN MGA.

Esta reacción de PCR en tiempo real para el estudio de la expresión del gen de MGA se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ L, el cual contiene 2 μ L de ADNc, 5 μ L de la mezcla de reacción 2x comercial y 1 μ M de los cebadores directo y reverso de MGA. Las secuencias de los cebadores que se utilizaron se detallan a continuación (Tjensvoll y col. 2010):

MGA Directo: 5'-ATGAAGTTGCTGATGGTCCTCAT-3'.

MGA Reverso: 5'-GTCTTAGACACTTGTGGATTG-3'.

Se utilizó el siguiente programa de ciclado:

- 95°C durante 10 min

Seguido de 40 ciclos de:

- 95°C por 15 seg
- 62°C por 30 seg
- 72°C por 30 seg
- 76°C por 10 seg.

La curva de desnaturalización fue generada calentando a 95°C durante 10 min, seguido de una re-naturalización a 62°C por 30 seg, y luego un aumento de la temperatura desde 62°C a 95°C, a 0,3°C/seg.

Para validar la especificidad de los cebadores se utilizó ADNc obtenido de las líneas celulares T47-D (línea celular humana de carcinoma ductal infiltrante de mama) y MDA-MB-468 (línea celular humana de adenocarcinoma de mama de origen metastásico), ya que según se describen en trabajos publicados anteriormente expresan el gen MGA (Silva y col., 2002; Raynor y col., 2002). Ambas líneas celulares fueron donadas por la Dra. Patricia Elizalde.

3.10.1 Obtención de ADNc a partir de las líneas celulares T47-D y MDA-MB-468.

Se cultivaron ambas líneas celulares en el medio DMEM/Ham F12 suplementado con 10% SFB y penicilina/estreptomicina, a 37°C y pCO₂ 5%. Alcanzada la confluencia, las células se recolectaron con el reactivo TRIZOL y se siguieron los pasos descritos anteriormente en el ítem 3.5 para obtener el ARN total, el cual luego se utilizó para la obtención del ADNc por RT.

3.10.2 Obtención de ADNc a partir de una muestra de tejido de mama normal.

Se utilizaron muestras de tejido mamario como control positivo de la expresión de MGA. Los tejidos se obtuvieron luego de la intervención quirúrgica de pacientes donantes sometidas a reducción mamaria. Se diseccionó un pequeño fragmento del tejido de mama y rápidamente se lo colocó en un tubo de 50 mL estéril con 5 mL del reactivo TRIZOL. Las muestras se conservaron en baño de hielo hasta su procesamiento, dentro de la hora post-cirugía. La extracción del ARN tisular se realizó mediante un homogeneizador manual estéril inmerso en un baño de hielo. Como

partimos de un fragmento de tejido y no de células aisladas, al homogenado obtenido se le realizó un paso adicional para descartar el material insoluble. Para ello se colocó el homogenado en un tubo de 1,5 mL estéril y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4°C, el pellet se descartó y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Luego se siguieron los pasos de extracción de ARN como se describió anteriormente.

3.11 ENSAYO DEL COMETA.

El protocolo del ensayo del cometa que se utilizó fue adaptado del método de Sing y del protocolo sugerido por Tice y Vasquez (Singh y col., 1988; Tice & Vasquez, 1999).

El ensayo del cometa fue aplicado a linfocitos obtenidos de muestras de sangre periférica de donantes sanos y de pacientes con cáncer de mama esporádico.

3.11.1 Preparación de los portaobjetos.

Se preparó una solución de agarosa al 1 % p/v en un vaso de precipitado con agua destilada estéril, calentando hasta disolución completa. Luego, los portaobjetos se sumergen en la solución unos segundos, cubriendo aproximadamente el 60 % de la altura de los mismos. Seguidamente, se los deja secar en posición vertical a temperatura ambiente hasta el día siguiente o se los coloca en la estufa a 50°C por 2 h, en caso de ser necesario un secado rápido.

Luego de la separación de las células nucleadas como se indica en el punto **3.4**, se procedió a realizar el recuento y la viabilidad celular. El recuento celular se realizó mezclando 5 µl de la suspensión de células nucleadas en 95 µL de solución Turk (ácido acético glacial 5%, azul de metileno, PBS 1x), que produce la lisis de los glóbulos rojos remanentes. Se colocó una alícuota de la mezcla en una Cámara de Neubauer y se visualizaron las células en un microscopio Nikon E200 (Natick MA, EEUU), utilizando un aumento 200x. Se contaron las células que se encuentran dentro de los cuatro cuadrantes de las esquinas de la cámara y se calculó el número de células/µL de solución. Para el cálculo se sumó el número de células de los 4 cuadrantes y se multiplicó por el coeficiente de dilución de las células en la solución Turk. Además, se verificó la viabilidad celular mediante el colorante vital Azul Tripan, que penetra en las células no viables otorgándoles un color azul-celeste, de este modo se facilita su visualización en el microscopio. Para evaluar la viabilidad celular, se mezclaron 5 µL de la suspensión celular con 25 µL del colorante Azul Tripan al 0,4% p/v en PBS. Se

colocó una alícuota de la suspensión en portaobjetos y se cuantificaron 100 células observando bajo el microscopio con un aumento del 200x, y se reportó como porcentaje de células viables. Solo se utilizaron aquellas muestras cuya viabilidad celular fue mayor al 90%.

Luego del recuento y la viabilidad celular, en cada portaobjetos se colocaron 7000 células en un volumen final de 10 μ L, diluyendo la suspensión celular con PBS 1x. Los 10 μ L de la dilución de células se mezclaron con 90 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (Promega, Madison, WI, USA) al 0,5 % p/v (preparada con agua destilada estéril en baño María) y los 100 μ L de la suspensión resultante se depositaron sobre un portaobjeto cubierto con agarosa al 1 % p/v (figura 8A). Posteriormente, se colocó sobre los geles un cubreobjetos y se los dejó solidificar a 4°C durante 15 min (figura 8B). Cada muestra se analizó por cuadruplicado.

3.11.2 Lisis alcalina.

Los portaobjetos conteniendo los geles se colocaron en un vaso Coplin y se adicionó la solución de lisis (NaCl 2,5 M, EDTA 0,1 M, Tris-Base 10 mM, DMSO 10% v/v, Tritón X-100 1% v/v, pH 10), hasta cubrir los minigeles (Figura 8C). La solución de lisis se preparó agregando DMSO y Tritón X-100 (Promega, Madison, WI, USA) 15 min antes de llevar a cabo la lisis. Finalmente, se realizó la lisis celular a 4°C durante 1 h.

3.11.3 Desenrollamiento alcalino y electroforesis.

Luego de la lisis alcalina, los portaobjetos se sumergieron en solución de electroforesis (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH > 13) y se incubaron durante 20 min a 4°C (figura 8D). Al cabo de la incubación, los portaobjetos se colocaron en una cuba de electroforesis horizontal y se realizó la electroforesis a 20 V por 20 min, a 4°C (Figura 8E). Se controló durante toda la corrida que el voltaje permaneciera constante, mediante el agregado o la remoción de volumen del tampón de electroforesis.

3.11.4 Neutralización.

Se retiraron los portaobjetos de la cuba y se realizaron tres lavados de 5 min cada uno, con solución neutralizante (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) (figura 8F). Al finalizar el último lavado, se adicionó etanol frío (Merck, Buenos Aires, Argentina) sobre los

minigeles como fijador (figura 8G). Luego de 10 min, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar hasta el día siguiente (figura 8H).

3.11.5 Análisis de los cometas

Se adicionaron sobre los portaobjetos secos, 30 μ L de una solución de bromuro de etidio de 20 μ g/mL (figura 8I). Se colocaron cubreobjetos y se observaron los cometas en un microscopio de epifluorescencia (Olympus, Japón; 400x) (figura 8J). En base a datos previos se consideraron 5 tipos de cometa de acuerdo con la longitud e intensidad de la cola y al tamaño de la cabeza: tipo 0 (cola ausente, ADN sin daño), 1, 2, 3 y 4 (cabeza muy pequeña o ausente y cola muy larga, ADN severamente dañado), el criterio fue adoptado según lo descrito por Anderson y col. (1994).

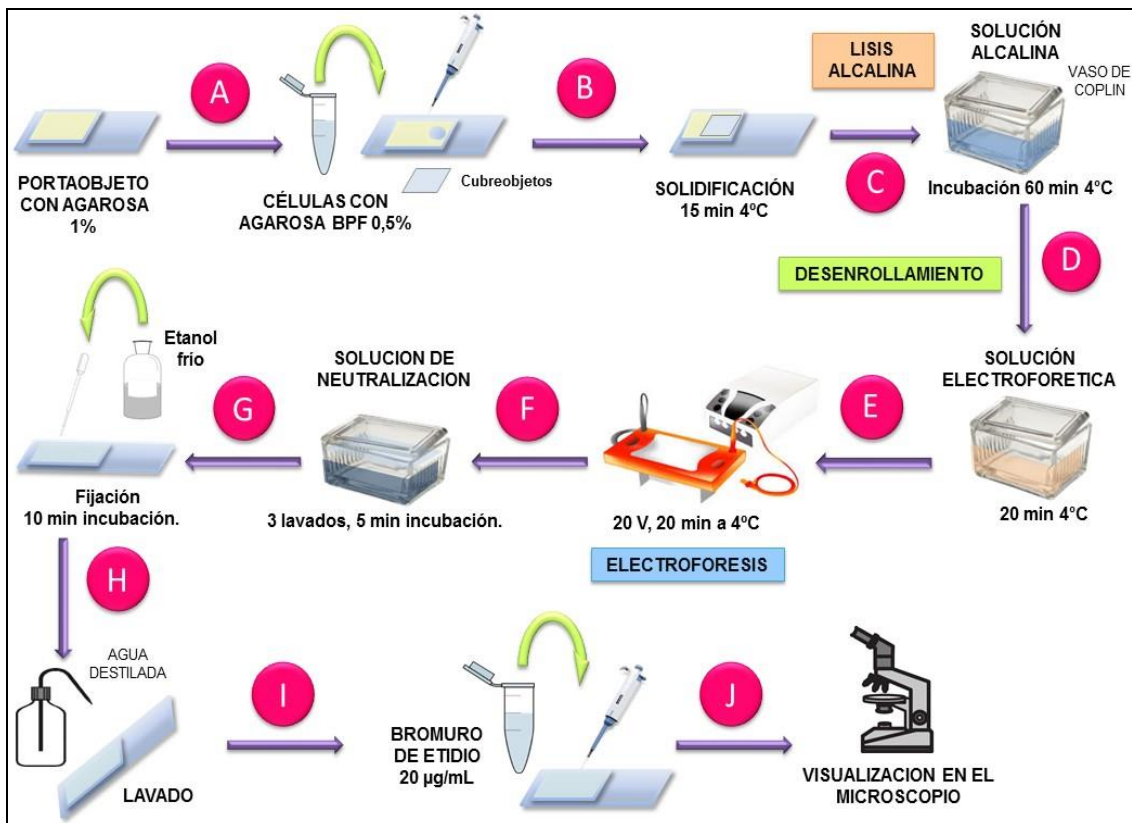


Figura 8: Esquema del protocolo del Ensayo del Cometa. A- siembra de células mononucleadas B- solidificación, C- lisis alcalina, D- desenrollamiento, E- electroforesis (20V, 20 min 4°C), F- neutralización, G- fijación con etanol frío, H- lavado, I- tinción del ADN con bromuro de Etidio, J- visualización en el microscopio de epifluorescencia. BPF: bajo punto de fusión.

Para estimar el daño genotóxico se calculó un score a partir de los porcentajes obtenidos para cada grado:

$$\text{SCORE} = 0 \times (\% \text{ grado } 0) + 1 \times (\% \text{ grado } 1) + 2 \times (\% \text{ grado } 2) + 3 \times (\% \text{ grado } 3) + 4 \times (\% \text{ grado } 4).$$

Se clasificaron los tipos de al menos 150 cometas por muestra analizando 50 cometas por cada replicado (al menos 3 replicados por muestra) según lo sugerido por Collins y col. (Collins y col., 1997) y se calculó el porcentaje para cada tipo en la muestra. Se asignó un puntaje a cada muestra en base a la fórmula indicada arriba. De esta manera, el rango del puntaje variaba entre 0 (solo tipo 0) y 400 (todos tipo 4).

3.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Para el análisis de asociación entre la expresión de los dos genes en estudio y los diferentes factores pronósticos en el cáncer de mama se utilizaron tablas de contingencia basadas en el test de Fisher (Graph-Pad Instat, CA, EEUU). Para el análisis de asociación se consideraron los siguientes factores: edad de las pacientes (mayores o menores a 50 años), presencia o ausencia de los receptores de estrógeno y progesterona en el tumor, HER-2new sobre-expresado o normal en el tumor, tamaño del tumor (mayor o menor a 2cm), el grado nuclear (1-2 ó 3), grado histológico (1-2 ó 3) y presencia o ausencia de nódulos metastásicos.

3.13 CONSENTIMIENTO INFORMADO UTILIZADO PARA LA DONACIÓN DE MUESTRA DE SANGRE HUMANA:

Consentimiento informado utilizado para la donación de muestra de sangre humana de pacientes:

Título del proyecto: “Detección de células tumorales circulantes en pacientes con cáncer de mama mediante el uso de 2 biomarcadores moleculares: mamaglobina A y Twist-1. Correlación del daño genotóxico relacionado al tratamiento con la evolución de las pacientes”.

Rosario,/...../.....

Información para el paciente:

Se la invita a participar del presente proyecto cuyo objetivo es detectar células tumorales en sangre periférica de pacientes con carcinoma mamario. Si bien estos estudios no traerán un beneficio inmediato a la salud de las pacientes afectadas, los mismos contribuirán a mejorar el estudio de factores pronóstico de la enfermedad.

La muestra de sangre de la donante se obtendrá antes de su tratamiento o procedimiento diagnóstico invasivo. En algunos casos se le solicitará una nueva muestra finalizado su tratamiento. El uso de las muestras para estudios bioquímicos no causará efectos adversos en la donante, ni representará ningún riesgo para la misma. La no aceptación por participar en el estudio no afectará en ninguna medida su atención en el centro médico. Ud. podrá retirarse del estudio cuando lo desee. Todos los datos personales de la donante serán absolutamente confidenciales.

Datos de contacto con representantes del estudio:

Dr. S. Ghersevich. Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Suipacha 531. 2000. Rosario. Tel: 341-4804592 int 237.

Comité de Ética Hospital Provincial del Centenario: Dra. Stella Pezzotto. Urquiza 3101. Rosario. Tel: 341-472-4643.

CERTIFICADO DE CONSENTIMIENTO

He leído la información anterior (o me ha sido leída). Tuve la posibilidad de formular preguntas sobre la misma, las cuales fueron respondidas a profundidad. Entiendo que el objetivo del proyecto “Detección de células tumorales circulantes en pacientes con cáncer de mama mediante el uso de la combinación de biomarcadores moleculares: mamaglobina A y Twist-1. Evaluación del daño genotóxico relacionado al

tratamiento” es estudiar la presencia de células tumorales en sangre y correlacionarla con la evolución de la enfermedad en pacientes con cáncer de mama.

Voluntariamente acepto donar muestras de mi sangre para llevar a cabo este estudio. Entiendo que esto no implica riesgo alguno para mi persona.

Nombre: _____

Firma del donante: _____

Testigo 1: _____

Profesional a cargo: _____

Consentimiento informado utilizado para la donación de muestra de sangre humana de donantes sanos:

Rosario,/...../.....

Título del proyecto: “Detección de células tumorales circulantes en pacientes con cáncer de mama mediante el uso de 2 biomarcadores moleculares: mamaglobina A y Twist-1. Correlación del daño genotóxico relacionado al tratamiento con la evolución de las pacientes”.

Información para el donante sano: Se la invita a participar como donante sano sin patología mamaria del presente proyecto cuyo objetivo es detectar células tumorales en sangre periférica de pacientes con carcinoma mamario. Si bien estos estudios no traerán un beneficio inmediato a la salud de las pacientes afectadas, los mismos contribuirán a mejorar el estudio de factores pronóstico de la enfermedad.

La muestra de sangre de la donante sana se obtendrá en ayunas y se utilizará como control del estudio. El uso de las muestras para estudios bioquímicos no causará efectos adversos en la donante, ni representará ningún riesgo para la misma. Ud. podrá retirarse del estudio cuando lo desee. Todos los datos personales de la donante serán absolutamente confidenciales.

Datos de contacto con representantes del estudio:

Dr. S. Ghersevich. Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Suipacha 531. 2000. Rosario. Tel: 341-4804592 int 237.

Comité de Ética Hospital Provincial del Centenario: Dra. Stella Pezzotto. Urquiza 3101. Rosario. Tel: 341-472-4643.

CERTIFICADO DE CONSENTIMIENTO

He leído la información anterior (o me ha sido leída). Tuve la posibilidad de formular preguntas sobre la misma, las cuales fueron respondidas a profundidad. Entiendo que el objetivo del proyecto “Detección de células tumorales circulantes en pacientes con cáncer de mama mediante el uso de la combinación de biomarcadores moleculares: mamaglobina A y Twist-1. Evaluación del daño genotóxico relacionado al tratamiento” es estudiar la presencia de células tumorales en sangre y correlacionarla con la evolución de la enfermedad en pacientes con cáncer de mama.

Voluntariamente acepto donar muestras de mi sangre para llevar a cabo este estudio. Entiendo que esto no implica riesgo alguno para mi persona.

Nombre: _____

Firma del donante: _____

Testigo 1: _____

Profesional a cargo: _____

4. RESULTADOS

4.1 DETECCIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LAS MUESTRAS DE ARN.

Se tomaron muestras de sangre periférica de 55 pacientes con cáncer de mama y de 23 donantes sanas. Las muestras de sangre fueron procesadas dentro de la hora de la extracción. A través de los métodos de separación anteriormente descritos se obtuvieron las células nucleadas y se procedió a extraer el ARN. Posteriormente, se determinó su concentración, pureza e integridad.

El análisis de la integridad del ARN se realizó mediante la observación de dos bandas perfectamente definidas correspondientes al ARNr 28S y 18S en un gel de agarosa. Por el contrario, cuando la muestra de ARN se encuentra degradada se generan fragmentos de diferentes tamaños que producen bandas indefinidas, generando una distribución desigual en el gel y una disminución en la señal de fluorescencia.

El análisis indicó que el ARN estaba dañado en 6 de las muestras de las pacientes, las cuales fueron descartadas.

4.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES.

El estudio de la expresión de los genes TWIST-1 y MGA solo pudo llevarse a cabo en 36 de las 49 muestras con el ARN no dañado. La edad promedio de las pacientes cuyas muestras se usaron en el estudio fue de $51,5 \pm 12,5$ años. Se extrajo ARN de 14 (rango de edades de $49,4 \pm 9,4$ años) de las 23 donantes sanas.

La información clínica registrada de las biopsias de tejido y los datos de cada paciente se describen en la tabla 2.

	<i>N</i>	<i>%</i>
<i>Edad</i>		
<50	16	44,4
>50	20	55,6
<i>Receptores de estrógeno</i>		
Positivos	26	78,8
Negativos	7	21,2
<i>Receptores de progesterona</i>		
Positivos	27	81,8
Negativos	6	18,2
<i>Her2-neu</i>		
Positivo	10	30,3
Negativo	23	69,7
<i>Tamaño del tumor</i>		
<2 cm	14	50,0
>2 cm	14	50,0
<i>Grado nuclear</i>		
1-2	24	80,0
3	6	20,0
<i>Grado histológico</i>		
1-2	14	58,3
3	10	41,7
<i>Nódulos metastásicos</i>		
Presencia	14	56,0
Ausencia	11	44,0

Tabla 2: Factores pronósticos de las pacientes con cáncer de mama que participaron en el estudio. N y %: número y porcentaje de pacientes con una dada característica. Algunos datos no estaban disponibles en las historias clínicas de todas las pacientes.

4.3 DETERMINACION DE LA EXPRESION DEL GEN TWIST-1.

4.3.1 Ajuste de los parámetros y optimización de la reacción de RT-PCR.

Para lograr condiciones óptimas de la reacción de RT-PCR en tiempo real previamente se realizaron diferentes pruebas ajustando parámetros de la reacción, tales

como la concentración del ADNc, la concentración de los cebadores y la temperatura de hibridación.

En una primera instancia, se realizó un ensayo probando distintas diluciones de ADNc y se mantuvo el programa de tiempo y temperaturas reportado por el grupo de investigación de Tjensvoll y col. (Tjensvoll y col., 2010). De esta forma se escogió la dilución adecuada, tomándose dos criterios de evaluación: un valor de Ct registrado entre los 20 a 30 ciclos y el mayor valor de intensidad de fluorescencia.

Luego para lograr mayor especificidad en la reacción se probaron distintas temperaturas de hibridación ya que la descrita en el trabajo mencionado anteriormente producía la formación de dímeros entre los cebadores. Se deben eliminar la formación de estos dímeros para evitar resultados que generen falsos positivos.

Finalmente, se probaron distintas concentraciones de cebadores. Seleccionando la concentración óptima en la cual se detectó señal en el menor número de ciclos (menor Ct) y se emitió mayor intensidad de fluorescencia. Ajustar la concentración de cebadores ayuda a disminuir la unión no específica de los mismos, generando menor cantidad de productos inespecíficos.

A partir de los análisis indicados, las condiciones de termociclado fueron las siguientes:

- 10 min a 95°C
- seguido de 40 ciclos de:
- 15 seg a 95°C
 - 1 min a 57°C
 - 30 seg a 72°C.

Una vez puesta a punto la reacción de amplificación por PCR en tiempo real, se obtuvo por cada paciente y donante sana un valor de Ct. Se estableció que la expresión del gen TWIST-1 en la población control presentaba una distribución normal del conjunto de datos, por lo cual se estimó un intervalo de referencia de la expresión del gen TWIST-1 considerando el valor promedio del nivel de expresión de este grupo ($\Delta Ct: Ct_{TWIST-1} - Ct_{GADPH}$) ± 2 DS. Se espera que el 95% de las observaciones estén dentro del intervalo de referencia (Wellek y col., 2014). Utilizando el método comparativo de delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) se calculó el nivel de expresión del gen TWIST-1 en cada paciente relativo al valor máximo del intervalo de referencia de la expresión del gen en las muestras del grupo control sano:

Intervalo referencia grupo control: promedio ($Ct_{TWIST-1} - Ct_{GADPH}$) \pm 2DS.

Los resultados indicaron que 6 de las pacientes presentaron un aumento de expresión de gen TWIST-1 por sobre el nivel máximo del grupo control, desde un 25-550% por encima de la expresión máxima en donantes sanas (Tabla 3, Figura 9).

	N	TWIST-1 (+)	TWIST-1 (-)
Pacientes con cáncer de mama	36	17% (6/36)	83% (30/36)

Tabla 3: Detección de la expresión del gen TWIST-1 en sangre de pacientes con cáncer de mama. TWIST-1 (+): se detectó sobre-expresión del gen, TWIST-1(-): no se detectó sobre-expresión del gen.

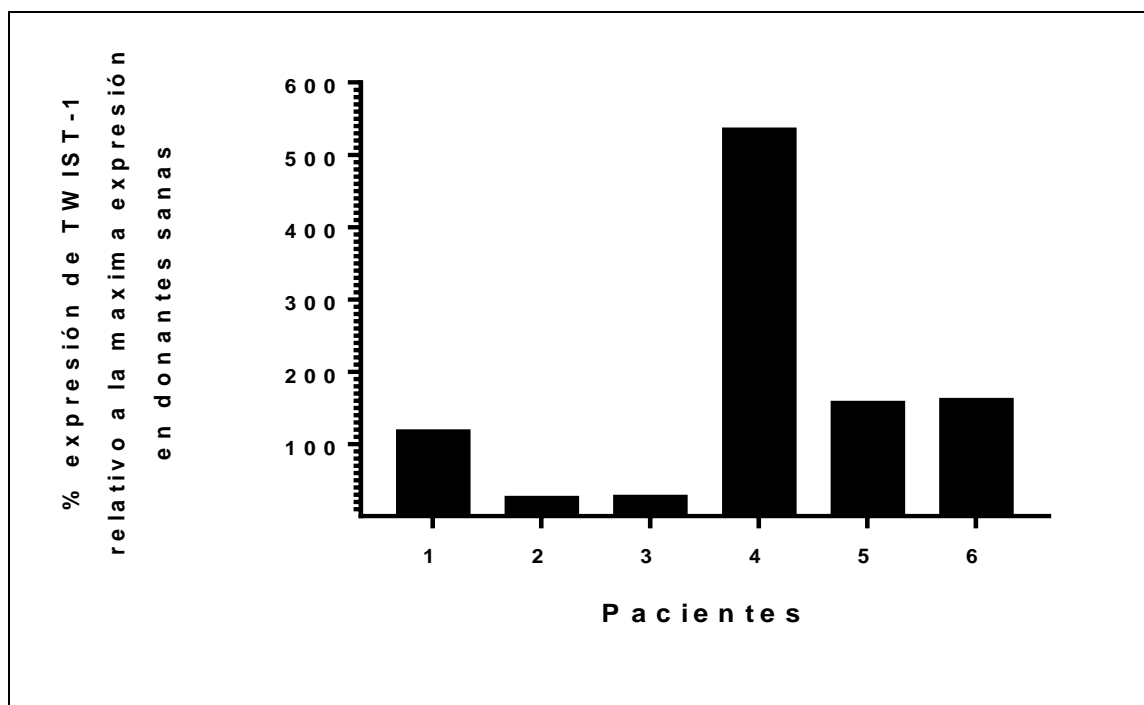


Figura 9: Porcentaje de aumento de la expresión del gen TWIST-1 en 6 de las pacientes con cáncer de mama estudiadas tomando como referencia el valor máximo del intervalo de referencia de expresión detectada en el grupo control. Las pacientes 4, 5 y 6 presentaron los mayores niveles de expresión de dicho gen.

El análisis de las historias clínicas reveló que las tres pacientes (4, 5 y 6) que presentaron mayores porcentajes de expresión del gen TWIST-1 además presentaron metástasis en órganos a distancia (Figura 9).

4.3.2 Análisis de asociación entre la expresión del gen TWIST-1 y los diferentes factores pronósticos del cáncer de mama.

En la tabla 4 se muestran los datos registrados de los factores pronósticos para el cáncer de mama, de las pacientes en las cuales se detectó un incremento de la expresión del gen TWIST-1 y de aquellas en las cuales la expresión detectada fue similar a la

	<i>TWIST-1 (+)</i>	<i>TWIST-1 (-)</i>	<i>p</i>
<i>Edad (años)</i>			
<50	4	12	0,37
>50	2	18	
<i>Receptores de estrógeno</i>			
<i>Positivos</i>	5	21	1,00
<i>Negativos</i>	1	6	
<i>Receptores de progesterona</i>			
<i>Positivo</i>	5	22	1,00
<i>Negativo</i>	1	5	
<i>Her2-neu</i>			
<i>Positivo</i>	1	9	0,64
<i>Negativo</i>	5	18	
<i>Tamaño del tumor</i>			
<2 cm	3	11	1,00
>2 cm	3	11	
<i>Grado nuclear</i>			
1-2	5	19	0,55
3	0	6	
<i>Grado histológico</i>			
1-2	5	11	0,34
3	1	9	
<i>Nódulos metastásicos</i>			
<i>Presencia</i>	3	13	0,64
<i>Ausencia</i>	3	7	

Tabla 4: Análisis de asociación entre la expresión del gen TWIST-1 y factores pronósticos de cáncer de mama en las pacientes estudiadas. TWIST-1 (+): pacientes en las que se detectó incremento de la expresión del gen TWIST-1. TWIST-1 (-): pacientes en las cuales la expresión de TWIST-1 se halla dentro de los valores de la población control. Algunos datos no estaban disponibles en las historias clínicas de todas las pacientes.

obtenida en el grupo control. Estos datos fueron analizados mediante el test de Fisher, y los resultados no indicaron una asociación significativa entre la expresión de TWIST-1 y los factores pronósticos estudiados.

4.4 DETERMINACION DE LA EXPRESION DEL GEN MGA.

De un total de 36 muestras de pacientes estudiadas, solo en 5 de ellas se detectó expresión del gen MGA. Por el contrario, en ninguna de las donantes sanas del grupo control se detectó expresión de MGA (Tabla 5).

	N	MGA (+)	MGA (-)
Pacientes con cáncer de mama	36	14% (5/36)	86% (31/36)
Donantes sanas	14	0%	100%

Tabla 5: Detección de la expresión de MGA en sangre de pacientes con cáncer de mama estudiadas y en el grupo de donantes sanas. MGA (+): se detectó amplificación del gen MGA, MGA (-): no se detectó amplificación para dicho gen. N: número de muestras analizadas.

4.4.1 Análisis de asociación entre la expresión de MGA y diferentes factores pronósticos del cáncer de mama.

Utilizando el test de Fisher se investigó la asociación de la expresión de MGA con factores pronósticos de cáncer de mama. Los datos fueron registrados en la tabla 6, en donde se puede observar que no se encontraron asociaciones significativas entre la presencia o ausencia de la expresión de MGA y los diferentes factores pronósticos del cáncer de mama.

	<i>MGA (+)</i>	<i>MGA (-)</i>	<i>P</i>
<i>Edad (años)</i>			
<50	2	14	1,00
>50	3	17	
<i>Receptores de estrógeno</i>			
Positivos	2	25	0,18
Negativos	2	5	
<i>Receptores de progesterona</i>			
Positivo	2	26	0,13
Negativo	2	4	
<i>Her2-neu</i>			
Positivo	1	9	1,00
Negativo	3	21	
<i>Tamaño del tumor</i>			
<2 cm	4	12	0,33
>2 cm	1	13	
<i>Grado nuclear</i>			
1-2	2	22	0,17
3	2	4	
<i>Grado histológico</i>			
1-2	3	11	0,61
3	1	9	
<i>Nódulos metastásicos</i>			
Presencia	4	11	0,34
Ausencia	1	11	

Tabla 6: Análisis de asociación entre la expresión de MGA en sangre periférica y diferentes factores pronósticos de cáncer de mama. MGA (+): cantidad de pacientes en las que se detectó expresión de MGA. MGA (-): cantidad de pacientes en las cuales no se detectó expresión de MGA. Algunos datos no estaban disponibles en las historias clínicas de todas las pacientes.

4.5 DETECCIÓN DE CTCs MEDIANTE LA COMBINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TWIST-1 Y MGA.

Considerando la detección de las CTCs a través de la expresión de al menos uno de los genes investigados, 10 (27,8%) de las muestras analizadas resultaron positivas (Figura 10). Es importante notar que solo una muestra fue positiva para ambos genes.

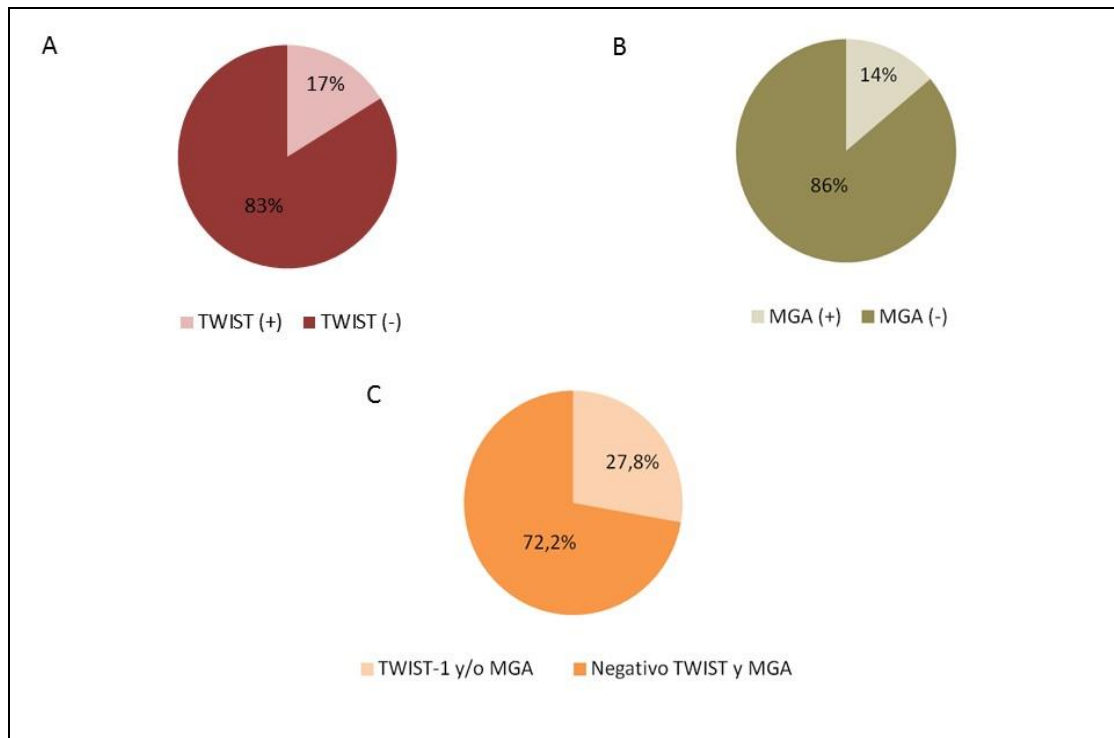


Figura 10: Gráficos del porcentaje de pacientes en el que se detectó CTCs mediante el análisis de la expresión de TWIST-1 y MGA. En el panel A se muestra el porcentaje de pacientes a las que se les detectó CTCs utilizando como marcador la determinación de la expresión del gen TWIST-1. En el panel B, se muestra el porcentaje de pacientes a las que se les detectó CTCs utilizando como marcador la determinación de la expresión del gen MGA. En el panel C, se muestra el porcentaje de pacientes a las que se detectó CTCs utilizando la combinación de la expresión de ambos genes.

4.5.2 Análisis de asociación entre la expresión de TWIST-1/MGA y diferentes factores pronósticos del cáncer de mama.

La tabla 7 muestra el análisis de asociación entre la determinación de la expresión de TWIST-1 y/o MGA y los factores pronósticos para el cáncer de mama. Los resultados indicaron que no existe evidencia estadística de asociación entre las variables estudiadas.

	<i>TWIST-1 y/o MGA (+)</i>	<i>TWIST-1/MGA(-)</i>	<i>p</i>
<i>Edad (años)</i>			
<50	6	16	1,00
>50	4	10	
<i>Receptores de estrógeno</i>			
Positivos	6	21	0,35
Negativos	3	4	
<i>Receptores de progesterona</i>			
Positivo	6	22	0,30
Negativo	3	3	
<i>Her2-neu</i>			
Positivo	3	7	1,00
Negativo	6	18	
<i>Tamaño del tumor</i>			
<2 cm	6	9	0,21
>2 cm	2	12	
<i>Grado nuclear</i>			
1-2	6	18	0,64
3	2	4	
<i>Grado histológico</i>			
1-2	6	8	0,23
3	2	8	
<i>Nódulos metastásicos</i>			
Presencia	3	9	0,69
Ausencia	5	10	

Tabla 7: Análisis de asociación entre la expresión de ambos genes TWIST-1 y MGA en sangre periférica y diferentes factores pronósticos de cáncer de mama. TWIST-1 y/o MGA (+): cantidad de pacientes en las que se detectó expresión de TWIST-1 y/o MGA. TWIST-1/MGA (-): cantidad de pacientes en las cuales no se detectó expresión de ninguno de los dos genes. Algunos datos no estaban disponibles en las historias clínicas de todas las pacientes.

4.6 ENSAYO DEL COMETA.

El ensayo del cometa se realizó en muestras de sangre periférica de 49 pacientes (52,0 ± 11,9 años) con cáncer de mama previo al tratamiento y de 23 donantes sanas (47,8 ± 2,3 años).

La figura 11 muestra los distintos tipos de cometas observados.

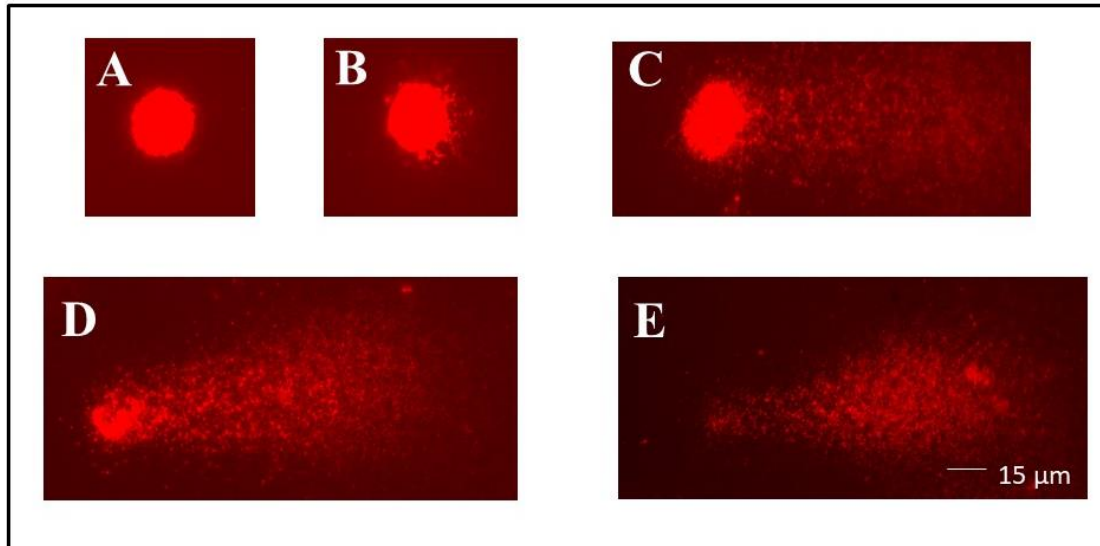


Figura 11: Micrografías de fluorescencia de diferentes tipos de cometa y su relación con el daño en el ADN celular. A partir de linfocitos de sangre periférica se analizó el daño al ADN celular mediante el ensayo del cometa. Los cometas fueron teñidos con bromuro de etidio y analizados en un microscopio de epifluorescencia (400X).

- A- Grado 0: sin daño del ADN, cometa sin cola.
- B- Grado 1: daño mínimo del ADN, cometa con cabeza aumentada de tamaño.
- C- Grado 2: daño moderado del ADN, cometa con cabeza grande y cola débil.
- D- Grado 3: daño marcado del ADN, cometa con cola grande y cabeza pequeña.
- E- Grado 4: daño completo del ADN, cometa con ausencia de cabeza.

Como se mencionó en la sección Materiales y Métodos, los valores de score estuvieron comprendidos entre 0 y 400, reflejando el valor 0 la ausencia de daño genotóxico y el valor 400 al mayor nivel de daño.

Los resultados del score para las pacientes fueron de 179,63 ± 8,30 (promedio ± EEM) y para las donantes sanas de 148,13 ± 8,63. El análisis estadístico reveló que el score de las pacientes con cáncer de mama fue significativamente más alto ($p < 0,05$) que el del grupo de donantes sanas (Figura 12).

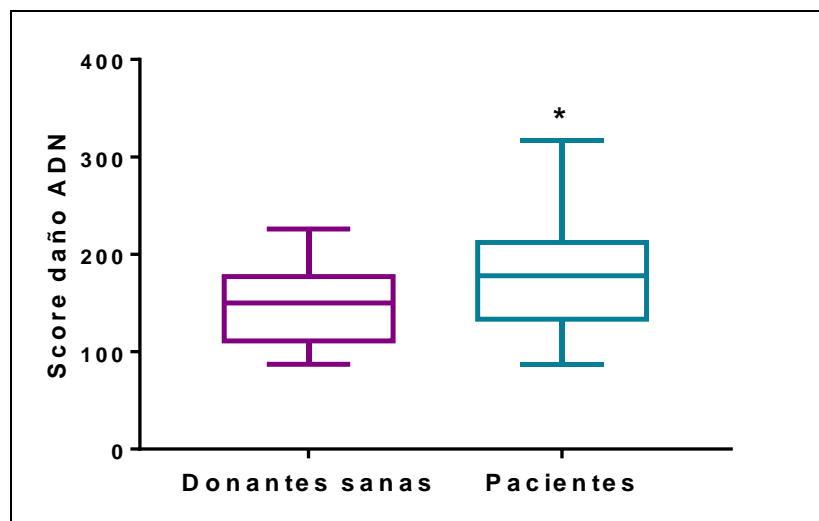


Figura 12: Valores de score del ensayo del cometa de pacientes con cáncer de mama (n=49) y de las donantes sanas (n=23) que participaron en este estudio. La línea dentro de las cajas representa la mediana, en tanto que los extremos de las mismas representan los percentilos 75 y 25 de los valores reportados. * $p < 0,05$.

Se trató de establecer un valor de corte del score para estimar valores del mismo que no correspondan a la población de pacientes con cáncer de mama. Para poder encontrar dicho valor de corte para el score se utilizó el método de análisis por curva ROC (del inglés “Receiver Operating Characteristic”) considerando los valores de score del grupo control y de las pacientes. El análisis arrojó un área bajo la curva de 0,7163 (95% CI 0,5696-0,8357) con un $p = 0,005$. A partir de los resultados obtenidos de la curva ROC, se determinó que un valor de score menor a 124 se asociaría principalmente a individuos sin cáncer de mama con una especificidad del 80% y una sensibilidad del 40%.

4.6.1 Análisis de asociación entre el daño en el ADN y los factores pronósticos en el cáncer de mama.

Considerando el valor de corte del score del cometa establecido como se indicó en el punto anterior, se realizaron estudios de asociación entre el score del daño genotóxico (score > 124 o score ≤ 124) y los diferentes factores pronósticos del cáncer de mama. Este análisis no arrojó asociaciones significativas entre los factores pronósticos estudiados y el daño basal en el ADN linfocitario previo al tratamiento de las pacientes con cáncer de mama (Tabla 8).

	<i>Score ≤ 124</i>	<i>Score >124</i>	<i>P</i>
<i>Edad</i>			
<i><50 años</i>	7	15	0,09
<i>>50 años</i>	3	24	
<i>Receptores de estrógeno</i>			
<i>Positivos</i>	7	27	1,00
<i>Negativos</i>	1	7	
<i>Receptores de progesterona</i>			
<i>Positivo</i>	6	26	1,00
<i>Negativo</i>	2	8	
<i>Her2-neu</i>			
<i>Positivo</i>	4	10	0,40
<i>Negativo</i>	4	25	
<i>Tamaño del tumor</i>			
<i><2 cm</i>	5	11	0,68
<i>>2 cm</i>	3	12	
<i>Grado nuclear</i>			
<i>1-2</i>	7	20	0,64
<i>3</i>	1	7	
<i>Grado histológico</i>			
<i>1-2</i>	5	9	0,34
<i>3</i>	1	9	
<i>Nódulos metastásicos</i>			
<i>Presencia</i>	2	9	0,67
<i>Ausencia</i>	5	13	

Tabla 8: Análisis de asociación entre diferentes factores pronóstico de cáncer de mama y el daño en el ADN de las pacientes (score > 124 o score ≤ 124). Algunos datos no estaban disponibles en las historias clínicas de todas las pacientes.

4.6.2 Análisis del daño en el ADN antes y después del tratamiento.

Para corroborar el daño genotóxico causado por el tratamiento de quimio y/o radioterapia en 12 de las pacientes con cáncer de mama se aplicó el ensayo del cometa en muestras tomadas antes y después (12 +/- 2 meses después de la cirugía de mama)

del primer ciclo de tratamiento de quimio y/o radioterapia. Los resultados obtenidos de los scores son referidos en la Figura 13-A.

El análisis estadístico indicó un aumento muy significativo del score en las pacientes después de recibir el tratamiento ($p < 0,001$), corroborando el efecto perjudicial para el ADN de los tratamientos mencionados (Figura 13-B).

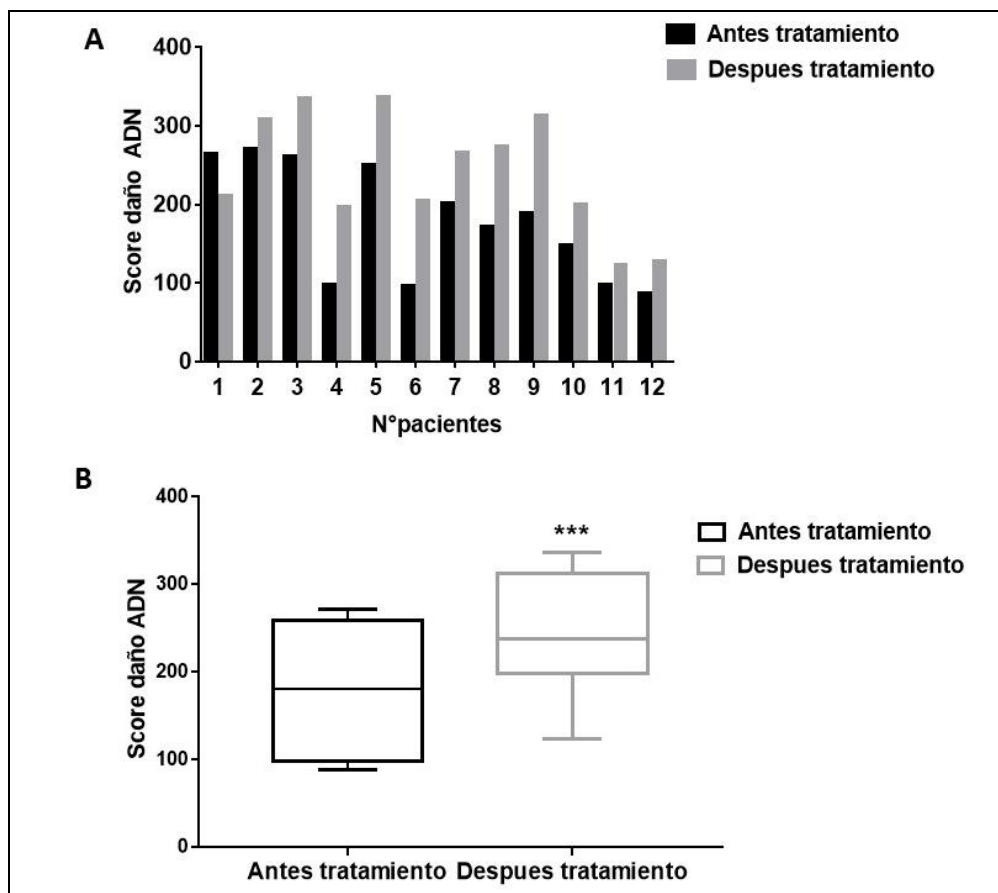


Figura 13: A- Valores de score del daño en el ADN de pacientes con cáncer de mama ($n=12$) antes y después del 1er ciclo de tratamiento de quimio y/o radioterapia.

B- Gráfico de caja de los valores de scores del daño del ADN en las muestras obtenidas antes y después del tratamiento. La línea interna en cada caja corresponde a la mediana de la población y los extremos de la caja indican el 25 y 75 percentil de la población. *** $p < 0,001$.

Con el objetivo de estudiar si existe una dependencia entre los valores de daños en el ADN antes y después del tratamiento se realizó un análisis de regresión lineal entre las dos variables. De este análisis se obtuvo un coeficiente R^2 de 0,8224 y $p=0,0001$, indicando una correlación muy significativa entre los valores de daño genotóxico pre y post-tratamiento.

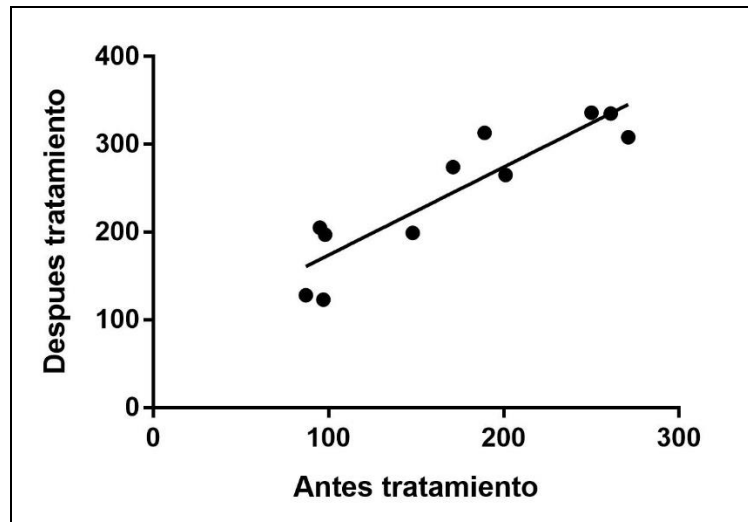


Figura 14: Análisis de regresión lineal entre los valores de scores del cometa en las pacientes con cáncer de mama antes del tratamiento y después del mismo. Coeficiente R^2 : 0,8224 y $p= 0,0001$.

Para corroborar si el score de daño en el ADN observado luego de los tratamientos es influenciado por el score basal de las pacientes, se realizó una comparación de los scores después del tratamiento entre las pacientes que tenían un nivel de daño basal del ADN con un score ≤ 124 y aquellas que presentaron un score >124 (Figura 15), antes y después del tratamiento.

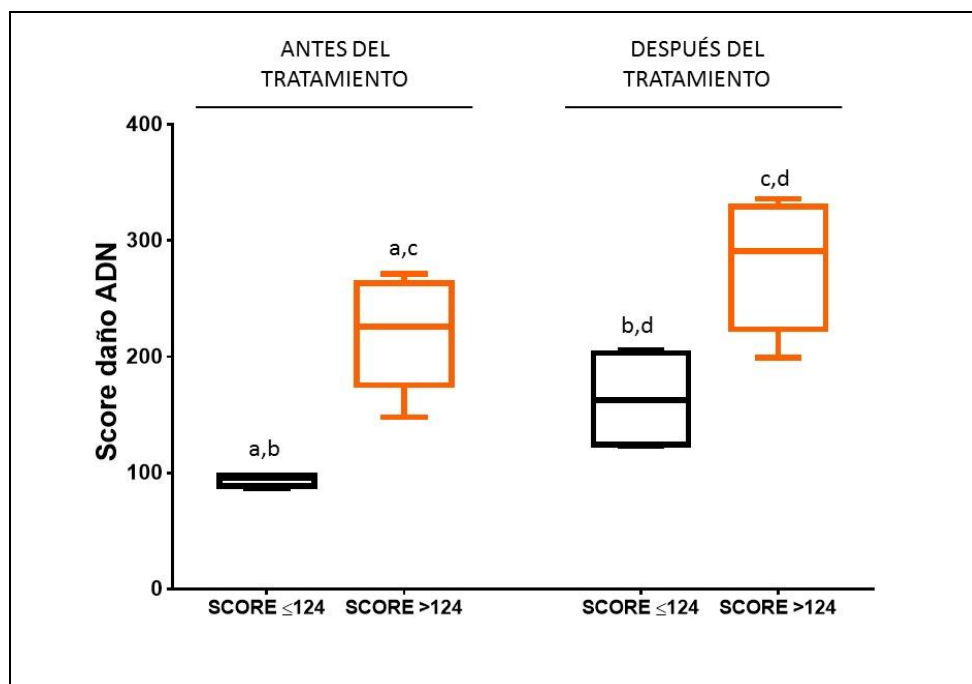


Figura 15: Comparación del nivel de daño basal del ADN entre las pacientes con un score ≤ 124 y aquellas con un score >124 antes del tratamiento, con sus respectivos valores después del tratamiento. Las letras iguales indican los grupos comparados. a: $p<0,001$; b: $p<0,05$; c: $p<0,05$; d: $p<0,01$

Si bien en ambos grupos de pacientes (score basal ≤ 124 ó > 124) el tratamiento causó un aumento significativo del score, cuando se realizó la comparación del daño del

ADN entre los dos grupos de pacientes después de haber sido sometidas al tratamiento, los resultados indicaron valores de daño genotóxico significativamente más altos en los pacientes cuyos valores iniciales de daño eran >124 (Figura 15, d; $p < 0,01$), confirmando que el daño al ADN causado por el tratamiento dependía de los valores de daño basal.

4.6.3 Análisis de asociación entre el daño en el ADN y la expresión de MGA y TWIST-1.

Se contrastaron los valores medios de score del cometa entre los pacientes con MGA (+) respecto de las pacientes en las cuales no se encontró expresión de dicho gen [MGA (-)] (Figura 16 A). El mismo análisis se realizó con las pacientes con sobreexpresión del gen TWIST-1 (Figura 16 B). Asimismo, se compararon los valores de score de las pacientes con uno o ambos marcadores positivos respecto de las pacientes con expresión negativa de ambos genes (Figura 16 C). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos.

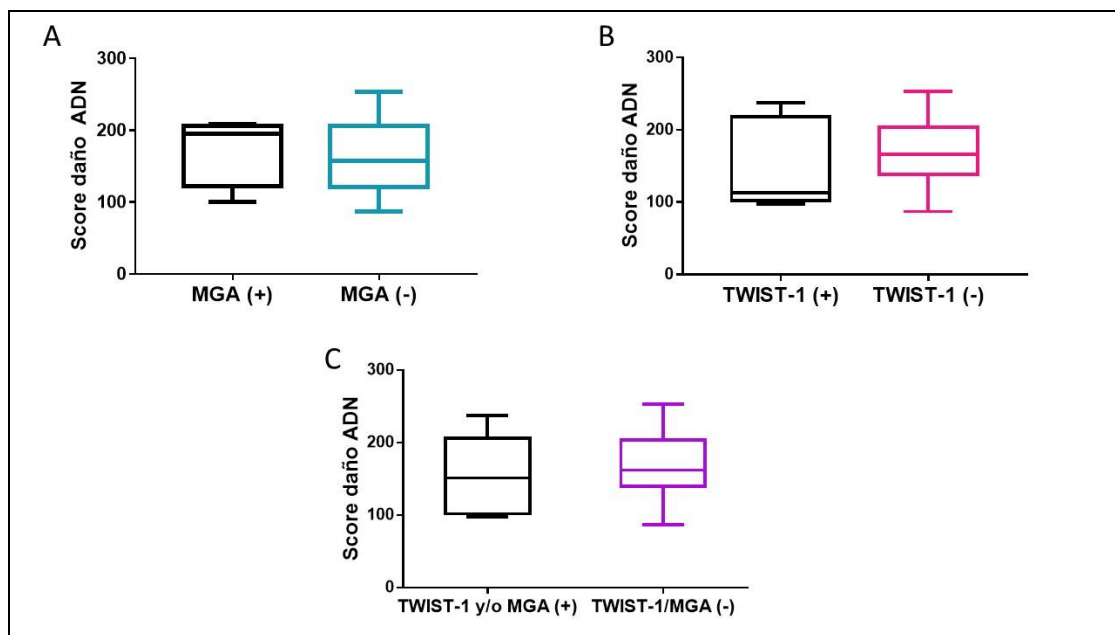


Figura 16: A- Valores de los scores del daño en el ADN en las pacientes que resultaron ser positivas para el gen MGA en sangre ($174,3 \pm 25,05$) y las pacientes que fueron negativas ($165 \pm 9,07$). $p > 0,05$. B- Valores de los scores del daño en el ADN de las pacientes que resultaron ser positivas para el gen TWIST-1 en sangre ($150,8 \pm 28,37$) y las pacientes que fueron negativas ($166,9 \pm 8,44$). $p > 0,05$. C- Valores de los scores del daño en el ADN de las pacientes que resultaron positivas para uno o ambos genes [TWIST-1 y/o MGA (+), $156,4 \pm 20,33$] y las pacientes en las cuales no se detectó expresión de ninguno de los dos genes [TWIST-1/MGA (-), $167,1 \pm 8,87$]. $p > 0,05$. La línea interna en cada caja corresponde a la mediana de la población y los extremos de la caja indican el 25 y 75 percentilo de la población.

5. DISCUSIÓN.

La principal causa de mortalidad asociada al cáncer de mama sigue siendo la metástasis. La diseminación de células tumorales desde el tumor primario hasta sitios distantes a través del torrente sanguíneo no puede detectarse tempranamente por métodos tradicionales. Si las CTCs fueran detectadas precozmente, podrían reflejar la progresión de la enfermedad en tiempo real. Esta información podría ser particularmente útil para la aplicación de terapias sistémicas. De este modo, se contribuiría a guiar las terapias específicas para un determinado paciente con cáncer en una ventana terapéutica definida, afirmando el concepto de medicina personalizada (Pantel & Alix-Panabières, 2012).

El método de detección de CTCs que se ha planteado en este estudio utiliza la técnica de PCR en tiempo real, la cual es una herramienta altamente sensible para la detección de pequeñas cantidades de ARNm, siendo el principal objetivo la detección de genes específicos de cáncer que no se expresan en células de la sangre o lo hacen en bajas proporciones. En este trabajo se estudió la presencia de las CTCs a través del análisis de la expresión de los genes MGA y TWIST-1.

La detección de la expresión de MGA es específica de tejido mamario, ya que se limita principalmente a dicha glándula y normalmente no se encuentra en sangre. El problema de la aplicación de MGA como único marcador de CTCs es que es un gen epitelial y su expresión podría estar disminuida durante el proceso de EMT. Por lo tanto, dado que la expresión de TWIST-1 está asociada a la EMT, la combinación de la detección de MGA con la de este último gen permitiría también la detección de células que podrían estar expresando marcadores mesenquimales como parte del proceso metastásico.

5.1 TWIST-1.

Nuestro estudio reveló que un 17% de las pacientes con cáncer de mama mostraron elevada la expresión de TWIST-1 en sangre comparada con la expresión en donantes sanas. En un estudio previo realizado por Strati y col. la expresión de TWIST-1 fue detectada en alrededor de un 40% de las muestras de sangre analizadas (Strati y col., 2011). Esta aparente discrepancia con nuestros resultados podría ser explicada por varios aspectos. En primer lugar, en el estudio de Strati y col. se realizó en una población de pacientes en Grecia y se utilizaron muestras de sangre obtenidas luego de la cirugía del tumor, por lo cual no debe descartarse la potencial siembra de células

derivadas del tumor en el torrente sanguíneo. Otra diferencia es que en dicho estudio el volumen de muestra utilizado fue de 20 ml de sangre, contra solo 5 ml que se usaron en nuestro trabajo. Al utilizar un mayor volumen podría aumentar la posibilidad de detectar las CTCs. En su estudio Strati y col. concluyeron que las CTCs presentan una notable heterogeneidad de la expresión génica entre distintos pacientes con cáncer de mama, lo cual también puede contribuir a la diferencia observada. Además, en el estudio realizado por Strati y col. se utilizó una etapa de enriquecimiento de CTCs, procedimiento que puede haber favorecido el hallazgo de las mismas. Se debe destacar que, aunque el proceso de enriquecimiento para CTCs es útil, el mismo es generalmente costoso y no es totalmente efectivo, ya que no se obtiene una población pura de células tumorales (Álvarez Cubero y col., 2017). Los métodos de enriquecimiento que están basados en la expresión de antígenos de superficie de naturaleza epitelial tales como EpCAM, presentan limitaciones ya que no pueden detectar CTCs que expresen niveles de EpCAM muy bajos o que no lo expresen, como es el caso de las células tumorales al experimentar EMT (Went y col., 2004; Bitting y col., 2013; Hyun y col., 2016). Además, se ha mostrado experimentalmente que aproximadamente el 20% de las células no son detectables debido a la pérdida de CK después de transcurrir la EMT (Pecot y col., 2011).

Se ha descubierto que TWIST-1 se sobreexpresa en varios tipos de cáncer tales como mamario (Watanabe y col., 2004), pancreático (Chen y col., 2016), ovárico (Nutti y col., 2014), hepático (Zou y col., 2015), y prostático (Kwok y col., 2005). Una revisión sistemática de varios estudios en donde se evaluó la expresión de TWIST-1 asociada al pronóstico de pacientes con diferentes tipos de carcinoma (pulmonar, cabeza y cuello, mamario, esófago, hígado, osteosarcoma, vejiga, cervical y de ovario) reveló que la expresión de este gen se asociaría con pronósticos desfavorables de supervivencia (Wushou y col., 2014).

Distintos estudios han destacado el rol fundamental que posee TWIST-1 en aumentar la capacidad de las células tumorales de sobrellevar el proceso de EMT, de modo similar al rol que cumple en el desarrollo embrionario (Yang & Weinberg, 2008). Pero a pesar de que se han descubierto numerosas vías de señalización involucradas en el desarrollo metastásico mediado por TWIST-1, el mecanismo exacto por el cual dicho factor regularía la progresión del cáncer aún se desconoce (Qin y col., 2012).

Se ha sugerido que TWIST-1 puede servir como un regulador maestro en la progresión del cáncer de mama modulando múltiples genes involucrados en varias vías

de señalización (Je y col., 2013). Experimentos realizados por Yang y col., demostraron que suprimiendo la expresión de TWIST-1 en células de carcinoma mamario se inhibe la capacidad de diseminación de las células desde la glándula mamaria al pulmón (Yang y col., 2004). Asimismo, se propuso que TWIST-1 contribuye al proceso de metástasis, promoviendo la EMT. Mientras que el proceso de EMT es crucial para el desarrollo embrionario, para la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos, la activación anormal de dicho proceso puede ser muy perjudicial en el adulto. La expresión de los inductores de EMT se silencia en el organismo adulto, pero se pueden reactivar en células donde se altera la homeostasis epitelial, adquiriendo la capacidad de migrar y colonizar otros sitios distantes (Acloque y col., 2009). Esta reprogramación celular es disparada por factores inductores de la EMT que incluyen a los genes TWIST-1, Snail y Zeb (Peinado y col., 2007), los cuales actuarían como interruptores moleculares que responden a rutas de señalización embrionarias (ej: Wnt, Notch, Hedgehog y TFB- β) (Garg, 2013). Estos genes no solo estarían involucrados en la migración e invasión, sino también en la supresión de la senescencia y apoptosis, en la atenuación de la progresión del ciclo celular y en la resistencia a la quimio y radioterapia (De Craene & Berx, 2013). Además, un paso crucial para este proceso es la represión de E-Cadherina mediada por los factores de transcripción mencionados (Huber y col., 2005) dando como resultado la pérdida de la adhesión célula-célula (Vesuna y col., 2008).

Niveles elevados de expresión de TWIST-1 han sido correlacionados con características metastásicas/invasivas en carcinomas mamarios (Yang y col., 2004). Es interesante destacar que las tres pacientes que presentaron la mayor sobre-expresión de TWIST-1 además se les detectó metástasis en órganos a distancia. Varios estudios han demostrado que la expresión de TWIST-1 se asociaría con un mal pronóstico tanto en la supervivencia libre de enfermedad como para la sobrevida global de los pacientes con cáncer de mama, lo cual apoya su rol como un factor pronóstico independiente (Wushou y col., 2014; Imani y col., 2016).

No solo ha sido de interés el estudio de TWIST-1 como factor pronóstico, sino que también se ha planteado en el futuro como un posible objetivo terapéutico en el cáncer (Khan y col., 2013).

5.2 MGA.

En el presente estudio el análisis de la expresión de MGA permitió detectar la expresión de dicho gen en sangre en alrededor del 14% de las pacientes. En cambio,

en ninguna de las muestras de sangre de las donantes sanas se detectó MGA, corroborando su expresión normalmente restringida al tejido mamario. Los porcentajes de detección reportados varían ampliamente según distintos estudios, entre un 8% y un 60 % (Ferro y col., 2010; Ceballos y col., 2011; Skondra y col., 2014; Aristizábal-Pachón y col., 2015). Esta variación estaría relacionada al tipo de muestra obtenida y al método utilizado para analizar la expresión de MGA. Por otra parte, en la mayoría de los estudios la expresión de MGA tampoco fue detectada en sangre de donantes sanas.

Considerando que la expresión MGA es altamente específica de tejido mamario, distintos trabajos han utilizado la determinación de la expresión de dicho gen como un biomarcador para las CTCs derivadas del cáncer de mama (Bossolasco y col., 2002; Zehentner & Carter, 2004; Cheng y col., 2014).

Estudios previos en nuestro laboratorio, han corroborado la utilidad de la detección de MGA mediante PCR anidada como un marcador específico de CTCs en pacientes con cáncer de mama, considerando este hallazgo como un factor pronóstico negativo para la enfermedad al asociarse con la ausencia de receptores estrogénicos en el tumor primario (Ceballos y col., 2011). Otros estudios han reportado que la detección de la expresión de MGA en sangre se asocia con factores pronósticos desfavorables y menores tasas de supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama (Lee y col., 2012; Aristizábal-Pachón y col., 2015).

5.3 DETECCIÓN DE CTCs MEDIANTE LA COMBINACION DE TWIST-1 Y MGA.

La evidencia experimental indica que la expresión génica de las CTCs es muy heterogénea y varía entre distintos pacientes con cáncer de mama. Por lo tanto, para la búsqueda de las CTCs se plantea la combinación de dos o más marcadores genéticos con el objetivo de aumentar la sensibilidad en la detección de dichas células (De Albuquerque y col., 2012). Esta propuesta pudo ser verificada en nuestro estudio ya que, considerando la detección de la expresión de al menos uno de los genes investigados (TWIST-1 y/o MGA), el 27,8% de las muestras analizadas resultaron positivas, aumentando casi el 100% la detección respecto del uso de MGA únicamente y en más de un 60% la detección respecto del uso de TWIST-1 solamente. De este modo, el análisis combinado de los dos genes incrementa notablemente la sensibilidad en la detección de CTCs. Esto concuerda con otros

trabajos donde se ha observado que la combinación de varios biomarcadores resultó capaz de aumentar tanto la especificidad como la sensibilidad de la detección de CTCs (Skondra y col., 2014). Es interesante notar que en una sola muestra se detectó la expresión tanto de MGA como de TWIST-1, es decir que ambos marcadores genéticos fueron complementarios en la información que brindaron. Una posible explicación podría basarse en los resultados obtenidos por Picot y col. que indican que MGA modularía la expresión de TWIST-1, disminuyendo la expresión de dicho gen (Picot y col., 2016).

Cabe destacar que el análisis de asociación entre la detección de CTCs mediante la expresión de MGA y/o de TWIST-1 y los factores pronósticos para el cáncer de mama no reveló asociaciones significativas con ninguno de ellos. Por lo tanto, la detección de CTCs sería un factor pronóstico independiente que podría brindar información del riesgo de la progresión metastásica. Estos resultados también coinciden con los de otros autores que indican el valor pronóstico independiente de las CTCs en el cáncer de mama (Wushou y col., 2014; Zhou y col., 2017).

En los últimos diez años, numerosos ensayos clínicos se han realizado para establecer el valor pronóstico de las CTCs en etapas tempranas y avanzadas del cáncer de mama (Zhang y col., 2012). La simple presencia de una única CTC es un indicador de que la enfermedad se ha propagado desde el sitio primario. Por lo tanto, la detección de CTCs representa un predictor "silencioso" del avance de la enfermedad metastásica (Zhou y col., 2017). Consecuentemente, la detección temprana de CTCs podría ayudar a predecir qué pacientes necesitan un monitoreo más intenso y terapias sistémicas adicionales después de una resección quirúrgica del tumor primario. Aunque los tratamientos antitumorales están dirigidos a prevenir la recaída metastásica, la selección de las pacientes que las reciben se basa actualmente en el riesgo estadístico de desarrollar una recidiva tumoral, sin saber si realmente albergan células tumorales diseminadas. Esta incertidumbre se asociaría al sobretratamiento de pacientes con cáncer que pueden desencadenar efectos colaterales graves debido al efecto de las terapias (Fehm y col., 2008).

Por lo tanto, la evaluación de CTCs en pacientes con cáncer de mama mediante la detección de la expresión de TWIST-1 y MGA podría aportar información de relevancia clínica. Mediante la simple extracción de muestras de sangre periférica se puede detectar la presencia de CTCs. Este procedimiento puede realizarse con frecuencia, logrando la monitorización en tiempo real de la progresión

metastásica y de la respuesta a un dado tratamiento. La implementación de la detección de CTCs en la clínica podría contribuir a mejorar la selección del tratamiento para cada paciente y, por lo tanto, avanzar hacia terapias más eficientes y personalizadas.

Sin embargo, aún es un gran desafío la estandarización de la detección de CTCs en pacientes con cáncer de mama en el uso de la práctica clínica. Por lo cual deben realizarse ensayos clínicos en donde se analicen mayor cantidad de pacientes contribuyendo a validar tanto los métodos como los biomarcadores utilizados.

5.4 ENSAYO DEL COMETA.

En el presente estudio se evaluó mediante el ensayo del cometa el daño del ADN en células de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama antes del tratamiento de quimio y/o radioterapia, como así también en donantes sanas.

Al comparar el daño en el ADN de las pacientes con cáncer de mama antes del tratamiento y de las donantes sanas, se encontró que las pacientes presentaron un daño del ADN significativamente mayor al de las donantes sanas. Este resultado concuerda con lo publicado por otros autores (Smith y col., 2003; Kopjar y col., 2006; Santos y col., 2010). Debido a que continuamente el ADN está siendo expuesto a fuentes genotóxicas endógenas y exógenas produciéndose lesiones en el mismo. Estas lesiones dan lugar a una variedad de aberraciones genéticas, incluyendo a mutaciones, daños cromosomales con ganancia o pérdida de segmentos o aún de cromosomas enteros (Jeggio y col., 2016). Cuando estos daños no logran repararse pueden detener el ciclo celular o inducir la senescencia o la apoptosis. La reparación errónea o el “bypass” replicativo de las lesiones pueden resultar en mutaciones y aberraciones cromosómicas. Cuando las mutaciones afectan a genes supresores de tumores u oncogenes, la célula podría transformarse en una célula tumoral (Torgovnick & Schumacher, 2015). Debido a la combinación frecuente de niveles aumentados de daño del ADN y la capacidad disminuida de la reparación del ADN, la mayoría de las células tumorales acumulan centenares a millares de aberraciones genómicas (Lawrence y col., 2014). El proceso de transformación maligna en células de mama se asocia con una reducción o incluso con el agotamiento de la capacidad de las células para eliminar el daño a su ADN (Blasiak y col., 2004). Por lo tanto, la progresión tumoral estaría asociada a un aumento del daño en el ADN en las células tumorales. En un estudio se ha observado que los linfocitos de

pacientes con cáncer de mama, a diferencia de las células de individuos sanos, tendrían un deterioro en la capacidad de reparar el daño al ADN (Alapetite y col., 1999).

En base a los resultados obtenidos y a los datos mencionados se podría pensar que las pacientes con cáncer de mama presentan un aumento del daño en el ADN comparado con el daño en donantes sanas. Este hecho, podría explicarse debido que las pacientes con cáncer de mama podrían presentar una deficiencia en los mecanismos de reparación de daño al ADN.

Sin embargo, otros autores no hallaron diferencias en el daño del ADN de linfocitos de sangre periférica entre pacientes cáncer de mama y donantes sanas (Alapetite y col., 1999; Ceballos y col., 2014). Estos resultados que difieren respecto del daño al ADN entre distintos estudios tal vez podrían ser explicados por la población y cantidad de pacientes estudiados y por las condiciones experimentales utilizadas. Respecto a este último punto, en un trabajo realizado en conjunto entre distintos laboratorios se analizaron muestras de sangre periférica de donantes sanas usando el mismo procedimiento para aislar las células mononucleadas. Luego cada laboratorio utilizó su propio protocolo del ensayo del cometa. Los resultados demostraron que el nivel de daño en el ADN reportado difería entre laboratorios. Consecuentemente, se propuso que esta variación inter-laboratorios podría ser reducida mediante la utilización de un procedimiento estándar del protocolo del ensayo del cometa (Forchhammer y col., 2012). Otra de las cuestiones que debe ser considerada son los métodos de análisis de imágenes y estadísticos que se utilizan para evaluar los resultados, ya que los análisis con diferentes métodos estadísticos pueden derivar en diferentes conclusiones (Lovell y col., 1999).

En el presente trabajo, se registraron datos clínicos de las pacientes y se realizaron análisis de correlación entre los factores pronósticos para el cáncer de mama y el nivel de daño en el ADN. Los resultados no arrojaron asociaciones significativas con ninguno de los factores estudiados. Esto apoyaría que la determinación del daño del ADN en linfocitos de sangre periférica de las pacientes con cáncer de mama sería un parámetro independiente de los analizados tradicionalmente en la clínica.

En este estudio también se evaluó la integridad del ADN de linfocitos en algunas de las pacientes tanto antes como después del tratamiento de quimio y/o radioterapia, lo cual corroboró un aumento significativo de daño genotóxico provocado por los tratamientos. Estos hallazgos concuerdan con resultados previamente obtenidos en nuestro laboratorio y por otros autores (Blasiak y col., 2004; Ceballos y col., 2014). En

efecto, tanto el tratamiento de quimioterapia como de radioterapia causarían lesiones en el ADN celular. Es controversial el hecho que los daños en el ADN son precursores de la iniciación y progresión del cáncer y a la vez los tratamientos antitumorales convencionales se asocian con el daño en el ADN. Por lo tanto, sería importante considerar en cada paciente el nivel de daño genotóxico basal antes de aplicar el tratamiento contra el cáncer, cuando el mismo actúa a través de la inducción de daños letales en el ADN de las células, ya que afecta tanto a las células normales como a las tumorales.

En algunos casos, estas lesiones en el ADN no logran activar los mecanismos de respuestas de daño al ADN que conducen a la eliminación de la célula dañada. De este modo, las células son capaces de sobrevivir y transformarse en células tumorales. Por lo tanto, las células normales como consecuencia de la terapia antitumoral podrían adquirir mutaciones causando nuevos tumores (Tang y col., 2012).

En este punto, es importante tener en cuenta que aquellas pacientes que ya tenían niveles elevados de daño en el ADN antes del tratamiento sufrieron un incremento aún mayor luego del mismo respecto a aquellas pacientes con un daño basal menor. Esto puede deberse al hecho de que el tratamiento provocará numerosas lesiones en el ADN, pero el daño será mucho más importante cuando el ADN ya presenta una estructura más lesionada, lo cual estará reflejado en un mayor score del cometa. Como consecuencia de las lesiones ocasionadas por los agentes quimioterapéuticos y la radioterapia, después del tratamiento los pacientes mostraron un incremento en el daño del ADN. En algunos casos, los mecanismos de reparación del ADN no logran reparar las lesiones producidas y se activa la muerte celular o senescencia. Sin embargo, hay ocasiones en los que la acumulación de lesiones en el ADN conduce a la inestabilidad genómica y eventualmente al desarrollo de células tumorales. De este hecho se concluye, que el estado inicial del ADN de las pacientes es un factor importante por considerar antes del tratamiento. Los resultados indicaron que el nivel de daño post-tratamiento va a depender individualmente de los niveles de daño basal en el ADN que cada paciente haya adquirido a lo largo del tiempo en su genoma. Mientras mayores sean los niveles de daño en el ADN preexistente antes del tratamiento, mayores serán los niveles de daño después del tratamiento. Entonces, sería importante detectar aquellas pacientes que tienen niveles basales elevados de daños en el ADN para considerar un tratamiento alternativo o de menor intensidad. De este modo se podría contribuir a disminuir la aparición de efectos colaterales indeseados.

El ensayo del cometa parece ser una técnica adecuada para monitorear el estado del daño genotóxico en pacientes con cáncer de mama, antes y/o después del tratamiento anti-tumoral. Cumple con importantes requisitos para poder ser aplicado clínicamente, siendo una técnica altamente sensible que detecta niveles bajos de daños en el ADN. Incluso, en base al esfuerzo colaborativo de varios grupos de trabajo internacionales el ensayo del cometa es ahora aceptado como un método para el biomonitoreo de efectos tóxicos en humanos según la FDA y las instrucciones de la OMS (<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm074931.pdf>).

Finalmente, también se realizó un análisis de asociación entre el daño genotóxico y la expresión de los genes MGA y TWIST-1 que no arrojó una asociación significativa, lo cual indicaría que tanto la detección de CTCs mediante la determinación de la expresión de MGA y TWIST-1 como la evaluación del daño genotóxico serían factores independientes.

Por lo tanto, tanto la determinación de CTCs a través del análisis de la expresión de MGA y TWIST-1 como la evaluación del daño genotóxico en las pacientes con cáncer de mama podrían aportar información adicional con un potencial valor clínico para el pronóstico y para personalizar el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama.

6. CONCLUSIONES.

- La evaluación de la expresión de TWIST-1 y MGA en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama puede utilizarse para la detección de CTCs.
- Dado que en general ambos genes no se co-expresan en las CTCs, el análisis combinado de ambos aumenta la sensibilidad para la detección de las CTCs en pacientes con cáncer de mama.
- La detección de las CTCs contribuiría el monitoreo en tiempo real de la evolución de la enfermedad, con el potencial de mejorar el diagnóstico y tratamiento para el cáncer de mama.
- Los resultados sugieren el valor pronóstico independiente de la detección de las CTCs en el cáncer de mama. Incluso, se ha sugerido que la detección de CTCs se asocia a un peor pronóstico de la enfermedad aumentando el riesgo de recurrencia.
- La detección de las CTCs podría contribuir al desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer dirigidas a erradicar estas células antes que se manifiesten en una metástasis.
- El ensayo del cometa es una técnica sensible, simple y relativamente económica para evaluar el daño en el ADN de células individuales, tales como linfocitos de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama antes y después del tratamiento.
- La evaluación del daño genotóxico en las pacientes con cáncer de mama antes del tratamiento anti-tumoral permitiría predecir si una dada paciente tendrá una mayor susceptibilidad al daño en el ADN a causa de los efectos de la quimio y/o radioterapia. Por lo tanto, la identificación de aquellas pacientes que poseen un nivel de daño en el ADN marcado antes de recibir el tratamiento sería clínicamente relevante para contribuir a disminuir efectos colaterales indeseados relacionados a las terapias convencionales.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*, 119(6):1438-49.
- Alapetite C, Thirion P, de la Rochefordière A, Cosset J-M, Moustacchi E. (1999) Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients. *Int J Cancer*, 83:83–90.
- Alapetite C, Wachter T, Sage E, Moustacchi E. (1996) Use of the alkaline comet assay to detect DNA repair deficiencies in human fibroblasts exposed to UVC, UVB, UVA and gamma-rays. *Int J Radiat Biol*, 69(3):359-69.
- Alix-Panabières C, Mader S, Pantel K. (2017) Epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells. *J Mol Med (Berl)*, 95(2):133-142.
- Alix-Panabières C, Pantel K. (2014) Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip*, 14(1):57-62.
- Alunni-Fabbroni M, Müller V, Fehm T, Janni W, Rack B. (2014) Monitoring in metastatic breast cancer: is imaging outdated in the era of circulating tumor cells?. *Breast Care (Basel)*, 9(1):16-21.
- Álvarez Cubero MJ, Lorente JA, Robles-Fernandez I, Rodriguez-Martinez A, Puche JL, Serrano MJ. (2017) Circulating Tumor Cells: Markers and Methodologies for Enrichment and Detection. *Methods Mol Biol*, 1634:283-303.
- Andergassen U, Kölbl AC, Mahner S, Jeschke U. (2016) Real-time RT-PCR systems for CTC detection from blood samples of breast cancer and gynaecological tumour patients (Review). *Oncol Rep*, 35(4):1905-15.
- Andreopoulou E, Hortobagyi GN. (2008) Prognostic factors in metastatic breast cancer: successes and challenges toward individualized therapy. *J Clin Oncol*, 26(22):3660-2.
- Andreopoulou E, Yang LY, Rangel KM, Reuben JM, Hsu L, Krishnamurthy S, Valero V, Fritsche HA, Cristofanilli M. (2012) Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect™ versus Veridex CellSearch™ system. *Int J Cancer*, 130(7):1590-7.
- Ansieau S, Collin G, Hill L. (2014) EMT or EMT-Promoting Transcription Factors, Where to Focus the Light?. *Front Oncol*, 4:353.
- Ao Z, Cote RJ, Datar, RH. (2016) Affinity-Based Enrichment of Circulating Tumor Cells. *Circulating Tumor Cells*. (Cote RJ & Datar RH, Eds.) pp. 17–29. New York, NY: Springer New York.
- Aristizábal-Pachón AF, de Carvalho TI, Carrara HH, de Andrade JM, Takahashi CS. (2015) Detection of human mammaglobin A mRNA in peripheral blood of breast cancer patients before treatment and association with metastasis. *J Egypt Natl Canc Inst*, 27(4):217-22.
- Ashworth TR. (1869) A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J*, 14:146–147.
- Augustyniak M, Gladysz M, Dziewięcka M. (2016) The Comet assay in insects-Status, prospects and benefits for science. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 767:67-76.

- Awwad HK. (2005) Normal tissue radiosensitivity: prediction on deterministic or stochastic basis? *J Egypt Natl Canc Inst*, 17(4):221-30.
- Azqueta A, Slyskova J, Langie SA, O'Neill Gaivão I, Collins A. (2014). Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Front Genet*, 5:288
- Barberis M, Pellegrini C, Cannone M, Arizzi C, Coggi G, Bosari S. (2008) Quantitative PCR and HER2 Testing in Breast Cancer. *Am J Clin Pathol*, 129(4), 563–570.
- Barcellos-Hoff MH, Park C, Wright EG. (2005) Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer*, 5(11):867-75.
- Barnes R, Firulli Anthony B. (2009) A twist of insight - the role of Twist-family bHLH factors in development. *Int J Dev Biol*, 53: 909 – 924.
- Barok M, Szollosi J. (2011) Steps in metastasis research: analyzing, collecting, and culturing circulating tumor cells. *Cytometry A*, 79(2):93-4.
- Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. (2016) Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell*, 30(6):836-848.
- Becker FF, Wang XB, Huang Y, Pethig R, Vykoukal J, Gascoyne PR. (1995) Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(3):860-4.
- Becker RM, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Watson MA, Fleming TP. (1998) Identification of mammaglobin B, a novel member of the uteroglobin gene family. *Genomics*, 54(1):70-78.
- Bhagat AA, Hou HW, Li LD, Lim CT, Han J. (2011) Pinched flow coupled shear-modulated inertial microfluidics for high-throughput rare blood cell separation. *Lab Chip*, 11(11):1870-8.
- Bitting RL, Boominathan R, Rao C, Kemeny G, Foulk B, Garcia-Blanco MA, Connelly M, Armstrong AJ. (2013) Development of a method to isolate circulating tumor cells using mesenchymal-based capture. *Methods*, 64(2):129-36.
- Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Rykala J, Kolacinska A, Morawiec Z, Drzewoski J, Zadrozny M. (2004) Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutat Res*, 554(1-2):139-48.
- Bossolasco P, Ricci C, Farina G, Soligo D, Pedretti D, Scanni A, Deliliers GL. (2002) Detection of micrometastatic cells in breast cancer by RT-PCR for the mammaglobin gene. *Cancer Detect Prev*, 26(1):60-3.
- Bourgeois P, Stoetzel C, Bolcato-Bellemin AL, Mattei MG, Perrin-Schmitt F. (1996) The human H-twist gene is located at 7p21 and encodes a B-HLH protein that is 96% similar to its murine M-twist counterpart. *Mamm Genome*, (12):915-917.
- Bozhenko VK, Kharchenko NV, Vaskevich EF, Kudinova EA, Oorzhak AV, Rozhkova NI, Trotsenko ID. (2016) Mammaglobin in peripheral blood and tumor in breast cancer patients. *Biomed Khim*, 62(4):453-7.
- Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller G, Schlimok G. (2000) Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med*, 342(8):525-33.
- Breasted JH. *The Edwin Smith Surgical Papyrus*. Chicago: University of Chicago Press; 1930.

- Burella PM, Simoniello MF, Poletta GL. (2017) Evaluation of Stage-Dependent Genotoxic Effect of Roundup® (Glyphosate) on Caiman latirostris Embryos. *Arch Environ Contam Toxicol*, 72(1):50-57.
- Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. (2003) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res*, 531(1-2):5-23.
- Cannan WJ, Pederson DS. (2016) Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *J Cell Physiol*, 231(1):3-14.
- Castanon I, Baylies Mary K. A. (2002) Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene*, 287(1-2):11-22.
- Ceballos MP, Funes JC, Massa E, Cipulli G, Gil AB, Funes CC, Tozzini R, Ghersevich, S. (2014) Relationship between Genotoxic Effects of Breast Cancer Treatments and Patient Basal DNA Integrity. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 33(2), 111–121.
- Ceballos MP, Zumoffen C, Massa E, Cipulli G, Funes CC, Gil AB, Morales C, Tozzini R, Ghersevich S. (2011) Detection of mammaglobin A in blood from breast cancer patients, before and after treatment, using a one-tube nested PCR protocol. Association with the absence of tumor estrogen receptors. *Clin Biochem*, 44(17-18):1429-1433.
- Chabner BA, Loeffler J. (2015) Cancer chemotherapy and radiation therapy (Vol. 1). Oxford University Press.
- Chen S, Chen JZ, Zhang JQ, Chen HX, Yan ML, Huang L, Tian YF, Chen YL, Wang Y. (2016) Hypoxia induces TWIST-activated epithelial-mesenchymal transition and proliferation of pancreatic cancer cells in vitro and in nude mice. *Cancer Lett*, 383(1):73-84.
- Cheng M, Chen Y, Zou D, Shen G, Bian G, Shen G, Hu S. (2014) The clinical utility of circulating tumor cells in breast cancer patients: detection by a quantitative assay of h-MAM gene expression. *Int J Biol Markers*, 29(3): e268-78.
- Chew HK. (2001) Adjuvant therapy for breast cancer: who should get what? *West J Med*, 174(4):284–287.
- Collins AR, Dobson VL, Dusinská M, Kennedy G, Stětina R. (1997) The comet assay: what can it really tell us?. *Mutat Res*, 375(2):183-93.
- Collins AR, Dusinská M. (2002) Oxidation of cellular DNA measured with the comet assay. *Methods Mol Biol*, 186:147-59.
- Condie AG, Yan Y, Gerson SL, Wang Y (2015) A Fluorescent Probe to Measure DNA Damage and Repair. *PLoS ONE*, 10(8): e0131330.
- Corradini P, Voena C, Astolfi M, Delloro S, Pilotti S, Arrigoni G, Bregni M, Pileri A, Gianni AM. (2001) Maspin and mammaglobin genes are specific markers for RT-PCR detection of minimal residual disease in patients with breast cancer. *Ann Oncol*, 12(12):1693-8.
- Cortés-Gutiérrez EI, Fernández JL, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Gosálvez J. (2017) Two-Tailed Comet Assay (2T-Comet): Simultaneous Detection of DNA Single and Double Strand Breaks. *Methods Mol Biol*, 1560:285-293.
- Cruz I, Ciudad J, Cruz JJ, Ramos M, Gómez-Alonso A, Adansa JC, Rodríguez C, Orfao A. (2005) Evaluation of multiparameter flow cytometry for the detection of breast cancer tumor cells in blood samples. *Am J Clin Pathol*, 123(1):66-74.
- Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, Dunning MJ, Gale D, Forshew T, Mahler-Araujo B, Rajan S, Humphray S, Becq J, Halsall D,

- Wallis M, Bentley D, Caldas C, Rosenfeld N. (2013) Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 368(13):1199-1209.
- De Albuquerque A, Kaul S, Breier G, Krabisch P, Fersis N. (2012) Multimarker Analysis of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Metastatic Breast Cancer Patients: A Step Forward in Personalized Medicine. *Breast Care (Basel)*, 7(1): 7–12.
 - De Bont R, van Larebeke N. (2004) Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*, 19(3):169-185.
 - De Craene B, Berx G. (2013) Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*, (2):97-110.
 - De Santis CE, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Anderson BO, Jemal A. (2015) International variation in female breast cancer incidence and mortality rates. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, 24 (10):1495–1506.
 - Deans AJ, West SC. (2011) DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer*, 11(7):467-80.
 - Deng G, Herrler M, Burgess D, Manna E, Krag D, Burke JF. (2008) Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 10: R69.
 - Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. (2009) Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol*, 25(1):5-32.
 - Di Sibio A, Abriata G, Forman D, Sierra Mónica S. (2016) Female breast cancer in Central and South America. *Cancer Epidemiol*, 44S S110–S120.
 - Doherty AT. (2012) The in vitro micronucleus assay. *Methods Mol Biol*, 817:121-41.
 - Dronkert ML, Kanaar R. (2001) Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res*, 486(4):217-247.
 - Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker RH, Mann M, Mersch-Sundermann V. (2004) The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res*, 566(3):209-229.
 - Fehm T, Müller V, Alix-Panabières C, Pantel K. (2008) Micrometastatic spread in breast cancer: detection, molecular characterization and clinical relevance. *Breast Cancer Res*, 10(Suppl 1); S1.
 - Fehm T, Solomayer EF, Meng S, Tucker T, Lane N, Wang J, Gebauer G. (2005) Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy*, 7(2):171-85.
 - Ferro P, Franceschini MC, Bacigalupo B, Dessanti P, Falco E, Fontana V, Gianquinto D, Pistillo MP, Fedeli F, Roncella S. (2010) Detection of circulating tumour cells in breast cancer patients using human mammaglobin RT-PCR: association with clinical prognostic factors. *Anticancer Res*, 30(6):2377-82.
 - Fleming TP, Watson MA. (2000) Mammaglobin, a breast-specific gene, and its utility as a marker for breast cancer. *Ann NY Acad Sci*, 923:78-89.
 - Forchhammer L, Ersson C, Loft S, Möller L, Godschalk RW, van Schooten FJ, Møller P. (2012) Inter-laboratory variation in DNA damage using a standard comet assay protocol. *Mutagenesis*, 27(6):665-72.
 - Franco HL, Casasnovas J, Rodríguez-Medina JR, Cadilla CL. (2011) Redundant or separate entities? Roles of Twist1 and Twist2 as molecular switches during gene transcription. *Nucleic Acids Res*, 39(4):1177–1186.

- Friedl P, Wolf K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 3:362–374.
- Frisch SM, Screaton RA. (2001) Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*, 13:555–62.
- Furda A, Santos J, Meyer J, Van Houten B. (2014) Quantitative PCR-Based Measurement of Nuclear and Mitochondrial DNA Damage and Repair in Mammalian Cells. *Methods Mol Biol*, 1105:419–437.
- Gajula RP, Chettiar ST, Williams RD, Thiyagarajan S, Kato Y, Aziz K, Wang R, Gandhi N, Wild AT, Vesuna F, Ma J, Salih T, Cades J, Fertig E, Biswal S, Burns TF, Chung CH, Rudin CM, Herman JM, Hales RK, Raman V, An SS, Tran PT. (2013) The Twist Box Domain is Required for Twist1-induced Prostate Cancer Metastasis. *Mol Cancer Res*, 11(11):1387-400.
- Galvis-Jiménez JM, Curtidor H, Patarroyo MA, Monterrey P, Ramírez-Clavijo SR. (2013) Mammaglobin peptide as a novel biomarker for breast cancer detection. *Cancer Biol Ther*, 14(4):327-332.
- Garg M. (2013). Epithelial-mesenchymal transition - activating transcription factors - multifunctional regulators in cancer. *World J Stem Cells*, 5(4):188–195.
- Gerashchenko TS, Denisov EV, Litviakov NV, Zavyalova MV, Vtorushin SV, Tsyganov MM, Perelmuter VM, Cherdyntseva NV. (2013) Intratumor heterogeneity: nature and biological significance. *Biochemistry (Mosc)*, 78(11):1201-1215.
- Gertler R, Rosenberg R, Fuehrer K, Dahm M, Nekarda H, Siewert JR. (2003) Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. *Recent Results Cancer Res*, 162:149-55.
- Ghersevich S, Ceballos MP. (2014) Mammaglobin A: review and clinical utility. *Adv Clin Chem*, 64:241-68.
- Gkountela S, Szczerba B, Donato C, Aceto N. (2016) recent advances in the biology of human circulating tumour cells and metastasis. *ESMO Open*, 1(4): e000078.
- Gleib M, Schneider T, Schlörmann W. (2016) Comet assay: an essential tool in toxicological research. *Arch Toxicol*, 90(10):2315-36.
- Gupta GP, Massagué J. (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127:679–695.
- Gupta V, Jafferji I, Garza M, Melnikova VO, Hasegawa DK, Pethig R, Davis DW. (2012) ApoStream™, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. *Biomicrofluidics*, 6(2):24133.
- Hagemann IS, Pfeifer JD, Cao D. (2013) Mammaglobin expression in gynecologic adenocarcinomas. *Hum Pathol*, 44(4):628-35.
- Haile TM, Mišák M, Grummt T, Halh AS, Pichler C, Knasmueller S, Fuerhacker M. (2016) Cytotoxic and genotoxic activities of waters and sediments from highway and parking lot runoffs. *Water Sci Technol*, 73(11):2772-2780.
- Hamidinia M, Ghafourian Boroujerdnia M, Talaiezhadeh A, Solgi G, Roshani R, Iranprast S, Khodadadi A. (2015) Increased P-35, EB13 Transcripts and Other Treg Markers in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Breast Cancer Patients with Different clinical Stages. *Adv Pharm Bull*, 5(2):261-7.
- Hardingham JE, Hewett PJ, Sage RE, Finch JL, Nuttall JD, Kotasek D, Dobrovic A. (2000) Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease. *Int J Cancer*, 89(1):8-13.

- Harouaka RA, Nisic M, Zheng SY. (2013) Circulating tumor cell enrichment based on physical properties. *J Lab Autom*, 18(6):455-68.
- Hassan I, Naseem I, Aman S, Alhazza IM. (2016) Age Affects the Mitigating Efficacy of Riboflavin Against Cisplatin-Induced Toxicity In Vivo. *Nutr Cancer*, 68(8):1381-1393.
- Headley MB, Bins A, Nip A, Roberts EW, Looney MR, Gerard A, Krummel MF. (2016) Visualization of immediate immune responses to pioneer metastatic cells in the lung. *Nature*, 531(7595):513-7
- Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. (2008) DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 8(3):193-204.
- Hernandez-Aya LF, Ma CX. (2016) Chemotherapy principles of managing stage IV breast cancer in the United States. *Chin Clin Oncol*, 5(3):42.
- Ho TV, Schärer OD. (2010) Translesion DNA synthesis polymerases in DNA interstrand crosslink repair. *Environ Mol Mutagen*, 51(6):552-66.
- Hovhannisyann GG. (2010) Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Mol Cytogenet*, 3:17.
- Hsieh HB, Marrinucci D, Bethel K, Curry DN, Humphrey M, Krivacic RT, Kroener J, Kroener L, Ladanyi A, Lazarus N, Kuhn P, Bruce RH, Nieva J. (2006) High speed detection of circulating tumor cells. *Biosens Bioelectron*, 21(10):1893-9.
- Huber MA, Kraut N, Beug H. (2005) Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.*, (5):548-558.
- Huñis AP. (2016) A current view of oncology in Argentina. *Ecancermedicalscience*, 10:622.
- Hyun K, Goo K, Han H, Sohn J, Choi W, Kim S, Jung H, Kim Y. (2016). Epithelial-to-mesenchymal transition leads to loss of EpCAM and different physical properties in circulating tumor cells from metastatic breast cancer. *Oncotarget*, 7(17), 24677–87.
- Hyun KA, Lee TY, Jung HI. (2013) Negative enrichment of circulating tumor cells using a geometrically activated surface interaction chip. *Anal Chem*, 85(9):4439-45.
- Iinuma H, Okinaga K, Egami H, Mimori K, Hayashi N, Nishida K, Adachi M, Mori M, Sasako M. (2006) Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer. *Int J Oncol*, 28(2):297-306.
- Imani S, Hosseinifard H, Cheng J, Wei C, Fu J. (2016) Prognostic value of EMT-inducing Transcription Factors (EMT-TFs) in metastatic breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, 6:28587.
- Islam MT. (2017) Radiation interactions with biological system. *Int J Radiat Biol*, 1-28.
- Jackson SP. (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 23(5):687-96.
- Je EC, Lca BS, Ga GA. (2013) The Role of Transcription Factor TWIST in Cancer Cells. *J Genet Syndr Gene Ther*, S2:002.
- Jeggo PA, Pearl LH, Carr AM. (2016) DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nat Rev Cancer*, 16:35–42.

- Jena NR. (2012) DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J Biosci*, 37(3):503-517.
- Jie X, Zhang X, Xu C. (2017) Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications. *Oncotarget*, 11–13.
- Jones, S. (2004) An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol*, 5(6): 226.
- Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S. (2011) Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *BCR*, 13(3):R59.
- Kang SH, Kwon JY, Lee JK, Seo YR. (2013) Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. *J Cancer Prev*, 18(4):277-88.
- Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA, Giudice LC. (2002) Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*, 143(6):2119-2138.
- Khan MA, Chen HC, Zhang D, Fu J. (2013) Twist: a molecular target in cancer therapeutics. *Tumour Biol*, 34(5):2497-506.
- Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, Massagué J. (2009) Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell*, 139(7):1315-1326.
- Koh EH, Cho YW, Mun YJ, Ryu JH, Kim EJ, Choi DS, Maeng KY, Han J, Kang D. (2014) Upregulation of human mammaglobin reduces migration and invasion of breast cancer cells. *Cancer Invest*, 32(1):22-9.
- Kopjar N, Garaj-Vrhovac V, Milas I. (2002) Assessment of chemotherapy-induced DNA damage in peripheral blood leukocytes of cancer patients using the alkaline comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen*, 22(1), 13–30.
- Kopjar N, Milas I, Garaj-Vrhovac V, Gamulin M. (2006) Alkaline comet assay study with breast cancer patients: evaluation of baseline and chemotherapy-induced DNA damage in non-target cells. *Clin Exp Med*, 6(4):177-90.
- Krivacic RT, Ladanyi A, Curry DN, Hsieh HB, Kuhn P, Bergsrud DE, Bruce, R. H. (2004). A rare-cell detector for cancer.
- Kumar A, Purohit S, Sharma NK. (2016) Aberrant DNA Double-strand Break Repair Threads in Breast Carcinoma: Orchestrating Genomic Insult Survival. *J Cancer Prev*, 21(4): 227–234.
- Kwok WK, Ling MT, Lee TW, Lau TC, Zhou C, Zhang X, Chua CW, Chan KW, Chan FL, Glackin C, Wong YC, Wang X. (2005) Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res*. 65(12):5153-5162.
- Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kioussi C. (2012) Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol*, 887:41-7.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(3): 178–196.
- Lara O, Tong X, Zborowski M, Chalmers JJ. (2004) Enrichment of rare cancer cells through depletion of normal cells using density and flow-through, immunomagnetic cell separation. *Exp Hematol*, 32(10):891-904.
- Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, Meyerson M, Gabriel SB, Lander ES, Getz G. (2014) Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*, 505:495–501.

- Lee GW, Kim JY, Koh EH, Kang D, Choi DS, Maeng KY, Lee JS. (2012) Plasma human mammaglobin mRNA associated with poor outcome in patients with breast cancer. *Genet Mol Res*, 11(4):4034-42.
- Lewis SE, Agbaje IM. (2008) Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. *Mutagenesis*, 23(3):163-170.
- Li H, Xu Y, Shi W, Li F, Zeng Q, Yi C. (2017) Assessment of alterations in X-ray irradiation-induced DNA damage of glioma cells by using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Int J Biochem Cell Biol*, 84:109-118.
- Lindahl T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422):709-715.
- Liu Y, Cao X. (2016) Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell*, 30(5), 668-681.
- Liu Z, Fusi A, Klopocki E, Schmittl A, Tinhofer I, Nonnenmacher A, Keilholz U. (2011) Negative enrichment by immunomagnetic nanobeads for unbiased characterization of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients. *J Transl Med*, 19; 9:70.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25:402-408.
- Lovell DP, Thomas G, Dubow R. (1999) Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of in vivo and in vitro comet studies. *Teratog Carcinog Mutagen*, 19(2):109-19.
- Lustberg M, Jatana KR, Zborowski M, Chalmers JJ. (2012) Emerging technologies for CTC detection based on depletion of normal cells. *Recent Results Cancer Res*, 195:97-110.
- Magbanua MJ, Park JW. (2013) Isolation of circulating tumor cells by immunomagnetic enrichment and fluorescence-activated cell sorting (IE/FACS) for molecular profiling. *Methods*, 64(2):114-8.
- Maia AM, da Silva JH, Mencialha AL, Caffarena ER, Abdelhay E. (2012) Computational modeling of the bHLH domain of the transcription factor TWIST1 and R118C, S144R and K145E mutants. *BMC Bioinformatics*, 13:184.
- Mak M, Erickson D. (2013) A serial micropipette microfluidic device with applications to cancer cell repeated deformation studies. *Integr Biol (Camb)*, 5(11):1374-84.
- Markou A, Strati A, Malamos N, Georgoulas V, Lianidou ES. (2011) Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay. *Clin Chem*, 57(3):421-430.
- Masood S. (2005) Prognostic/predictive factors in breast cancer. *Clin Lab Med*, 25(4):809-25, viii.
- Masood S. (2016) Neoadjuvant chemotherapy in breast cancers. *Womens Health (Lond)*, 12(5):480-491.
- Masuda TA, Kataoka A, Ohno S, Murakami S, Mimori K, Utsunomiya T, Inoue H, Tsutsui S, Kinoshita J, Masuda N, Moriyama N, Mori M. (2005) Detection of occult cancer cells in peripheral blood and bone marrow by quantitative RT-PCR assay for cytokeratin-7 in breast cancer patients. *Int J Oncol*, 26(3):721-30.
- Mejean A, Vona G, Nalpas B, Damotte D, Brousse N, Chretien Y, Dufour B, Lacour B, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P. (2000) Detection of circulating prostate derived cells in patients with prostate adenocarcinoma is an independent risk factor for tumor recurrence. *J Urol*, 163(6):2022-9.

- Mohammadalipour A, Choi YE, Benencia F, Burdick MM, Tees DF. (2012) Investigation of mechanical properties of breast cancer cells using micropipette aspiration technique. *The FASEB Journal*, 26(1 Supplement), 905-9.
- Moller P. (2005) Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline Comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 96:1-4.
- Morales ME, Derbes RS, Ade CM, Ortego JC, Stark J, Deininger PL, Roy-Engel AM. (2016) Heavy Metal Exposure Influences Double Strand Break DNA Repair Outcomes. *PLoS One*, 11(3): e0151367.
- Mouchet F, Gauthier L, Mailhes C, Ferrier V, Devaux A. (2005) Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian comet assay. *Environ Toxicol*, 20(1):74-84.
- Müller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, Jänicke F, Pantel K. (2005) Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res*, 11(10):3678-85.
- Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M. (2007) Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 450(7173):1235-9.
- Nakano T, Xu X, Salem AM, Shoukamy MI, Ide H. (2016) Radiation-induced DNA-protein cross-links: Mechanisms and biological significance. *Free Radic Biol Med*, pii: S0891-5849(16)31075-9.
- Ni J, Kalff-Suske M, Gentz R, Schageman J, Beato M, Klug J. (2000) All human genes of the uteroglobin family are localized on chromosome 11q12.2 and form a dense cluster. *Ann NY Acad Sci*, 923:25-42.
- Núñez-Villar MJ, Martínez-Arribas F, Pollán M, Lucas AR, Sánchez J, Tejerina A, Schneider J. (2003) Elevated mammaglobin (h-MAM) expression in breast cancer is associated with clinical and biological features defining a less aggressive tumour phenotype. *Breast Cancer Res*, 5(3): R65-70.
- Nuti SV, Mor G, Li P, Yin G. (2014) TWIST and ovarian cancer stem cells: implications for chemoresistance and metastasis. *Oncotarget*, 5(17):7260-71.
- Obenauf AC, Massagué J. (2015) Surviving at a distance: organ specific metastasis. *Trends in Cancer*, 1(1):76-91.
- O'Brien NA, O'Donovan N, Ryan B, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ. (2005) Mammaglobin A in breast cancer: existence of multiple molecular forms. *Int J Cancer*, 114(4):623-627.
- Olive PL, Banáth JP, Durand RE. (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res*, 122(1):86-94.
- Onuma K, Dabbs DJ, Bhargava R. (2008) Mammaglobin expression in the female genital tract: immunohistochemical analysis in benign and neoplastic endocervix and endometrium. *Int J Gynecol Pathol*, 27(3):418-25.
- Ortega FG, Lorente JA, García Puche JL, Ruiz MP, Sánchez-Martin RM, de Miguel-Pérez D, Diaz-Mochon JJ, Serrano MJ. (2015) miRNA in situ hybridization in circulating tumor cells-MishCTC. *Sci Rep*, 5:9207.
- Ostling O, Johanson KJ. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123(1):291-298.

- Pallis AG, Karamouzis MV. (2010) DNA repair pathways and their implication in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev*, 29(4):677-85.
- Palyvoda O, Polańska J, Wygoda A, Rzeszowska-Wolny J. (2003) DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and micronucleus tests. *Acta Biochim Pol*, 50(1):181-90.
- Pantel K, Alix-Panabieres C, Riethdorf S. (2009) Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol*, 6:339–351.
- Pantel K, Alix-Panabières C. (2012) Detection methods of circulating tumor cells. *J Thorac Dis*, 4(5), 446–447.
- Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. (2008) Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 8:329–340.
- Pantel K, Brakenhoff RH. (2004) Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*, 4(6):448-56.
- Park S, Choi S, Ahn B. (2016) DNA Strand Breaks in Mitotic Germ Cells of *Caenorhabditis elegans* Evaluated by Comet Assay. *Mol Cells*, 39(3):204-10.
- Paterlini-Brechot P, Benali NL. (2007) Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett*, 253(2):180-204.
- Pecot CV, Bischoff FZ, Mayer JA, Wong KL, Pham T, Bottsford-Miller J, Stone RL, Lin YG, Jaladurgam P, Roh JW, Goodman BW, Merritt WM, Pircher TJ, Mikolajczyk SD, Nick AM, Celestino J, Eng C, Ellis LM, Deavers MT, Sood AK. (2011) A novel platform for detection of CK+ and CK- CTCs. *Cancer Discov*, 1(7):580-6.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A. (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, 7(6):415-28.
- Perakis S, Speicher, MR. (2017) Emerging concepts in liquid biopsies. *BMC Medicine*, 15(1), 75.
- Picot N, Guerrette R, Beauregard AP, Jean S, Michaud P, Harquail J, Benzina S, Robichaud GA. (2016) Mammaglobin 1 promotes breast cancer malignancy and confers sensitivity to anticancer drugs. *Mol Carcinog*, 55(7):1150-62.
- Psaila B, Lyden D. (2009) The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*, 9(4):285-93.
- Pu X, Wang Z, Klaunig JE. (2015) Alkaline Comet Assay for Assessing DNA Damage in Individual Cells. *Curr Protoc Toxicol*, 65:3.12.1-11.
- Punnoose EA, Atwal SK, Spoerke JM, Savage H, Pandita A, Yeh RF, Pirzkall A, Fine BM, Amler LC, Chen DS, Lackner MR. (2010) Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells. *PLoS One*, 5:e12517.
- Qin Q, Xu Y, He T, Qin C, Xu J. (2012) Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. *Cell Res*, 22(1):90-106.
- Ramirez JM, Fehm T, Orsini M, Cayrefourcq L, Maudelonde T, Pantel K, Alix-Panabières C. (2014) Prognostic relevance of viable circulating tumor cells detected by EPISPOT in metastatic breast cancer patients. *Clin Chem*, 60(1):214-21.
- Rastogi RP, Richa, Kumar A, Tyagi MB, Sinha RP. (2010) Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids*, 2010:592980.

- Raynor M, Stephenson SA, Walsh DC, Pittman KB, Dobrovic A. (2002) Optimisation of the RT-PCR detection of immunomagnetically enriched carcinoma cells. *BMC Cancer*, 2:14.
- Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Jänicke F, Jackson S, Gornet T, Cristofanilli M, Pantel K. (2007) Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the Cell Search system. *Clin Cancer Res*, 13:920–928.
- Roncella S, Ferro P, Bacigalupo B, Dessanti P, Giannico A, Gorji N, Moroni M, Tozzini S, Pensa F, Gianquinto D, Fais F, Pronzato P, Fedeli F. (2006). Relationship between human mammaglobin mRNA expression in breast cancer tissue and clinico-pathologic features of the tumors. *J Exp Clin Cancer Res*, 25(1):65-72.
- Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, Fuehrer K, Dahm M, Phelps R, Thorban S, Nekarda H, Siewert JR. (2002) Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry*, 49(4):150-8.
- Rosenbluth MJ, Lam WA, Fletcher DA. (2006) Force Microscopy of Nonadherent Cells: A Comparison of Leukemia Cell Deformability. *Biophys J*, 90(8):2994–3003.
- Santivasi WL, Xia F. (2014) Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxid Redox Signal*, 21(2):251-9.
- Santos CL, Pourrut B, Ferreira de Oliveira JM. (2015) The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. *Front Genet*, 6:216.
- Santos RA, Teixeira AC, Mayorano MB, Carrara HH, Andrade JM, Takahashi CS. (2010) Basal levels of DNA damage detected by micronuclei and comet assays in untreated breast cancer patients and healthy women. *Clin Exp Med*, 10(2):87-92.
- Sceneay J, Smyth MJ, Möller A. (2013) The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metastasis Rev*, 32(3-4):449-64.
- Schmittgen TD, Livak KJ. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C_t method. *Nat Protoc*, 3(6):1101-8.
- Sestili P. (2009) The fast-halo assay for the assessment of DNA damage at the single-cell level. *Methods Mol Biol*, 521:517-33.
- Shahneh FZ. (2013) Sensitive antibody-based CTCs detection from peripheral blood. *Hum Antibodies*, 22(1-2):51-4.
- Silva AL, Tomé MJ, Correia AE, Passos-Coelho JL. (2002) Human mammaglobin RT-PCR assay for detection of occult breast cancer cells in hematopoietic products. *Ann Oncol*, 13(3):422-9.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175(1):184-91.
- Sjödin A, Guo D, Hofer PA, Henriksson R, Hedman H. (2003a) Mammaglobin in normal human sweat glands and human sweat gland tumors. *J Invest Dermatol*, 121(2):428-9.
- Sjödin A, Guo D, Sørhaug S, Bjermer L, Henriksson R, Hedman H. (2003b) Dysregulated secretoglobin expression in human lung cancers. *Lung Cancer*, 41(1):49-56.
- Skondra M, Gkioka E, Kostakis ID, Pissimissis N, Lembessis P, Pectasides D, Koutsilieris M. (2014) Detection of circulating tumor cells in breast cancer

- patients using multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction and specific primers for MGB, PTHRP and KRT19. Correlation with clinicopathological features. *Anticancer Res*, 34(11):6691-9.
- Smith TR, Miller MS, Lohman KK, Case LD, Hu JJ. (2003) DNA damage and breast cancer risk. *Carcinogenesis*, 24(5):883-9.
 - Solanky D, Haydel SE. (2012) Adaptation of the neutral bacterial comet assay to assess antimicrobial-mediated DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods*, 91(2):257-61.
 - Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. (2014) Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer*, 14(9):611–22.
 - Spitz DR, Azzam EI, Li JJ, Gius D. (2004) Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev*, 23(3-4):311-22.
 - Steeg PS. (2006) Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*, 12:895–90.
 - Strati A, Markou A, Parisi C, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou E. (2011) Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR. *BMC Cancer*, 11:422.
 - Sugarbaker, PH. (1993) Metastatic inefficiency: the scientific basis for resection of liver metastases from colorectal cancer. *J Surg Oncol, Suppl 31*: 58–160.
 - Tan SJ, Lakshmi RL, Chen P, Lim WT, Yobas L, Lim CT. (2010) Versatile label free biochip for the detection of circulating tumor cells from peripheral blood in cancer patients. *Biosens Bioelectron*, 26(4):1701-5.
 - Taneja P, Maglic D, Kai F, Zhu S, Kendig RD, Fry EA, Inoue K. (2010). Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clin Med Insights Oncol*, 4:15–34.
 - Tang HL, Tang HM, Mak KH, Hu S, Wang SS, Wong KM, Fung MC. (2012) Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response. *Mol Biol Cell*, 23(12): 2240–2252.
 - Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5):871-90.
 - Tice R, Vasquez, M. (1999) Protocol for the application of the pH >13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. Comet Assay Interest Group (www.cometassay.com).
 - Tjensvoll K, Oltedal S, Farmen RK, Shammas FV, Heikkilä R, Kvaløy JT, Gilje B, Smaaland R, Nordgård O. (2010) Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow Assessed by *TWIST1*, Cytokeratin 19, and Mammaglobin A mRNA Predict Clinical Outcome in Operable Breast Cancer Patients. *Clin Breast Cancer*, 10: 378-384.
 - Torgovnick A, Schumacher B. (2015) DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Front Genet*, 6:157.
 - Tretyakova NY, Groehler A, Ji S. (2015) DNA-Protein Cross-Links: Formation, Structural Identities, and Biological Outcomes. *Acc Chem Res*, 48(6):1631-44.
 - Ulaner GA, Riedl CC, Dickler MN, Jhaveri K, Pandit-Taskar N, Weber W. (2016) Molecular Imaging of Biomarkers in Breast Cancer. *J Nucl Med*, 57 Suppl 1:53S-9S.
 - Valastyan S, Weinberg RA. (2011) Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2):275–9
 - Vega-Stromberg T. (2003) Chemotherapy-induced secondary malignancies. *J Infus Nurs*, 26(6):353-61.

- Vesuna F, va Diest P, Chen JH, Raman V. (2008) Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 367(2):235-41.
- Vignard J, Mirey G, Salles B. (2013) Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up. *Radiother Oncol*, 108(3):362-9.
- Vogelstein B, Kinzler KW. (1993) the multistep nature of cancer. *Trends Genet*, (4):138-41.
- Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, Capron F, Franco D, Pazzagli M, Vekemans M, Lacour B, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P. (2000) Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol*, 156(1):57-63.
- Voulgari A, Pintzas A. (2009) Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta*, 1796(2):75-90.
- Wang SM, Coljee VW, Pignolo RJ, Rotenberg MO, Cristofalo VJ, Sierra F. (1997) Cloning of the human twist gene: its expression is retained in adult mesodermally-derived tissues. *Gene*, 187(1):83-92.
- Wang X, Qian X, Beitler JJ, Chen ZG, Khuri FR, Lewis MM, Shin HJ, Nie S, Shin DM. (2011) Detection of circulating tumor cells in human peripheral blood using surface-enhanced Raman scattering nanoparticles. *Cancer Res*, 71(5):1526-32.
- Watanabe O, Imamura H, Shimizu T, Kinoshita J, Okabe T, Hirano A, Yoshimatsu K, Konno S, Aiba M, Ogawa K. (2004) Expression of twist and wnt in human breast cancer. *Anticancer Res*, 24(6):3851-6.
- Watson MA, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Fleming TP. (1998) Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13. *Oncogene*, 16(6):817-24.
- Watson MA, Fleming TP. (1994) Isolation of differentially expressed sequence tags from human breast cancer. *Cancer Res*, 54(17):4598-602.
- Watson MA, Fleming TP. (1996) Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res*, 56(4):860-5.
- Weigel MT, Dowsett M. (2010) Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer*, 17(4): R245-62.
- Weiss L. (1990) Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res*, 54: 159–211.
- Wellek S, Lackner KJ, Jennen-Steinmetz C, Reinhard I, Hoffmann I, Blettner M. (2014) Determination of reference limits: statistical concepts and tools for sample size calculation. *Clin Chem Lab Med*, 52(12):1685-94.
- Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S. (2004) Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol*, 35(1):122-8.
- Wojewódzka M, Buraczewska I, Kruszewski M. (2002) A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. *Mutat Res*, 518(1):9-20.
- Wushou A, Hou J, Zhao YJ, Shao ZM. (2014) Twist-1 up-regulation in carcinoma correlates to poor survival. *Int J Mol Sci*, 15(12):21621-30.
- Xi L, Nicastrì DG, El-Hefnawy T, Hughes SJ, Luketich JD, Godfrey TE. (2007) Optimal markers for real-time quantitative reverse transcription PCR detection

- of circulating tumor cells from melanoma, breast, colon, esophageal, head and neck, and lung cancers. *Clin Chem*, 53(7):1206-15.
- Yan WT, Cui X, Chen Q, Li YF, Cui YH, Wang Y, Jiang J. (2017) Circulating tumor cell status monitors the treatment responses in breast cancer patients: a meta-analysis. *Sci Rep*, 7: 43464.
 - Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 117(7): 927–939.
 - Yang J, Weinberg RA. (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*, 14(6):818-29.
 - Ye X, Weinberg RA. (2015) Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol*, 25(11):675-86.
 - Zehentner BK, Carter D. (2004) Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast cancer. *Clin Biochem*, 37(4):249-57.
 - Zhang L, Riethdorf S, Wu G, Wang T, Yang K, Peng G, Liu J, Pantel K. (2012) Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res*; 18:5701–1.
 - Zhang W, Becciolini A, Biggeri A, Pacini P, Muirhead CR. (2011) Second malignancies in breast cancer patients following radiotherapy: a study in Florence, Italy. *Breast Cancer Res*, 13(2): R38.
 - Zheng G, Fu Y, He C. (2014) Nucleic acid oxidation in DNA damage repair and epigenetics. *Chem Rev*, 14(8):4602-20.
 - Zheng S, Lin HK, Lu B, Williams A, Datar R, Cote RJ, Tai YC. (2011) 3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood. *Biomed Microdevices*, 13(1):203-13.
 - Zhou L, Dicker DT, Matthew E, El-Deiry WS, Alpaugh RK. (2017) Circulating tumor cells: silent predictors of metastasis. *F1000Res*, 6. pii: F1000 Faculty Rev-1445.
 - Zhu H, Han SY, Li XG, Zhou XG, Zhang QF. (2013) DNA damage in peripheral blood lymphocytes of ovarian cancer patients after radiotherapy. *Eur J Gynaecol Oncol*, 34(5):450-2.
 - Zhu QQ, Ma C, Wang Q, Song Y, Lv T. (2016) the role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. *Tumour Biol*, 37(1):185-97.
 - Zou H, Feng X, Cao JG. (2015) Twist in hepatocellular carcinoma: pathophysiology and therapeutics. *Hepatol Int*, 9(3):399-405.