

# TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL

## IMPORTANCIA DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES (CSCs) Y DE LAS METALOPROTEASAS (MMPs) EN RESPUESTA A LA RADIACIÓN EN CÁNCER DE MAMA

---

Programa de Doctorado en  
Medicina Clínica y Salud Pública

*M<sup>a</sup> Auxiliadora Olivares Urbano*

### Directores:

María Isabel Núñez Torres

Juan Antonio Marchal Corrales

Departamento de Radiología y Medicina Física

Facultad de Medicina

*Granada, 2019*



UNIVERSIDAD  
DE GRANADA

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: María Auxiliadora Olivares Urbano  
ISBN: 978-84-1306-496-3  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/62282>





# ÍNDICE

---

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>9</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	11
2. OBJETIVOS .....	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	14
5. CONCLUSIONES.....	16
<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>19</b>
1. INTRODUZIONE.....	21
2. OBIETTIVI .....	23
3. MATERIALE E METODI .....	23
4. RISULTATI E DISCUSSIONE .....	24
5. CONCLUSIONI .....	26
<b>SUMMARY</b> .....	<b>29</b>
1. INTRODUCTION .....	31
2. AIMS.....	32
3. MATERIAL AND METHODS .....	33
4. RESULTS AND DISCUSSION .....	34
5. CONCLUSIONS.....	36
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>39</b>
1. CÁNCER EN LA ACTUALIDAD .....	41
2. CÁNCER DE MAMA .....	41
3. RADIACIÓN IONIZANTE (RI) .....	44
4. CÉLULAS MADRE TUMORALES (CSCs) .....	45
5. RESISTENCIA DE LAS CSCs A LA RI.....	47
5.1. Reparación del DNA.....	48

5.2. Puntos de control del ciclo celular .....	48
5.3. Vías de supervivencia .....	49
5.3.1. Vía Hedgehog .....	49
5.3.1. Vía Notch .....	50
5.3.1. Vía Wnt/ $\beta$ -catenina .....	50
5.4. Nicho y microambiente tumoral: hipoxia y angiogénesis .....	50
6. METALOPROTEASAS (MMPs) Y SUS INHIBIDORES .....	52
7. PAPEL DE LAS MMPs EN LA CARCINOGENÉISIS .....	55
7.1. Invasión y metástasis .....	55
7.2. Transición epitelial-mesenquimal (ETM) .....	56
7.3. Crecimiento tumoral .....	57
7.4. Evasión de la apoptosis .....	57
7.5. Formación de vasos sanguíneos .....	57
7.6. Respuesta inflamatoria .....	58
7.7. Formación de nichos premetastásicos .....	58
8. ALTERACIÓN DE LAS MMPs TRAS RI .....	58
9. IMPORTANCIA DEL MICROAMBIENTE EN EL CRECIMIENTO CELULAR: CULTIVOS 3D .....	59
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>63</b>
1. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	65
2. OBJETIVOS A DESARROLLAR .....	65
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
1. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> : LÍNEAS CELULARES .....	69
1.1. Mantenimiento celular .....	69
1.1.1. Cultivo 2D: monocapa .....	69
1.2. Determinación de marcadores de CSCs de mama .....	70
1.3. Medidas de expresión génica .....	71
1.3.1. Separación en diferentes subpoblaciones celulares .....	71
1.3.1.1. Cultivo 3D: esferas en suspensión .....	72
1.3.1.2. Cultivo 3D+IrECM: esferas en Matrigel .....	72

1.3.2. Irradiación celular .....	73
1.3.3. Parada de cultivos celulares.....	73
1.3.4. Extracción y cuantificación de RNA.....	74
1.3.5. Síntesis de cDNA mediante RT-PCR.....	75
1.3.6. Amplificación de cDNA y cuantificación de expresión génica mediante qRT-PCR.....	75
1.4. Co-Cultivo IrECM: líneas celulares tumorales + fibroblastos .....	76
2. ESTUDIO <i>IN VIVO</i> : RATONES.....	77
2.1. Ensayo ortotópico por inoculación de células en Matrigel.....	78
2.2. Monitorización del crecimiento tumoral .....	78
2.3. Tinciones histológica e inmunohistoquímica (IHC) .....	78
3. ESTUDIO PILOTO: PACIENTES.....	80
3.1. Toma de muestras y variables de estudio.....	80
3.2. Medidas de niveles proteicos en suero de pacientes .....	81
3.3. Base de datos GEO .....	83
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	83
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>85</b>
1. EFECTOS DE LA RI EN LA EXPRESION GENICA <i>IN VITRO</i> .....	87
1.1. Caracterización de CSCs .....	87
1.2. Expresión génica en Cultivo 3D .....	88
1.3. Expresión génica en Cultivo 3D+IrECM .....	93
1.4. Expresión génica en Co-cultivo IrECM.....	97
2. EFECTOS DE LA RI EN EL CRECIMIENTO TUMORAL <i>IN VIVO</i> : RATONES.....	100
2.1. Monitorización del crecimiento tumoral.....	100
2.2. Tinción histológica: Hematoxilina-Eosina (H&E).....	101
2.3. Tinción IHC: MMP-1 .....	102
3. EFECTOS DE LA RI EN LOS NIVELES PROTÉICOS DE MMPs Y TIMPs EN EL SUERO DE PACIENTES .....	103
3.1. Curso temporal de los niveles séricos de proteína .....	103
3.2. Base de datos GEO .....	104
3.3. Correlación de los niveles proteicos en suero .....	105

3.4. Niveles séricos de proteínas en variables dependientes de las pacientes .....	106
3.5. Niveles séricos de proteínas en variables dependientes de la biología del tumor .....	111
3.6. Niveles séricos de proteínas en variables relacionadas con la RT .....	123
3.7. Recurrencia tumoral .....	129
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>133</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>145</b>
<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>149</b>
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>153</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>157</b>
1. ABREVIATURAS .....	159
2. ÍNDICE DE ESQUEMAS .....	163
3. ÍNDICE DE FIGURAS .....	163
4. ÍNDICE DE TABLAS .....	165
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>167</b>



# RESUMEN

---



## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo. Los tipos de cáncer responsables de más fallecimientos son: pulmonar, hepático, colorrectal, gástrico y mamario [1]. El cáncer de mama es el tumor más común en las mujeres y a nivel mundial, en términos de mortalidad, ocupa el quinto lugar de todas las muertes causadas por cáncer [2]. El pronóstico del cáncer de mama viene determinado por la heterogeneidad de la enfermedad, el tipo de tumor (desde un punto de vista histológico y molecular), la localización tumoral, el grado de diferenciación, la presencia o ausencia de diferentes proteínas (E-cadherina, p53, Ki67), la afectación del ganglio centinela, y la edad del paciente; los cuales también intervienen en la respuesta al tratamiento [3].

La radioterapia (RT) se usa en el tratamiento de la mayoría de los tumores [4]. La selección de un régimen radioterápico adecuado depende de la dosis umbral, de las características del paciente, y de los tejidos y órganos donde se encuentra ubicado el tumor [5]. En cáncer de mama, ha sido ampliamente utilizada la RT convencional (2 Gy/fracción diarios; 45-50 Gy totales), pero cada vez es más usada la RT hipofraccionada, implicando dosis de radiación más altas en tiempos más cortos de tratamiento [6-9]. En cáncer de mama, la toxicidad cutánea es el efecto adverso más común y suele presentarse como eritema, descamación, ulceración y hemorragia (efectos agudos) e hiperpigmentación y telangiectasia (efectos crónicos). La eficacia total obtenida con la RT depende de la dosis umbral, el régimen radioterápico, la ubicación del tumor, la toxicidad y la resistencia presentada por los pacientes frente a este tratamiento [4-5]. Dicha radioresistencia se debe a la heterogeneidad y complejidad biológica que presentan ciertos tumores y, principalmente, a las células madre tumorales (CSCs) presentes en ellos [10].

Las CSCs son una pequeña proporción de células dentro del tumor [11] que son capaces de originar, mantener y expandir tumores [11-12], de autorenovarse, de sobrevivir en el torrente sanguíneo, y de resistir a los tratamientos oncológicos (RT y quimioterapia) [12-14]. En el caso de la RT, la radioresistencia presentada por las CSCs es debida a su capacidad de recuperación frente a las lesiones inducidas por la radiación mediante la gran capacidad de reparación del DNA, la activación de puntos de control en el ciclo celular así como de

distintas vías de supervivencia (Hedgehog, Notch, Wnt/ $\beta$ -catenina) y de señales procedentes del entorno extracelular (nicho y microambiente) [15]. Debido a esto, las CSCs están relacionadas con los procesos de metástasis y recurrencia tumoral [16-19] y, por tanto, están siendo candidatas como nuevas perspectivas terapéuticas [20].

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son endopeptidasas que difieren en su estructura, especificidad de sustrato, homología de secuencia, localización celular y secreción [21]. Las MMPs participan principalmente en la remodelación de la matriz extracelular (ECM) [22], pero también son capaces de procesar proteínas no relacionadas con dicha matriz, de activar otras MMPs [23], de regular las interacciones célula-célula [24], y están involucradas en el recambio de fibras estromales [25]. Además, participan en gran variedad de procesos biológicos normales [24] y carcinogénicos (crecimiento tumoral, evasión de apoptosis, angiogénesis, respuesta a la inflamación, transición epitelial-mesenquimal (EMT), formación de nichos premetastásicos, invasión y metástasis) [26-27]. Hay evidencias de que dichos procesos carcinogénicos se favorecen tras la radiación por un aumento de la actividad de las MMPs, la cual necesita ser regulada por inhibidores tisulares endógenos de las MMPs (TIMPs) y, mediante mecanismos epigenéticos, por histonas desacetilasas (HDACs) [21]. Los TIMPs no sólo son inhibidores de las MMPs, sino que también tienen actividades biológicas independientes de ellas, como son el crecimiento y la diferenciación celular, la angiogénesis, la apoptosis y la plasticidad sináptica [28]. Las HDACs son enzimas que participan en el silenciamiento de genes mediante la eliminación de grupos acetilo de la cromatina. El proceso de desacetilación de las histonas favorece la evasión de la apoptosis e induce la no respuesta a señales antiproliferativas [29].

El microambiente del tejido es fundamental para la forma, la función, el desarrollo y el crecimiento del tejido [30-31]. Teniendo en cuenta la importancia de las interacciones célula-célula y célula-ECM, los cultivos celulares tridimensionales (3D) están siendo una herramienta esencial en el desarrollo celular y en la biología del cáncer. Además, se han convertido en una válida alternativa al uso de los modelos animales, debido a que imitan las condiciones *in vivo* a través de un microambiente controlado y reproducible [32].

## **2. OBJETIVOS**

1. Identificar la proporción de CSCs en tres líneas celulares tumorales de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3) tras la administración de distintas dosis de radiación (0, 2 y 6 Gy).
2. Cuantificar las distintas proteínas secretadas (MMPs, TIMPs y HDACs) en distintas subpoblaciones celulares (incluyendo la de CSCs), tras la administración de diferentes dosis de radiación (0, 2 y 6 Gy) en las tres líneas celulares tumorales de cáncer de mama.
3. Comprobar las modificaciones, en caso de que haya, tras la irradiación de MMPs, TIMPs y HDACs entre estudios *in vitro* (experimental) e *in vivo* (ratones y pacientes).
4. Examinar el comportamiento de MMPs, TIMPs y HDACs tras la radiación para poder estudiarlas como posibles biomarcadores predictivos y de pronóstico en el cáncer de mama, debido a su relación en la invasión y metástasis tumoral.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

En esta Tesis Doctoral se llevaron a cabo distintos estudios *in vitro* con tres líneas celulares tumorales de cáncer de mama humano (MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3) y una línea celular de fibroblastos adultos humanos (HAF) derivados de piel. Las líneas celulares tumorales se cultivaron en 2D (monocapa) y 3D (suspensión) y 24 horas después de ser irradiadas a 0, 2 y 6 Gy, se determinaron los marcadores específicos de CSCs de mama: ALDH1, CD44<sup>+</sup> y CD24<sup>-/low</sup>. Las tres líneas celulares tumorales también fueron separadas mediante citometría de flujo en distintas subpoblaciones celulares (general, positiva o CSCs, y negativa o no-CSCs), las cuales se cultivaron en 3D y 3D+IrECM (Matrigel) y a las 24 horas de irradiarlas a 0, 2 y 6 Gy, se determinó la expresión génica de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, HDAC-1, HDAC-2 y HDAC-4 mediante qRT-PCR. Además, las líneas celulares tumorales se co-cultivaron en Matrigel con HAF y 24 horas después de ser irradiadas a 0, 2 y 6 Gy, se determinó la expresión de los genes citados anteriormente.

En esta Tesis Doctoral también se llevó a cabo tanto un estudio *in vivo* en ratones como un estudio piloto en pacientes de cáncer de mama. El estudio en ratones consistió en la monitorización del crecimiento tumoral tras la inoculación ortotópica en Matrigel de las tres subpoblaciones celulares (general, positiva o CSCs y negativa o no-CSCs) de la línea MDA-MB-231, tras haber sido irradiadas a 0, 2 y 6 Gy. Los tumores obtenidos se sumergieron en parafina y se cortaron en secciones, en las cuales se realizó una tinción Hematoxilina-Eosina (H&E) y una tinción inmunohistoquímica (IHC) de MMP-1. El estudio piloto consistió en la determinación proteica de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-12, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 mediante inmunoensayo, en 3 muestras de suero de pacientes obtenidas a distintos tiempos del tratamiento (antes, durante y después de la RT). Los niveles séricos de estas proteínas también se estudiaron de acuerdo a distintas variables (dependientes de las pacientes, dependientes de la biología tumoral y relacionadas con la RT) y según la recurrencia de las pacientes a los 6 meses de finalizar el tratamiento.

#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la determinación de marcadores específicos de CSCs de mama (ALDH1, CD44<sup>+</sup> y CD24<sup>-/low</sup>) tras radiación, vimos que la expresión de dichos marcadores varió en función del modelo de cultivo utilizado. En términos generales, el nivel de expresión de ALDH1 disminuyó con la radiación en ambos modelos de cultivo en las tres líneas celulares tumorales. Sin embargo, la expresión de CD44<sup>+</sup> aumentó con la radiación en el cultivo 3D, el cual contenía la subpoblación positiva, es decir, la subpoblación de CSCs. Dicho marcador se ha asociado con la EMT [33] y con un mal pronóstico en cáncer de mama y, además, está involucrado en la resistencia a la RT y la QUIMIOTERAPIA en varios tipos de cánceres [34-36].

En las medidas de expresión génica en cultivos 3D y 3D+lrECM tras radiación, cada línea tumoral expresó diferentes genes. Nuestros resultados mostraron que con la radiación los niveles de expresión de MMP-1 y MMP-3 aumentaron en la subpoblación positiva (CSCs) en la línea MDA-MB-231 en ambos modelos de cultivo, siendo más altos en las células cultivadas en 3D+lrECM. Por tanto, sugerimos que este modelo de cultivo podría contribuir a

la aparición de un fenotipo de MDA-MB-231 más agresivo tras la radiación. Además, también destacaron los niveles de MMP-9 y MMP-13 en la misma línea tumoral en el cultivo 3D. La MMP-9 es una de las principales responsables en la remodelación de la ECM [22, 37], y la MMP-13 está involucrada en el crecimiento tumoral mediante una regulación de la actividad y la biodisponibilidad de los factores de crecimiento secuestrados en la ECM [38]. En cuanto a las HDACs, hemos encontrado que las alteraciones producidas por la radiación pueden depender de la dosis administrada y de la subpoblación celular estudiada; lo que podría alterar la regulación que ejercen sobre las MMPs tras dicha radiación. Con respecto a los TIMPs, de forma general vimos un aumento en los niveles de expresión de TIMP-1 en el cultivo 3D+IrECM, y de TIMP-2 en el cultivo 3D, mostrando significancia estadística al comparar las subpoblaciones celulares.

En la determinación de expresión génica en co-cultivos en Matrigel tras radiación, se detectaron los mismos genes en las tres líneas celulares tumorales. Nuestros resultados mostraron un aumento significativo en la expresión de la mayoría de los genes a la dosis de 6 Gy en las tres líneas celulares tumorales, pero principalmente, en la línea tumoral MDA-MB-231.

En la monitorización del crecimiento tumoral en ratones, pudimos ver que dicho crecimiento no sólo depende de la dosis de radiación sino también de la subpoblación celular estudiada. El tumor de mayor volumen se obtuvo en la subpoblación general, la cual contiene tanto CSCs como no-CSCs. También vimos que los tumores derivados de las células irradiadas a 2 Gy en las subpoblaciones general y positiva, conteniendo ambas la fracción de CSCs, han presentado un volumen mayor con respecto al control no irradiado. Esto apoyaría la idea de que la dosis de 2 Gy sería insuficiente para erradicar las CSCs debido a la radioresistencia que éstas presentan, y que además esta dosis sería capaz de promover el crecimiento del tumor. Dicho efecto fue más pronunciado en los tumores correspondientes a la subpoblación general, lo que sugiere la importancia de las interacciones entre CSCs y no-CSCs en la proliferación tumoral después de la radiación. Sin embargo, las dosis más altas de radiación (6 Gy) se asocian con un retraso en el crecimiento del tumor, probablemente debido a la muerte de las CSCs. Estos resultados estarían apoyando la relevancia clínica de los regímenes hipofraccionados en cáncer de mama.

En la determinación de los niveles séricos de MMPs en pacientes de cáncer de mama a lo largo de la RT, encontramos una correlación positiva entre éstos antes, durante y después de la RT, siendo dicha correlación más fuerte con la radiación. En el curso temporal del tratamiento, la mayoría de las MMPs analizadas aumentaron de forma no significativa, siendo los niveles de MMP-2 y MMP-9 los más altos. Con respecto a los TIMPs, encontramos correlaciones positivas y negativas entre sus niveles séricos según el momento de la RT, con un aumento en las correlaciones negativas para TIMP-1 y TIMP-3 con la radiación. A lo largo del tratamiento, los niveles séricos de TIMP-1 y TIMP-3 disminuyeron, lo cual podría estar asociado con el aumento de algunas MMPs estudiadas en este trabajo. En cuanto a las variables estudiadas, encontramos valores significativos al relacionar los niveles séricos de MMP-3 con el estado menopáusico, la clasificación tumoral, el grado de diferenciación y la presencia de E-cadherina; y al relacionar los niveles séricos de MMP-9 con la radiotoxicidad. En cambio, entre los TIMPs encontramos significancia en los niveles séricos de TIMP-3 al relacionarlos con la RT de los ganglios linfáticos y la radioresistencia; y al relacionar los niveles séricos de TIMP-4 con la presencia de E-cadherina, el portanaje de Ki67 y la afectación del ganglio centinela. Finalmente, al comparar los niveles séricos de proteínas según la recurrencia tumoral 6 meses después del tratamiento, obtuvimos un aumento en la mayoría de MMPs y TIMPs después de la RT en las pacientes con recidiva tumoral. Estas variaciones no fueron estadísticamente significativas, pero estarían apoyando la influencia de las MMPs en el desarrollo de la carcinogénesis y su relación con un mal pronóstico en cáncer de mama.

## 5. CONCLUSIONES

1. La expresión de los marcadores de CSCs de mama (ALDH1, CD44<sup>+</sup> y CD24<sup>-/low</sup>) varía con la dosis de radiación administrada. En la subpoblación positiva (CSCs), a dosis altas (6 Gy) aumenta el CD44<sup>+</sup>, el cual se asocia con la EMT y un mal pronóstico en cáncer de mama.
2. En los estudios *in vitro* de cultivo 3D y 3D+lrECM, la expresión de MMPs, TIMPs y HDACs varía en función de la línea tumoral (MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3), la dosis de radiación (0, 2 y 6 Gy), la subpoblación celular (general, positiva o CSCs, y negativa



o no-CSCs) y el modelo de cultivo 3D (esferas en suspensión o embebidas en Matrigel).

3. Tras la irradiación celular y en ambos modelos de cultivo 3D, la MMP-1 aumenta su expresión en la subpoblación positiva (CSCs) de la línea triple negativa MDA-MB-231, la cual es la más radioresistente. Este hecho sugiere la importancia de MMP-1 en el proceso de invasión y metástasis tras el tratamiento con radiación.
4. El microambiente tumoral también se altera tras el tratamiento con radiación, afectando a la expresión de MMPs, TIMPs y HDACs.
5. En el estudio *in vitro* de co-cultivo (líneas celulares tumorales con fibroblastos), en general, la mayoría de genes estudiados aumentan su expresión a dosis altas de radiación. Este comportamiento apoya la importancia de los componentes del microambiente tumoral (entre ellos, fibroblastos) en la progresión de la enfermedad.
6. En el estudio *in vivo*, los tumores formados a partir de células MDA-MB-231 irradiadas a 2 Gy previo a la inoculación han sido de mayor volumen con respecto al control en las subpoblaciones general y positiva. Este hecho pone de manifiesto que dosis bajas de radiación serían insuficientes para erradicar las CSCs debido a su radioresistencia, contribuyendo al crecimiento tumoral.
7. En el desarrollo tumoral *in vivo*, los tumores formados a partir de células MDA-MB-231 irradiadas a 6 Gy previo a la inoculación han sido los más pequeños dentro de cada subpoblación celular. Este resultado sugiere que a dosis altas de radiación (6 Gy) se reduce la velocidad de crecimiento tumoral y el volumen final del mismo.
8. El estudio piloto realizado en pacientes con cáncer de mama pone de manifiesto que la RT induce alteraciones en los niveles séricos de MMPs y TIMPs.
9. Las pacientes de cáncer de mama con recidiva tumoral muestran un aumento en los niveles séricos de todas las MMPs analizadas y una disminución en los niveles de TIMP-1. Este hecho apoya la teoría de que TIMP-1 es el principal inhibidor de las

MMPs y el más afín a ellas. Es importante considerar que el tamaño muestral es pequeño y se requieren estudios adicionales para corroborar estos hallazgos.

10. Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo confirman la importancia del microambiente y sus componentes, y de las CSCs en el desarrollo tumoral y en la respuesta al tratamiento con radiación.

# RIASSUNTO

---



## 1. INTRODUZIONE

Il cancro è la seconda causa di morte nel mondo. Le tipologie di cancro responsabili di maggior numero di decessi sono: polmone, epatico, colorettales, gastrico e mammario [1]. Il carcinoma mammario è il tumore più comune nelle donne e globalmente, in termini di mortalità, e la quinta causa di decesso per cancro [2]. La prognosi del cancro al seno è determinata dall'eterogeneità della malattia, dal tipo di tumore (dal punto di vista istologico e molecolare), dalla sua localizzazione, dal grado di differenziazione, dalla presenza o dall'assenza di diverse proteine (E-caderina, p53, Ki67), dal coinvolgimento del linfonodo sentinella e dell'età del paziente; questi fattori intervengono anche nella risposta al trattamento [3].

La radioterapia (RT) è utilizzata nel trattamento della maggior parte dei tumori [4]. La scelta di un adeguato regime radioterapico dipende dalla dose soglia, dalle caratteristiche del paziente, e dai tessuti e organi in cui si trova il tumore [5]. Nel carcinoma mammario, la RT convenzionale è stata ampiamente utilizzata (2 Gy/frazione giornaliera, 45-50 Gy totale), ma ogni volta viene usata di più la RT ipofrazionata, che comporta dosi più elevate d'irradiazione in tempi più brevi di trattamento [6-9]. Nel carcinoma mammario, la tossicità cutanea è l'effetto avverso più comune e di solito si presenta come eritema, desquamazione, ulcera ed emorragia (effetti acuti), e iperpigmentazione e telangiectasia (effetti cronici). L'efficacia totale ottenuta con RT dipende dalla dose soglia, dal regime radioterapico, dalla posizione del tumore, dalla tossicità e dalla resistenza presentata dai pazienti a questo trattamento [4-5]. La radioresistenza è dovuta all'eterogeneità e alla complessità biologica di alcuni tumori e, principalmente, alle cancer stem cells (CSCs) presenti in essi [10].

Le CSCs sono una piccola percentuale di cellule all'interno del tumore [11] in grado di originarlo, mantenerlo ed espanderlo [11-12], di auto-rinnovarsi, di sopravvivere nel flusso sanguigno e di resistere ai trattamenti oncologici (RT e chemioterapia) [12-14]. Nel caso della RT, la radioresistenza presentata dalle CSCs è dovuta alla loro capacità di recupero dalle lesioni indotte dall'irradiazione mediante riparazione del DNA, attivazione dei punti di controllo nel ciclo cellulare, diversi pathway di sopravvivenza (Hedgehog, Notch, Wnt/ $\beta$ -catenina) e segnali dall'ambiente extracellulare (nicchia e microambiente) [15]. Per

questo motivo, le CSCs sono correlate ai processi di metastasi e recidiva del tumore [16-19], e pertanto, sono candidate come nuove prospettive terapeutiche [20].

Le metalloprotease della matrice (MMPs) sono endopeptidase che differiscono per struttura, specificità del substrato, sequenza genica, localizzazione cellulare e modalità di secrezione [21]. Le MMPs sono principalmente coinvolte nel rimodellamento della matrice extracellulare (ECM) [22], ma sono anche in grado di processare proteine non correlate all'ECM, attivare altre MMPs [23], regolare le interazioni cellula-cellula [24], e sono coinvolti nella sostituzione delle fibre stromali [25]. Inoltre, partecipano ad una varietà di processi biologici normali [24] e cancerogeni (crescita tumorale, evasione dai processi apoptotici, angiogenesi, risposta infiammatoria, transizione epitelio-mesenchimale (EMT), formazione di premetastatiche nicchie, invasione e metastasi) [26-27]. Vi sono evidenze scientifiche che tali processi cancerogeni sono favoriti dopo l'irradiazione per via di una maggiore attività delle MMPs, che per essere regolate necessitano d'inibitori tissutali endogeni delle MMPs (TIMPs) e da meccanismi epigenetici operati dalle istone deacetilase (HDACs) [21]. Gli TIMPs non solo inibiscono le MMPs, ma hanno anche attività biologiche indipendenti da queste, come la crescita e il differenziamento cellulare, l'angiogenesi, l'apoptosi e la plasticità sinaptica [28]. Le HDACs sono enzimi che partecipano al silenziamento dei geni rimuovendo i gruppi acetilici dalla cromatina. Il processo di deacetilazione delle istone favorisce l'evasione dell'apoptosi e induce una mancata risposta ai segnali antiproliferativi [29].

Il microambiente tissutale è fondamentale per la forma, la funzione, lo sviluppo e la crescita dei tessuti [30-31]. Tenendo conto dell'importanza delle interazioni cellula-cellula e cellula-ECM, le colture cellulari tridimensionali (3D) sono uno strumento essenziale nella comprensione dello sviluppo cellulare e della biologia del cancro. Inoltre, sono diventati una valida alternativa all'uso di modelli animali, perché imitano le condizioni *in vivo* attraverso un microambiente controllato e riproducibile [32].

## **2. OBIETTIVI**

1. Identificare la percentuale di CSCs in tre linee cellulari del carcinoma mammario (MCF-7, MDA-MB-231 e SK-BR-3) dopo aver somministrato diverse dosi d'irradiazione (0, 2 e 6 Gy).
2. Quantificare le diverse proteine secrete (MMPs, TIMPs e HDACs) in diverse sottopopolazioni cellulari (inclusa quella delle CSCs), dopo aver somministrato diverse dosi d'irradiazione (0, 2 e 6 Gy) nelle tre linee tumorali del carcinoma mammario.
3. Verificare le eventuali alterazioni dopo l'irradiazione di MMPs, TIMPs e HDACs con studi *in vitro* (sperimentali) e *in vivo* (topi e pazienti).
4. Esaminare il comportamento di MMPs, TIMPs e HDACs dopo l'irradiazione per valutarli come possibili biomarcatori predittivi e prognostici del carcinoma mammario, dovuto alla loro relazione nell'invasione e nella metastasi tumorali.

## **3. MATERIALE E METODI**

In questa Tesi di Dottorato sono stati condotti diversi tipi di studi *in vitro* con tre linee tumorali di carcinoma mammario umano (MCF-7, MDA-MB-231 e SK-BR-3) e una linea di cellule umane di fibroblasti adulti (HAF) derivati da pelle. Le linee tumorali sono state coltivate in 2D (monostrato) e 3D (sospensione) e 24 ore dopo essere state irradiate a 0, 2 e 6 Gy, sono stati determinati marcatori specifici di CSCs del seno: ALDH1, CD44<sup>+</sup> e CD24<sup>-/low</sup>. Le tre linee tumorali sono state separate mediante citometria a flusso in diverse sottopopolazioni di cellule (generale, positiva o CSCs, e negativa o non-CSCs), sono state coltivate in 3D e 3D+IrECM (Matrigel) e 24 ore dopo essere state irradiate a 0, 2 e 6 Gy, è stata determinata l'espressione genica di MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, HDAC-1, HDAC-2 e HDAC-4 attraverso qRT-PCR. Inoltre, le linee tumorali sono state co-coltivate in Matrigel con HAF e 24 ore dopo essere state irradiate a 0, 2 e 6 Gy, è stata determinata l'espressione dei geni sopracitati.

In questa Tesi di Dottorato è stato effettuato anche uno studio *in vivo* su topi e uno studio pilota su pazienti con carcinoma mammario. Lo studio su modello murino ha consistito nel monitoraggio della crescita tumorale dopo l'inoculazione ortotopica in Matrigel delle tre sottopopolazioni di cellule (generale, positiva o CSCs, e negativa o non-CSCs) della linea MDA-MB-231, dopo essere state irradiate a 0, 2 e 6 Gy. I tumori ottenuti sono stati inclusi in paraffina e tagliati in sezioni in cui è stata eseguita una colorazione Ematossilina-Eosina (H&E) e colorazione immunohistochimica (IHC) di MMP-1. Lo studio pilota è stato condotto su tre campioni di siero dei pazienti, sottoposti a tempi diversi di RT (prima, durante e dopo). Su questi campioni sono stati determinati i livelli, tramite saggio immunologico, delle proteine MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-12, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. I livelli sierici di queste proteine sono stati anche studiati in base a diverse variabili (dipendenti dai pazienti, dalla biologia tumorale e correlati alla RT) e in base alla recidiva dei pazienti a 6 mesi dalla fine del trattamento.

#### **4. RISULTATI E DISCUSSIONE**

Nella determinazione di specifici marcatori di CSCs del seno (ALDH1, CD44<sup>+</sup> e CD24<sup>-/low</sup>) dopo l'irradiazione, abbiamo visto che l'espressione di loro variava a seconda del modello cellulare utilizzato. In termini generali, il livello di espressione di ALDH1 è diminuito con l'irradiazione in entrambi i modelli di coltura nelle tre linee tumorali. Tuttavia, l'espressione di CD44<sup>+</sup> aumentava con l'irradiazione della coltura 3D, che conteneva la sottopopolazione positiva, cioè la sottopopolazione di CSCs. Questo marcatore è stato associato all'EMT [33] e con una prognosi sfavorevole nel carcinoma mammario e, inoltre, è coinvolto nella resistenza alla RT e alla chemioterapia in diversi tipi di cancro [34-36].

Nelle misurazioni dell'espressione genica in colture 3D e 3D+lrECM dopo l'irradiazione, ogni linea tumorale esprimeva geni diversi. I nostri risultati mostrano che con l'irradiazione i livelli di espressione di MMP-1 e MMP-3 sono aumentati nella sottopopolazione positiva (CSCs) nella linea MDA-MB-231 in entrambi i modelli di coltura, essendo più alti nelle cellule cresciute in 3D+lrECM. Pertanto, suggeriamo che questo modello di coltura potrebbe



contribuire alla comparsa di un fenotipo MDA-MB-231 più aggressivo dopo l'irradiazione. Inoltre, anche i livelli di MMP-9 e MMP-13 si sono emersi nella stessa linea di tumore nella coltura 3D. La MMP-9 è una dei principali responsabili del rimodellamento dell'ECM [22, 37] e la MMP-13 è coinvolta nella crescita del tumore regolando l'attività e la biodisponibilità dei fattori di crescita sequestrati dall'ECM [38]. Riguardo alle HDACs, abbiamo scoperto che le alterazioni prodotte dall'irradiazione possono dipendere dalla dose somministrata e dalla sottopopolazione cellulare studiata; che potrebbe alterare la regolazione che esercitano sulle MMPs dopo l'irradiazione. Per quanto riguarda i TIMPs, in generale abbiamo visto un aumento dei livelli di espressione di TIMP-1 nella coltura 3D+lrECM e di TIMP-2 nella coltura 3D, che mostra significato statistico quando si confrontano le sottopopolazioni cellulari.

Nella determinazione dell'espressione genica in co-culture in Matrigel dopo l'irradiazione, tutti i geni tranne MMP-2 e HDAC-1 sono stati rilevati nelle tre linee tumorali. I nostri risultati hanno mostrato un aumento significativo nell'espressione della maggior parte dei geni alla dose di 6 Gy nelle tre linee tumorali, ma principalmente nella linea tumorale MDA-MB-231.

Nel monitoraggio della crescita del tumore nei topi, abbiamo potuto vedere che questa crescita dipende non solo dalla dose d'irradiazione, ma anche dalla sottopopolazione cellulare studiata. Il tumore col volume più alto è stato ottenuto nella sottopopolazione generale, che contiene sia CSCs che non-CSCs. Abbiamo anche visto che i tumori derivanti dalle cellule irradiate a dose di 2 Gy nelle sottopopolazioni generale e positiva, entrambi contenenti la frazione di CSCs, hanno presentato un volume maggiore rispetto al controllo non irradiato. Ciò sosterebbe l'idea che la dose di 2 Gy sarebbe insufficiente ad eradicare le CSCs a causa della radioresistenza che presentano, e che questa dose sarebbe anche in grado di promuovere la crescita del tumore. Questo effetto è risultato più pronunciato nei tumori corrispondenti alla sottopopolazione generale, il che suggerisce l'importanza delle interazioni tra CSCs e non-CSCs nella proliferazione del tumore dopo l'irradiazione. Tuttavia, dosi più elevate d'irradiazione (6 Gy) sono associate a un ritardo nella crescita del tumore, probabilmente a causa della morte delle CSCs. Questi risultati supportano la rilevanza clinica dei regimi di RT ipofrazionata nel carcinoma mammario.

Nella determinazione dei livelli sierici di MMPs nei pazienti con carcinoma mammario durante tutta la RT, abbiamo trovato una correlazione positiva tra questi livelli prima, durante e dopo la RT, diventando più forte con l'irradiazione. Nel corso temporaneo del trattamento, la maggior parte delle MMPs analizzate sono aumentate, ma non in modo significativo, emergono comunque i livelli di MMP-2 e MMP-9. Per quanto riguarda i TIMPs, abbiamo trovato correlazioni positive e negative tra i loro livelli sierici in base al tempo di RT, con un aumento delle correlazioni negative per TIMP-1 e TIMP-3 con l'irradiazione. Durante il trattamento, i livelli sierici di TIMP-1 e TIMP-3 sono diminuiti. Questa diminuzione potrebbe essere associata all'aumento di alcune MMPs studiate in questo lavoro. Per quanto riguarda le variabili studiate, abbiamo trovato valori significativi nella correlazione tra i livelli sierici di MMP-3 e lo stato della menopausa, la classificazione del tumore, il grado di differenziazione e la presenza di E-caderina; e correlando i livelli sierici di MMP-9 con la radiotossicità. Tuttavia, tra i TIMPs abbiamo trovato significatività statistica nei livelli sierici di TIMP-3 quando li messi in relazione con la RT dei linfonodi e con la radioresistenza; e mettendo in relazione i livelli sierici di TIMP-4 con la presenza di E-caderina, la percentuale di Ki67 e il coinvolgimento del nodo sentinella. Infine, confrontando i livelli delle proteine sieriche secondo la recidiva del tumore 6 mesi dopo il trattamento, abbiamo ottenuto un aumento nella maggior parte delle MMPs e dei TIMPs dopo RT in pazienti con recidiva del tumore. Queste variazioni non sono risultate statisticamente significative, ma sembrerebbero appoggiare l'influenza delle MMPs sullo sviluppo della carcinogenesi e la sua relazione con una prognosi sfavorevole nel carcinoma mammario.

## **5. CONCLUSIONI**

1. L'espressione dei marcatori CSCs del seno (ALDH1, CD44<sup>+</sup> y CD24<sup>-/low</sup>) varia con la dose d'irradiazione somministrata. Nella sottopopolazione positiva (CSCs), alte dosi d'irradiazione (6 Gy) inducono l'aumento di CD44<sup>+</sup>, che è associato all'EMT e a una prognosi sfavorevole nel carcinoma mammario.
2. Negli studi di coltura 3D e 3D+lrECM *in vitro*, l'espressione di MMPs, TIMPs e HDACs varia a seconda della linea tumorale (MCF-7, MDA-MB-231 e SK-BR-3), la dose

d'irradiazione (0, 2 e 6 Gy), la sottopopolazione di cellule (generale, positiva o CSC, e negativa o non-CSC) e il modello di coltura 3D (sfere in sospensione o incorporati in Matrigel).

3. Dopo l'irradiazione cellulare e in entrambi i modelli di coltura 3D, l'espressione di MMP-1 aumenta nella sottopopolazione positiva (CSCs) della linea tripla negativa MDA-MB-231, che è la più radioresistente. Questo fatto suggerisce l'importanza di MMP-1 nel processo d'invasione e metastasi dopo il trattamento con radiazioni.
4. Il microambiente tumorale viene alterato anche dopo il trattamento con radiazioni, influenzando l'espressione di MMPs, TIMPs e HDACs.
5. Nello studio di co-coltura *in vitro* (linee tumorali con fibroblasti), in generale, la maggior parte dei geni studiati aumentano la loro espressione a dosi elevate d'irradiazione. Questo comportamento supporta l'importanza dei componenti del microambiente tumorale (compresi i fibroblasti) nella progressione della malattia.
6. Nello studio *in vivo*, i tumori formati da cellule MDA-MB-231 irradiate a dose di 2 Gy prima dell'inoculazione sono risultati avere un volume maggiore rispetto al controllo nelle sottopopolazioni generale e positiva. Questo fatto dimostra che basse dosi d'irradiazione non sarebbero sufficienti a eradicare le CSCs a causa della loro radioresistenza, contribuendo alla crescita del tumore.
7. Nello sviluppo del tumore *in vivo*, i tumori formati da cellule MDA-MB-231 irradiate a dose di 6 Gy prima dell'inoculazione sono risultati avere un volume più piccolo all'interno di ogni sottopopolazione cellulare. Questo risultato suggerisce che a dosi elevate d'irradiazione (6 Gy) il tasso di crescita del tumore e il volume finale del tumore sono ridotti.
8. Lo studio pilota condotto su pazienti con carcinoma mammario mostra che la RT induce alterazioni dei livelli sierici di MMPs e TIMPs.
9. I pazienti con carcinoma mammario con recidiva del tumore mostrano un aumento dei livelli sierici di tutte le MMPs analizzate e una diminuzione dei livelli di TIMP-1. Questo fatto supporta la teoria che TIMP-1 è il principale inibitore di MMPs e ha una

maggior affinità per queste. È importante considerare che le dimensioni del campione sono piccole e sono necessari ulteriori studi per confermare questi risultati.

10. Infine, i risultati ottenuti in questo lavoro confermano l'importanza del microambiente e dei suoi componenti, e delle CSCs nello sviluppo del tumore e nella risposta al trattamento con irradiazione.

# SUMMARY

---



## 1. INTRODUCTION

Cancer is the second cause of death in the world. The types of cancer responsible for the most deaths are: lung, liver, colorectal, gastric and breast [1]. Breast cancer (BC) is the most common tumor in women and globally, in terms of mortality, it ranks fifth of all deaths caused by cancer [2]. The prognosis of BC is determined by the heterogeneity of the disease, the type of tumor (from a histological and molecular point of view), the tumor location, the degree of differentiation, the presence or absence of different proteins (E-cadherin, p53, Ki67), the involvement of the sentinel lymph node, and the age of the patient; which also intervene in the response to treatment [3].

Radiation therapy (RT) is used in the treatment of most tumors [4]. The selection of a suitable radiotherapy regimen depends on the threshold dose, on the characteristics of the patient, and on the tissues and organs where the tumor is located [5]. In BC, conventional RT has been widely used (2 Gy/daily fraction, 45-50 Gy total), but it hypofractionated RT is increasingly used, involving higher doses of radiation in shorter times of treatment [6-9]. In BC, cutaneous toxicity is the most common adverse effect and usually presents as erythema, desquamation, ulceration and hemorrhage (acute effects) and hyperpigmentation and telangiectasia (chronic effects). The total efficacy obtained from RT depends on the threshold dose, the RT regimen, the location of the tumor, the toxicity and the resistance presented by the patients to this treatment [4-5]. This radioresistance is due to the heterogeneity and biological complexity of certain tumors and, mainly, to the cancer stem cells (CSCs) present in them [10].

CSCs are a small proportion of cells within the tumor [11] that are capable of originating, maintaining and expanding tumors [11-12], to self-renew, of surviving in the bloodstream, and of resisting oncological treatments (RT and chemotherapy) [12-14]. In the case of RT, the radioresistance presented by the CSCs is due to their ability to recover from radiation-induced injuries by the capacity of DNA repair, the activation of control points in the cell cycle as well as different survival pathways (Hedgehog, Notch, Wnt/ $\beta$ -catenin) and signals from the extracellular environment (niche and microenvironment) [15]. Because of this, CSCs are related to the processes of metastasis and tumor recurrence [16-19] and, therefore, are being candidates as new therapeutic perspectives [20].

Matrix metalloproteases (MMPs) are endopeptidases that differ in structure, substrate specificity, sequence homology, cell localization, and secretion [21]. MMPs are mainly involved in the remodeling of the extracellular matrix (ECM) [22], but they are also capable of processing proteins unrelated to said matrix, of activating other MMPs [23], of regulating cell-cell interactions [24], and are involved in the replacement of stromal fibers [25]. In addition, they participate in a great variety of normal biological processes [24] and carcinogenic (tumor growth, evasion of apoptosis, angiogenesis, response to inflammation, epithelial-mesenchymal transition (EMT), formation of premetastatic niches, invasion and metastasis) [26-27]. There is evidence that said carcinogenic processes are favored after radiation by an increase in the activity of the MMPs, which needs to be regulated by endogenous tissue inhibitors of the MMPs (TIMPs) and, by epigenetic mechanisms, by histone deacetylases (HDACs) [21]. TIMPs are not only inhibitors of MMPs, but also have biological activities independent of them, such as cell growth and differentiation, angiogenesis, apoptosis and synaptic plasticity [28]. HDACs are enzymes that participate in the silencing of genes by removing acetyl groups from chromatin. The deacetylation process of histones favors the evasion of apoptosis and induces non-response to antiproliferative signals [29].

The tissue's microenvironment is fundamental to the shape, function, development and growth of tissue [30-31]. Taking into account the importance of cell-cell and cell-ECM interactions, three-dimensional cell cultures (3D) are an essential tool in cell development and cancer biology. In addition, they have become a valid alternative to the use of animal models, because they mimic *in vivo* conditions through a controlled and reproducible microenvironment [32].

## 2. AIMS

1. Identify the proportion of CSCs in three BC tumor lines (MCF-7, MDA-MB-231 and SK-BR-3) after administration of different doses of radiation (0, 2 and 6 Gy).



2. Quantify the different secreted proteins (MMPs, TIMPs and HDACs) in different cell subpopulations (including that of CSCs), after the administration of different doses of radiation (0, 2 and 6 Gy) in the three tumor lines of BC.
3. Check the modifications, if any, after irradiation of MMPs, TIMPs and HDACs between *in vitro* (experimental) and *in vivo* studies (mice and patients).
4. To examine the behavior of MMPs, TIMPs and HDACs after radiation to be able to study them as possible predictive and prognostic biomarkers in BC, due to their relation in the invasion and tumor metastasis.

### **3. MATERIAL AND METHODS**

In this Doctoral Thesis, several *in vitro* studies were carried out with three tumor lines of human BC (MCF-7, MDA-MB-231 and SK-BR-3) and a human adult fibroblast cell line (HAF) derived of skin. The tumor lines were cultured in 2D (monolayer) and 3D (suspension) and 24 hours after being irradiated at 0, 2 and 6 Gy, the specific markers of breast CSCs (BCSCs) were determined: ALDH1, CD44<sup>+</sup> y CD24<sup>-/low</sup>. The three tumor lines were also separated by flow cytometry in different cell subpopulations (general, positive or CSCs, and negative or non-CSCs), which were cultured in 3D and 3D+IrECM (Matrigel) and after 24 hours of irradiation at 0, 2 and 6 Gy, the gene expression of MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, HDAC-1, HDAC-2 and HDAC-4 was determined by qRT-PCR. In addition, the tumor lines were co-cultured in Matrigel with HAF and 24 hours after being irradiated at 0, 2 and 6 Gy, the expression of the genes mentioned above was determined.

In this investigation, an *in vivo* study on mice and a pilot study in BC patients were also carried out. The study on mice consisted in the monitoring of tumor growth after orthotopic inoculation in Matrigel of the three cell subpopulations (general, positive or CSCs, and negative or non-CSCs) of the MDA-MB-231 line, after having been irradiated to 0, 2 and 6 Gy. The tumors obtained were immersed in paraffin and cut into sections, in which a Hematoxylin-Eosin stain (H&E) and an immunohistochemical (IHC) stain of MMP-1 were performed. The pilot study consisted in the protein determination of MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-12, MMP-13, TIMP-1, TIMP -2, TIMP-3

and TIMP-4 by immunoassay, in 3 patient serum samples obtained at different times of treatment (before, during and after). The serum levels of these proteins were also studied according to different variables (dependent on the patients, dependent on tumor biology and related to RT) and according to the recurrence of the patients at 6 months after the end of treatment.

#### **4. RESULTS AND DISCUSSION**

In the determination of specific markers of BCSCs (ALDH1, CD44<sup>+</sup> y CD24<sup>-/low</sup>) after radiation, we saw that the expression of said markers varied depending on the culture model used. In general terms, the level of expression of ALDH1 decreased with radiation in both culture models in the three tumor lines. However, the expression of CD44<sup>+</sup> increased with radiation in the 3D culture, which contained the positive subpopulation, that is, the subpopulation of CSCs. This marker has been associated with EMT [33] and with a poor prognosis in BC and, moreover, it is involved in resistance to RT and chemotherapy in several types of cancer [34-36].

In the measurements of gene expression in 3D cultures and 3D+IrECM after radiation, each tumor line expressed different genes. Our results showed that with the radiation the expression levels of MMP-1 and MMP-3 increased in the positive subpopulation (CSCs) in the MDA-MB-231 line in both culture models, with higher levels in cells grown in 3D+IrECM. Therefore, we suggest that this culture model could contribute to the appearance of a more aggressive MDA-MB-231 phenotype after radiation. In addition, the levels of MMP-9 and MMP-13 were also highlighted in the same tumor line in 3D culture. MMP-9 is one of the main orchestrators of ECM remodelling [22, 37], and MMP-13 is involved in tumor growth by regulating the activity and bioavailability of the growth factors sequestered in the ECM [38]. Regarding the HDACs, we have found that the alterations produced by radiation may depend on the dose administered and the cell subpopulation studied; which could alter the regulation they exert on the MMPs after said radiation. Regarding the TIMPs, we generally saw an increase in the expression levels of TIMP-1 in the 3D+IrECM culture, and of TIMP-2 in the 3D culture, showing statistical significance when comparing the cell subpopulations.

In the determination of gene expression in co-cultures in Matrigel after radiation, the same genes were detected in the three tumor lines. Our results showed a significant increase in the expression of most of the genes at the dose of 6 Gy in the three tumor lines, but mainly, in the tumor line MDA-MB-231.

In the monitoring of tumor growth in mice, we could see that this growth depends not only on the dose of radiation but also on the cell subpopulation studied. The highest volume tumor was obtained in the general subpopulation, which contains both CSCs and non-CSCs. We also saw that the tumors derived from cells irradiated at 2 Gy in the general and positive subpopulations, both containing the fraction of CSCs, have presented a larger volume with respect to the non-irradiated control. This would support the idea that the dose of 2 Gy would be insufficient to eradicate CSCs due to the radioresistance they present, and that this dose would also be able to promote tumor growth. This effect was more pronounced in the tumors corresponding to the general subpopulation, which suggests the importance of interactions between CSCs and non-CSCs in tumor proliferation after radiation. However, higher doses of radiation (6 Gy) are associated with a delay in tumor growth, probably due to the death of CSCs. These results would support the clinical relevance of hypofractionated regimens in BC.

In the determination of the serum levels of MMPs in BC patients throughout the RT, we found a positive correlation between them before, during and after the RT, becoming stronger with radiation. In the temporary course of treatment, most of the MMPs analyzed increased non-significantly, highlighting the levels of MMP-2 and MMP-9. With respect to TIMPs, we found positive and negative correlations between their serum levels according to the time of RT, with an increase in negative correlations for TIMP-1 and TIMP-3 with radiation. Throughout the treatment, the serum levels of TIMP-1 and TIMP-3 decreased, which could be associated with the increase of some MMPs studied in this work. Regarding the variables studied, we found significant values in the correlations between MMP-3 serum levels and the menopausal state, the tumor classification, the degree of differentiation and the presence of E-cadherin; and between MMP-9 serum levels and the radiotoxicity. In contrast, among the TIMPs we found significant values in the correlations between TIMP-3 serum levels and the RT of the lymph nodes and the radioresistance; and between TIMP-4 serum levels and the presence of E-cadherin, the percentage Ki67 and the involvement of

the sentinel node. Finally, when comparing serum protein levels according to tumor recurrence 6 months after treatment, we obtained an increase in most MMPs and TIMPs after RT in patients with tumor recurrence. These variations were not statistically significant, but they would be supporting the influence of MMPs in the development of carcinogenesis and its relationship with a poor prognosis in BC.

## 5. CONCLUSIONS

1. The expression of the BCSCs markers (ALDH1, CD44<sup>+</sup> and CD24<sup>-/low</sup>) varies with the dose of radiation administered. In the positive subpopulation (CSCs), high doses of radiation (6 Gy) increases CD44<sup>+</sup>, which is associated with EMT and a poor prognosis in BC.
2. In the *in vitro* 3D and 3D+IrECM studies, the expression of MMPs, TIMPs and HDACs varies depending on the tumor line (MCF-7, MDA-MB-231 and SK-BR-3), the radiation dose (0, 2 and 6 Gy), the cell subpopulation (general, positive or CSCs, and negative or non-CSCs) and the 3D culture model (spheres suspended or embedded in Matrigel).
3. After cell irradiation and in both 3D culture models, MMP-1 increases its expression in the positive subpopulation (CSCs) of the MDA-MB-231 triple negative line, which is the most resistant. This fact suggests the importance of MMP-1 in the process of invasion and metástasis after radiation treatment.
4. The tumor microenvironment is also altered after radiation treatment, affecting the expression of MMPs, TIMPs and HDACs.
5. In the *in vitro* co-culture study (tumor lines with fibroblasts), in general, most of the genes studied increase their expression at high doses of radiation. This behavior supports the importance of the components of the tumor's microenvironment (including fibroblasts) in the progression of the disease.
6. In the *in vivo* study, tumors formed from MDA-MB-231 cells irradiated at 2 Gy prior to inoculation have been of higher volume with respect to the control in the general

and positive subpopulations. This fact shows that low doses of radiation would be insufficient to eradicate CSCs due to their radioresistance, contributing to tumor growth.

7. In tumor development *in vivo*, tumors formed from MDA-MB-231 cells irradiated at 6 Gy prior to inoculation dose have been the smallest within each cell subpopulation. This result suggests that at high doses of radiation (6 Gy) the tumor growth rate and the final volume of the tumor are reduced.
8. The pilot study carried out in BC patients shows that RT induces alterations in the serum levels of MMPs and TIMPs.
9. BC patients with tumor recurrence show an increase in serum levels of all MMPs analyzed and a decrease in TIMP-1 levels. This fact supports the theory that TIMP-1 is the main inhibitor of MMPs and the most related to them. The sample size is small and additional studies are required.
10. Finally, the results obtained in this work confirm the importance of the microenvironment and its components, and of the CSCs in tumor development and in the response to radiation treatment.



# INTRODUCCIÓN

---





## **1. CÁNCER EN LA ACTUALIDAD**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo; en 2015, esta enfermedad ocasionó 8.8 millones de defunciones. Los tipos de cáncer responsables de más fallecimientos son, por orden descendente, los siguientes: pulmonar, hepático, colorrectal, gástrico y mamario [1].

Casi un tercio de las muertes por cáncer se deben a los 5 principales factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol. El envejecimiento es otro factor fundamental en la aparición del cáncer, muy probablemente por combinación entre la pérdida de eficacia de los mecanismos de reparación celular y el acúmulo de los factores de riesgo ya citados [1].

## **2. CÁNCER DE MAMA**

Según los datos recogidos en 2018 por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), el cáncer de mama es el tumor más común en las mujeres y ocupa el segundo lugar a nivel mundial con un 11.6% de todas las nuevas incidencias. Sin embargo, en términos de mortalidad, ocupa el quinto lugar en el mundo con un 6.6% de todas las muertes causadas por cáncer [2]. El principal responsable de este último porcentaje es la metástasis; casi un 90% de las muertes por cáncer de mama se producen por diseminación metastásica de los tumores primarios [39] al pulmón, cerebro, hígado y huesos [40].

Desde un punto de vista clínico, el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea a nivel inter- e intratumoral, lo cual es relevante para el pronóstico y la terapia de esta patología [41]. Otros factores determinantes en el pronóstico del cáncer de mama son: el tipo de tumor (desde un punto de vista histológico y molecular), la localización, el grado de diferenciación, la presencia o ausencia de diferentes proteínas (E-cadherina, p53, Ki67), la afectación del ganglio centinela, la edad del paciente; los cuales intervienen también en la respuesta al tratamiento [3].

La localización del tumor es importante para un pronóstico bueno o malo de la enfermedad. Según la localización, el cáncer de mama puede ser: *in situ* e invasivo o infiltrante [3]. Desde un punto de vista histológico, también puede haber distintos tipos de cáncer de mama: ductal, lobular, de pezón, y no especificado [42]. Además, existe una clasificación molecular del cáncer de mama, la cual influye mucho en la terapia de la enfermedad. Dicha clasificación se basa en la presencia o ausencia de receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR) y receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2). Según estos receptores, el cáncer de mama puede ser: luminal A (ER+ y PR+, HER2-), luminal B (ER+ y PR+, HER2+), basal o triple negativo (ER-, PR- y HER2-) y enriquecido en HER2 (ER-, PR- y HER2+) [43]; siendo el triple negativo el subtipo molecular asociado con un peor resultado [44]. Según la literatura, los distintos subtipos de cáncer de mama pueden presentar distintos patrones de recurrencia, siendo el subtipo luminal A el de menor riesgo, y los subtipos triple negativo y enriquecido en HER2 los de mayor riesgo [43]. Además, HER2 está vinculado con las células madre tumorales (CSCs) de mama y se está utilizando como un marcador predictivo para el diagnóstico de cáncer de mama metastásico [45].

El grado de diferenciación indica la tasa de crecimiento y diseminación del tumor, y su determinación se basa en la similitud que presentan las células tumorales al ser comparadas con las células normales del tejido mamario. Teniendo en cuenta esto, los tumores se diferencian en tres grados: grado I o bien diferenciados (crecimiento lento, células tumorales similares a las normales y bien organizadas); grado II o moderadamente diferenciado (crecimiento y apariencia entre grado I y grado III); y grado III o mal diferenciado (crecimiento y diseminación rápidos, y apariencia muy diferente de las células normales) [3].

Las proteínas Ki67, p53 y E-cadherina se consideran marcadores de pronóstico. Hay evidencias de que Ki67 está involucrada en la división celular [46] y su detección inmunohistoquímica (IHC) se usa para evaluar la proliferación de los tumores. El índice Ki67 se expresa como el porcentaje de células marcadas positivamente con respecto al número total de células tumorales analizadas [47]. Principalmente, Ki67 se utiliza para diferenciar el tumor luminal A del tumor luminal B [48].

La proteína p53 está involucrada en el desarrollo del cáncer debido a mutaciones de TP53 o a cambios en el estado de los moduladores de p53, lo cual impide su activación [49]. Varios estudios en ratones han demostrado que las mutaciones de p53 pueden dar como resultado un comportamiento tumoral más agresivo y provocar metástasis [50-51]. Por el contrario, la proteína de tipo salvaje tiene actividad supresora de tumores, lo que le permite detectar eventos oncogénicos en células cancerosas y eliminarlos por senescencia o apoptosis. Además de esto, p53 también participa en otros procesos como la respuesta al daño del DNA, el envejecimiento, el metabolismo, la diferenciación de las células madre, la fertilidad y la angiogénesis [49].

La proteína E-cadherina media la adhesión célula-célula y es expresada por las células epiteliales [52]. El daño en su estructura o la alteración en su expresión están relacionados con la progresión tumoral y la metástasis [53]. Sin embargo, algunas metástasis distantes presentan una expresión alta de E-cadherina [54]. Esta proteína también es supresora de tumores mediante mecanismos que promueven la organización de los tejidos y bloquean la apoptosis [55]. Con respecto al cáncer de mama, los estudios *in vitro* han demostrado que la E-cadherina se utiliza para caracterizar los histotipos tumorales, lo cual es importante para las nuevas terapias dirigidas [56].

El ganglio linfático centinela, primer ganglio linfático alcanzado por las células tumorales que se diseminan a través de la linfa, es importante para el pronóstico de la enfermedad, pero también para la invasión y metástasis a los ganglios linfáticos [57]. La biopsia del ganglio linfático centinela está siendo esencial para evaluar la extensión loco-regional de la enfermedad. Diferentes estudios han demostrado que los pacientes con biopsia de ganglio linfático centinela negativo no requieren disección de la cadena linfática axilar [58].

La edad y el estado menopáusico es otro factor a considerar en el desarrollo del cáncer de mama. Alrededor de los 40 años, los lóbulos mamarios se someten a una involución lobular relacionada con la edad (ARLI), la cual se acelera después de la menopausia y se asocia con un menor riesgo de cáncer de mama [59-60]. Hanna *et al.* estudiaron la asociación entre ARLI y la inflamación local del tejido mamario, para poder conocer el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Este estudio reveló asociaciones significativas inversas entre

ARLI y altos niveles de marcadores proinflamatorios; es decir, las mamas menos involutivas se asocian con un mayor riesgo de enfermedad y viceversa [61].

Además de todos los factores descritos, las CSCs también están involucradas en el desarrollo y crecimiento del cáncer [11].

### **3. RADIACIÓN IONIZANTE (RI)**

La radiación ionizante (RI) ha sido uno de los principales tratamientos oncológicos utilizados en cáncer durante más de 100 años [10]. La terapia con radiación, radioterapia (RT), se usa en el tratamiento de la mayoría de los tumores debido a que la energía asociada a la radiación ionizante es suficiente como para dañar el DNA de las células [4].

Al trabajar con radiación es muy importante conocer el concepto de dosis umbral, que para un efecto dado, se puede definir como la dosis por debajo de la cual no se produce efecto [4]. La selección de un régimen radioterápico adecuado no sólo depende de dicha dosis umbral, sino también de las características del paciente, y de los tejidos y órganos donde se encuentra ubicado el tumor. Además, la RT puede ser combinada con cirugía y/o terapia sistémica [5].

En cáncer de mama, el régimen radioterápico más aplicado en clínica es la RT convencional, que consta de fracciones diarias de 2 Gray (Gy) hasta alcanzar una dosis total de 45-50 Gy. Alternativamente, cada vez se usa más la RT hipofraccionada, la cual implica dosis de radiación más altas en tiempos más cortos de tratamiento, con la misma eficacia y menor toxicidad. Un régimen de hipofraccionamiento muy utilizado se asocia con el empleo de fracciones de 2.66 Gy, aunque en cáncer de mama se están administrando incluso fracciones de 6 Gy [6-9].

La toxicidad es otro factor a tener en cuenta al trabajar con radiación, ya que depende principalmente del régimen radioterápico elegido y de la dosis total administrada, pero también del volumen irradiado y de la edad del paciente. Dicha toxicidad se puede poner de manifiesto con 2 tipos de efectos adversos [5, 62]:

- Agudos. Aparecen en los 3 primeros meses del tratamiento. Son el resultado de cambios en la permeabilidad celular y en la liberación de mediadores inflamatorios.
- Tardíos/crónicos. Aparecen después de 3 meses de tratamiento. Son el resultado de una lesión directa en el tejido diana y de reacciones tempranas graves.

En cáncer de mama, la toxicidad cutánea es el efecto adverso más común y, generalmente, se presenta como eritema, descamación, ulceración y hemorragia (efectos agudos) e hiperpigmentación y telangiectasia (efectos crónicos). De Felice *et al.* encontraron que la RT convencional y un mayor volumen de mama irradiado tienen un efecto negativo sobre la toxicidad aguda de la piel [5].

La eficacia total obtenida con la RT no sólo depende de todo lo descrito (dosis umbral, régimen radioterápico, ubicación del tumor, toxicidad), sino también de la resistencia presentada por los pacientes frente a este tratamiento [4-5]. Esta resistencia se debe a la heterogeneidad y complejidad biológica que presentan ciertos tumores y, principalmente, a las CSCs presentes en ellos [10]. La resistencia presentada por dichas células es debida a una radioadaptación, es decir, una modificación de la respuesta a la exposición de radiación. En el desarrollo de dicha adaptación se han distinguido 2 etapas [4]:

- Adaptación inicial. Tiene lugar justo después de la exposición e implica mecanismos fisiológicos.
- Adaptación persistente. Se desarrolla gradualmente e implica mecanismos como la estimulación de la reparación del DNA, inducción de la síntesis de proteínas, activación de sistemas radioprotectores, etc.

La radioresistencia es otro factor a tener en cuenta, ya que puede provocar recurrencia después del tratamiento y metástasis [10].

#### **4. CÉLULAS MADRE TUMORALES (CSCs)**

Las CSCs constituyen un pequeño porcentaje de células dentro del tumor [11], que se distinguen del resto de células por la asimetría de su división celular y por alteraciones en su

expresión génica [63].

Los primeros datos sobre la existencia de CSCs son de 1996 y se basan en alteraciones cromosómicas idénticas en regiones contiguas del epitelio mamario [64-66]. El concepto de estas células ha existido durante muchas décadas, pero aún sigue evolucionando [41], ya que ha sido difícil definir su origen y su proporción en un determinado tumor [67]. Hay tres modelos que intentan explicar el origen de las CSCs en el desarrollo tumoral [68]:

- Modelo estocástico o modelo de evolución clonal. Establece que todas las células tumorales tienen la misma probabilidad de ser la célula que origina el tumor y que todas ellas intervienen en el mantenimiento tumoral mediante distintas capacidades que dependen del microambiente en el que las células se encuentran [69].
- Modelo jerárquico o modelo CSCs. Defiende que los tumores tienen una organización jerárquica, en la cual las CSCs representan el origen. Según este modelo, la carcinogénesis se inicia cuando una célula madre sana escapa de la regulación convirtiéndose en CSC, la cual genera el resto del tumor [70].
- Modelo dinámico CSCs. Postula que el fenotipo de las CSCs es más flexible de lo establecido en el modelo jerárquico y que está muy condicionado por el microambiente tumoral [71].

Las CSCs presentan un potencial tumorigénico aumentado y ciertas características de las células madre/progenitoras normales [41]. Estas células han sido objeto de estudio por ser capaces de originar, mantener y expandir tumores [11-12]. Además, presentan capacidad de autorenovación, de supervivencia en el torrente sanguíneo y de resistencia a los tratamientos oncológicos como la RT y la quimioterapia [12-14]. Debido a todo esto, las CSCs desempeñan un papel importante en los procesos de metástasis y recurrencia de tumores [16-19].

La metástasis es un proceso complejo a través del cual, las células de tumores sólidos primarios invaden tejidos adyacentes y distantes, produciendo el crecimiento de tumores secundarios. Estas metástasis pueden iniciarse a partir de la formación de nichos premetastásicos, nichos formados por las CSCs en los órganos diana [72].

Por todas las características y propiedades citadas, en cáncer de mama, las CSCs están siendo candidatas como nuevas perspectivas terapéuticas [20]. Para ello, su caracterización es esencial en la investigación. Ginestier *et al.* demostraron que, dentro del tumor, estas células muestran una mayor actividad para la enzima aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) mediante el ensayo de Aldefluor [73]. Por otro lado, los marcadores de membrana establecidos para estas células son CD44<sup>hi</sup>/CD24<sup>-</sup>, CD133<sup>+</sup> o CD29<sup>hi</sup>/CD61<sup>+</sup> [6, 11-12, 20, 41, 74-75].

Como consecuencia a todo lo citado, cada vez serán más necesarias las terapias dirigidas a las CSCs para una completa erradicación del tumor [12], ya que son las responsables de la morbilidad y mortalidad asociadas a dicha enfermedad [20].

## **5. RESISTENCIA DE LAS CSCs A LA RI**

Dentro del tumor, las células sufren una serie de efectos provocados por la radiación ionizante: senescencia, quiescencia, inestabilidad genómica y epigenómica, modificación del metabolismo y del ciclo celular, daño en el DNA y alteración en su reparación, y muerte celular. Dichos efectos dependen de todo lo descrito hasta el momento (dosis umbral, régimen radioterápico, dosis total, ubicación del tumor), pero también de la transferencia lineal de energía (LET), que es la cantidad de energía que se deposita en las células cuando interaccionan con la radiación ionizante [76]. Además, dicha radiación, al llegar a las células, puede producir un efecto conocido como “mecanismo bystander”, que es el daño producido en las células no irradiadas adyacentes a las irradiadas como resultado de una comunicación intercelular entre ellas [77-79].

Los efectos provocados por la radiación pueden ser reparados por las células tumorales mediante propiedades intrínsecas y extrínsecas, los cuales les proporcionan la capacidad de recuperación, induciéndoles radioresistencia. Dicha recuperación se da en todas las células tumorales, siendo más rápida en aquellas que son CSCs. En las propiedades intrínsecas se incluyen los siguientes mecanismos: reparación del DNA, puntos de control en la fase del ciclo celular en la que se lleva a cabo la radiación y distintas vías de supervivencia

(Hedgehog, Notch, Wnt/ $\beta$ -catenina). Las propiedades extrínsecas, en cambio, incluyen señales procedentes del entorno extracelular (nicho y microambiente) [15].

### 5.1. Reparación del DNA

Este mecanismo es esencial para la supervivencia de las células, y puede llevarse a cabo mediante reparación de apareamiento erróneo de bases (“mismatch repair”) [80-82], reparación de escisión de bases (BER) [83-86], reparación de escisión de nucleótidos (NER) [84, 87-88], reparación por recombinación homóloga (HR) [89-90] o reparación de uniones finales no homólogas (NHEJ) [91-92].

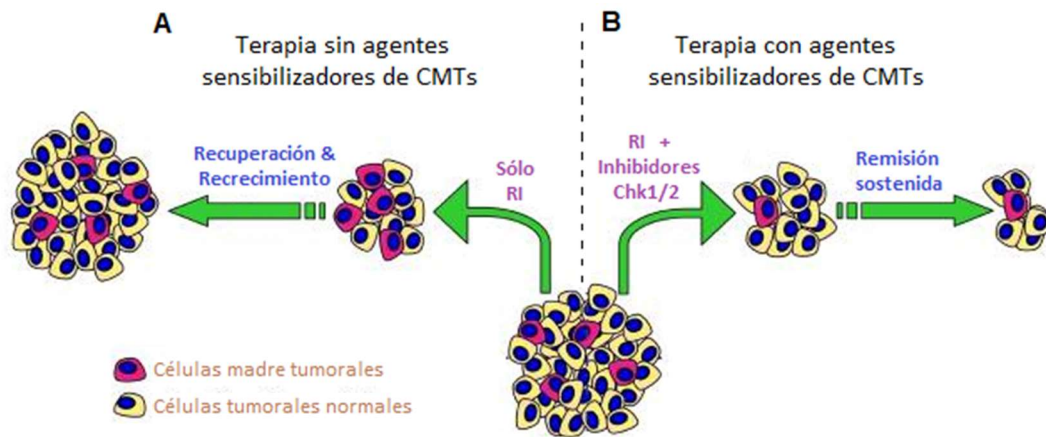
En la reparación del DNA intervienen una serie de proteínas como la ataxia telangiectasia mutada (ATM), DNA-PKc, BRCA1/2, Chk2, p53 y otras de la familia RAD [93-94].

### 5.2. Puntos de control del ciclo celular

Este mecanismo está relacionado con paradas en diferentes momentos del ciclo celular, permitiendo a las células mayor tiempo para la reparación del DNA. Este retraso en la progresión del ciclo está regulado, principalmente, por las quinasas de los puntos de control, Chk1 y Chk2, y por la ATM. Estos puntos de control son activados más fácilmente por las CSCs que por las células no madre. De hecho, las CSCs muestran una activación basal de los puntos de control [95].

Sabiendo las proteínas que intervienen en este mecanismo, los puntos de control pueden ser una posible diana terapéutica. Se podrían administrar inhibidores de dichas proteínas junto a la RT para disminuir la radioresistencia y mejorar la eficacia del tratamiento. La inhibición de Chk1/2 evitaría las paradas del ciclo celular y, por tanto, impediría la reparación completa del DNA. De este modo, también se impediría la recuperación de las células, provocándoles mayor sensibilidad a la RT [15, 95]. Un ensayo *in vitro* de formación de colonias y otro *in vivo* de crecimiento tumoral sugieren que una respuesta intacta de Chk1/2 es fundamental para la radioresistencia de CSCs de glioblastoma (**Esquema 1**) [95].





**Esquema 1:** Sensibilizadores de CSCs en RT. Las CSCs pueden sobrevivir a un tratamiento exclusivo de RT (A) y, sin embargo, podrían radiosensibilizarse al combinar la RT con inhibidores de Chk1/2 (B).

Esquema adaptado de *Eyler et al., J Clin Oncol, 2008* [95].

### 5.3. Vías de supervivencia

Las CSCs presentan 3 vías de supervivencia como mecanismo de radioresistencia: vía Hedgehog, vía Notch y vía Wnt/ $\beta$ -catenina.

#### 1.3.1. Vía Hedgehog

La vía Hedgehog juega un papel importante no sólo en el mantenimiento y la supervivencia de las CSCs, sino también en su proliferación [96-99]. La activación de esta vía favorece la repoblación de las CSCs después de la RT, provocando radioresistencia y fracaso al tratamiento [100].

Estudios realizados en CSCs de glioblastoma, han puesto de manifiesto que la vía Hedgehog interviene en las recaídas tras la RT por su implicación en la autorenovación y la tumorigenicidad de las células [101]. En este tipo de tumor, esta vía de supervivencia parece ser dependiente de un factor similar al factor de crecimiento de la insulina (IGF) [102], el cual induce la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) que, a su vez, promueve la supervivencia celular. Todo esto provoca una proliferación celular incontrolada y, por tanto, una alta capacidad tumorigénica en las CSCs [103].

### 1.3.2. Vía Notch

La vía Notch es crucial en la autorenovación de las CSCs, y se asocia con la inhibición de su diferenciación [104-105] mediante un aumento de los niveles del receptor activado Notch1 tras la radiación [106]. La activación de esta vía favorece la repoblación acelerada de las CSCs después de la RT, provocando radioresistencia [107].

Hay evidencias de esta vía de supervivencia en glioblastoma, donde se asocia con la activación de otras vías como la del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), favoreciendo no sólo la reparación de DNA en las CSCs sino también su regeneración y supervivencia [108-109].

### 1.3.3. Vía Wnt/ $\beta$ -catenina

La vía de Wnt/ $\beta$ -catenina también interviene en la autorenovación de las CSCs, mediante un aumento de los niveles de  $\beta$ -catenina activados tras la radiación. La activación de esta vía favorece la proliferación de las CSCs y su estabilidad en los nichos después de la RT, provocando radioresistencia [95, 110-112].

Además, esta vía de supervivencia está relacionada con la reparación de DNA y con los puntos de control del ciclo celular [113], lo que favorece aún más la supervivencia de las CSCs y su radioresistencia.

## 5.4. Nicho y microambiente tumoral: hipoxia y angiogénesis

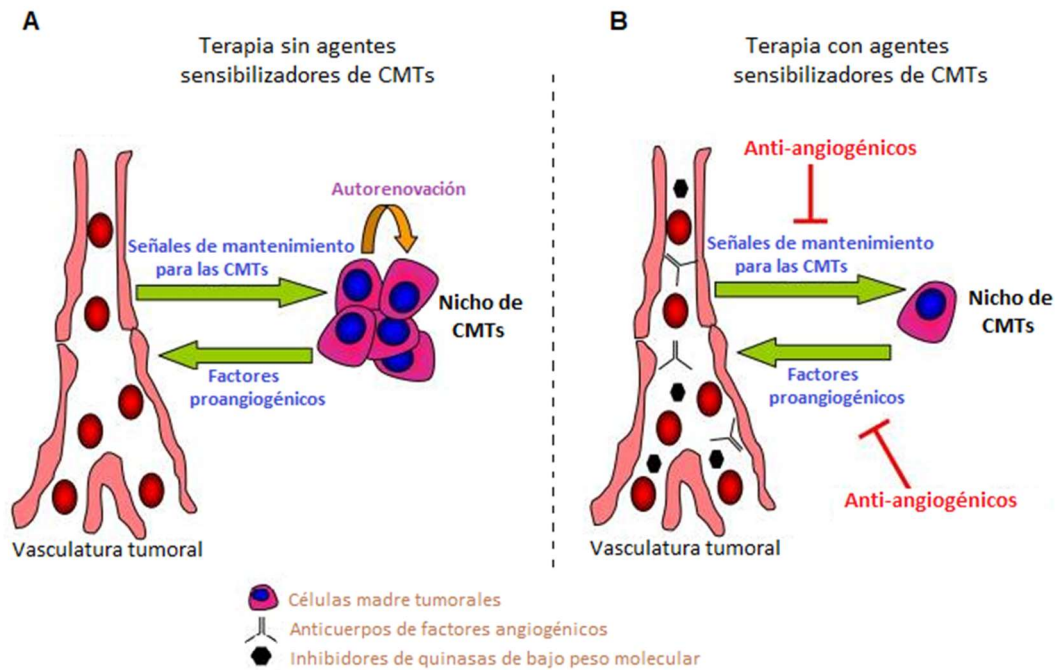
El microambiente tumoral es especialmente importante para las CSCs, ya que sus interacciones con los elementos estromales constituyen el nicho de éstas. Dentro de los nichos, las CSCs pueden regular dichas interacciones por contacto célula-célula o mediante la secreción de moléculas reguladoras, favoreciendo su proliferación o inhibiendo su diferenciación [114].

Los propios nichos también pueden alterarse tras la radiación y, por tanto, afectar a la supervivencia de las CSCs [112, 114-116]. Como consecuencia, los nichos producen citoquinas de supervivencia como son el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de

crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), induciendo así radioresistencia y radioprotección a las CSCs [114].

Con respecto al nicho y al microambiente tumoral, en la radioresistencia de las CSCs hay otros dos factores a tener muy en cuenta: la hipoxia y la angiogénesis. La hipoxia es una deficiencia de oxígeno, y la concentración de éste es determinante en el momento de la radiación debido a su potencia radiosensibilizadora y a su capacidad de formar radicales libres que dañan el DNA [117-120]. Además, en estado de hipoxia se aumenta la expresión del factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), protegiendo a las CSCs del daño oxidativo y contribuyendo a su resistencia frente a la radiación [113, 121-122]. Por otro lado, la angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, y está meticulosamente regulada mediante un equilibrio de factores pro- y antiangiogénicos. La situación de hipoxia estimula dicha angiogénesis a través de HIF-1 $\alpha$  mediante la activación de factores proangiogénicos como el VEGF, lo que provoca un aumento de la radioresistencia [123]. Además, las propias CSCs también intervienen en la angiogénesis aumentando los niveles de factores proangiogénicos [124].

Al igual que los puntos de control, la angiogénesis puede ser una diana terapéutica. Calabrese *et al.* confirmaron que las CSCs generan VEGF y otros factores que inducen la angiogénesis, pero también que estas células dependen de los factores generados por la propia vasculatura. Debido a esto, inhibidores de la angiogénesis podrían ser administrados junto a la RT para impedir la formación de nuevos vasos sanguíneos y el mantenimiento del nicho y de las CSCs, proporcionando efectos antitumorales (**Esquema 2**) [95, 125].



**Esquema 2:** Agentes antiangiogénicos dirigidos tanto al mantenimiento del nicho como a la formación de la vasculatura tumoral. **(A)** Las CSCs generan factores proangiogénicos para estimular la angiogénesis, mientras que la vasculatura del tumor ayuda a mantener la autorenovación y el mantenimiento de dichas células. **(B)** Los agentes antiangiogénicos (ej. anti-VEGF, inhibidores de quinasa de bajo peso molecular) interrumpen la angiogénesis y las señales originadas en la vasculatura para el mantenimiento de las CSCs.

Esquema adaptado de *Eyler et al., J Clin Oncol, 2008* [95].

## 6. METALOPROTEASAS (MMPs) Y SUS INHIBIDORES

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son endopeptidasas dependientes de zinc secretadas como zimógenos por células tumorales y estromales. En humanos, se han descrito 23 MMPs [126], y se pueden dividir en diferentes subfamilias en función de su estructura, especificidad de sustrato, homología de secuencia, localización celular y secreción. La **Tabla 1** recoge el método de clasificación más usado, basado en su localización y en su especificidad de sustrato [21].

**Tabla 1:** Clasificación de MMPs basada en la especificidad de sustrato y localización celular.

Tabla adaptada de *Artacho-Cordón et al., Surg Oncol, 2012* [21].

SUBFAMILIAS	MIEMBROS	SUSTRATO
Colagenasas	MMP-1	Colágeno fibrilar de triple hélice
	MMP-8	
	MMP-13	
Estromelisinás	MMP-3	Componentes de la ECM, excepto el colágeno fibrilar de triple hélice
	MMP-10	
	MMP-11	
Gelatinasas	MMP-2	Gelatina
	MMP-9	
Matrilisinás	MMP-7	Familia TNF; Componentes de la ECM
	MMP-26	
MMPs de tipo membrana	MMP-14 (MT1-MMP)	Zimógenos
	MMP-15 (MT2-MMP)	
	MMP-16 (MT3-MMP)	
	MMP-17 (MT4-MMP)	
	MMP-24 (MT5-MMP)	
	MMP-25 (MT6-MMP)	
Otras MMPs	MMP-12	
	MMP-19	
	MMP-20	
	MMP-21	
	MMP-23A	
	MMP-23B	
	MMP-27	
	MMP-28	

Las MMPs participan principalmente en la remodelación de la matriz extracelular (ECM) [22], pero también son capaces de procesar proteínas no relacionadas con dicha matriz y de activar otras MMPs [23]. Estas enzimas, además, son reguladores clave en las interacciones célula-célula [24] y están involucradas en el recambio de fibras estromales [25]. A parte de esto, las MMPs participan en gran variedad de procesos biológicos normales [24] y carcinogénicos (crecimiento tumoral, evasión de apoptosis, angiogénesis, respuesta a la inflamación, transición epitelial-mesenquimal (EMT), formación de nichos premetastásicos, invasión y metástasis) [26-27].

Hay evidencias de que los procesos carcinogénicos citados se favorecen tras la radiación por un aumento de la actividad de las MMPs, la cual necesita ser regulada por inhibidores

tisulares endógenos de las MMPs (TIMPs) y, mediante mecanismos epigenéticos, por histonas desacetilasas (HDACs) [21]. El equilibrio entre las MMPs y sus inhibidores regula la remodelación de la ECM durante el desarrollo normal y patogénico [127]. Debido a ello, las MMPs serían otra posible diana terapéutica para mejorar la eficacia de la RT, desempeñando un papel crucial en la progresión del cáncer y en la disminución de la metástasis [21, 128].

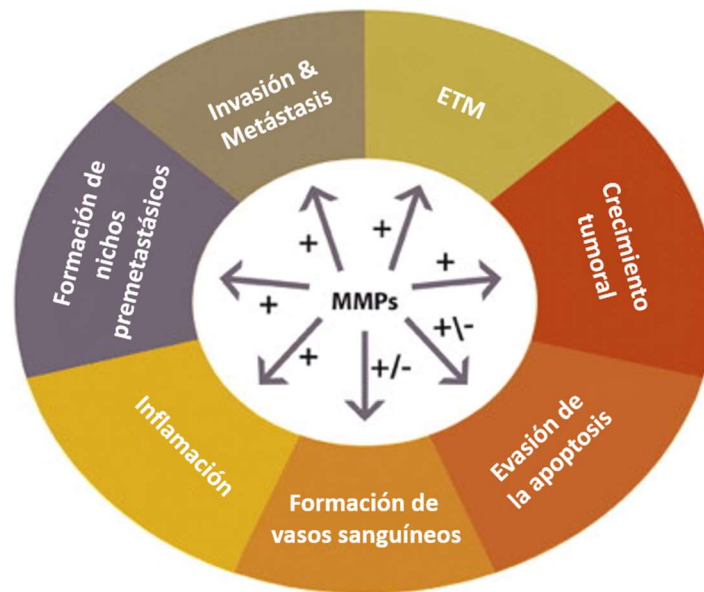
Los TIMPs no sólo son inhibidores de las MMPs, sino que también tienen actividades biológicas independientes de ellas, como son el crecimiento y la diferenciación celular, la angiogénesis, la apoptosis y la plasticidad sináptica [28]. Los cuatro TIMPs descritos en humanos (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4) difieren en los espectros de inhibición y en la afinidad por las MMPs humanas [127, 129].

Las HDACs son enzimas que participan en el silenciamiento de genes mediante la eliminación de grupos acetilo de la cromatina. Sin embargo, el proceso de desacetilación de las histonas favorece la evasión de la apoptosis e induce la no respuesta a señales antiproliferativas [29]. Por lo que se requieren inhibidores de HDACs (HDACIs) para compensar la situación [130]. En los seres humanos, existen 18 HDACs divididas en cuatro clases en función de su homología con sus equivalentes en levaduras [131-132].

En el cáncer de mama, los cambios en la expresión de MMPs pero también en la de sus inhibidores, pueden contribuir al desarrollo tumoral; por lo que se han examinado como posibles biomarcadores de pronóstico en este tipo de cáncer [27]. Hay estudios que relacionan altos niveles séricos de MMPs y TIMPs con un mal pronóstico [28, 127]; concretamente, la MMP-1, MMP-9, MMP-11, MMP-12, MMP-14 y MMP-15 se han identificado como factores predictivos de resultados adversos y se han relacionado con escasa supervivencia [133-134]. En las implicaciones pronósticas también influye el tipo de célula que expresa las MMPs (células estromales frente a células tumorales) [27]. Diferentes estudios demuestran que la inmunotinción de MMP-1, MMP-7, MMP-9, MMP-11, MMP-13 y MMP-14 en células tumorales, en fibroblastos del estroma y en células inflamatorias mononucleares se asocia con una menor supervivencia sin recaída [135-136].

## 7. PAPEL DE LAS MMPs EN LA CARCINOGENÉISIS

Como se ha citado anteriormente, las MMPs no sólo participan en procesos biológicos normales [24] sino que también están involucradas en diferentes procesos de la carcinogénesis (**Esquema 3**) [21, 26-27].



**Esquema 3:** Papel de las MMPs en la carcinogénesis. Las MMPs modulan la progresión tumoral mediante su implicación en la invasión y metástasis, la EMT, el crecimiento tumoral, la evasión de la apoptosis, la formación de vasos sanguíneos, la inflamación y la formación de nichos premetastásicos.

Esquema adaptado de *Artacho-Cordón et al., Surg Oncol, 2012* [21].

### 7.1. Invasión y metástasis

La invasión y metástasis tienen lugar debido a la degradación de la ECM que rodea al tumor. Dicha degradación, es llevada a cabo principalmente mediante las MMPs colagenasas y gelatinasas, aunque también intervienen algunas MMPs de tipo membrana como MT1-MMP, MT2-MMP y MT3-MMP. En primer lugar, las colagenasas, MMP-1, MMP-8 y MMP-13, se encargan de degradar el colágeno fibrilar de triple hélice, dividiéndolo en 2 segmentos que se desnaturalizan espontáneamente en gelatina. En segundo lugar, las gelatinasas, MMP-2 y MMP-9, se encargan de degradar dicha gelatina formada [137].

En este proceso, se podría decir que la MMP-1 es la más importante debido a que es la única MMP capaz de degradar todos los tipos de colágeno de la glándula mamaria y, además, es esencial en la degradación de fibras estromales en distintas enfermedades entre las que se incluye el cáncer de mama [138]. La MMP-1 también juega un papel crucial en la red de señalización MMP-1/PAR-1, siendo este último un receptor de membrana que activa proteasas y que también está involucrado en la invasión y metástasis. Boire *et al.* observaron que la MMP-1 se secretaba sólo por los fibroblastos próximos al tumor, poniendo de manifiesto la importancia del microambiente en el desarrollo tumoral [139].

Por otra parte, es importante considerar las MMP-2 y MMP-9, que son las mayores responsables de la remodelación de la ECM. Una alta actividad de estas MMPs aumentaría la degradación de la membrana basal, favoreciendo la invasión tumoral. Además, las gelatinasas se encargan de la degradación final del colágeno, liberando células tumorales [37]. Por estas razones, las MMP-2 y MMP-9 se están convirtiendo en biomarcadores para la metástasis [140-141].

Como ya se ha dicho, algunas MMPs de tipo membrana también intervienen en la invasión y metástasis. Hay evidencias de que la inducción de MT1-MMP y MT2-MMP aumenta la invasión de células tumorales a través de la membrana basal [142], y que la invasión también se encuentra potenciada por MT3-MMP en células de melanoma [143].

## **7.2. Transición epitelial-mesenquimal (EMT)**

El término EMT describe los cambios estructurales y funcionales que tienen lugar en las células epiteliales cuando migran a través de la membrana basal y adoptan características de células mesenquimales [144-145]. Este proceso está regulado por las MMP-3 y MMP-28. En un estudio se pudo ver que la expresión de MMP-28 estabiliza la EMT en células de adenocarcinoma de pulmón A549 [146]. En cuanto a la MMP-3, se ha visto que participa, junto con la MMP-7, en la ruptura de las uniones mediadas por E-cadherina, lo cual favorece la invasión [26]. Además, la MMP-3 genera especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante el empalme alternativo de Rac1b. Este último, inducido por ROS, estimula factores de transcripción como Snail, el cual promueve la expresión de proteínas mesenquimales, como la fibronectina y la MMP-9 [147-148].



### 7.3. Crecimiento tumoral

Las MMP-9 y MMP-13 intervienen en el crecimiento tumoral mediante una desregulación en el equilibrio de señales pro- y antiproliferativas en el microambiente tumoral. Dicho crecimiento es inhibido por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el cual es activado proteolíticamente por la MMP-9 y está involucrado en una vía de señalización supresora de tumores [149-150]. Por otro lado, la MMP-13 interviene en el crecimiento tumoral por regulación de la actividad y la biodisponibilidad de los factores de crecimiento secuestrados en la ECM [38]. Además, esta MMP se ha relacionado con un fenotipo tumoral agresivo y un mal pronóstico en cáncer de mama [135, 151].

### 7.4. Evasión de la apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que se puede iniciar por una vía intrínseca o mitocondrial mediada por p53, o por una vía extrínseca mediada por receptores de muerte en la superficie de la membrana. Ambas vías coinciden en la activación de la caspasa y la posterior muerte celular. Los receptores de muerte involucrados pertenecen a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), los cuales son sustratos de la MMP-7 y promueven la apoptosis a través de su activación proteolítica [21, 152]. Además, distintos estudios confirman que niveles muy altos de esta MMP desarrollan resistencia a la apoptosis y un efecto protumoral [153-154].

### 7.5. Formación de vasos sanguíneos

La formación de nuevos vasos sanguíneos se puede llevar a cabo tanto por vasculogénesis (a partir de angioblastos) como por angiogénesis (a partir de vasos preexistentes) [21]. Dicha angiogénesis está asociada, además, con la remodelación de la ECM, ambas necesarias para el crecimiento e invasión tumoral [155-156].

Las MMPs implicadas en este proceso son MMP-2, MMP-9 y MMP-12, cuya función puede variar según la biodisponibilidad de sustrato y el momento de su actividad, generando señales pro- o antiangiogénicas [157]. La MMP-9 está involucrada tanto en la vasculogénesis [158] como en la estimulación de la angiogénesis regulando la disponibilidad de VEGF [159-160]. Por otro lado, se han identificado fragmentos derivados de la remodelación de la

ECM con propiedades antiangiogénicas. Además, el plasminógeno degradado por las MMP-2, MMP-9 y MMP-12 genera angiostatina, que también es antiangiogénica. [157].

### **7.6. Respuesta inflamatoria**

La inflamación es una respuesta fisiológica a la producción de citoquinas y quimiocinas, la cual está modulada por la MMP-7. La principal citoquina modulada por esta MMP es TNF- $\alpha$  y la principal quimiocina, CXCL1. TNF- $\alpha$  es primordial en la modulación de la respuesta inmunológica y está presente en el microambiente tumoral produciendo MMP-7. Existe una relación entre niveles elevados tanto de TNF- $\alpha$  como de MMP-7 [161]. Por otro lado, CXCL1 tiene actividad quimioestática y su función está regulada indirectamente por MMP-7 [150].

### **7.7. Formación de nichos premetastásicos**

Las células metastásicas tienen preferencias por ciertos órganos a la hora de formar tumores secundarios; en el caso del cáncer de mama, son el hueso o el pulmón [162-163]. Esto significa que la diseminación de las células tumorales no es un mecanismo aleatorio, sino que dichas células requieren la formación de un entorno receptivo en el que participan las MMPs. Dicho entorno es llamado nicho premetastásico y en él interviene, principalmente, la MMP-2 [150]. En la formación del nicho premetastásico es esencial la proteína lisil oxidasa (LOX), la cual es secretada por las células tumorales hipóxicas y, al acumularse en estos sitios, induce la formación de enlaces cruzados de colágeno IV en la membrana basal. Este colágeno se necesita para reclutar las células mieloides positivas para CD11b, que al adherirse producen MMP-2. Finalmente, la MMP-2 degrada el colágeno IV mediante la liberación de péptidos, los cuales funcionan de guía para que las células derivadas de la médula ósea formen tumores en dichos sitios [150, 164].

## **8. ALTERACIÓN DE LAS MMPs TRAS RI**

La exposición a la radiación produce una serie de cambios en el microambiente que contribuyen a los efectos antitumorales de la RT [21]. Sin embargo, se puede llegar a tener efectos contrarios debido a una desregulación de las MMPs tras la radiación. Hay evidencias

de que la radiación promueve el crecimiento del tumor y favorece el comportamiento metastásico de las células tumorales en el microambiente irradiado [114, 165-166]. También se ha descrito que la RT puede aumentar la tasa de proliferación celular, reduciendo el control local y la respuesta al tratamiento [167].

La alteración directa de las MMPs puede afectar en la carcinogénesis debido a un comportamiento agresivo en las células tumorales por parte de dichas MMPs [21]. Este comportamiento podría influir en el crecimiento tumoral, la diseminación celular y la neovascularización [168]. La influencia de las MMPs en la carcinogénesis también podría deberse a cambios epigenéticos en el microambiente, los cuales tienen lugar tras la radiación mediante la modificación de HDACs [169].

La actividad de las MMPs está estrechamente relacionada con los niveles de estrés oxidativo celular, el cual puede tener lugar durante el crecimiento celular pre- y postneoplásico mediante un desequilibrio entre la producción de estrés y los mecanismos antioxidantes de defensa. Dicho desequilibrio viene dado, tras la radiación, por un aumento en la generación de radicales libres [170-172].

En cáncer de mama, Cao *et al.* demostraron que las MMPs también pueden ser alteradas por una sobreexpresión en las células tumorales de integrina  $\alpha_v \beta_3$ , la cual interviene en la transformación del carcinoma de mama en un fenotipo más agresivo tras la radiación [173].

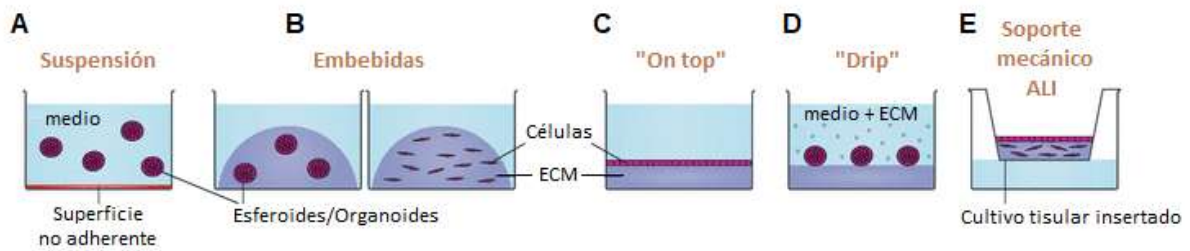
## **9. IMPORTANCIA DEL MICROAMBIENTE EN EL CRECIMIENTO CELULAR: CULTIVOS TRIDIMENSIONALES (3D)**

El microambiente del tejido, incluyendo la ECM y las células vecinas, es fundamental para la forma, la función, el desarrollo y el crecimiento del tejido [30-31], no sólo en la clínica o en *in vivo* sino también a nivel experimental *in vitro*. Los cultivos celulares bidimensionales (2D) tradicionales son fáciles de trabajar, pero carecen del contexto ambiental y de la

arquitectura estructural adecuados, provocando cambios funcionales en las células. Al cultivar en monocapa 2D, las células epiteliales normales suelen perder diferenciación, volviéndose altamente plásticas y desarrollando características mostradas por las células tumorales; y las células malignas pueden diferir de sus equivalentes en el tumor sólido [32, 174].

Teniendo en cuenta las interacciones célula-célula y célula-ECM, y consiguiendo una alternativa fisiológicamente más relevante, los cultivos celulares tridimensionales (3D) están siendo una herramienta esencial en el desarrollo celular y en la biología del cáncer. Este tipo de cultivo permite a las células desarrollar importantes características presentes en los tejidos como son morfología, polaridad, diferenciación [32], expresión génica [175-177], tasa de proliferación [178], heterogeneidad celular, y gradientes de oxígeno y de nutrientes [179-180]. Además, los cultivos 3D se han convertido en una válida alternativa al uso de los modelos animales, debido a que imitan las condiciones *in vivo* a través de un microambiente controlado y reproducible [32].

Los cultivos celulares 3D han evolucionado mucho desde su primer empleo (década 1970), pero aún se están desarrollando y perfeccionando de acuerdo con necesidades científicas específicas, con el objetivo de conseguir recrear órganos completos [181]. Las células pueden cultivarse en 3D mediante diferentes técnicas: en suspensión sobre superficies no adherentes; embebidas en una ECM/hidrogel; “on top”: en la superficie de la ECM; cultivo por goteo (“drip”): en la superficie de la ECM añadiendo al medio gotas de ECM; en soportes mecánicos mediante una interfase aire-líquido (ALI), si se desea (por ejemplo, mediante insertos de cultivo tisular) (**Esquema 4**) [32, 182].



**Esquema 4:** Técnicas de cultivo celular 3D. **(A)** Células en suspensión en forma de esferoides. **(B)** Células embebidas en ECM/hidrogel, como células aisladas o en forma de esferoides u organoides. **(C)** Cultivo en la superficie de la ECM. **(D)** Células en la superficie de la ECM en forma de esferoides y, además, añadiendo al medio gotas de ECM. **(E)** Células en un soporte mecánico mediante una interfase aire-líquido, si se desea (por ejemplo, mediante insertos de cultivo tisular).

Esquema adaptado de *Koledova, Z., Methods Mol Biol, 2017 [32]*.



# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---





## **1. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Las hipótesis planteadas para el desarrollo de esta Tesis Doctoral fueron las siguientes:

1. La respuesta a la RT en cáncer de mama viene determinada, en gran medida, por la fracción de CSCs presentes en el tumor.
2. El empleo de radiación ionizante puede ser decisivo para la erradicación y/o selección de CSCs. Cuando no han sido eliminadas como consecuencia de su alta radioresistencia, la fracción de éstas aumentaría en el tumor en función de la dosis administrada y, además, debido a un incremento en la expresión de enzimas asociadas al microambiente.
3. Las CSCs confieren resistencia frente a la RT debido a que en ellas se produce un menor número de lesiones inducidas por la radiación, presentan una mayor tasa de reparación de las mismas, generan niveles más bajos de ROS, e inducen alteraciones en la actividad de las MMPs y sus inhibidores (TIMPs y HDACs).
4. La modificación de estas MMPs y sus inhibidores está asociada con algunos procesos de la carcinogénesis, favoreciendo la invasión celular y la metástasis tumoral.
5. El crecimiento y desarrollo idóneos del tumor dependen, principalmente, del microambiente. Puede haber variaciones en la expresión de proteínas del mismo (MMPs, TIMPs y HDACs) según el modelo de cultivo utilizado debido a las interacciones célula-célula y célula-ECM.
6. Se podría mejorar la respuesta terapéutica combinando la radiación con alguna terapia dirigida frente a las CSCs o a las MMPs, disminuyendo así la radioresistencia presentada por éstas y, por tanto, la progresión tumoral.

## **2. OBJETIVOS A DESARROLLAR**

Los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral, para dar respuesta a las anteriores hipótesis, fueron los siguientes:

1. Identificar la proporción de CSCs en tres líneas celulares tumorales de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3) tras la administración de distintas dosis de radiación (0, 2 y 6 Gy).
2. Cuantificar las distintas proteínas secretadas (MMPs, TIMPs y HDACs) en distintas subpoblaciones celulares (incluyendo la de CSCs), tras la administración de diferentes dosis de radiación (0, 2 y 6 Gy) en las tres líneas celulares tumorales de cáncer de mama.
3. Comprobar las modificaciones, en caso de que haya, tras la radiación de MMPs, TIMPs y HDACs entre estudios *in vitro* (experimental) e *in vivo* (ratones y pacientes).
4. Examinar el comportamiento de MMPs, TIMPs y HDACs tras la radiación, debido a su relación con la invasión y metástasis tumoral, para poder estudiarlas como posibles biomarcadores predictivos y de pronóstico en el cáncer de mama.

# MATERIAL Y MÉTODOS

---



## **1. ESTUDIOS *IN VITRO*: LÍNEAS CELULARES**

En esta Tesis Doctoral, se llevaron a cabo estudios *in vitro* con tres líneas celulares tumorales de cáncer de mama humano (MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3) y una línea celular de fibroblastos adultos humanos (HAF) derivados de piel.

- MCF-7 (ATCC HTB-22): presenta expresión de ER y PR, pero no de HER2.
- MDA-MB-231 (ATCC HTB-26): carece de la expresión de ER, PR y HER2; es triple negativa.
- SK-BR-3 (ATCC HTB-30): carece de la expresión de ER y PR, pero presenta sobreexpresión de HER2.
- HAF (BBSSPA-Fibroblastos-AF#8).

Las líneas celulares tumorales se obtuvieron de *American Type Culture Collection* (ATCC) y los fibroblastos del Biobanco del Sistema de Salud Pública de Andalucía en Granada.

### **1.1. Mantenimiento celular**

Tanto las líneas celulares tumorales como los fibroblastos se mantuvieron dentro de un incubador [*SANYO CO<sub>2</sub> Incubator*], a una temperatura de 37°C y una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> y del 5% de O<sub>2</sub> saturada de humedad (90%). El crecimiento de los cultivos se controló con un microscopio óptico, modelo *Olympus 1x51*, conectado a una fuente de alimentación *Olympus TH4-200*. Los cultivos se manipularon en condiciones de asepsia, dentro de una campana de flujo laminar [*TellstarBio-II-A/M*].

#### **1.1.1. Cultivo 2D: monocapa**

Las líneas celulares tumorales y los fibroblastos se cultivaron en monocapa hasta tener la cantidad y confluencia necesaria para realizar los experimentos. El medio empleado para las líneas celulares tumorales fue *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) [*HyClone*, SH30243] suplementado con 1% Penicilina-Estreptomicina [*Gibco*, 15140130], 1% Anfotericina B [*Sigma-Aldrich*, A2942] y 10% *Foetal Bovine Serum* (FBS) [*Lonza*, OSB005H2]. Para el caso de los fibroblastos, el medio empleado fue *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

(IMDM) [Gibco, 12440061] suplementado con 1% Penicilina-Estreptomicina [Gibco, 15140130], 1% Anfotericina B [Sigma-Aldrich, A2942] y 10% FBS [Lonza, OSB005H2].

## 1.2. Determinación de marcadores de CSCs de mama

Para la caracterización de CSCs de mama, las tres líneas celulares tumorales (MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3) se cultivaron de dos formas diferentes: en 2D (monocapa) y en 3D (esferas en suspensión; sólo la subpoblación positiva). Las esferas se obtuvieron mediante *sorter* con *Aldefluor Kit* [StemCell, 01700] (véase el apartado 1.3.1.). Las células se mantuvieron en cultivo durante 5 días y se irradiaron a diferentes dosis (0, 2, 4 y 6 Gy). La determinación de los marcadores se llevó a cabo 24 horas después de la radiación mediante citometría de flujo [Becton Dickinson, FACS Canto II]. Se determinaron dos anticuerpos humanos específicos: anti-CD24 [Miltenyi Biotec, 130-095-954] y anti-CD44 [Miltenyi Biotec, 130-113-342]. Y además, se determinó la actividad ALDH1 presentada por las células mediante el uso de *Aldefluor Kit*.

Protocolo del marcaje celular. Las células se tripsinizaron, se contaron, se repartieron en tubos *FACS* (concentración de 200000 células/tubo) y se centrifugaron ( $T^a$  ambiente, 1800rpm, 5 minutos). Los *pellets* obtenidos se resuspendieron con 1ml de *Aldefluor assay buffer* o con 50 $\mu$ l de *Bovine Serum Albumin* al 1% (BSA), según el tubo en cuestión. Los tubos resuspendidos con *buffer* fueron 1 tubo-Control, 1 tubo-DEAB, 1 tubo-ALDH y varios tubos-Muestra (distintas condiciones de radiación y cultivo); los tubos resuspendidos con BSA fueron 1 tubo-CD24 y 1 tubo-CD44. El tubo-Control sirvió como control de la línea tumoral, al cual no se añadió ningún reactivo. El tubo-DEAB sirvió como control para inhibir la fluorescencia de fondo, al cual se añadió DEAB (10 $\mu$ l/millón de células) y *Aldefluor* (5 $\mu$ l/millón de células). El tubo-ALDH sirvió como control de la fluorescencia presentada por la línea tumoral, al cual se añadió sólo *Aldefluor* (5 $\mu$ l/millón de células). El tubo-CD24 sirvió como control del anticuerpo anti-CD24, al cual se añadió sólo su anticuerpo (6 $\mu$ l/millón de células). El tubo-CD44 sirvió como control del anticuerpo anti-CD44, al cual se añadió sólo su anticuerpo (6 $\mu$ l/millón de células). El marcaje de ALDH1 se llevó a cabo en los tubos Control, DEAB, ALDH y Muestra. Para ello, se incubaron (Oscuridad, 37°C, 40 minutos) y se centrifugaron (4°C, 1800rpm, 5 minutos). Los *pellets* obtenidos de los tubos Control, DEAB y ALDH se resuspendieron con 200 $\mu$ l de *buffer*, quedando listos para el análisis en el

citómetro. Los *pellets* obtenidos de los tubos-Marcaje se resuspendieron con 50µl de BSA y, junto a los tubos CD24 y CD44, se llevó a cabo el marcaje de los anticuerpos. Para ello, se incubaron (Oscuridad, 4°C, 10 minutos), se añadieron 150µl de BSA y se centrifugaron (4°C, 1800rpm, 5 minutos). Los *pellets* obtenidos se resuspendieron con 200µl de BSA. Finalmente, se llevó a cabo el análisis en el citómetro.

### 1.3. Medidas de expresión génica

#### 1.3.1. Separación en diferentes subpoblaciones celulares

La separación de las subpoblaciones se llevó a cabo en las tres líneas celulares tumorales (MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3) mediante *Aldefluor Kit* [*StemCell*, 01700], el cual permite identificar células humanas con altos niveles de la enzima ALDH1. Con la utilización del kit se consiguió que el reactivo Aldefluor (sustrato fluorescente no tóxico para la ALDH1) difundiera en las células y se retuviera dentro de ellas en presencia de ALDH1. La cantidad de producto fluorescente es proporcional a la actividad ALDH1, lo que nos permitió separar las células con alta actividad de las de baja actividad mediante un citómetro de flujo [*Becton Dicknson FACS ARIA II*], equipado con el *Software FACS Diva*. Para mantener la actividad fluorescente dentro de las células durante la separación de las subpoblaciones, se usó *Aldefluor assay buffer* que evitó que el sustrato activo saliera de las células. Además, para controlar la fluorescencia de fondo presentada por las células, se usó un inhibidor específico de la ALDH1, el dietilaminobenzaldehído (DEAB).

Protocolo de *Aldefluor Kit*. Las células se tripsinizaron, se contaron, se repartieron en tubos *FACS* y se centrifugaron (T<sup>a</sup> ambiente, 1800rpm, 5 minutos). Los *pellets* obtenidos se resuspendieron con *Aldefluor assay buffer*. Entre los tubos había 1 tubo-Control y 1 tubo-DEAB (ambos con un volumen de 1ml y a una concentración de 1 millón de células/ml) y varios tubos-ALDH (volumen de 5ml y concentración de 2 millones de células/ml). El tubo-Control sirvió como control de la línea tumoral, al cual no se añadió ningún reactivo. El tubo-DEAB sirvió como control para inhibir la fluorescencia de fondo, al cual se añadió DEAB (10µl/millón de células) y Aldefluor (5µl/millón de células). Los tubos-ALDH contenían las células a separar y se marcaron sólo con Aldefluor (5µl/millón de células). Todos los tubos se incubaron (Oscuridad, 37°C, 40 minutos) y se centrifugaron (4°C,

1800rpm, 5 minutos). Los *pellets* obtenidos se resuspendieron con *buffer*. Finalmente, se realizó el *sorter*.

Al trabajar con *Aldefluor* es muy importante llevar a cabo su manipulación sin luz directa, ya que se trata de un reactivo fotosensible.

Tras el uso de *Aldefluor Kit* y la realización del *sorter* se obtuvieron, de cada línea tumoral, dos subpoblaciones celulares: subpoblación positiva o CSCs (células ALDH1+) y subpoblación negativa o no-CSCs (células ALDH1-). Además, una tercera subpoblación fue obtenida al pasar por el citómetro una fracción de las líneas celulares tumorales sin llevar a cabo el protocolo de *Aldefluor Kit*: subpoblación general (contiene el total de células), la cual se usó como subpoblación control.

Las tres subpoblaciones celulares obtenidas de las tres líneas celulares tumorales se mantuvieron, durante el tiempo del experimento, en dos modelos diferentes de cultivo 3D tal y como se detalla en los apartados siguientes.

#### 1.3.1.1. Cultivo 3D: esferas en suspensión

Las distintas subpoblaciones celulares se mantuvieron en condiciones específicas de incubación y esterilidad (véase apartado 1.1.), durante el tiempo del experimento. Para ello, las células se mantuvieron en cultivos 3D en suspensión en placas de baja adherencia con medio de esferas, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham* (DMEM-F12) [*Sigma-Aldrich*, D8437] libre de FBS y suplementado con 1% Penicilina-Estreptomicina [*Gibco*, 15140130], 1mg/ml de Hidrocortisona [*Sigma-Aldrich*, H4001], 4ng/ml de Heparina [*Sigma-Aldrich*, H3149], 1X Insulina (ITS-G) [*Thermo Fisher Scientific*, 41400045], 1X Vitamina B-27 [*Thermo Fisher Scientific*, 12587010], 10ng/ml de FGF humano (hFGF) [*Sigma-Aldrich*, F0291] y 10ng/ml de EGF humano (hEGF) [*Sigma-Aldrich*, E9644].

#### 1.3.1.2. Cultivo 3D+lrECM: esferas en Matrigel

Las distintas subpoblaciones celulares se mantuvieron en condiciones específicas de incubación y esterilidad (véase apartado 1.1.), durante el tiempo del experimento. Para ello, las células se mantuvieron en cultivos 3D en placas de baja adherencia embebidas en 0.5mg/ml de ECM rica en laminina (lrECM) (Matrigel; *Corning*, 356234).



Protocolo de preparación y uso del Matrigel. El Matrigel se acondicionó 2 días antes de ser usado, siendo diluido 1:2 con medio DMEM-F12 y dejándolo en movimiento en una noria durante 24 horas a 4°C (temperatura de almacenaje). Las placas utilizadas fueron placas de 24 pocillos, a los cuales se añadieron 300µl de Agarosa-1% y se dejó solidificar durante 1 hora aproximadamente. Una vez solidificado, se llevó a cabo la siembra con 300000 células/pocillo en 300µl de medio final. Este medio final se obtuvo a partes iguales con medio DMEM-F12 y la dilución de Matrigel que se había preparado previamente. Tras la siembra, las placas se dejaron en reposo dentro del incubador durante 2 horas aproximadamente para conseguir la gelificación de la matriz. A las 24 horas de la siembra, se añadieron 200µl de medio DMEM-F12 con cautela para no romper la matriz formada.

Al trabajar con Matrigel es muy importante mantener la temperatura a 4°C para que no gelifique y nos permita realizar la mezcla celular.

### 1.3.2. Irradiación celular

A los 5 días de la separación en las distintas subpoblaciones celulares, los cultivos se irradiaron mediante un equipo de Rayos X [*Yxlon International*, modelo *Smart Maxishot 200*] a Tª ambiente y bajo condiciones constantes de intensidad (4.5 mA) y voltaje (200 Kv). La irradiación se realizó a las dosis de 2 y 6 Gy, manteniendo un control sin irradiar (0 Gy). Los tiempos de irradiación correspondientes a cada dosis se detallan en la **Tabla 2**. Tras el tratamiento con radiación, las células se mantuvieron en cultivo durante 24 horas.

**Tabla 2:** Dosis y tiempos de radiación.

DOSIS	TIEMPO
0 Gy	-
2 Gy	3 minutos, 21 segundos
4 Gy	6 minutos, 45 segundos
6 Gy	10 minutos, 09 segundos

### 1.3.3. Parada de cultivos celulares

En los dos modelos de cultivo 3D las células se dejaron crecer durante 24 horas tras la irradiación y, trascurrido este tiempo, se procedió a la lisis celular. Para ello, se llevaron a cabo los siguientes protocolos:

### - Cultivo 3D

El contenido de las placas se recogió y se centrifugó (T<sup>a</sup> ambiente, 1800rpm, 5 minutos). Los *pellets* obtenidos se resuspendieron en 1 volumen de *buffer Lysis (RLT)* (perteneciente a *RNeasy Mini Kit; Qiagen, 74106*) para lisar las células.

### - Cultivo 3D+lrECM

Antes de recoger el contenido de las placas, se llevó a cabo la disgregación de Matrigel. Para ello, se retiró el medio de los pocillos, se añadieron 70µl/pocillo de dispasa [*Fisher Scientific, 11553550*] previamente calentada a 37°C y se incubaron las placas (37°C, 1 hora aproximadamente). Pasado este tiempo, el contenido de las placas se recogió y se siguió un protocolo específico para eliminar los restos de Matrigel y dispasa de las células: se centrifugó (T<sup>a</sup> ambiente, 10000rpm, 10 minutos), se resuspendió en 1.5ml de PBS-EDTA-8mM, se centrifugó y resuspendió de nuevo en las mismas condiciones, y se centrifugó una tercera vez. Los *pellets* obtenidos se resuspendieron en 1 volumen de *buffer lysis (RLT)* para lisar las células.

## 1.3.4. Extracción y cuantificación de RNA

Una vez obtenido el lisado celular, se aisló y purificó el total de RNA mediante *RNeasy Mini Kit [Qiagen, 74106]*, y se cuantificó mediante un *Nanodrop Spectrophotometer ND-1000* equipado con el *Software ND-1000 3.5.2*. En la cuantificación, se consideró la ratio 260nm/280nm con el fin de estimar la pureza e integridad del ácido nucleico. Los valores se obtuvieron en ng/µl.

Protocolo de *RNeasy Mini Kit*. El lisado celular se resuspendió añadiendo 1 volumen de Etanol-70%, se pasó todo el contenido a las columnas y se centrifugó (4°C, 10000rpm, 15 segundos), descartando el decantado. Se añadieron 700µl de *buffer RW1*, se centrifugó (4°C, 10000rpm, 15 segundos) y se descartó el decantado. Se añadieron 500µl de *buffer RPE*, se centrifugó (4°C, 10000rpm, 15 segundos) y se descartó el decantado. Se repitió el último paso con *RPE* y se descartó el decantado. Se centrifugaron (4°C, *full speed*, 1 minuto) las columnas sin añadir nada para eliminar el exceso y se descartó el decantado. Se pasaron las columnas a nuevos *Eppendorf-1.5ml*, se añadieron 30µl de *RNase-free H<sub>2</sub>O* y se

centrifugaron (4°C, 10000rpm, 3 minutos), quedándonos esta vez con el decantado porque contiene el RNA.

Durante la manipulación de RNA, todo el material utilizado y el espacio de trabajo se lavaron previamente con *RNase Zap* (libre de la enzima RNasa) para conseguir una concentración óptima de RNA.

### **1.3.5. Síntesis de cDNA mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR)**

La síntesis de cDNA se realizó mediante *iScript cDNA Synthesis Kit* [BioRad, 1708891] con el equipo *Thermal Cycler Applied Biosystems*, modelo 2720.

Protocolo de *iScript cDNA Synthesis Kit*. Cada transcripción inversa se llevó a cabo en un volumen de reacción de 20µl compuestos por 0,5µg de RNA (volumen variable según la concentración obtenida de RNA), 20% de *5x iScript Reaction Mix* (4µl), 5% de *iScript RT (RTasa)* (1µl) y *Nuclease-Free Water* (volumen necesario hasta completar los 20µl).

Protocolo seguido en el equipo. Fase 1 (25°C, 5 minutos), fase 2 (42°C, 30 minutos), fase 3 (85°C, 5 minutos) y fase 4 (15°C, 1 minuto).

### **1.3.6. Amplificación de cDNA y cuantificación de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).**

La amplificación de cDNA y cuantificación de la expresión génica se determinó mediante *SsoFast EvaGreen Supermix Kit* [BioRad, 1725201] con el equipo *X384 Real-Time PCR Systems* [BioRad]. Los genes medidos fueron: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, HDAC-1, HDAC-2 y HDAC-4 [Sigma-Aldrich]. Los valores obtenidos se normalizaron con dos genes de referencia, 18S y GAPDH. Las secuencias de los *primers* usados se describen en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Secuencia y T<sup>a</sup> de *annealing* de los *primers* empleados en la qRT-PCR.

GEN	SECUENCIA	T <sup>a</sup> DE ANNEALING (°C)
18S	<i>Forward</i> CGGCGACGACCCATTCTGAAC	52
	<i>Reverse</i> GAATCGAACCCCTGATTCCCCG	
GADPH	<i>Forward</i> CACCAGGGCTGCTTTTAACTC	57.9
	<i>Reverse</i> CCTTGACGGTGCCATGGAATT	
MMP-1	<i>Forward</i> AAGGCCAGTATGCACAGCTT	58
	<i>Reverse</i> TGCTTGACCCTCAGAGACCT	
MMP-2	<i>Forward</i> TTTCCATTCCGCTTCCAGGGC	58
	<i>Reverse</i> TCGCACACCACATCTTTCCGT	
MMP-3	<i>Forward</i> GGCTTTCCCAAGCAAATAGC	58
	<i>Reverse</i> GTGCCATATTGTGCCTTCT	
MMP-9	<i>Forward</i> CCTGCCAGTTTCCATTCATC	62
	<i>Reverse</i> GCCATTCACGTCGTCCTTAT	
MMP-13	<i>Forward</i> AACATCCAAAAACGCCAGAC	58
	<i>Reverse</i> GGAAGTTCTGGCCAAAATGA	
TIMP-1	<i>Forward</i> ACCAGACCACCTTATACCA	60
	<i>Reverse</i> CATTCTCACAGCCAACA	
TIMP-2	<i>Forward</i> TGCTTCTGCCTGTTCTG	60
	<i>Reverse</i> CTGGACTTCTTACTATGCTTA	
HDAC-1	<i>Forward</i> AAGACGACCCTGACAAGC	62
	<i>Reverse</i> AGACCTGGCACCCTTTAT	
HDAC-2	<i>Forward</i> GGTAACCTCCTGCTACTAAGAT	60
	<i>Reverse</i> GGTGCTATTGTGAATGTCTG	
HDAC-4	<i>Forward</i> ACCTACCTGATGCCTGTT	60
	<i>Reverse</i> AACCTCCAACCTCACTGA	

Protocolo de *SsoFast EvaGreen Supermix Kit*. Cada qRT-PCR se llevó a cabo en un volumen de reacción de 10µl compuestos por 100-500nM de la pareja de *primers*, 10% de cDNA, 50% de *SsoFast EvaGreen Supermix* y *Nuclease-Free Water*.

Protocolo seguido en el equipo. Fase 1 (1 ciclo, 30 segundos, 95°C), fase 2 (40 ciclos, 5 segundos, alternando 95°C y T<sup>a</sup> de *annealing*), fase 3 (1 ciclo, 10 segundos, 95°C), fase 4 (1 ciclo, 5 segundos, 75,5°C) y fase 5 (1 ciclo, 5 segundos, 95°C). La T<sup>a</sup> de *annealing* es específica de cada *primer* y se detalla en la **Tabla 3**.

#### 1.4. Co-Cultivo en lrECM: líneas celulares tumorales + fibroblastos

La expresión génica de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, HDAC-1, HDAC-2 y HDAC-4 también se determinó en co-cultivos de las líneas celulares

tumorales (MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3) con fibroblastos. Para llevar a cabo este experimento, se siguió el mismo orden protocolario descrito hasta el momento, a excepción de algunos puntos que serán detallados.

Las líneas celulares tumorales y los fibroblastos se mantuvieron en condiciones específicas de incubación y esterilidad (véase apartado 1.1.) mediante cultivos 2D (monocapa) (véase apartado 1.1.1.) hasta el momento del experimento. Las líneas celulares tumorales se usaron al completo sin ser separadas en distintas subpoblaciones. Durante el tiempo del experimento, la mezcla de cada línea tumoral con los fibroblastos se mantuvo en co-cultivo en placas de baja adherencia embebidas en 0.5mg/ml de Matrigel. La preparación y el uso del Matrigel (véase apartado 1.3.1.2.), en este caso, se llevó a cabo con medio DMEM y la cantidad de células a sembrar estaba compuesta por una mezcla de línea tumoral y fibroblastos en una proporción 3:1. Tras 5 días en cultivo, las células se irradiaron a diferentes dosis (0, 2 y 6 Gy) (véase apartado 1.3.2.) y 24 horas después, se llevó a cabo la parada del cultivo (véase apartado 1.3.3.). La extracción y cuantificación de RNA, la síntesis y amplificación de cDNA, y la cuantificación de expresión génica se llevó a cabo del mismo modo que se ha descrito anteriormente (véase apartados 1.3.4-6).

## **2. ESTUDIO *IN VIVO*: RATONES**

En esta Tesis Doctoral, se llevó a cabo un estudio *in vivo* con 45 ratones hembras scid NOD de 8 semanas [NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl / SzJ, NSG], que se mantuvieron en la Unidad de Experimentación Animal del Centro de Investigación Biomédica (CIBM) de la Universidad de Granada.

Todos los estudios en animales se realizaron de acuerdo con los protocolos revisados y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Granada.

## 2.1. Ensayo ortotópico por inoculación de células en Matrigel

La inoculación celular se realizó con las tres subpoblaciones celulares (general, positiva y negativa) obtenidas mediante *sorter* (véase apartado 1.3.1.) de la línea tumoral MDA-MB-231. Las distintas subpoblaciones celulares se mantuvieron en cultivo 3D (véase apartado 1.3.1.1.) durante 5 días y después se irradiaron a distintas dosis (0, 2 y 6 Gy) (véase apartado 1.3.2.). A las 24 horas post-radiación, se llevó a cabo la inoculación celular usando 15 ratones por cada subpoblación (5 ratones por cada dosis de radiación). Cada ratón se inoculó en la grasa mamaria de una mama, donde se inyectaron 3000 células de cada condición en una mezcla de 0.05ml de Matrigel y 0.05m de medio DMEM-F12.

## 2.2. Monitorización del crecimiento tumoral

El crecimiento del tumor se evaluó una vez a la semana utilizando un calibrador digital. El volumen del tumor se calculó mediante la ecuación  $V = longitud^2 \times ancho \times \pi / 6$ . Los animales se sacrificaron a los 120 días desde la inoculación y los tumores se extirparon para realizar análisis histológicos e inmunohistoquímicos.

## 2.3. Tinciones histológica e inmunohistoquímica (IHC)

Los tumores procedentes de las distintas condiciones se fijaron a 4°C durante 24 horas en paraformaldehído (PFA) al 4% (p/v) en PBS 0.1M, se lavaron en PBS 0.1M y se sumergieron en parafina en un procesador de tejidos automático (TP1020, Leica, Alemania). Los bloques de parafina se cortaron en secciones de 5µm con un micrótomo, y los cortes obtenidos se montaron en portas para su posterior uso en las tinciones histológica e IHC.

Los cortes tumorales se sometieron a dos tipos de tinciones: una tinción histológica con Hematoxilina-Eosina (H&E) que nos permitió estudiar la densidad celular, y una tinción IHC de MMP-1 que nos permitió ver la intensidad de expresión frente a este anticuerpo.

Protocolo de la tinción H&E. Los cortes se hidrataron (desparafinaron) mediante baños en distintos xilenos y alcoholes durante tiempos diferentes (Xileno1, 20 minutos; Xileno2, 20 minutos; Etanol-99%, 5 minutos; Etanol-99%, 5 minutos; Etanol-90%, 5 minutos;

Etanol-70%, 5 minutos) y se lavaron con agua destilada. Se tiñeron con hematoxilina [*Sigma-Aldrich*, HHS80] durante 1 minuto, y se lavaron con agua corriente. Se mantuvieron en carbonato de litio durante 10 segundos y se dejaron lavar en agua destilada con ácido acético durante 5 minutos. Se tiñeron con Eosina [*Sigma-Aldrich*, HT110280] durante 1 minuto y, por último, se deshidrataron mediante baños en distintos alcoholes y xilenos durante tiempos diferentes (Etanol-70%, 2 minutos en movimiento; Etanol-90%, 2 minutos; Etanol-99%, 2 minutos; Etanol-99%, 2 minutos; Xileno1, 2 minutos; Xileno2, 2 minutos).

Protocolo de la tinción IHC. Los cortes se hidrataron (véase párrafo anterior) y se incubaron en tampón citrato sódico 10mM a 100°C durante 30 minutos. Se dejaron enfriar durante 20 minutos y se lavaron 3 veces en agitación con TBS 1X (Tris 50mM y NaCl 0,15M) [*BioRad*, 1706435] durante 5 minutos. Se incubaron en agitación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% de metanol durante 10 minutos, y se lavaron bajo agua corriente. A continuación, se llevó a cabo la tinción IHC de MMP-1 mediante *Vectastain Elite ABC Kit* [*Vector Laboratories*, PK-6102]. Para ello, los cortes se bloquearon con *Blocking Normal Serum* a T<sup>a</sup> ambiente y humedad durante 30 minutos, y se incubaron con el anticuerpo primario anti-MMP-1 [*Abcam*, ab52631] a 4°C y humedad durante toda la noche. Se lavaron 3 veces en agitación (TBS 1X, 5 minutos), y se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado a T<sup>a</sup> ambiente y humedad durante 30 minutos. Se lavaron 3 veces en agitación (TBS 1X, 5 minutos), y se incubaron con un complejo de avidina-peroxidasa a T<sup>a</sup> ambiente y humedad durante 30 minutos. Se lavaron 3 veces en agitación (TBS 1X, 5 minutos), y se llevó a cabo una última incubación con *Dako Real DAB + Chromogen* [*Dako*, K5007] a T<sup>a</sup> ambiente y oscuridad durante 90 segundos. Se lavaron con agua destilada, se hizo la contratinción con Hematoxilina y se lavaron con agua corriente.

Las imágenes de los cortes se capturaron con un microscopio *Leica DMI3000 B* equipado con una cámara *Leica DFC420 C*. Las imágenes tanto de H&E como de IHC se realizaron con un aumento de 10X.

### **3. ESTUDIO PILOTO: PACIENTES**

En esta Tesis Doctoral, se llevó a cabo un estudio piloto con 20 pacientes de cáncer de mama, las cuales se reclutaron del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

Este estudio fue aprobado por el comité de ética correspondiente asociado a proyectos (PI-730 y PIE16-00045). Todas las pacientes involucradas en este estudio dieron su consentimiento informado por escrito.

#### **3.1. Toma de muestras y variables de estudio**

Las 20 pacientes se trataron con RT, recibiendo RT convencional (25 sesiones, 2 Gy/sesión) o RT hipofraccionada (16 sesiones, 2.65 Gy/sesión). De cada paciente, se tomaron 3 muestras de sangre en diferentes momentos del tratamiento, obteniendo un total de 60 muestras. La primera muestra se tomó antes de comenzar la RT (aproximadamente 1 semana antes), en este caso la dosis absorbida fue 0 Gy; la segunda muestra se tomó durante el tratamiento (a los 8 días de iniciar el tratamiento en las pacientes con RT hipofraccionada y a los 11 días en las pacientes con RT convencional), siendo las dosis absorbidas fueron 21.5 Gy en hipofraccionamiento y 22 Gy en terapia convencional; y la tercera muestra se tomó al terminar la RT (generalmente el último día de tratamiento), siendo las dosis absorbidas 42.4 Gy y 50 Gy en hipofraccionamiento y RT convencional. Todas las muestras fueron custodiadas hasta su análisis por el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía en Granada.

Las pacientes se clasificaron en distintos grupos en función de las diferentes variables de estudio, incluyendo variables dependientes de la paciente (edad, estado menopáusico), variables dependientes de la biología del tumor (clasificación tumoral basada en hormonas, grado de diferenciación, positividad o negatividad para E-cadherina y p53, porcentaje de Ki67, afectación del ganglio centinela) y variables relacionadas con la RT (régimen radioterápico, RT de ganglios linfáticos, presencia de radiotoxicidad). En la **Tabla 4** se describen con más detalle las variables estudiadas y, además, en cada grupo se muestra el número (n) y el porcentaje (%) de pacientes con respecto a la población total. En la misma tabla también se muestra la recurrencia estudiada a los 6 meses de finalizar la RT.



**Tabla 4:** Variables estudiadas (dependientes de las pacientes, de la biología del tumor y relacionadas con la RT) en pacientes de cáncer de mama. Se muestra el número (n), el porcentaje (%) y la recurrencia en cada una de ellas.

VARIABLE	n	%	RECURRENCIA		
			No	Si	
Edad	≤ 50 años	10	50	9	1
	> 50 años	10	50	8	2
Estado menopáusico	Premenopausia	10	50	9	1
	Menopausia	6	30	5	1
	Postmenopausia	4	20	3	1
Tipo tumoral	Ductal invasivo	19	95	16	3
	Lobular invasivo	1	5	1	0
Clasificación tumoral (ER, PR, HER2)	Hormono-negativo	2	10	1	1
	Hormono-positivo	18	90	16	2
Grado de diferenciación	Grado I	9	45	8	1
	Grado II	7	35	6	1
	Grado III	4	20	3	1
E-Cadherina	Postiva	16	80	14	2
	Negativa	4	20	3	1
p53	Positivo	3	15	2	1
	Negativo	17	85	15	2
Ki67	< 20%	15	75	13	2
	≥ 20%	5	25	4	1
Ganglio centinela	Si	12	60	11	1
	No	8	40	6	2
Régimen RT	Convencional	7	35	6	1
	Hipofraccionada	13	65	11	2
RT ganglios linfáticos	Si	9	45	7	2
	No	11	55	10	1
Radiotoxicidad	No	2	10	2	0
	Hiperpigmentación	1	5	1	0
	Eritema	12	60	10	2
	Radiodermatitis	5	25	4	1
Quimioterapia	Si	11	55	9	2
	No	9	45	8	1
Recurrencia	Sana	17	85		
	Enferma	3	15		

### 3.2. Medidas de niveles proteicos en suero de pacientes

Los niveles proteicos se determinaron y cuantificaron mediante *Bio-Plex Pro Human MMP and TIMP Assays* [BioRad, 171AM001M y 171AM002M] con el software *Bio-Plex Data Pro*. Las muestras de suero se obtuvieron de las muestras de sangre recopiladas de las

pacientes. Las proteínas medidas fueron: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-12, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4.

Los ensayos *Bio-Plex Pro* permiten cuantificar múltiples biomarcadores de proteínas en un solo pocillo de una placa de 96 pocillos. Son inmunoensayos similares al ELISA, basados en perlas magnéticas. Los anticuerpos de captura dirigidos contra el biomarcador deseado se acoplan covalentemente a las perlas. Las perlas acopladas reaccionan con la muestra que contiene el biomarcador de interés. Después de una serie de lavados para eliminar la proteína no unida, se agrega un anticuerpo de detección biotinilado para crear un complejo tipo sándwich. El complejo de detección final se forma con la adición de estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) conjugado. La PE sirve como un indicador fluorescente. Los datos son procesados y obtenidos por el software *Bio-Plex Manager*, y son presentados como intensidad de fluorescencia media (MFI) y concentración (pg/ml), siendo la concentración del analito unido a cada perla proporcional al MFI de la señal del indicador fluorescente.

Protocolo de *Bio-Plex Pro Human*. Las muestras usadas fueron alícuotas de suero de 5µl. Antes de comenzar del inmunoensayo, todos los componentes del Kit se atemperaron a T<sup>a</sup> ambiente y las placas se prepararon con 100µl de *Bio-Plex assay buffer*. Justo antes de comenzar el ensayo, el *buffer* se eliminó y se secó bien la parte inferior de las placas. La dilución de perlas acopladas (1X) se agitó en *vórtex* (30 segundos) y se añadieron 50µl/pocillo. Las placas se lavaron 2 veces con 100µl de *wash buffer*. Las diluciones de las muestras, los estándares, el blanco y los controles se agitaron en *vórtex* (5 segundos) y se añadieron 50µl/pocillo (cada dilución en su pocillo correspondiente). Las placas se cubrieron, se incubaron (Oscuridad, Agitación, T<sup>a</sup> ambiente, 850rpm, 1 hora) y, durante este tiempo, se preparó la dilución de los anticuerpos de detección (1X) (se debe preparar 10 minutos antes de su uso). Las placas se lavaron 3 veces con 100µl de *wash buffer*. La dilución de los anticuerpos de detección (1X) se agitó en *vórtex* (5 segundos) y se añadieron 25µl/pocillo. Las placas se cubrieron, se incubaron (Oscuridad, Agitación, T<sup>a</sup> ambiente, 850rpm, 30 minutos) y, durante este tiempo, se preparó la dilución SA-PE (1X) (se debe preparar 10 minutos antes de su uso). Las placas se lavaron 3 veces con 100µl de *wash buffer*. La dilución SA-PE (1X) se agitó en *vórtex* (5 segundos) y se añadieron 50µl/pocillo. Las placas se cubrieron, se incubaron (Oscuridad, Agitación, T<sup>a</sup> ambiente, 850rpm, 10 minutos) y se

lavaron 3 veces con 100µl de *wash buffer*. Para la lectura de las placas es necesario resuspender las perlas y, para ello, se añadieron 125µl de *buffer/pocillo* y se agitaron (Tª ambiente, 850rpm, 30 segundos). Finalmente, se procedió a la lectura de las placas.

### 3.3. Base de datos GEO

Estudios similares al nuestro se buscaron en distintas bases de datos (cBioPortal, GDC Data Portal, GEO DataSets) para corroborar los resultados obtenidos, pero no se encontró ningún estudio que relacionara los niveles séricos de MMPs y TIMPs con la RT. Sólo se pudo utilizar un estudio encontrado en la base de datos GEO (GSE101920) [183], el cual muestra el perfil de expresión génica de MMPs y TIMPs en biopsias de cáncer de mama tomadas tras RT pre-operatoria (antes de la cirugía) y tras RT post-operatoria (después de la mastectomía radical). Este estudio contiene un total de 23 muestras, pero debido al número limitado de muestras emparejadas (n=5), el estudio continuó centrándose únicamente en el análisis de las biopsias con RT pre-operatoria.

## 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) en los estudios *in vitro* y en el *in vivo* de ratones, y como mediana  $\pm$  desviación estándar (SD) en el estudio piloto de pacientes. Las pruebas no paramétricas de *Kruskal-Wallis* y *U-Mann-Whitney* se usaron para los histogramas y los gráficos lineales, y la prueba no paramétrica *Rho de Spearman* se usó para la correlación de matrices. La representación gráfica de los resultados se realizó con los programas *GraphPad Prism 8.0.0* y *R Statistical Computing Environment 3.4.0*. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa *IBS SPSS Statistics*, considerando un valor estadísticamente significativo cuando el valor de  $p < 0.05$ . Los valores significativos se marcaron de distinta forma dependiendo de la comparación realizada y del valor de  $p$  obtenido. Según la comparación realizada los símbolos usados fueron los siguientes: \*: comparación de las dosis de radiación (2 y 6 Gy) con el control no irradiado (0 Gy); †: comparación de las subpoblaciones positiva y negativa con la subpoblación general; ‡: comparación entre los distintos tiempos de la RT (antes,

durante y después). Según el valor de  $p$  obtenido los símbolos se marcaron de la siguiente manera: \*/+/<sup>x</sup> cuando  $p < 0.05$ ; \*\*/+/<sup>xx</sup> cuando  $p < 0.01$ ; y \*\*\*/+/<sup>xxx</sup> cuando  $p < 0.001$ . Los símbolos \* y + se usaron en los estudios *in vitro*, y el símbolo x se usó en el estudio piloto con pacientes.

# RESULTADOS

---



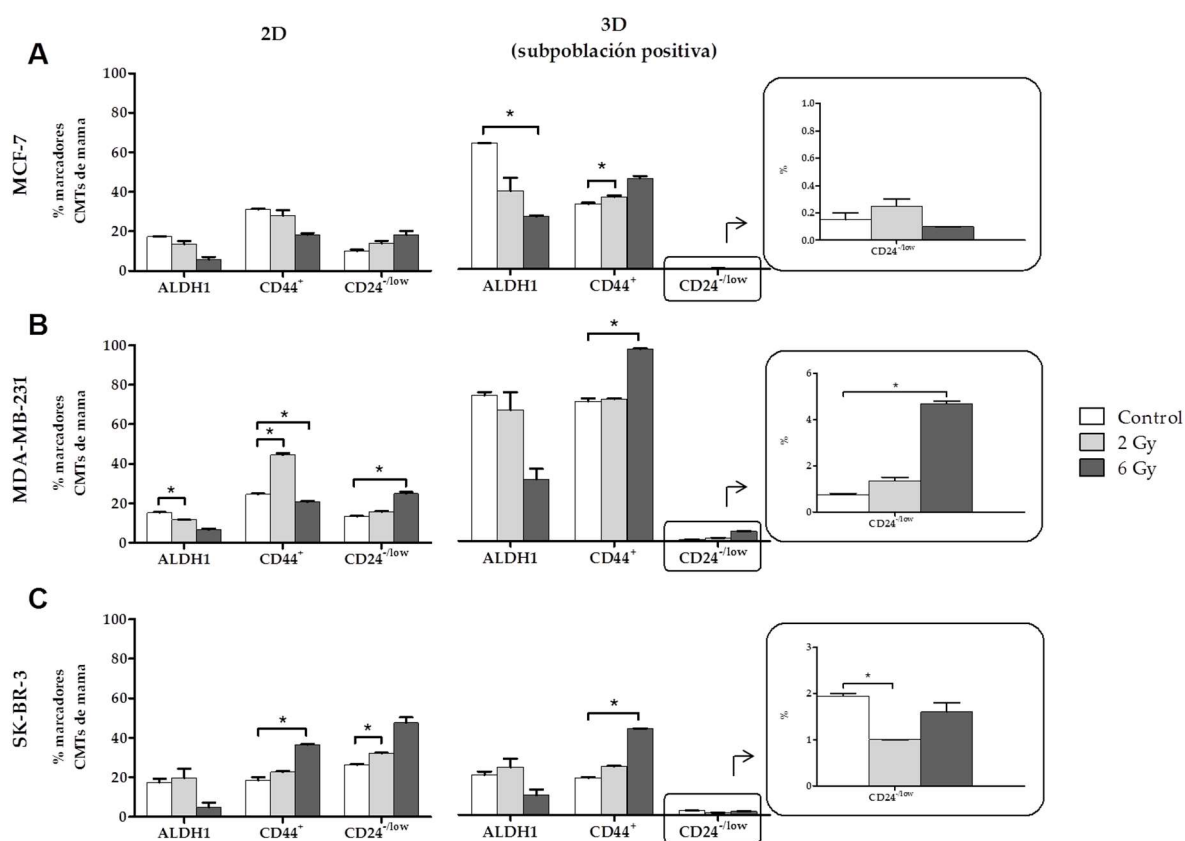
# 1. EFECTOS DE LA RI EN LA EXPRESIÓN GÉNICA

## IN VITRO

### 1.1. Caracterización de CSCs

Las líneas celulares tumorales MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3 se mantuvieron en cultivo 2D (monocapa) y 3D (esferas en suspensión; sólo la subpoblación positiva) durante 5 días, y se irradiaron a 0, 2 y 6 Gy. A las 24 horas del tratamiento con radiación, las células se caracterizaron con marcadores específicos de CSCs de mama: ALDH1, CD44<sup>+</sup> y CD24<sup>-/low</sup>.

La **Figura 1** muestra la expresión en porcentaje (%) de ALDH1, CD44<sup>+</sup> y CD24<sup>-/low</sup> en cultivo 2D y 3D para MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3. En MCF-7 (**Fig. 1A**), las expresiones de los marcadores en el cultivo 2D no fueron significativas para ninguna dosis de radiación empleada. Sin embargo, en el cultivo 3D hubo cambios significativos en las expresiones de ALDH1 y CD44<sup>+</sup>, cuyas tendencias son contrarias a lo largo de la radiación. En MDA-MB-231 (**Fig. 1B**), todas las expresiones fueron significativas, excepto la de ALDH1 en el cultivo 3D. Casi todas las significancias se encontraron al comparar 6 Gy con el control. En ambos modelos de cultivo, ALDH1 disminuye y CD24<sup>-/low</sup> aumenta a lo largo del tratamiento con radiación. Sin embargo, CD44<sup>+</sup> varía al comparar los cultivos, ya que en 2D tuvo su mayor expresión a 2 Gy y a 6 Gy en 3D. En SK-BR-3 (**Fig. 1C**), no hubo resultados significativos para ALDH1. Tanto la expresión de CD44<sup>+</sup> como la de CD24<sup>-/low</sup> fue significativa en ambos modelos de cultivo; CD44<sup>+</sup> al comparar 6 Gy con el control, la cual aumenta a lo largo de la radiación, y CD24<sup>-/low</sup> al comparar 2 Gy con el control, cuyo comportamiento es diferente en 2D y 3D a lo largo de la radiación.



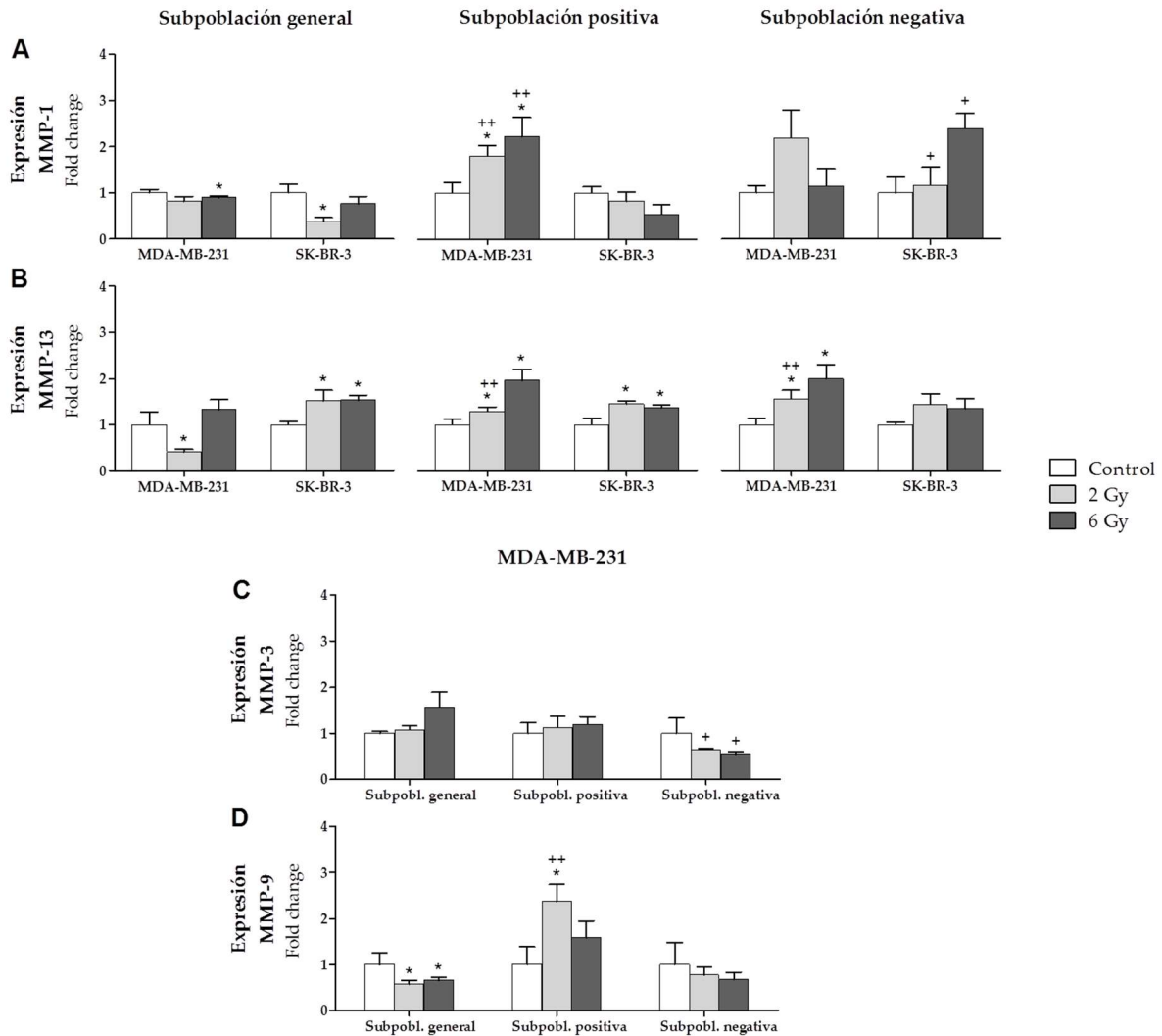
**Figura 1:** Expresión (%) de marcadores específicos de CSCs de mama, ALDH1, CD44<sup>+</sup> y CD24<sup>-/low</sup> en cultivo 2D y 3D a 0, 2 y 6 Gy en las líneas celulares tumorales MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) y SK-BR-3 (C). Los valores se expresan como media ± SEM (barras de error); \*  $p < 0.05$ .

## 1.2. Expresión génica en Cultivo 3D

Las líneas celulares tumorales MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3 se pasaron por un citómetro para ser separadas en las subpoblaciones general (total de las células), positiva (células CSCs o ALDH1+) y negativa (células no-CSCs o ALDH1-). Las tres subpoblaciones se mantuvieron en cultivo 3D durante 5 días, y se irradiaron a 0, 2 y 6 Gy. A las 24 horas del tratamiento con radiación, se midió la expresión de los genes MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, HDAC-1, HDAC-2, HDAC-4, TIMP-1 y TIMP-2 mediante qRT-PCR. En el cultivo 3D se detectaron todos los genes excepto la MMP-2; cada línea tumoral expresó diferentes genes.



La **Figura 2** muestra la expresión génica (*fold change*) de las MMPs detectadas en el cultivo 3D. Las MMP-1 y MMP-13 fueron expresadas en MDA-MB-231 y SK-BR-3, y las MMP-3 y MMP-9 se expresaron únicamente en MDA-MB-231; en MCF-7 no se detectó ninguna MMP.

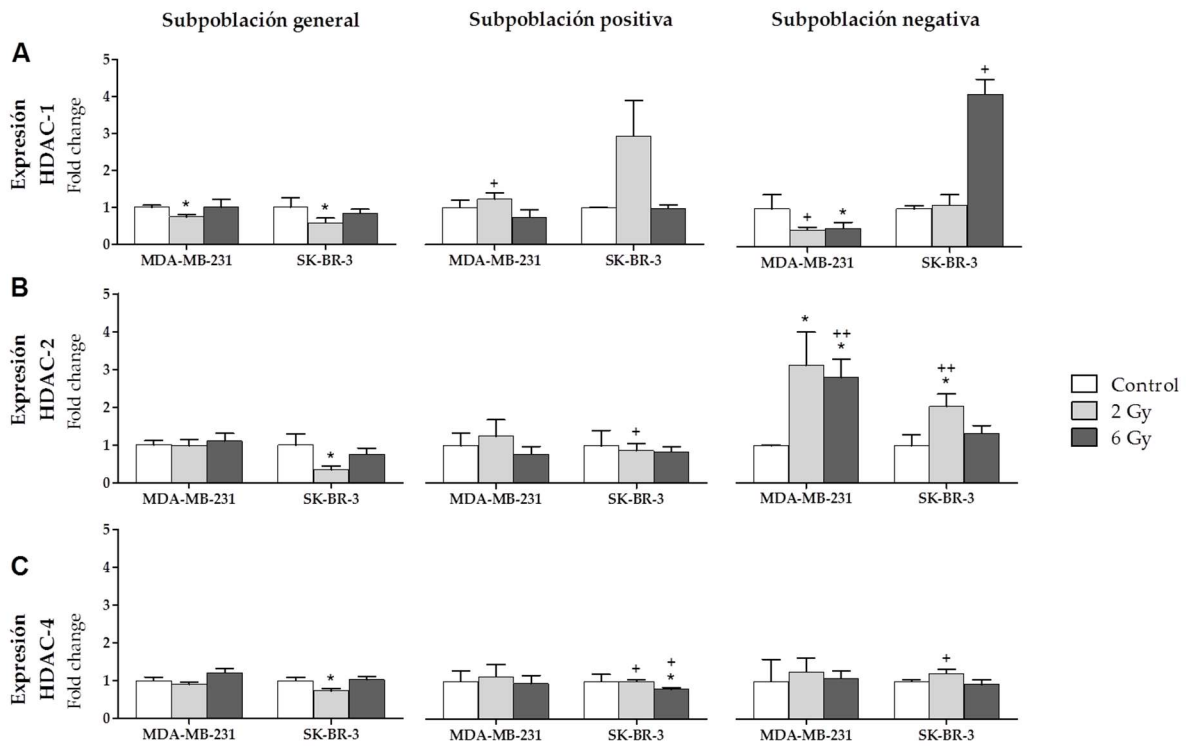


**Figura 2:** Expresión (*fold change*) de MMP-1 (A), MMP-13 (B), MMP-3 (C) y MMP-9 (D) en cultivo 3D a 0, 2 y 6 Gy en las subpoblaciones general, positiva y negativa para las líneas celulares tumorales MDA-MB-231 y SK-BR-3. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (barras de error); \*/+  $p < 0.05$  y \*\*/+  $p < 0.01$ .

La MMP-1 (**Fig. 2A**) se expresó de forma diferente en ambas líneas celulares tumorales y dependiendo de la subpoblación celular. En la subpoblación general, dicha expresión fue similar en las dos líneas celulares tumorales, habiendo significancia a 6 Gy en MDA-MB-231 y

a 2 Gy en SK-BR-3. La expresión de MMP-1 aumentó en MDA-MB-231 en las subpoblaciones positiva y negativa, presentando valores significativos a 2 y 6 Gy en la subpoblación positiva al comparar entre grupos y entre subpoblaciones. Sin embargo, en SK-BR-3 la expresión de MMP-1 aumentó sólo en la subpoblación negativa, siendo también significativa a 2 y 6 Gy con respecto a la subpoblación general. La MMP-13 (**Fig. 2B**) presentó una tendencia de aumento con la radiación en casi todos los casos. Sin embargo, destacó la disminución significativa a 2 Gy en MDA-MB-231 en la subpoblación general. En esta misma subpoblación, la expresión de MMP-13 también fue significativa en SK-BR-3 a 2 y 6 Gy. En la subpoblación positiva, las dos líneas celulares tumorales presentaron valores significativos al comparar entre dosis, y sólo MDA-MB-231 al comparar entre subpoblaciones. En la subpoblación negativa, sólo MDA-MB-231 presentó significancia al comparar tanto entre dosis como entre subpoblaciones. La MMP-3 (**Fig. 2C**) se expresó similarmente en las tres subpoblaciones celulares, destacando un aumento no significativo a 6 Gy en la subpoblación general. En la subpoblación negativa, la MMP-3 disminuyó significativamente a 2 y 6 Gy al compararla con la subpoblación general. La MMP-9 (**Fig. 2D**) se expresó de forma similar en las subpoblaciones general y negativa, disminuyendo a lo largo del tratamiento con radiación y presentado significancia al comparar entre dosis en la subpoblación general. Por el contrario, en la subpoblación positiva la expresión de MMP-9 aumentó con la radiación, siendo significativa a 2 Gy al comparar tanto entre dosis como entre subpoblaciones.

La **Figura 3** muestra la expresión génica (*fold change*) de las HDACs detectadas en el cultivo 3D. Todas las HDACs medidas (HDAC-1, HDAC-2 y HDAC-4) fueron expresadas en MDA-MB-231 y SK-BR-3; en MCF-7 no se detectó ninguna HDAC.

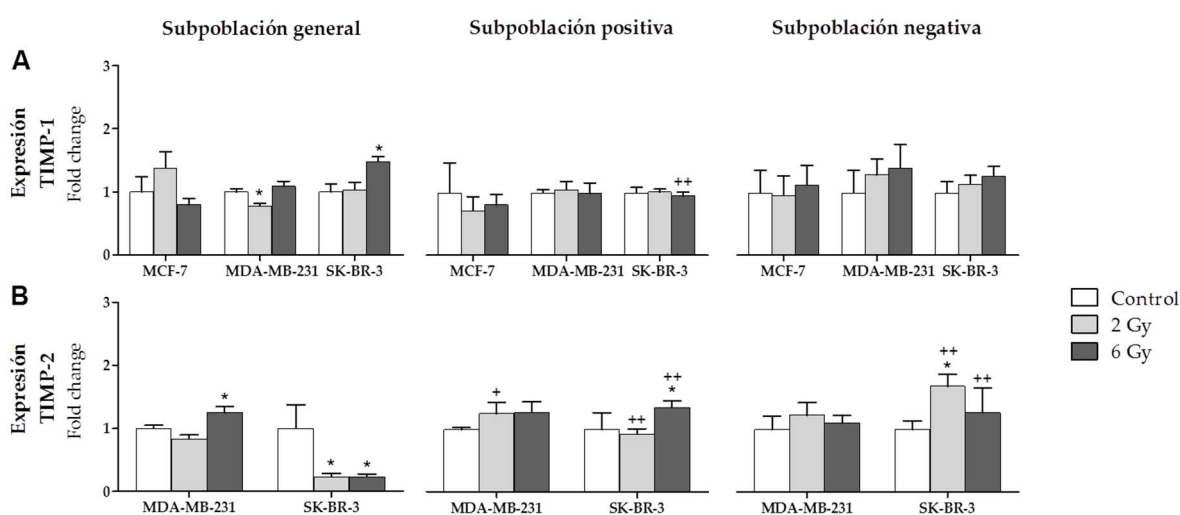


**Figura 3:** Expresión (*fold change*) de HDAC-1 (A), HDAC-2 (B), y HDAC-4 (C) en cultivo 3D a 0, 2 y 6 Gy en las subpoblaciones general, positiva y negativa para las líneas celulares tumorales MDA-MB-231 y SK-BR-3. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (barras de error); \*/+  $p < 0.05$  y \*\*/++  $p < 0.01$ .

La HDAC-1 (**Fig. 3A**) se expresó, de forma general, a bajos niveles en todos los casos. Sin embargo, en SK-BR-3 hubo un aumento no significativo de expresión a 2 Gy en la subpoblación positiva, y un aumento significativo a 6 Gy en la subpoblación negativa con respecto a la subpoblación general. Además, HDAC-1 disminuyó significativamente a 2 Gy con respecto al control en la subpoblación general. En MDA-MB-231, la expresión de HDAC-1 fue significativa a 2 Gy en la subpoblación general y a 6 Gy en la subpoblación negativa, ambas con respecto al control. La expresión también fue significativa a 2 Gy en las subpoblaciones positiva y negativa con respecto a la general. La HDAC-2 (**Fig. 3B**) presentó una baja expresión con tendencias diferentes en las subpoblaciones general y positiva en las dos líneas celulares tumorales. En SK-BR-3, la expresión de HDAC-2 fue significativa a 2 Gy en la subpoblación general al comparar entre dosis, y en la subpoblación positiva al comparar entre subpoblaciones. Sin embargo, en la subpoblación negativa, HDAC-2 aumentó significativamente a 2 y 6 Gy en MDA-MB-231 y a 2 Gy en SK-BR-3, siempre con respecto al

control. Este aumento también fue significativo a 6 Gy para MDA-MB-231 y a 2 Gy para SK-BR-3, con respecto a la subpoblación general. La HDAC-4 (**Fig. 3C**) se expresó de forma similar en todas las subpoblaciones celulares en ambas líneas celulares tumorales. En SK-BR-3 hubo pequeñas variaciones de expresión significativas con respecto al control a 2 y 6 Gy en la subpoblación general y positiva, respectivamente; y a 2 Gy en las subpoblaciones positiva y negativa, con respecto a la general.

La **Figura 4** muestra la expresión génica (*fold change*) de los TIMPs detectados en el cultivo 3D. El TIMP-1 fue el único gen expresado en las tres líneas celulares tumorales, y el TIMP-2 se expresó en MDA-MB-231 y SK-BR-3.



**Figura 4:** Expresión (*fold change*) de TIMP-1 (**A**) y TIMP-2 (**B**) en cultivo 3D a 0, 2 y 6 Gy en las subpoblaciones general, positiva y negativa para las líneas celulares tumorales MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3. Los valores se expresan como media ± SEM (barras de error); \*/+  $p < 0.05$  y \*\*/\*\*+  $p < 0.01$ .

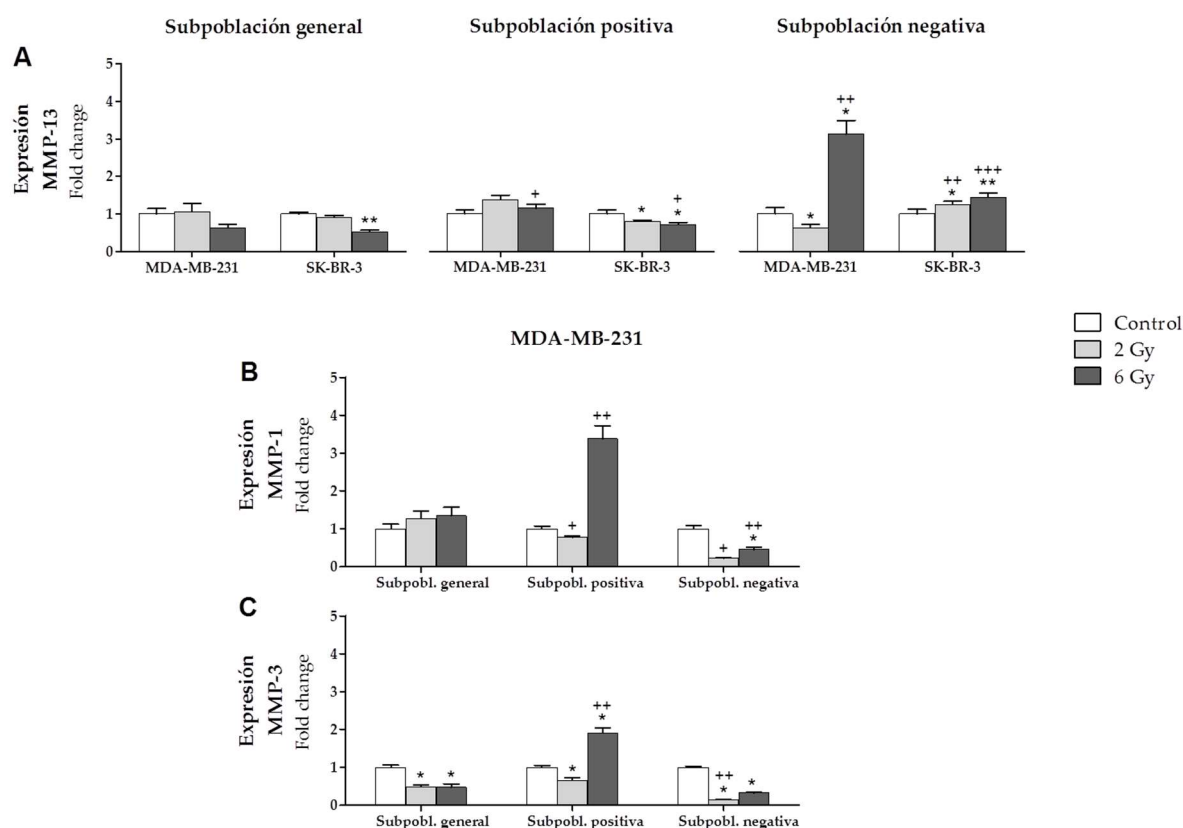
El TIMP-1 (**Fig. 4A**) se expresó de forma similar y con muy pocos cambios significativos en las tres subpoblaciones celulares y en las tres líneas celulares tumorales. En MDA-MB-231, TIMP-1 sólo fue significativo a 2 Gy con respecto al control en la subpoblación general. Sin embargo, en SK-BR-3, la expresión de TIMP-1 presentó significancia a 6 Gy en la subpoblación general al comparar entre dosis y en la subpoblación positiva al compararla con la general. El TIMP-2 (**Fig. 4B**) mostró variaciones leves de expresión en MDA-MB-231, encontrando significancia a 6 Gy con respecto al control en la subpoblación general, y a 2 Gy

en la subpoblación positiva con respecto a la general. Por el contrario, la expresión de TIMP-2 en SK-BR-3 presentó significancia a todas las dosis de radiación en las tres subpoblaciones. Concretamente, en la subpoblación general, TIMP-2 disminuyó de forma significativa a 2 y 6 Gy con respecto al control, y aumentó significativamente en las subpoblaciones positiva y negativa al compararla con la subpoblación general. Además, la expresión también fue significativa a 6 y 2 Gy en la subpoblación positiva y negativa, respectivamente, ambas con respecto al control.

### 1.3. Expresión génica en Cultivo 3D+lrECM

Las líneas celulares tumorales MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3 se pasaron por un citómetro para ser separadas en las subpoblaciones general (total de las células), positiva (células CSCs o ALDH1+) y negativa (células no-CSCs o ALDH1-). Las tres subpoblaciones se mantuvieron en cultivo 3D+lrECM durante 5 días, y se irradiaron a 0, 2 y 6 Gy. A las 24 horas del tratamiento con radiación, se midió la expresión de los genes MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, HDAC-1, HDAC-2, HDAC-4, TIMP-1 y TIMP-2 mediante qRT-PCR. En el cultivo 3D+lrECM se detectaron todos los genes excepto MMP-2, MMP-9 y HDAC-1; cada línea tumoral expresó diferentes genes.

La **Figura 5** muestra la expresión génica (*fold change*) de las MMPs detectadas en el cultivo 3D+lrECM. La MMP-13 fue expresada en MDA-MB-231 y SK-BR-3, y las MMP-1 y MMP-3 se expresaron únicamente en MDA-MB-231; en MCF-7 no se detectó ninguna MMP.

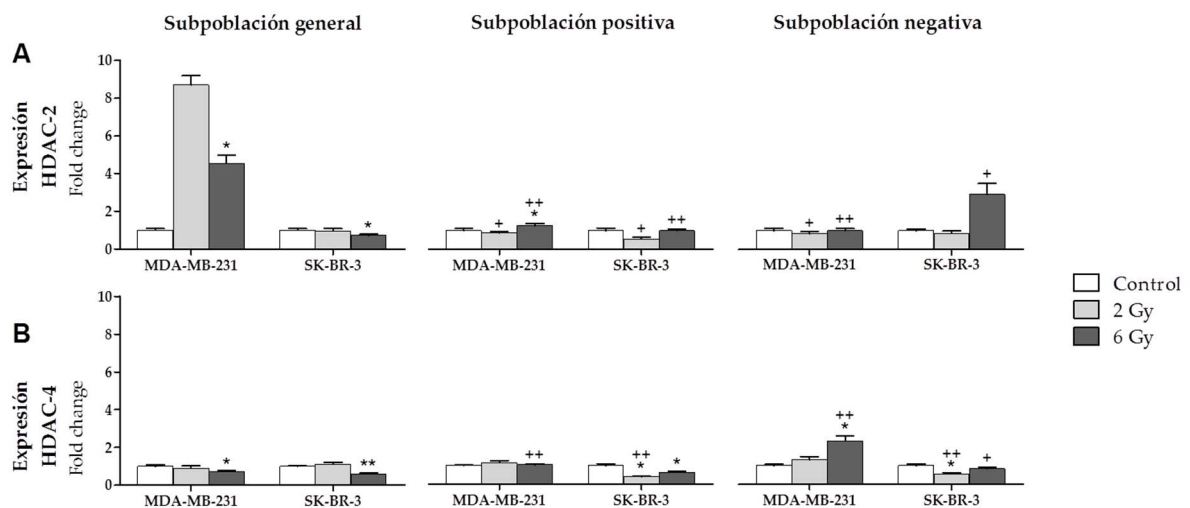


**Figura 5:** Expresión (*fold change*) de MMP-13 (**A**), MMP-1 (**B**) y MMP-3 (**C**) en cultivo 3D+IrECM a 0, 2 y 6 Gy en las subpoblaciones general, positiva y negativa para las líneas celulares tumorales MDA-MB-231 y SK-BR-3. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (barras de error); \*/+  $p < 0.05$ , \*\*/+  $p < 0.01$  y \*\*\*/+  $p < 0.001$ .

La MMP-13 (**Fig. 5A**) mostró una expresión similar en las tres subpoblaciones celulares en las dos líneas celulares tumorales, excepto a 6 Gy en la subpoblación negativa en MDA-MB-231, donde aumentó significativamente al compararla tanto entre dosis como entre subpoblaciones. La expresión de MMP-13 en MDA-MB-231 también resultó significativa a 2 Gy en la subpoblación negativa con respecto al control, y 6 Gy en la subpoblación positiva con respecto a la general. En la línea SK-BR-3, la significancia con respecto al control se encontró a 6 Gy en la subpoblación general y a 2 y 6 Gy en las subpoblaciones positiva y negativa. Además, la expresión de MMP-13 también fue significativa, al comparar entre subpoblaciones, a 6 Gy en la subpoblación positiva, y a 2 y 6 Gy en la subpoblación negativa. La MMP-1 (**Fig. 5B**) aumentó de forma destacada a 6 Gy en la subpoblación positiva al compararla con la general; también hubo significancia a 2 Gy, donde la expresión fue menor.

En la subpoblación negativa, se encontró significancia a 6 Gy con respecto al control, y a 2 y 6 Gy al compararla con la subpoblación general. La MMP-3 (**Fig. 5C**) presentó valores significativos con respecto al control a 2 y 6 Gy en las tres subpoblaciones celulares. En cuando a la comparación con la subpoblación general, hubo significancia a 6 y 2 Gy en la subpoblación positiva y negativa, respectivamente.

La **Figura 6** muestra la expresión génica (*fold change*) de las HDACs detectadas en el cultivo 3D+IrECM. Las HDAC-1 y HDAC-2 fueron expresadas en MDA-MB-231 y SK-BR-3; en la línea MCF-7 no se detectó ninguna HDAC.

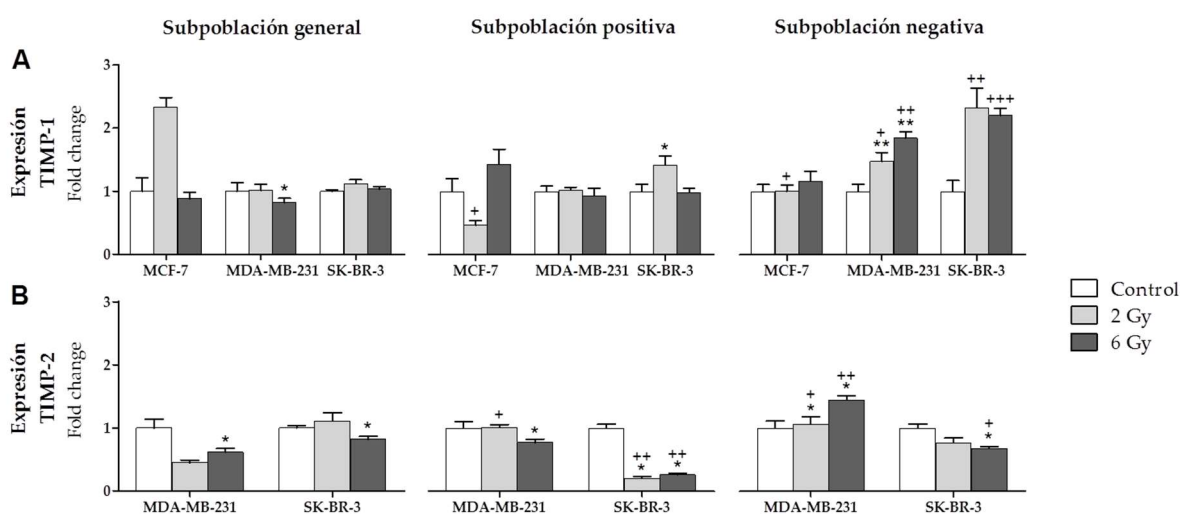


**Figura 6:** Expresión (*fold change*) de HDAC-2 (**A**) y HDAC-4 (**B**) en cultivo 3D+IrECM a 0, 2 y 6 Gy en las subpoblaciones general, positiva y negativa para las líneas celulares tumorales MDA-MB-231 y SK-BR-3. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (barras de error); \*/+  $p < 0.05$  y \*\*/\*\*+  $p < 0.01$ .

La HDAC-2 (**Fig. 6A**) se expresó a bajos niveles y de forma similar en ambas líneas celulares tumorales, aunque con algunas excepciones. En MDA-MB-231, la expresión de HDAC-2 destacó a 2 y 6 Gy en la subpoblación general, siendo significativa a 6 Gy con respecto al control. También presentó significancia a 6 Gy con respecto al control en la subpoblación positiva. Con respecto a la subpoblación general, la expresión de HDAC-2 fue significativa a 2 y 6 Gy tanto en la subpoblación positiva como negativa. En SK-BR-3, HDAC-2 aumentó significativamente a 6 Gy en la subpoblación negativa al compararla con la general. También hubo significancia entre subpoblaciones en la subpoblación positiva a 2 y 6 Gy. Al comparar

con el control, la expresión de HDAC-2 fue significativa a 6 Gy en la subpoblación general. La HDAC-4 (**Fig. 6B**) presentó niveles bajos de expresión en todos los casos excepto a 6 Gy en MDA-MB-231 en la subpoblación negativa, donde aumentó significativamente al comparar tanto entre dosis como entre subpoblaciones. Además, en MDA-MB-231 la expresión de HDAC-4 fue significativa a 6 Gy en la subpoblación general con respecto al control, y en la subpoblación negativa con respecto a la general. En SK-BR-3, HDAC-4 también se expresó a bajos niveles en todos los casos, presentando valores significativos a 6 Gy en la subpoblación general, a 2 y 6 Gy en la positiva, y a 2 Gy en la negativa, en todos los casos con respecto al control. Al comparar con la subpoblación general, hubo significancia a 2 Gy en la positiva y a 2 y 6 Gy en la negativa.

La **Figura 7** muestra la expresión génica (*fold change*) de los TIMPs detectados en el cultivo 3D+IrECM. El TIMP-1 fue el único gen expresado en las tres líneas celulares tumorales, y el TIMP-2 se expresó en MDA-MB-231 y SK-BR-3.



**Figura 7:** Expresión (*fold change*) de TIMP-1 (**A**) y TIMP-2 (**B**) en cultivo 3D+IrECM a 0, 2 y 6 Gy en las subpoblaciones general, positiva y negativa para las líneas celulares tumorales MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (barras de error); \*/+  $p < 0.05$ , \*\*/\*\*+  $p < 0.01$  y \*\*\*/+++  $p < 0.001$ .

El TIMP-1 (**Fig. 7A**) se expresó con niveles y tendencias diferentes en las tres líneas celulares tumorales, siendo en la subpoblación negativa donde presentó niveles más altos y mayor número de valores significativos. En esta subpoblación, la expresión también fue significativa

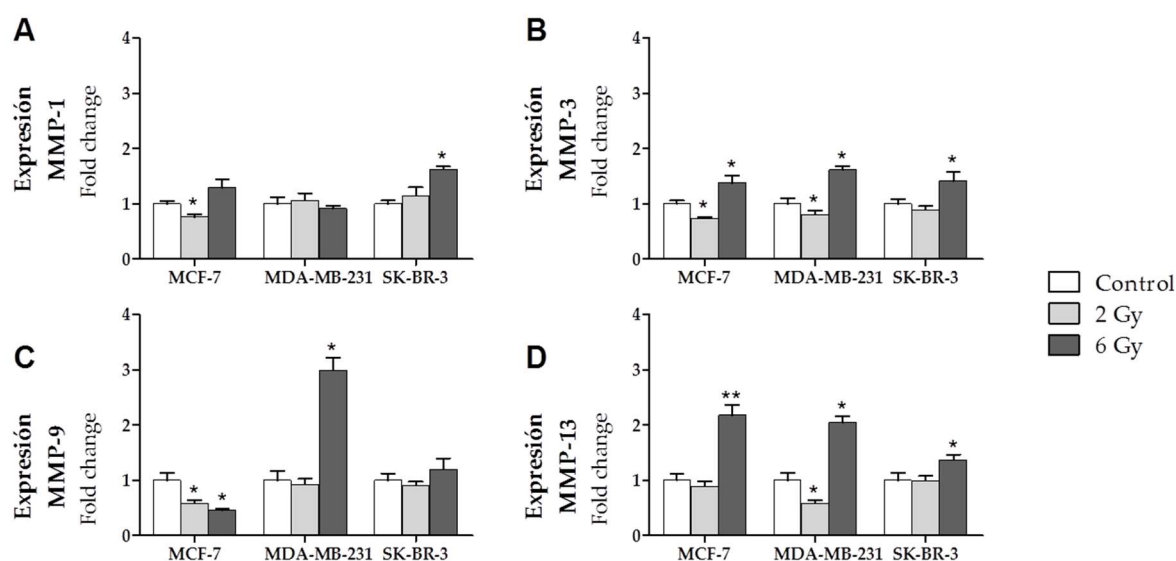


con respecto al control sólo en MDA-MB-231 a 2 y 6 Gy, y significativa con respecto a la subpoblación general en todos los casos excepto a 6 Gy en MCF-7. Además, la expresión de TIMP-1 fue significativa con respecto al control en la subpoblación general a 6 Gy en MDA-MB-231 y en la subpoblación positiva a 2 Gy en SK-BR-3. Al comparar entre subpoblaciones, TIMP-1 también presentó significancia en la subpoblación positiva a 2 Gy en MCF-7. El TIMP-2 (**Fig. 7B**) no tuvo cambios de expresión muy grandes aunque sí valores significativos. Al comparar entre dosis, hubo significancia a 6 Gy en todos los casos, y a 2 Gy, la significancia se encontró en SK-BR-3 en la subpoblación positiva y en MDA-MB-231 en la negativa. Al comparar con la subpoblación general, la expresión de TIMP-2 resultó significativa en MDA-MB-231 a 2 Gy en la subpoblación positiva y a 2 y 6 Gy en la negativa, y en SK-BR-3, a 2 y 6 Gy en la positiva y a 6 Gy en la negativa.

#### 1.4. Expresión génica en Co-cultivo IrECM

Las líneas celulares tumorales MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3 se mantuvieron en co-cultivo IrECM con fibroblastos durante 5 días, y se irradiaron a 0, 2 y 6 Gy. A las 24 horas del tratamiento con radiación, se midió la expresión de los genes MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, HDAC-1, HDAC-2, HDAC-4, TIMP-1 y TIMP-2) mediante qRT-PCR. En el co-cultivo IrECM se detectaron todos los genes en las tres líneas celulares tumorales, excepto MMP-2 y HDAC-1.

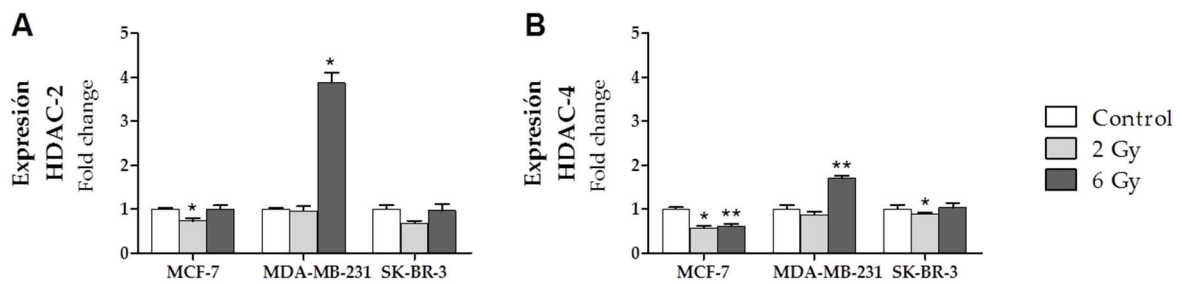
La **Figura 8** muestra la expresión génica (*fold change*) de las MMPs detectadas en el co-cultivo IrECM. Todas las MMPs fueron expresadas en las tres líneas celulares tumorales, excepto MMP-2.



**Figura 8:** Expresión (*fold change*) de MMP-1 (A), MMP-3 (B), MMP-9 (C) y MMP-13 (D) en co-cultivo IrECM a 0, 2 y 6 Gy para las líneas celulares tumorales MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (barras de error); \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ .

La MMP-1 (**Fig. 8A**) presentó valores similares de expresión en las tres líneas celulares tumorales, destacando por disminuir a 2 Gy en MCF-7 y por aumentar a 6 Gy en SK-BR-3, ambos con respecto al control. La MMP-3 (**Fig. 8B**) siguió la misma tendencia de expresión en las tres líneas celulares tumorales, disminuyendo a 2 Gy y aumentando a 6 Gy, ambos con respecto al control. Las disminuciones fueron significativas en MCF-7 y MDA-MB-231 y los aumentos, en las tres líneas celulares tumorales. La MMP-9 (**Fig. 8C**) disminuyó brevemente pero de forma significativa con respecto al control a 2 y 6 Gy en MCF-7, y aumentó en gran medida y significativamente a 6 Gy en MDA-MB-231. La MMP-13 (**Fig. 8D**) aumentó con valores significativos a 6 Gy en las tres líneas celulares tumorales. Además, también se encontró significancia a 2 Gy en MDA-MB-231 mediante una disminución de la expresión con respecto al control.

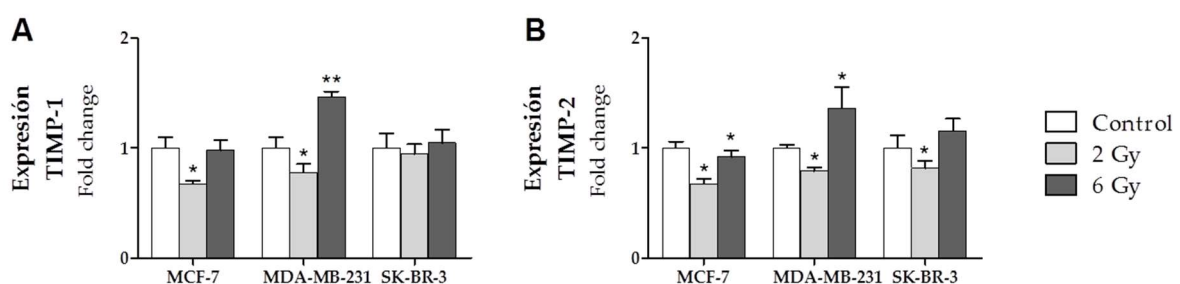
La **Figura 9** muestra la expresión génica (*fold change*) de las HDACs detectadas en el co-cultivo IrECM. Todas las HDACs fueron expresadas en las tres líneas celulares tumorales, excepto HDAC-1.



**Figura 9:** Expresión (*fold change*) de HDAC-2 (A) y HDAC-4 (B) en co-cultivo IrECM a 0, 2 y 6 Gy para las líneas celulares tumorales MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (barras de error); \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ .

La HDAC-2 (Fig. 9A) se expresó a bajos niveles y de forma similar en todos los casos excepto a 6 Gy en MDA-MB-231, donde aumentó bastante y significativamente. Además, la expresión de HDAC-2 también fue significativa por una leve disminución a 2 Gy en MCF-7. La HDAC-4 (Fig. 9B) no presentó cambios de expresión muy grandes pero sí con significancias, en MCF-7 a 2 y 6 Gy, en MDA-MB-231 a 6 Gy y en SK-BR-3 a 2 Gy.

La Figura 10 muestra la expresión génica (*fold change*) de los TIMPs detectados en el co-cultivo IrECM. Todos los TIMPs medidos (TIMP-1 y TIMP-2) fueron expresados en las tres líneas celulares tumorales.



**Figura 10:** Expresión (*fold change*) del TIMP-1 (A) y TIMP-2 (B) en co-cultivo IrECM a 0, 2 y 6 Gy para las líneas celulares tumorales MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (barras de error); \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ .

El TIMP-1 (Fig. 10A) disminuyó su expresión a 2 Gy con respecto al control en las tres líneas celulares tumorales, siendo esta bajada significativa en MCF-7 y MDA-MB-231. En cuanto a

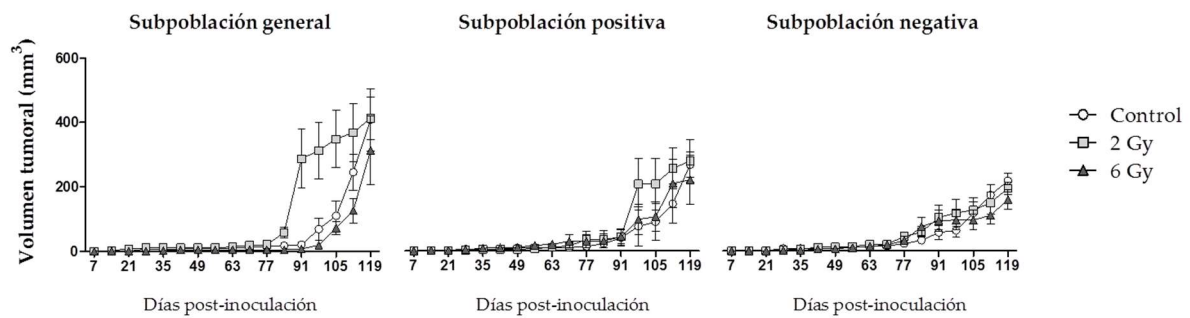
6 Gy, TIMP-1 aumentó con respecto al control en las tres líneas celulares tumorales, siendo significativo sólo en MDA-MB-231. El TIMP-2 (**Fig. 10B**) disminuyó significativamente a 2 Gy con respecto al control en las tres líneas celulares tumorales. Además, presentó significancia a 6 Gy en MCF-7 y MDA-MB-231 por un aumento su expresión.

## **2. EFECTOS DE LA RI EN EL CRECIMIENTO TUMORAL *IN VIVO*: RATONES**

### **2.1. Monitorización del crecimiento tumoral**

La línea tumoral MDA-MB-231 se pasó por un citómetro para ser separada en las subpoblaciones general (total de las células), positiva (células CSCs o ALDH1+) y negativa (células no-CSCs o ALDH1-). Las tres subpoblaciones se mantuvieron en cultivo 3D durante 5 días, y se irradiaron a 0, 2 y 6 Gy. A las 24 horas de la radiación, se realizó la inoculación celular en Matrigel en la grasa mamaria de los ratones, y se evaluó el crecimiento tumoral 1 vez por semana hasta el sacrificio de los ratones a los 120 días.

La **Figura 11** muestra el volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) obtenido en los ratones. Apenas hubo crecimiento tumoral hasta pasado aproximadamente 1 mes del seguimiento, siendo los primeros tumores en aparecer los correspondientes a la subpoblación positiva, y los últimos en aparecer los correspondientes a la subpoblación negativa. En cuanto a las células control, el tumor de mayor volumen se obtuvo en la subpoblación general y el de menor volumen en la negativa. Con respecto al tumor de las células no irradiadas, en la subpoblación general, el volumen tumoral aumentó en las células de 2 Gy y disminuyó en las de 6 Gy. En la subpoblación positiva, el volumen tumoral siguió la misma tendencia que en la subpoblación general, pero con valores más bajos. Sin embargo, en la subpoblación negativa, los volúmenes tumorales de las células tanto a 2 como a 6 Gy fueron más bajos que en el control. Además, en esta subpoblación, el volumen tumoral a todas las dosis incluyendo el control, fue menor en comparación con las subpoblaciones general y positiva.

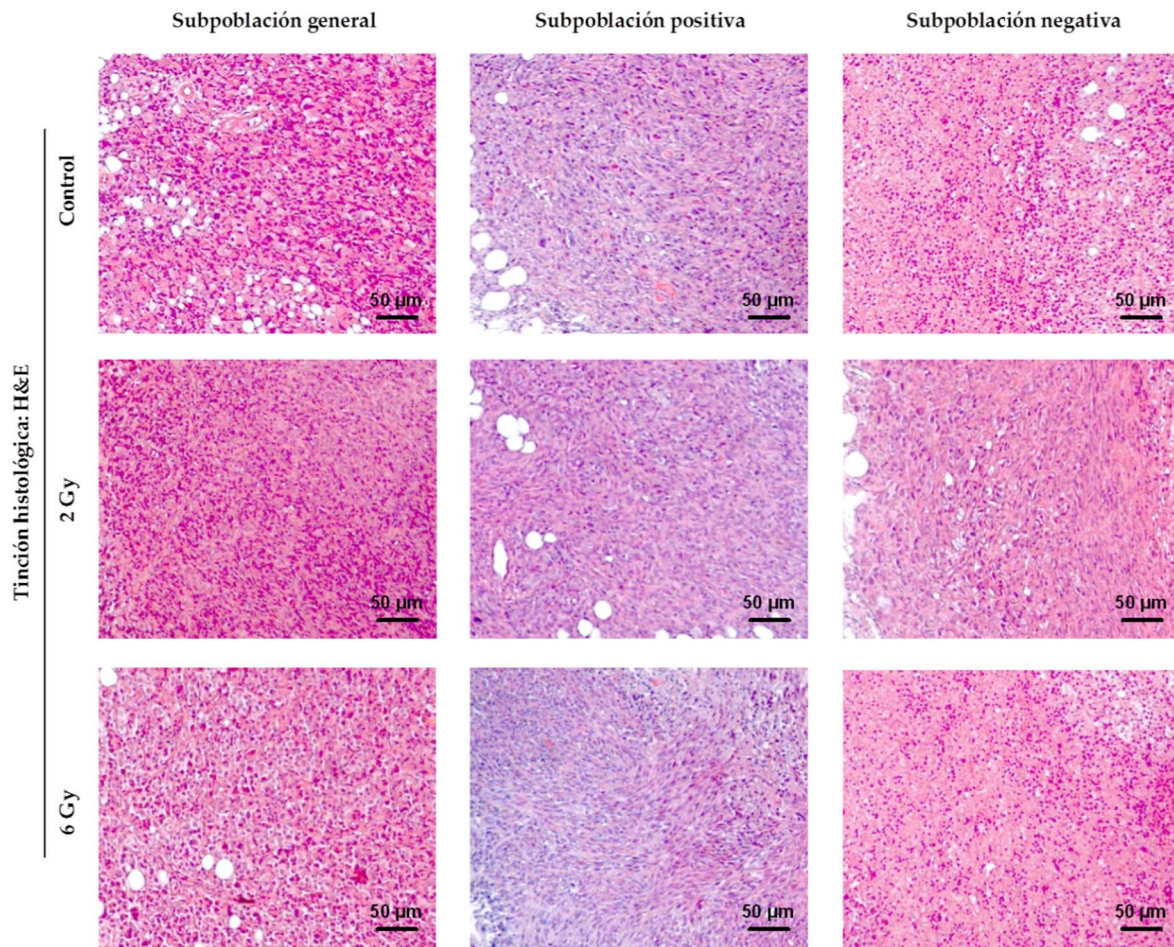


**Figura 11:** Monitorización del crecimiento tumoral en ratones hembra NSG después de la inoculación ortotópica en Matrigel de las subpoblaciones general, positiva y negativa a 0, 2 y 6 Gy de la línea MDA-MB-231.

## 2.2. Tinción histológica: Hematoxilina-Eosina (H&E)

Los tumores extraídos de los ratones se fijaron en PFA, se sumergieron en parafina y se cortaron, obteniendo cortes tumorales de las diferentes condiciones de estudio.

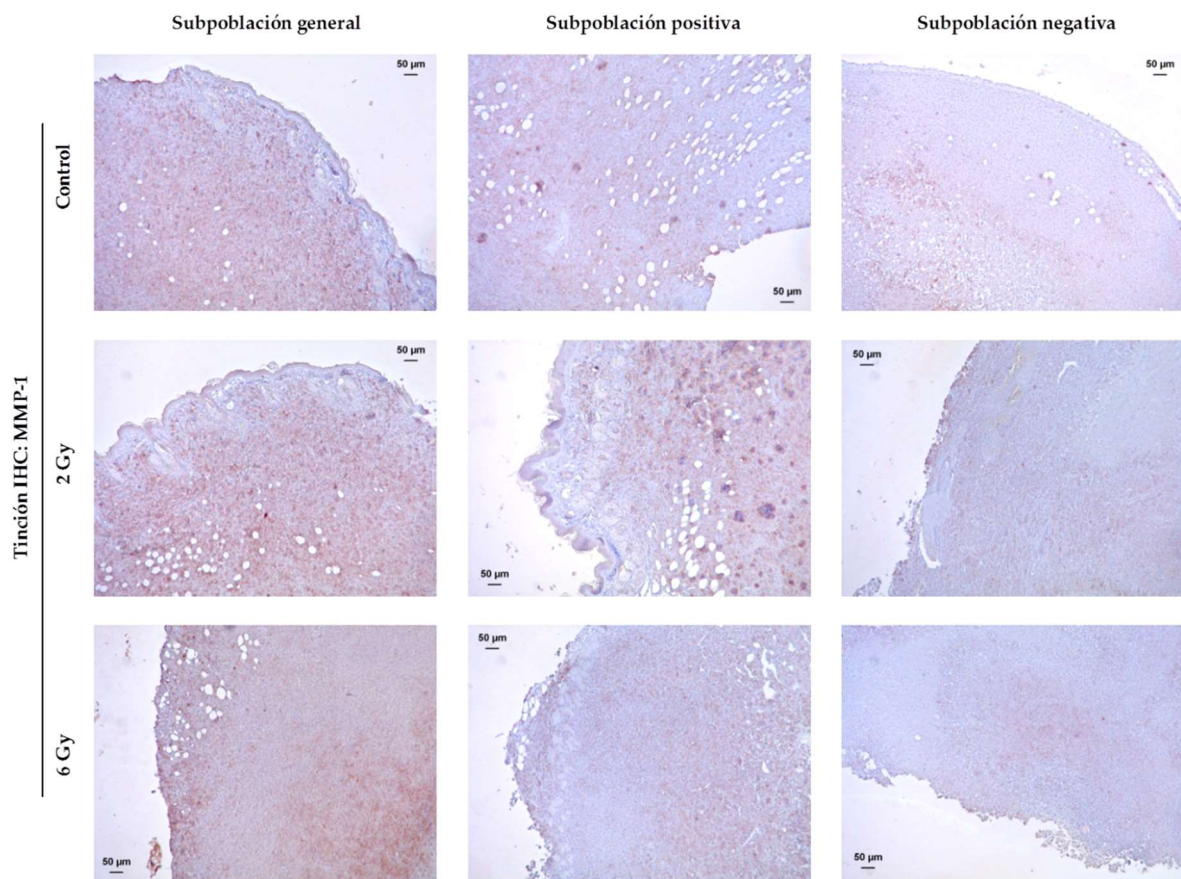
La **Figura 12** muestra la tinción histológica de H&E llevada a cabo en los cortes tumorales de los ratones, la cual nos permitió estudiar la densidad celular. Dicha densidad fue mayor en la subpoblación general y menor en la negativa, observando también variaciones al comparar entre las dosis de radiación. Los resultados obtenidos con esta tinción se relacionaron con los obtenidos en la monitorización del crecimiento tumoral (**Fig. 11**), pudiéndose observar la diferente densidad celular al comparar el corte tumoral de la dosis control en la subpoblación general con el correspondiente a 6 Gy en la negativa.



**Figura 12:** Tinción histológica H&E en cortes tumorales de ratones obtenidos tras la inoculación ortotópica de las subpoblaciones general, positiva y negativa a 0, 2 y 6 Gy de la línea MDA-MB-231.

### 2.3. Tinción IHC: MMP-1

La **Figura 13** muestra la tinción IHC de MMP-1 llevada a cabo en los cortes tumorales de los ratones, la cual nos permitió ver la intensidad de expresión frente a este anticuerpo. Esta tinción también nos permitió relacionar los resultados con el volumen tumoral obtenido (**Fig. 11**). La tinción de MMP-1 presentó mayor intensidad en los cortes tumorales de la subpoblación general, seguida de la positiva y de la negativa. En general, se observó que la intensidad disminuyó al aumentar la dosis de radiación, especialmente en la subpoblación negativa. Sin embargo, en las subpoblaciones general y positiva se pudo ver que la intensidad de la tinción aumentó levemente a 2 Gy con respecto al control.



**Figura 13:** Tinción IHC de MMP-1 en cortes tumorales de ratones obtenidos tras la inoculación ortotópica de las subpoblaciones general, positiva y negativa a 0, 2 y 6 Gy de la línea MDA-MB-231

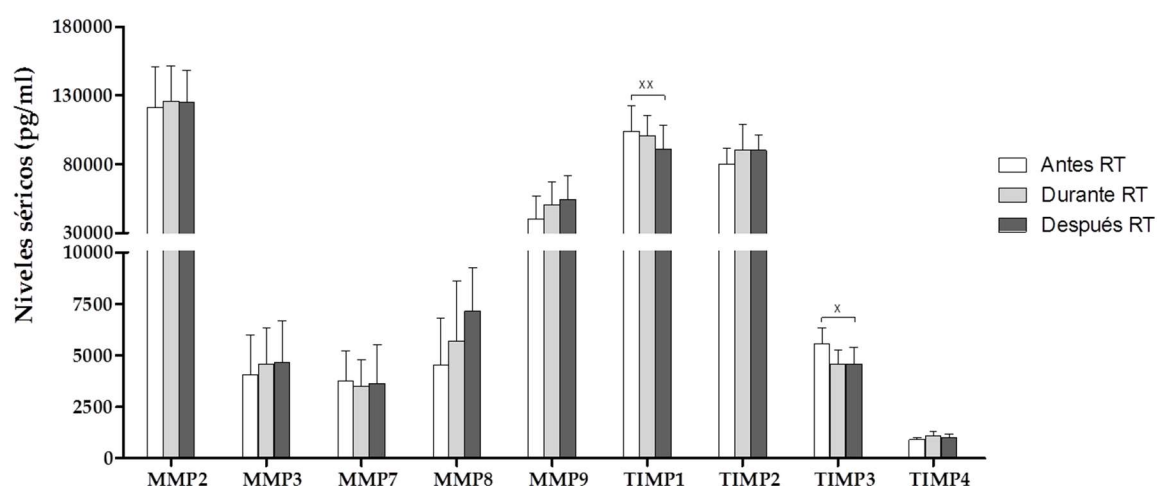
### **3. EFECTOS DE LA RI EN LOS NIVELES PROTÉICOS DE MMPs Y TIMPs EN SUERO DE PACIENTES**

#### **3.1. Curso temporal de los niveles séricos de proteínas**

De las 20 pacientes reclutadas de cáncer de mama se tomaron 3 muestras de sangre en diferentes momentos del tratamiento (antes, durante y después de la RT), obteniendo un total de 60 muestras. De las muestras sanguíneas se obtuvieron alícuotas de suero, donde se midieron los niveles de las proteínas MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9,

MMP-10, MMP-12, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 mediante inmunoensayos. En el suero de las pacientes se detectaron todas las proteínas excepto MMP-1, MMP-10, MMP-12 y MMP-13.

La **Figura 14** muestra el curso temporal de los niveles séricos de MMPs y TIMPs detectados antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama. Los resultados demostraron un ligero aumento en los niveles séricos en la mayoría de MMPs a lo largo del tratamiento. Sin embargo, los TIMPs no mostraron una tendencia concreta con la RT. Se encontraron valores estadísticamente significativos sólo en TIMP-1 y TIMP-3 por una disminución de sus niveles con la RT. Es importante señalar que, independientemente de su comportamiento presentado con el tratamiento, los niveles séricos de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 y TIMP-2 fueron mucho más altos que los obtenidos en el resto de proteínas analizadas.



**Figura 14:** Curso temporal de los niveles séricos de MMPs y TIMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error);  $^x p < 0.05$  y  $^{xx} p < 0.01$ .

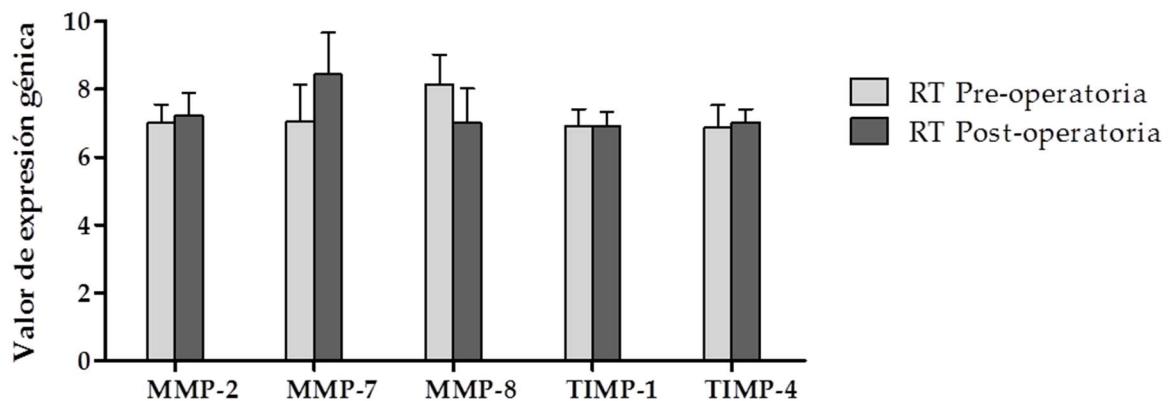
### 3.2. Base de datos GEO

Debido al pequeño tamaño muestral de nuestro estudio piloto, se realizaron búsquedas en diferentes bases de datos para identificar trabajos que pudieran respaldar nuestros resultados. No se encontró ningún estudio que correlacionara las concentraciones séricas de MMPs y TIMPs con la RT, y sólo se pudo usar un estudio de la base de datos GEO



(GSE101920) por mostrar resultados relacionados con RT. Aunque en dicho estudio, los resultados corresponden al perfil de expresión génica de MMPs y TIMPs en biopsias de cáncer de mama tomadas tras RT pre- y post-operatoria. Además, este estudio presentó limitaciones, ya que contiene las 2 muestras emparejadas en sólo 5 pacientes. A pesar de ello, dichos resultados se analizaron y no se encontraron resultados significativos.

La **Figura 15** muestra el perfil de expresión génica de MMPs y TIMPs tras RT pre- y post-operatoria en biopsias de cáncer de mama. Todos los genes, excepto MMP-8, presentaron menor expresión al recibir RT pre-operatoria.

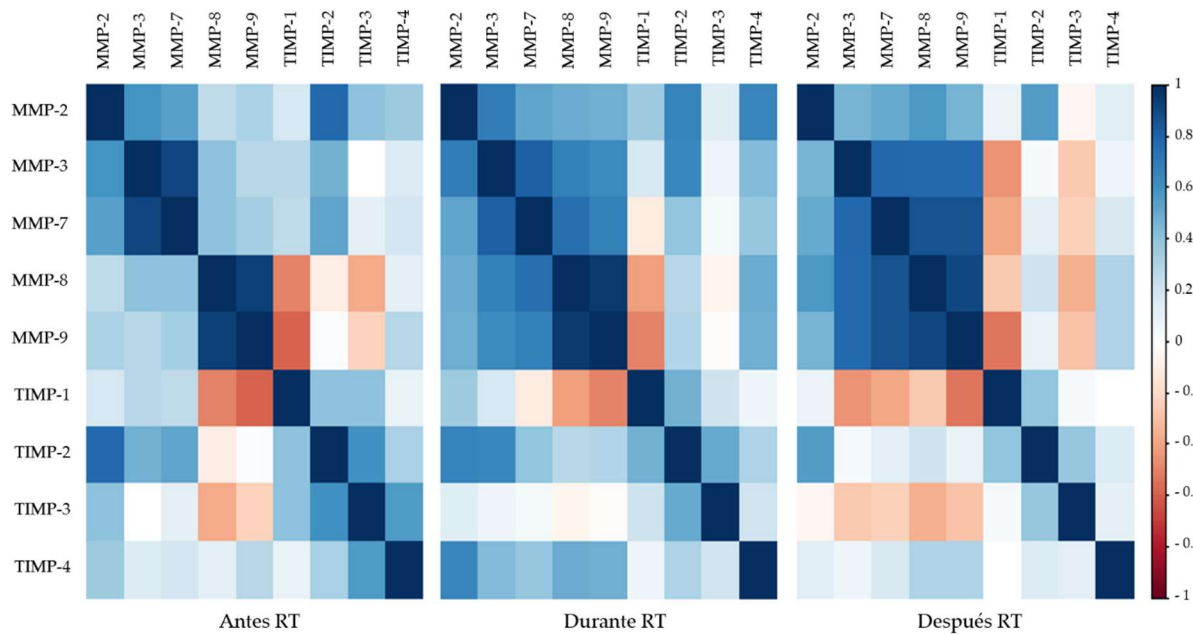


**Figura 15:** Perfil de expresión génica de MMPs y TIMPs tras RT pre- y post-operatoria en biopsias de cáncer de mama. Datos tomados de GSE101920 (base de datos GEO). Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error).

### 3.3. Correlación de los niveles proteicos en suero

La correlación entre los niveles séricos de MMPs y TIMPs se obtuvo utilizando el coeficiente de correlación de Spearman,  $\rho$  (rho). Según los valores de rho, cuando la asociación es positiva ( $0 < \rho < 1$ ), los niveles de los dos genes comparados muestran una tendencia similar, ya sea debido a su aumento o a su disminución. Una asociación negativa ( $-1 < \rho < 0$ ) significa que los niveles de los dos genes comparados son opuestos. Finalmente, no hay una correlación lineal entre los genes comparados cuando  $\rho = 0$ .

La **Figura 16** muestra la correlación entre los niveles séricos de MMPs y TIMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama. Se encontró una correlación positiva entre los niveles de MMPs en todos los tiempos del tratamiento, siendo más fuerte conforme avanza la RT. Sin embargo, en los TIMPs, las correlaciones encontradas han sido tanto positivas como negativas, con un aumento en las negativas para TIMP-1 y TIMP-3 conforme avanza el tratamiento.



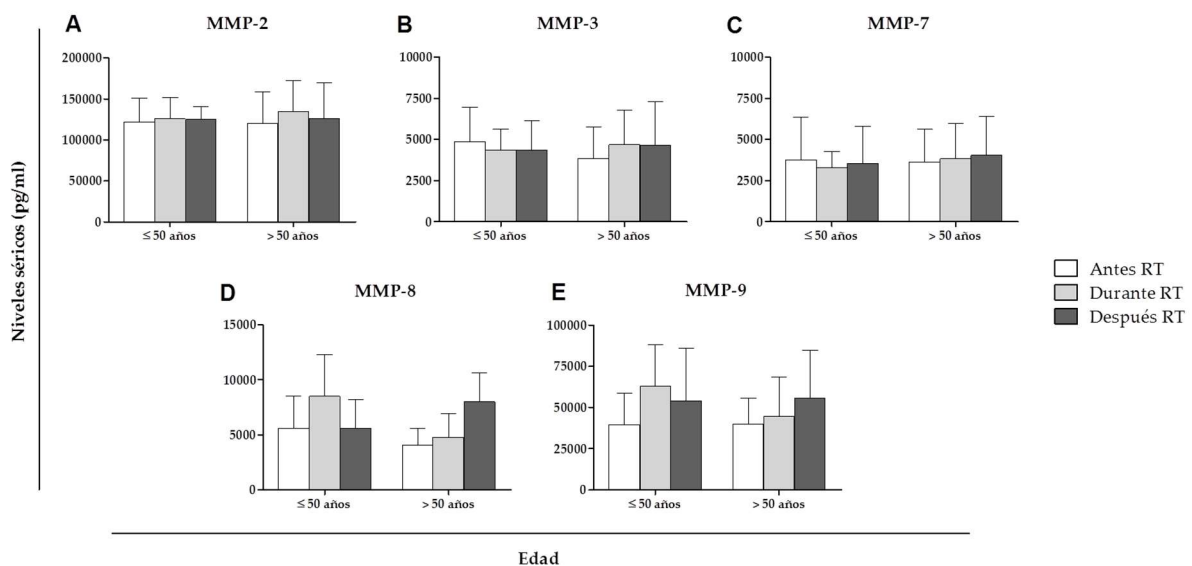
**Figura 16:** Correlación entre los niveles séricos de MMPs y TIMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama. El rango de colores representa los diferentes valores de rho ( $\rho$ ): correlación positiva ( $0 < \rho < 1$ ), correlación negativa ( $-1 < \rho < 0$ ), no correlación ( $\rho = 0$ ).

### 3.4. Niveles séricos de proteínas en variables dependientes de las pacientes

Las 20 pacientes de cáncer de mama se agruparon de acuerdo con las variables estudiadas dependientes de las pacientes: edad y estado menopáusico.

La **Figura 17** muestra los niveles séricos de MMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la edad. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, no se encontraron resultados estadísticamente significativos. La MMP-2 (**Fig. 17A**) aumentó con la RT, de forma independiente a la edad. La MMP-3

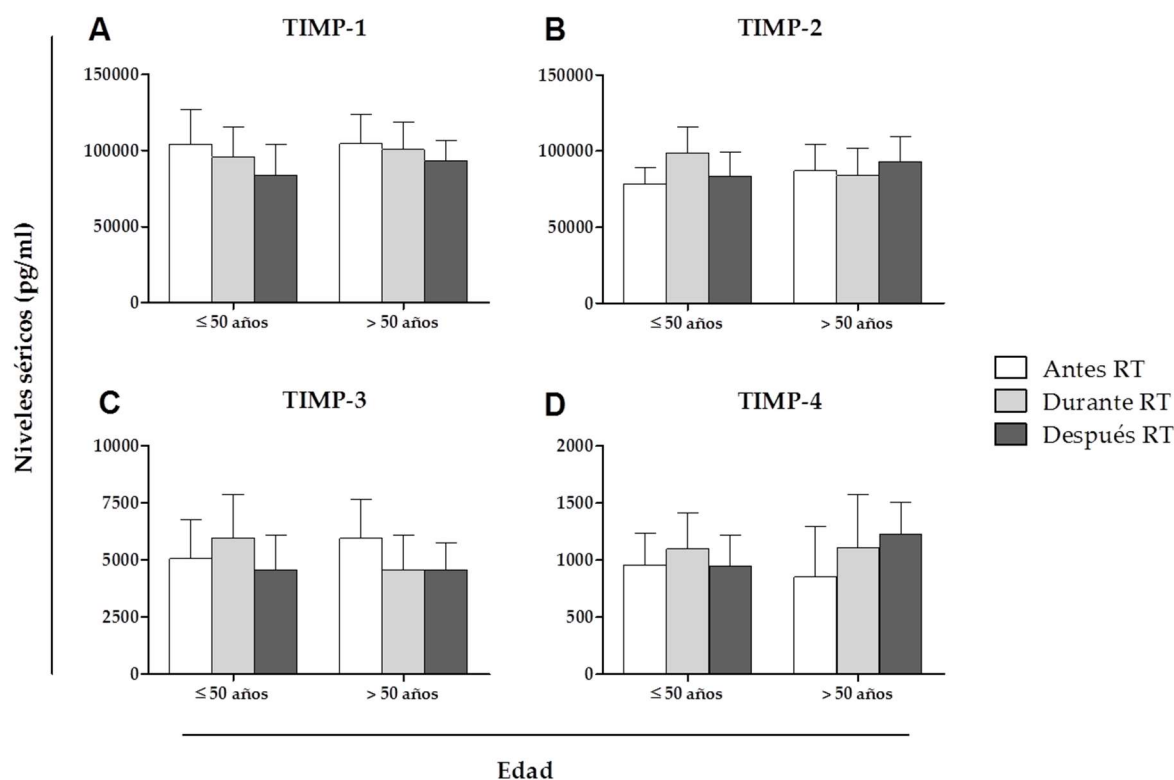
(Fig. 17B) presentó una tendencia contraria a lo largo del tratamiento en función de la edad de las pacientes. La MMP-7 (Fig. 17C) disminuyó levemente en pacientes menores de 50 años, y aumentó en las mayores de 50 años. La MMP-8 (Fig. 17D) aumentó durante la RT en pacientes menores de 50 años, y después de la RT en las mayores de 50 años. La MMP-9 (Fig. 17E) aumentó con el tratamiento en ambos grupos de pacientes, siguiendo la misma tendencia que la MMP-8.



**Figura 17:** Niveles séricos de MMP-2 (A), MMP-3 (B), MMP-7 (C), MMP-8 (D) y MMP-9 (E) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la edad. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error).

La **Figura 18** muestra los niveles séricos de TIMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la edad. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, no se encontraron resultados estadísticamente significativos. El TIMP-1 (Fig. 18A) disminuyó con la RT en ambos grupos de pacientes. El TIMP-2 (Fig. 18B) aumentó levemente en los dos grupos de pacientes después de la RT. Sin embargo, durante la RT, TIMP-2 aumentó en pacientes menores de 50 años y disminuyó en las mayores de 50 años. El TIMP-3 (Fig. 18C), en pacientes menores de 50 años aumentó durante la RT y disminuyó después de ella. Sin embargo, en pacientes mayores de 50 años disminuyó en los dos momentos del tratamiento. El TIMP-4 (Fig. 18D), en pacientes menores de 50 años se

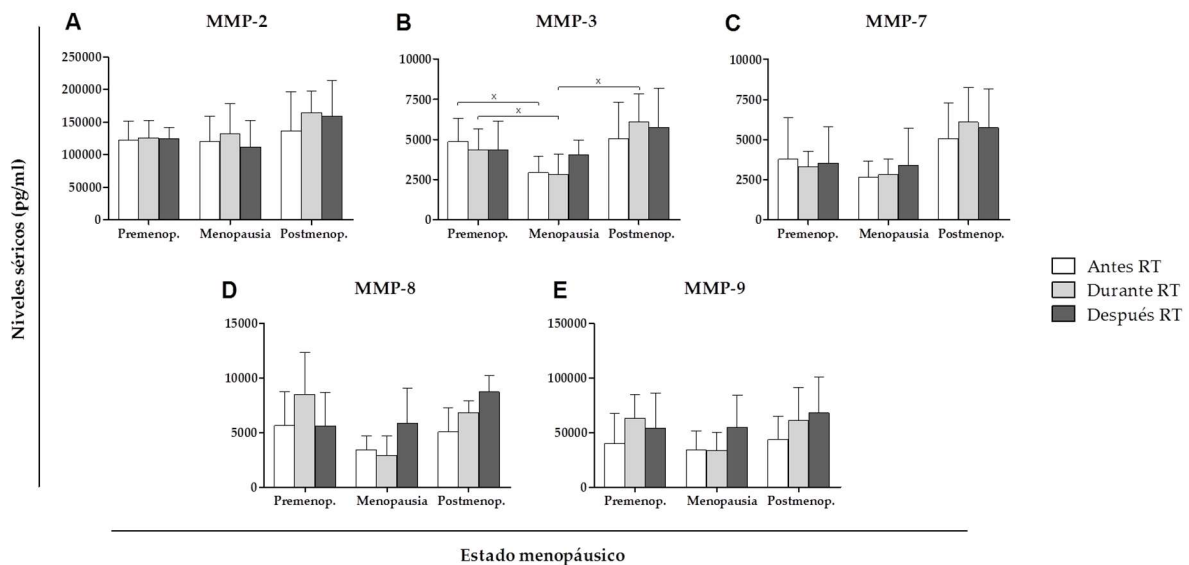
comportó de la misma manera que TIMP-3 pero con valores diferentes. En cambio, en pacientes mayores de 50 años aumentó durante y después de la RT.



**Figura 18:** Niveles séricos de TIMP-1 (A), TIMP-2 (B), TIMP-3 (C) y TIMP-4 (D) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la edad. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error).

La **Figura 19** muestra los niveles séricos de MMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el estado menopáusico. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, sólo se encontraron resultados estadísticamente significativos en MMP-3. De forma general, todas las proteínas aumentaron sus niveles en suero en pacientes postmenopáusicas. La MMP-2 (**Fig. 19A**) aumentó durante y después de la RT en pacientes premenopáusicas de forma muy leve, y en pacientes postmenopáusicas más visiblemente. En pacientes menopáusicas, en cambio, la MMP-2 aumentó durante la RT y disminuyó después de ella. La MMP-3 (**Fig. 19B**) presentó niveles inferiores en pacientes premenopáusicas durante y después de la RT, y aumentó en pacientes postmenopáusicas en los dos momentos del tratamiento. Sin embargo, en pacientes menopáusicas, la MMP-3 disminuyó muy levemente durante la RT y aumentó

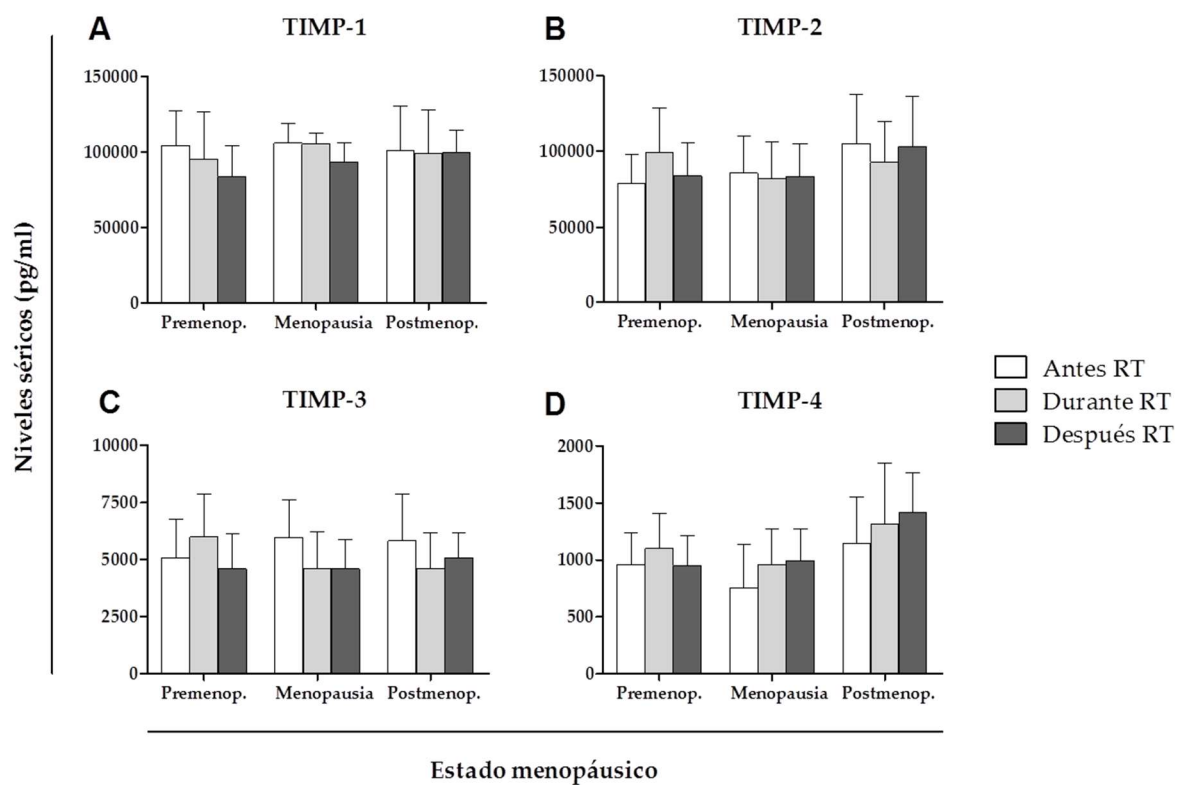
después de ella. La MMP-7 (**Fig. 19C**) disminuyó durante la RT y aumentó levemente después de ella, siendo en ambos casos sus niveles más bajos que antes de la RT. La MMP-8 (**Fig. 19D**) presentó niveles más bajos en pacientes menopáusicas, donde aumentó considerablemente después de la RT. En pacientes premenopáusicas, destacó la subida de MMP-8 durante la RT. Y en pacientes postmenopáusicas, la proteína aumentó gradualmente a lo largo del tratamiento. La MMP-9 (**Fig. 19E**) aumentó durante la RT en los tres grupos de pacientes. Después de la RT, disminuyó en pacientes premenopáusicas y siguió aumentando en pacientes menopáusicas y postmenopáusicas, siendo en los tres casos sus niveles mayores que antes de la RT.



**Figura 19:** Niveles séricos de MMP-2 (A), MMP-3 (B), MMP-7 (C), MMP-8 (D) y MMP-9 (E) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el estado menopáusico. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error); \*  $p < 0.05$ .

La **Figura 20** muestra los niveles séricos de TIMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el estado menopáusico. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, no se encontraron resultados estadísticamente significativos. Los niveles de TIMP-1 y TIMP-2 fueron muy superiores a los de TIMP-3 y TIMP-4. El TIMP-1 (**Fig. 20A**) disminuyó a lo largo del tratamiento en los tres grupos de pacientes, siendo de forma muy leve en pacientes postmenopáusicas. El TIMP-2 (**Fig. 20B**) aumentó durante la RT y disminuyó después de ella en pacientes

premenopáusicas, siendo sus niveles en ambos casos mayores que antes de la RT. Sin embargo, en pacientes menopáusicas y postmenopáusicas, los niveles de TIMP-2 durante y después de la RT fueron más bajos que antes de ella. El TIMP-3 (Fig. 20C) siguió una tendencia diferente en los tres grupos de pacientes, disminuyendo en todos los casos durante y después de la RT, excepto en pacientes premenopáusicas donde aumentó durante la RT. El TIMP-4 (Fig. 20D), en pacientes premenopáusicas aumentó durante la RT y sus niveles fueron más bajos después de ella. En cambio, en los otros dos grupos de pacientes, TIMP-4 aumentó durante y después de la RT.

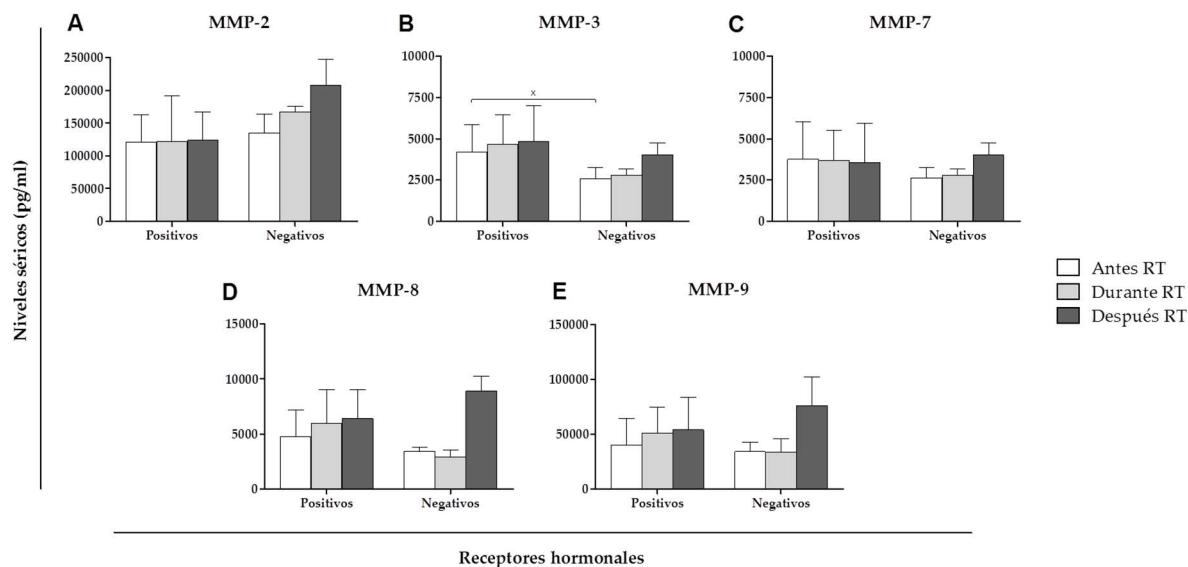


**Figura 20:** Niveles séricos de TIMP-1 (A), TIMP-2 (B), TIMP-3 (C) y TIMP-4 (D) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el estado menopáusico. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error).

### 3.5. Niveles séricos de proteínas en variables dependientes de la biología del tumor

Las 20 pacientes de cáncer de mama se agruparon de acuerdo con las variables estudiadas dependientes de la biología del tumor: estado de receptores hormonales, grado de diferenciación, positividad o negatividad para E-cadherina y p53, porcentaje de Ki67, y afectación del ganglio centinela.

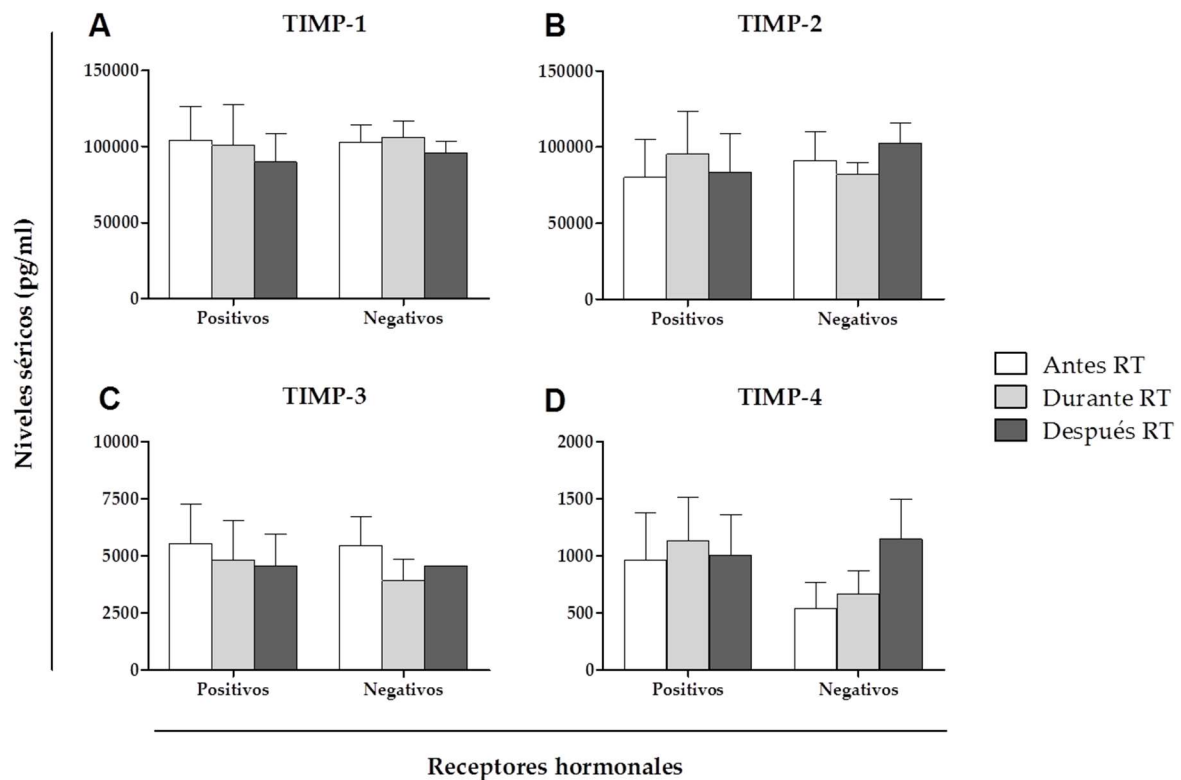
La **Figura 21** muestra los niveles séricos de MMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el estado de los receptores hormonales. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, sólo se encontraron resultados estadísticamente significativos en MMP-3. La MMP-2 (**Fig. 21A**) se mantuvo prácticamente constante en pacientes con tumores hormono-dependientes, y aumentó gradualmente durante y después de la RT en las pacientes con tumores no hormono-dependientes. La MMP-3 (**Fig. 21B**) aumentó con el tratamiento en ambos grupos de pacientes, presentando niveles mayores en pacientes con tumores con receptores hormonales positivos. La MMP-7 (**Fig. 21C**) presentó una tendencia contraria a lo largo del tratamiento en los dos grupos de pacientes, disminuyendo levemente en pacientes con tumores con receptores hormonales positivos y aumentando con mayor diferencia en las pacientes con tumores con receptores hormonales negativos. Tanto la MMP-8 (**Fig. 21D**) como la MMP-9 (**Fig. 21E**) aumentaron levemente a lo largo del tratamiento en pacientes con tumores positivos para receptores hormonales. Sin embargo, en pacientes con tumores negativos para receptores hormonales, los niveles de ambas proteínas fueron similares antes y durante de la RT, pero aumentaron en gran medida después de la RT.



**Figura 21:** Niveles séricos de MMP-2 (A), MMP-3 (B), MMP-7 (C), MMP-8 (D) y MMP-9 (E) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el estado de receptores hormonales. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error); \*  $p < 0.05$ .

La **Figura 22** muestra los niveles séricos de TIMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el estado de receptores hormonales. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, no se encontraron resultados estadísticamente significativos. Tanto el TIMP-1 (**Fig. 22A**) como el TIMP-3 (**Fig. 22C**) disminuyeron gradualmente durante y después de la RT en pacientes con tumores con receptores hormonales positivos. Sin embargo, en pacientes con tumores con receptores hormonales negativos, TIMP-1 aumentó durante la RT y disminuyó después de ella, quedando sus niveles después de la RT por debajo que antes de ella; y TIMP-3 disminuyó durante la RT y aumentó después de ella, siendo sus niveles en ambos casos más bajos que antes de la RT. El TIMP-2 (**Fig. 22B**) y el TIMP-4 (**Fig. 22D**) también se comportaron igual en pacientes con tumores con receptores hormonales positivos, aumentando durante la RT y disminuyendo después de ella, volviendo a unos niveles similares a los que tenían antes de la RT. En cambio, en pacientes con tumores con receptores hormonales negativos, TIMP-2 disminuyó durante la RT y aumentó después de ella, superando los niveles de antes de la RT; y TIMP-4 aumentó durante y después de la RT.

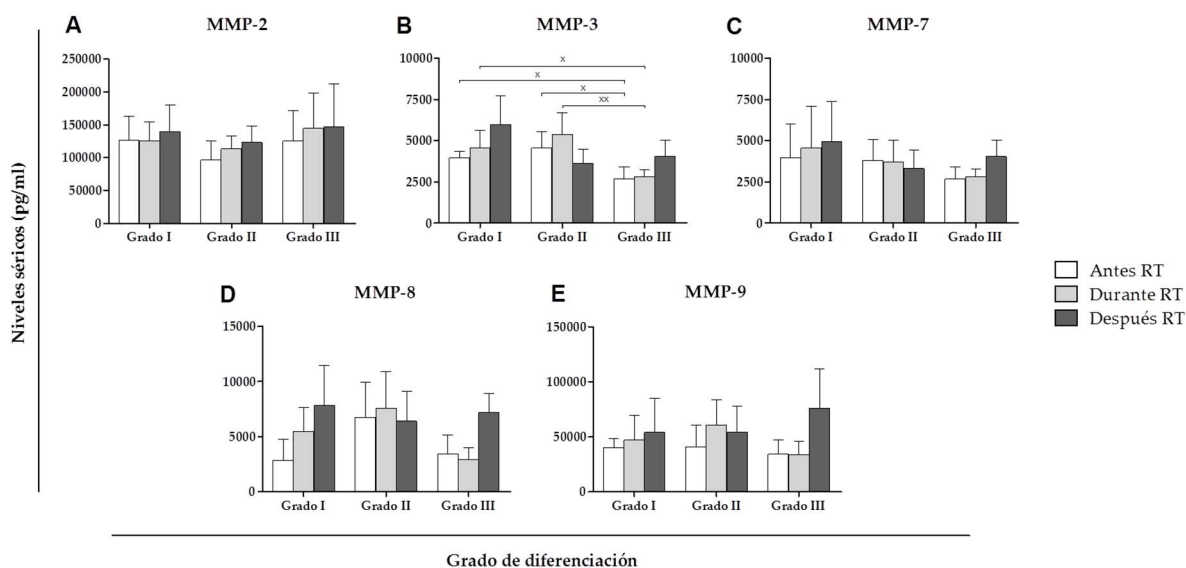




**Figura 22:** Niveles séricos de TIMP-1 (A), TIMP-2 (B), TIMP-3 (C) y TIMP-4 (D) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el estado de receptores hormonales. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error).

La **Figura 23** muestra los niveles séricos de MMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el grado de diferenciación tumoral. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, sólo se encontraron resultados estadísticamente significativos para MMP-3. La MMP-2 (**Fig. 23A**) aumentó a lo largo del tratamiento en los tres grupos de pacientes, presentando niveles mayores en pacientes de grado III. La MMP-3 (**Fig. 23B**) aumentó durante y después de la RT en pacientes de grado I y III. Sin embargo, en pacientes de grado II, la MMP-3 aumentó durante la RT y disminuyó después de ella, quedando sus niveles por debajo de antes de la RT. La MMP-7 (**Fig. 23C**) aumentó a lo largo del tratamiento en pacientes de grado I y III, y disminuyó en las de grado II. La MMP-8 (**Fig. 23D**) presentó tendencias diferentes en los tres grupos de pacientes. En pacientes de grado I, la MMP-8 aumentó durante y después de la RT. En pacientes de grado II, la proteína aumentó durante la RT y disminuyó después de ella. En pacientes de grado III, la MMP-8 disminuyó levemente durante la RT y aumentó

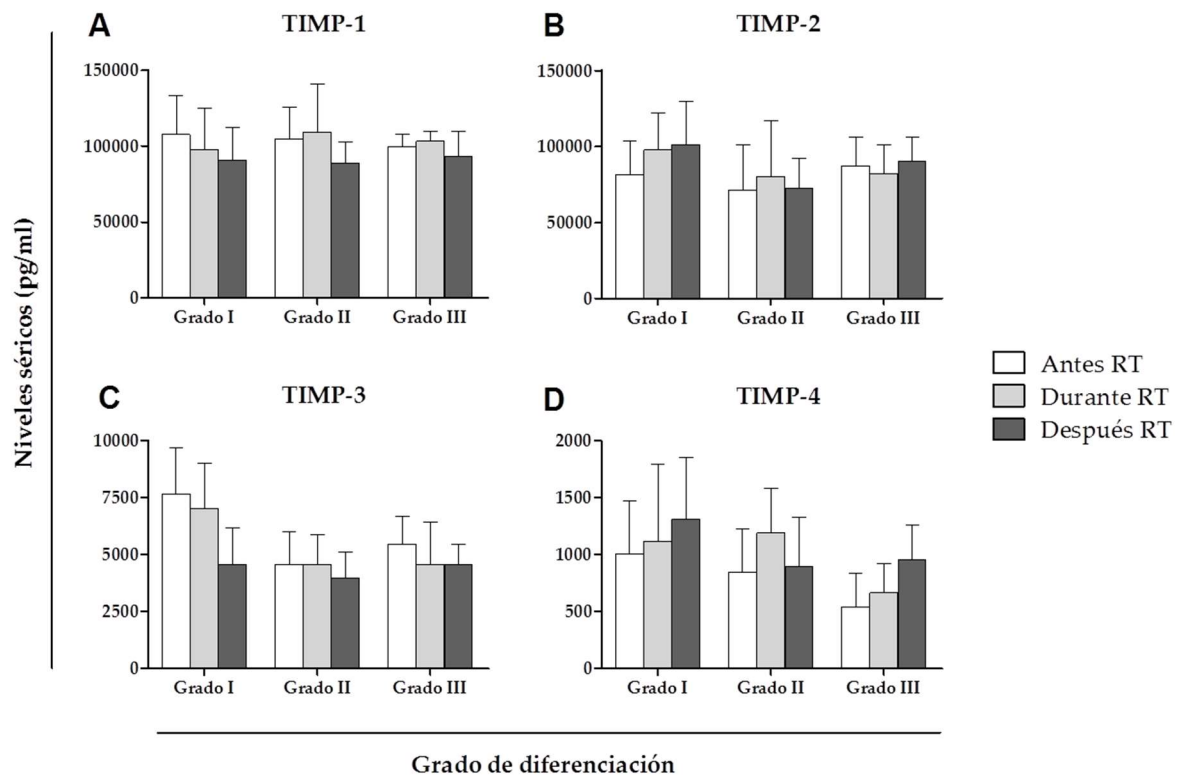
considerablemente después de ella. La MMP-9 (**Fig. 23E**) aumentó durante y después de la RT con respecto a los niveles de antes de la RT tanto en pacientes de grado I como de grado II. Sin embargo, en pacientes de grado III, los niveles de MMP-9 se mantuvieron similares durante la RT y aumentaron fuertemente después de ella.



**Figura 23:** Niveles séricos de MMP-2 (**A**), MMP-3 (**B**), MMP-7 (**C**), MMP-8 (**D**) y MMP-9 (**E**) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el grado de diferenciación tumoral. Los valores se representan como mediana  $\pm$  SD (barras de error); \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ .

La **Figura 24** muestra los niveles séricos de TIMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el grado de diferenciación tumoral. Tras analizar los valores de estas proteínas de acuerdo con la variable en estudio, no se encontraron resultados estadísticamente significativos. El TIMP-1 (**Fig. 24A**) disminuyó sus niveles después de la RT con respecto antes de ella en los tres grupos de pacientes. Sin embargo, durante la RT, TIMP-1 disminuyó en pacientes de grado I y aumentó en pacientes de grado II y III. El TIMP-2 (**Fig. 24B**) aumentó durante y después de la RT en pacientes de grado I. En pacientes tanto de grado II como de grado III, los niveles no variaron mucho a lo largo del tratamiento, habiendo aumentado durante la RT en pacientes de grado II y disminuido en pacientes de grado III. El TIMP-3 (**Fig. 24C**) disminuyó sus niveles a lo largo del tratamiento en los tres grupos de pacientes, siendo más destacado en pacientes de grado I. El TIMP-4 (**Fig. 24D**) aumentó durante y después de la RT en pacientes de grado I y III. En

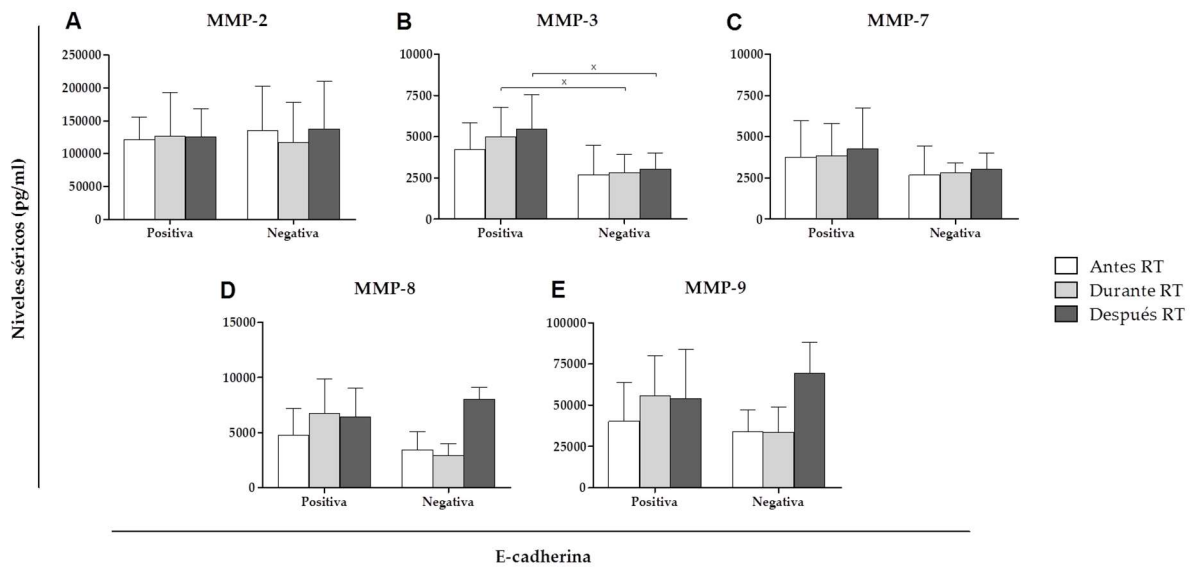
cambio, en pacientes de grado II el TIMP-4 aumentó durante la RT y disminuyó después de ella, presentado valores similares a los de antes de la RT.



**Figura 24:** Niveles séricos de TIMP-1 (A), TIMP-2 (B), TIMP-3 (C) y TIMP-4 (D) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el grado de diferenciación tumoral. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error).

La **Figura 25** muestra los niveles séricos de MMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la positividad/negatividad de la E-cadherina. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, sólo se encontraron resultados estadísticamente significativos en MMP-3. La MMP-2 (**Fig. 25A**) presentó niveles similares a lo largo del tratamiento en pacientes con E-cadherina positiva. En pacientes con E-cadherina negativa la MMP-2 disminuyó durante la RT y aumentó después de ella. La MMP-3 (**Fig. 25B**) y MMP-7 (**Fig. 25C**) aumentaron sus niveles durante y después de la RT en los dos grupos de pacientes. La MMP-8 (**Fig. 25D**) aumentó sus niveles durante y después de la RT con respecto antes de ella en pacientes con E-cadherina positiva. En cambio, en pacientes con E-cadherina negativa la MMP-8 disminuyó levemente durante la RT y aumentó

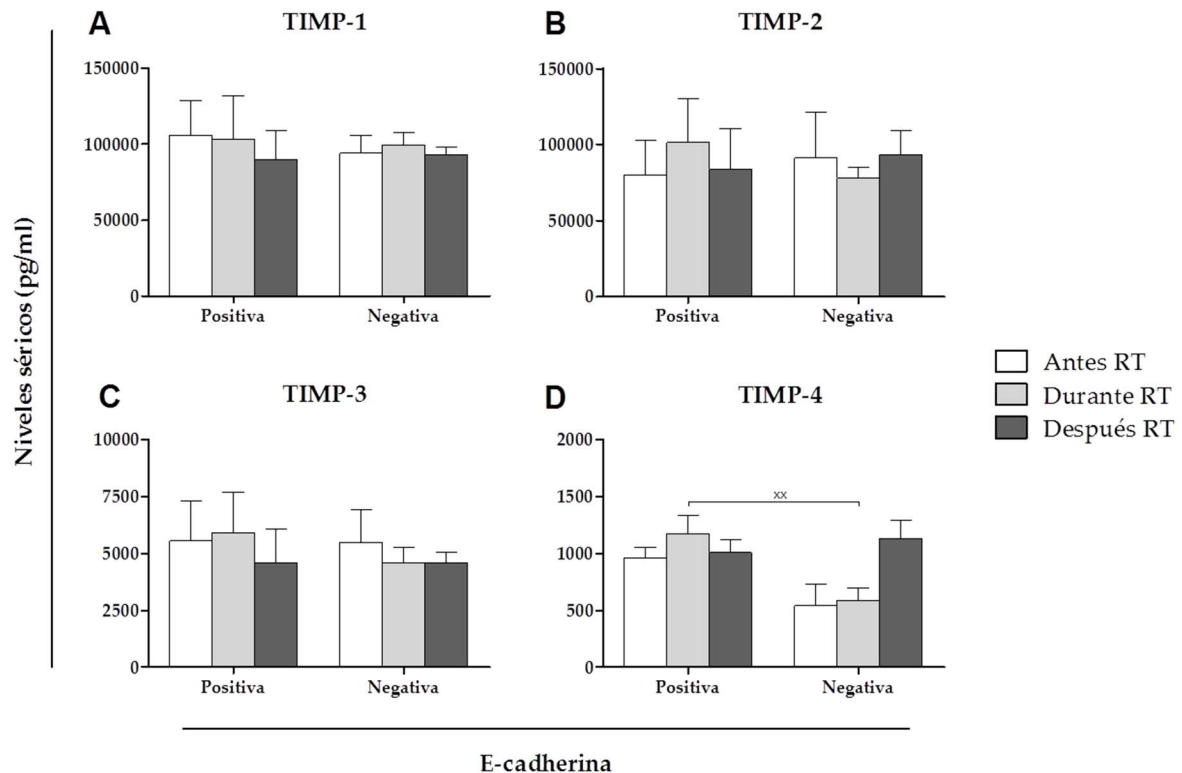
en gran medida después de ella. La MMP-9 (**Fig. 25E**) aumentó durante y después de la RT con respecto antes de la RT en pacientes con E-cadherina positiva. Sin embargo, en pacientes con E-cadherina negativa, la MMP-9 se mantuvo prácticamente constante durante la RT y aumentó después de ella.



**Figura 25:** Niveles séricos de MMP-2 (A), MMP-3 (B), MMP-7 (C), MMP-8 (D) y MMP-9 (E) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la positividad/negatividad de la E-cadherina. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error); \*  $p < 0.05$ .

La **Figura 26** muestra los niveles séricos de TIMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la positividad/negatividad de la E-cadherina. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, sólo se encontraron resultados estadísticamente significativos en TIMP-4. El TIMP-1 (**Fig. 26A**) disminuyó a lo largo del tratamiento en pacientes con E-cadherina positiva; mientras que en las con E-cadherina negativa, el TIMP-1 aumentó durante la RT y disminuyó después de ella. El TIMP-2 (**Fig. 26B**) presentó después de la RT valores similares a los de antes de ella en ambos grupos de pacientes. Sin embargo, durante la RT el TIMP-2 aumentó en pacientes con E-cadherina positiva y disminuyó en aquellas con E-cadherina negativa. El TIMP-3 (**Fig. 26C**) aumentó durante la RT y disminuyó después de ella en pacientes con E-cadherina positiva. En cambio, en pacientes con E-cadherina negativa, disminuyó sus niveles durante y después de la RT. TIMP-4 (**Fig. 26D**) aumentó durante y después de la RT con respecto a sus niveles

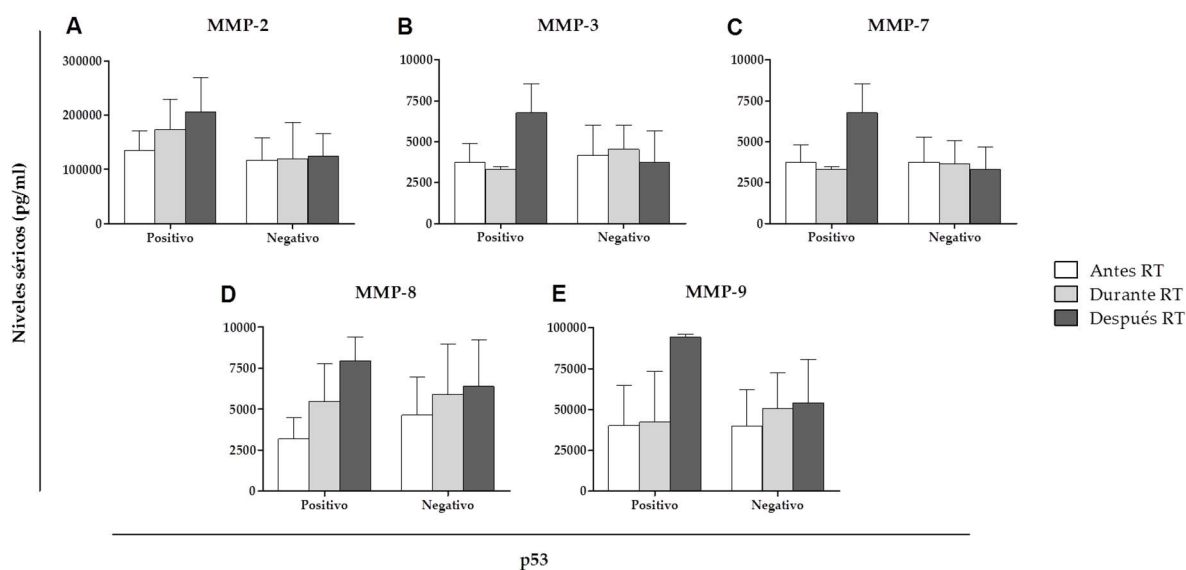
antes de ella en los dos grupos de pacientes, obteniéndose los mayores niveles durante la RT en pacientes con E-cadherina positiva, y después de la RT en aquellas con E-cadherina negativa.



**Figura 26:** Niveles séricos de TIMP-1 (A), TIMP-2 (B), TIMP-3 (C) y TIMP-4 (D) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la positividad/negatividad de la E-cadherina. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error); <sup>xx</sup>  $p < 0.01$ .

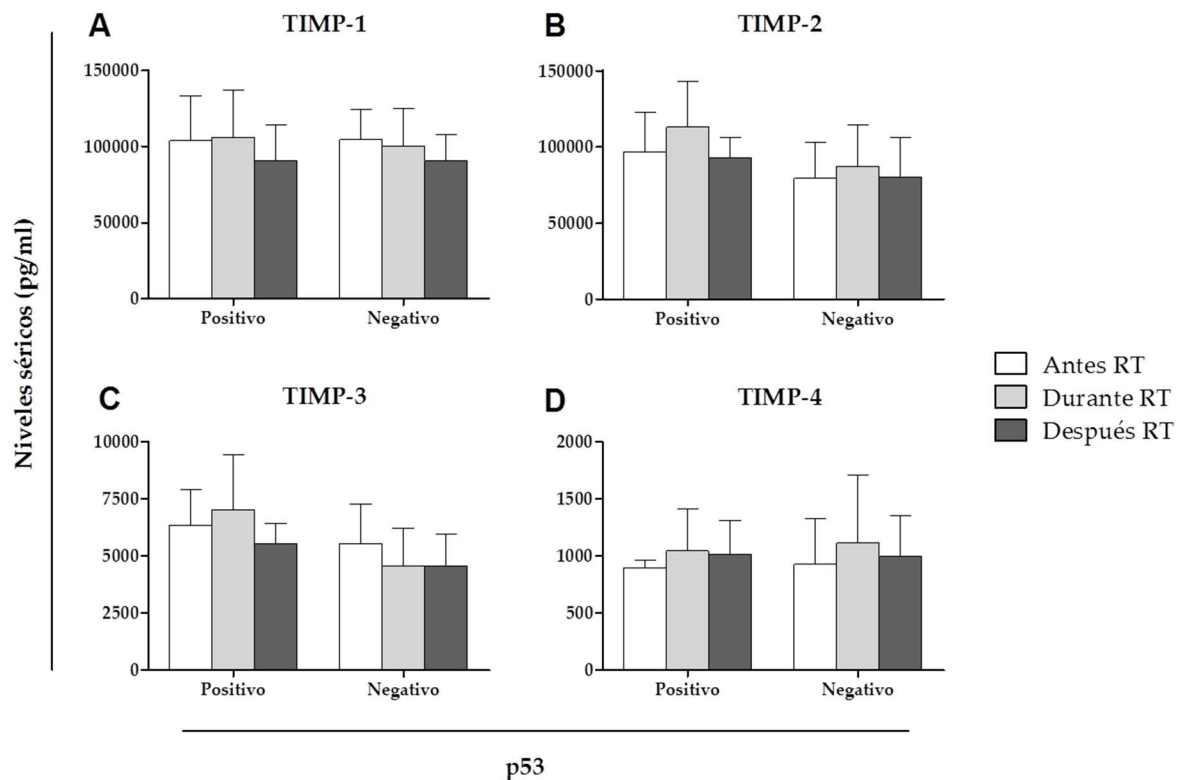
La **Figura 27** muestra los niveles séricos de MMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la positividad/negatividad de p53. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, no se encontraron resultados estadísticamente significativos. La MMP-2 (**Fig. 27A**) aumentó a lo largo del tratamiento en pacientes con p53 positiva; mientras que se mantuvo prácticamente constante en aquellas con p53 negativa. La MMP-3 (**Fig. 27B**) disminuyó durante la RT y aumento después de ella en pacientes con p53 positiva. Por el contrario, la MMP-3 se comportó de forma inversa en pacientes con p53 negativa. La MMP-7 (**Fig. 27C**) disminuyó a lo largo del tratamiento en pacientes con p53 negativa; mientras que en pacientes con p53 positiva, la proteína disminuyó durante la RT y aumentó fuertemente después de ella. La MMP-8 (**Fig. 27D**) y

MMP-9 (**Fig. 27E**) aumentaron a lo largo del tratamiento en los dos grupos de pacientes, siendo más destacado en ambas proteínas en pacientes con p53 positiva.



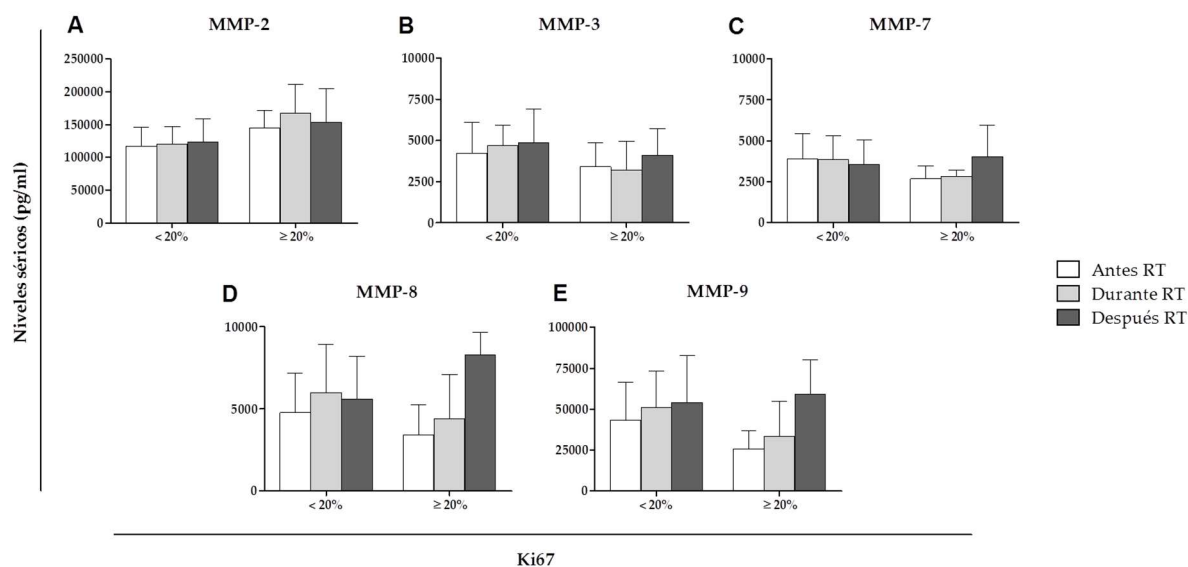
**Figura 27:** Niveles séricos de MMP-2 (**A**), MMP-3 (**B**), MMP-7 (**C**), MMP-8 (**D**) y MMP-9 (**E**) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la positividad/negatividad de p53. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error).

La **Figura 28** muestra los niveles séricos de TIMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la positividad/negatividad de p53. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, no se encontraron resultados estadísticamente significativos. Todos los TIMPs, TIMP-1 (**Fig. 28A**), TIMP-2 (**Fig. 28B**), TIMP-3 (**Fig. 28C**) y TIMP-4 (**Fig. 28D**), aumentaron durante la RT y disminuyeron después de ella en pacientes con p53 positiva. Sin embargo, en pacientes con p53 negativa, TIMP-1 y TIMP-3 disminuyeron a lo largo del tratamiento durante y después de la RT; mientras que TIMP-2 y TIMP-4 aumentaron durante la RT y disminuyeron después de ella.



**Figura 28:** Niveles séricos de TIMP-1 (A), TIMP-2 (B), TIMP-3 (C) y TIMP-4 (D) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la positividad/negatividad de p53. Los valores se expresan como mediana ± SD (barras de error).

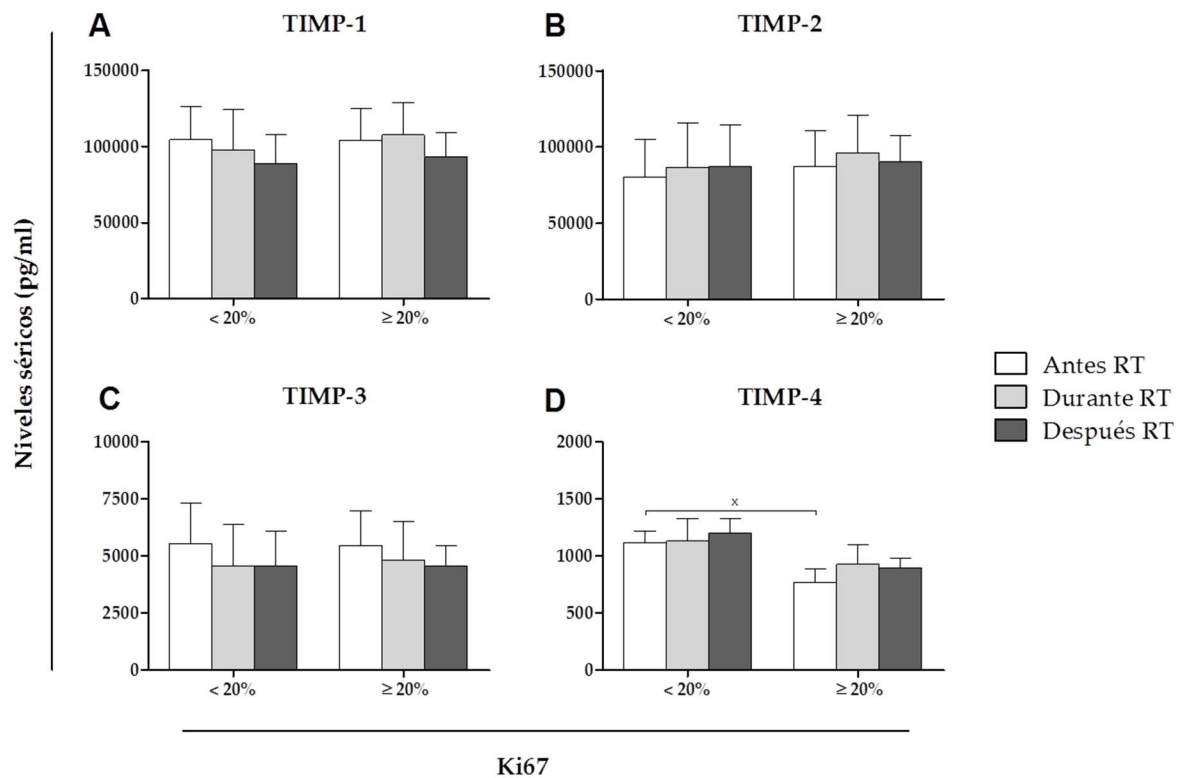
La **Figura 29** muestra los niveles séricos de MMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el porcentaje de Ki67. Tras estudiar los valores pacientes de cáncer de mama agrupadas según la edad, no se encontraron resultados estadísticamente significativos. Las MMP-2 (**Fig. 29A**) mantuvo sus niveles similares aunque con un leve aumento a lo largo del tratamiento en pacientes con Ki67 < 20%. En pacientes con Ki67 ≥ 20%, la MMP-2 aumentó durante la RT y disminuyó después de ella, siendo sus niveles en ambos casos mayores que los de antes de la RT. La MMP-3 (**Fig. 29B**) aumentó a lo largo del tratamiento en pacientes con Ki67 < 20%; mientras que disminuyó durante la RT y aumentó después de ella en pacientes con Ki67 ≥ 20%. La MMP-7 (**Fig. 29C**) disminuyó a lo largo del tratamiento en pacientes con Ki67 < 20%, y aumentó en aquellas con Ki67 ≥ 20%. La MMP-8 (**Fig. 29D**) aumentó sus niveles durante y después de la RT con respecto a los de antes de la RT. La MMP-9 (**Fig. 29E**) aumentaron a lo largo del tratamiento en los dos grupos de pacientes.



**Figura 29:** Niveles séricos de MMP-2 (A), MMP-3 (B), MMP-7 (C), MMP-8 (D) y MMP-9 (E) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el porcentaje de Ki67. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error).

La **Figura 30** muestra los niveles séricos de TIMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el porcentaje de Ki67. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, sólo se encontraron resultados estadísticamente significativos en TIMP-4. El TIMP-1 (**Fig. 30A**) disminuyó a lo largo del tratamiento en pacientes con Ki67 < 20 %. En cambio, aumentó durante la RT y disminuyó después de ella en pacientes con Ki67  $\geq$  20%. El TIMP-2 (**Fig. 30B**) aumentó sus niveles durante y después de la RT con respecto a los de antes de la RT en ambos grupos de pacientes. El TIMP-3 (**Fig. 30C**) disminuyó a lo largo del tratamiento en los dos grupos de pacientes. El TIMP-4 (**Fig. 30D**) aumentó levemente a lo largo del tratamiento en pacientes tanto con Ki67 < 20 % como con Ki67  $\geq$  20 %.

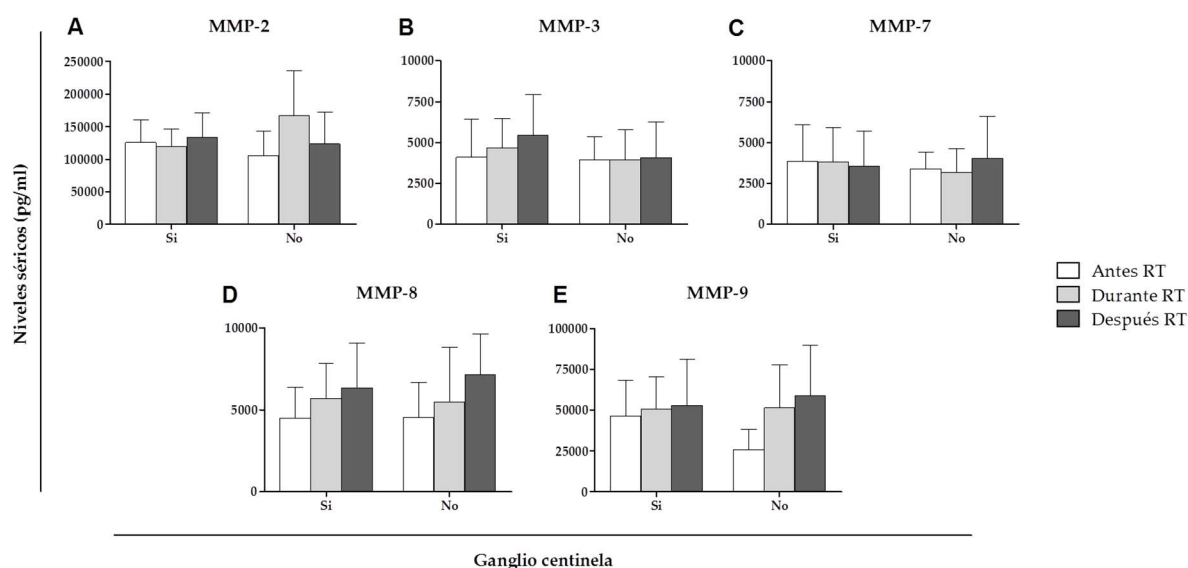




**Figura 30:** Niveles séricos de TIMP-1 (A), TIMP-2 (B), TIMP-3 (C) y TIMP-4 (D) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el porcentaje de Ki67. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error); \*  $p < 0.05$ .

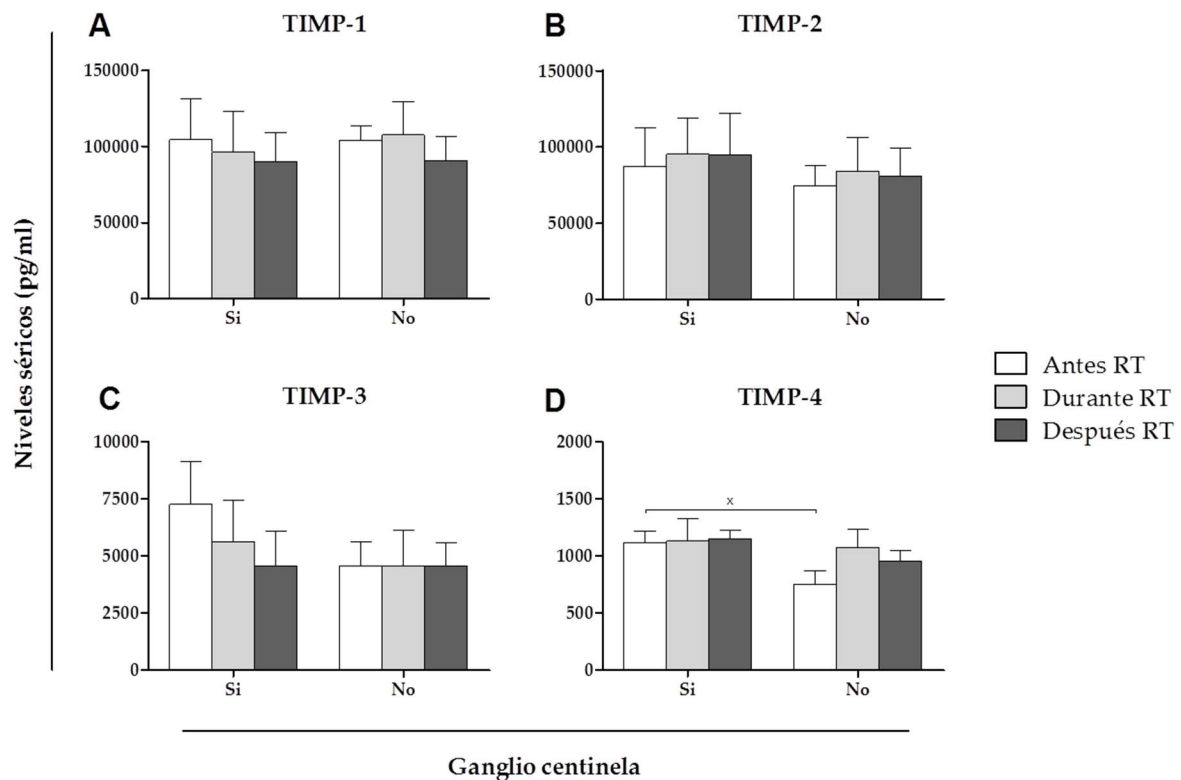
La **Figura 31** muestra los niveles séricos de MMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la afectación del ganglio centinela. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, no se encontraron resultados estadísticamente significativos. La MMP-2 (**Fig. 31A**) mantuvo niveles similares a lo largo del tratamiento en pacientes con el ganglio centinela afectado. Sin embargo, en pacientes que no lo tenían afectado, la MMP-2 aumentó durante la RT y disminuyó después de ella, siendo sus niveles en ambos casos mayores que los de antes de la RT. La MMP-3 (**Fig. 31B**) aumentó a lo largo del tratamiento en pacientes con afectación del ganglio centinela; mientras que se mantuvo prácticamente constante en aquellas sin afectación del mismo. La MMP-7 (**Fig. 31C**) disminuyó muy levemente a lo largo del tratamiento en pacientes con el ganglio centinela afectado. Por el contrario, en pacientes sin afectación del ganglio centinela, la MMP-7 disminuyó de forma leve durante la RT y aumentó después de ella. Tanto la MMP-8

(Fig. 31D) como la MMP-9 (Fig. 31E) aumentaron a lo largo del tratamiento en los dos grupos de pacientes.



**Figura 31:** Niveles séricos de MMP-2 (A), MMP-3 (B), MMP-7 (C), MMP-8 (D) y MMP-9 (E) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la afectación del ganglio centinela. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error).

La **Figura 32** muestra los niveles séricos de TIMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la afectación del ganglio centinela. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, sólo se encontraron resultados estadísticamente significativos en TIMP-4. El TIMP-1 (**Fig. 32A**) disminuyó a lo largo del tratamiento en pacientes con el ganglio centinela afectado; mientras que en aquellas sin afectación de éste, aumentó durante la RT y disminuyó después de ella, ambos con respecto a los niveles antes de la RT. El TIMP-2 (**Fig. 32B**) aumentaron durante y después de la RT al comparar sus niveles con los de antes de la RT en los dos grupos de pacientes. El TIMP-3 (**Fig. 32C**) disminuyó a lo largo del tratamiento en pacientes con el ganglio centinela afectado, y permaneció prácticamente constante en pacientes sin afectación del ganglio. El TIMP-4 (**Fig. 32D**) apenas varió a lo largo del tratamiento en pacientes con el ganglio centinela afectado. Sin embargo, en pacientes sin afectación del ganglio aumentó durante la RT y disminuyó después de ella, siendo los niveles de TIMP-4 en ambos momentos mayores que los de antes de la RT.



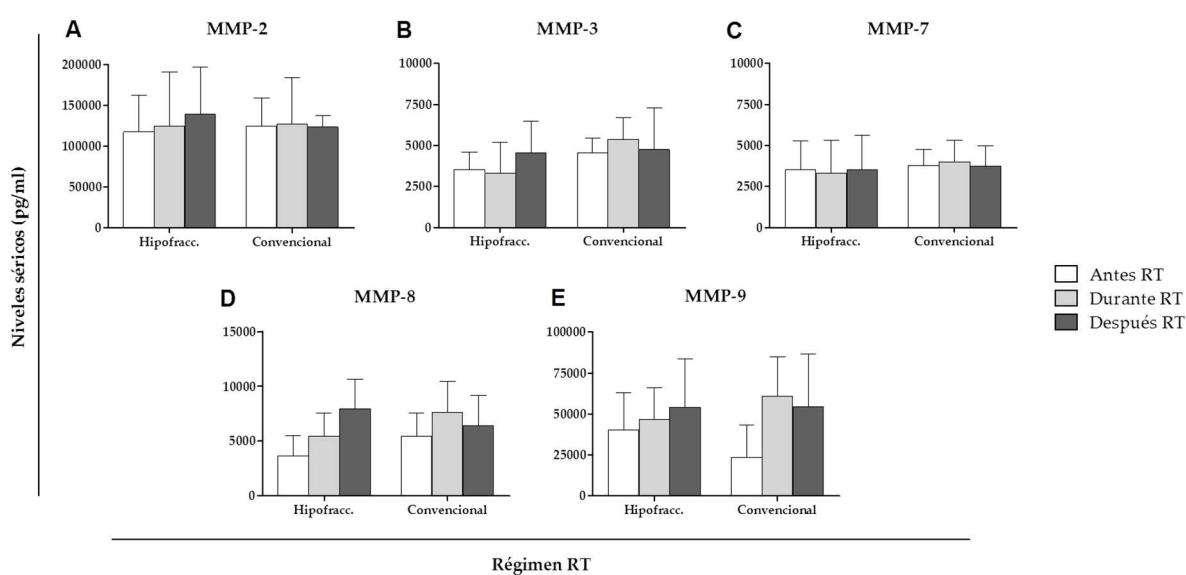
**Figura 32:** Niveles séricos de TIMP-1 (A), TIMP-2 (B), TIMP-3 (C) y TIMP-4 (D) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la afectación del ganglio centinela. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error); \*  $p < 0.05$ .

### 3.6. Niveles séricos de proteínas en variables relacionadas con la RT

Las 20 pacientes de cáncer de mama se agruparon de acuerdo con las variables estudiadas relacionadas con la RT: régimen radioterápico, RT de ganglios linfáticos, y presencia de radiotoxicidad.

La **Figura 33** muestra los niveles séricos de MMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el régimen radioterápico recibido. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, no se encontraron resultados estadísticamente significativos. La MMP-2 (**Fig. 33A**) aumentó a lo largo de la RT en pacientes con RT hipofraccionada; mientras que en pacientes con RT convencional, los niveles de MMP-2 apenas mostraron cambios. La MMP-3 (**Fig. 33B**) apenas varió sus niveles

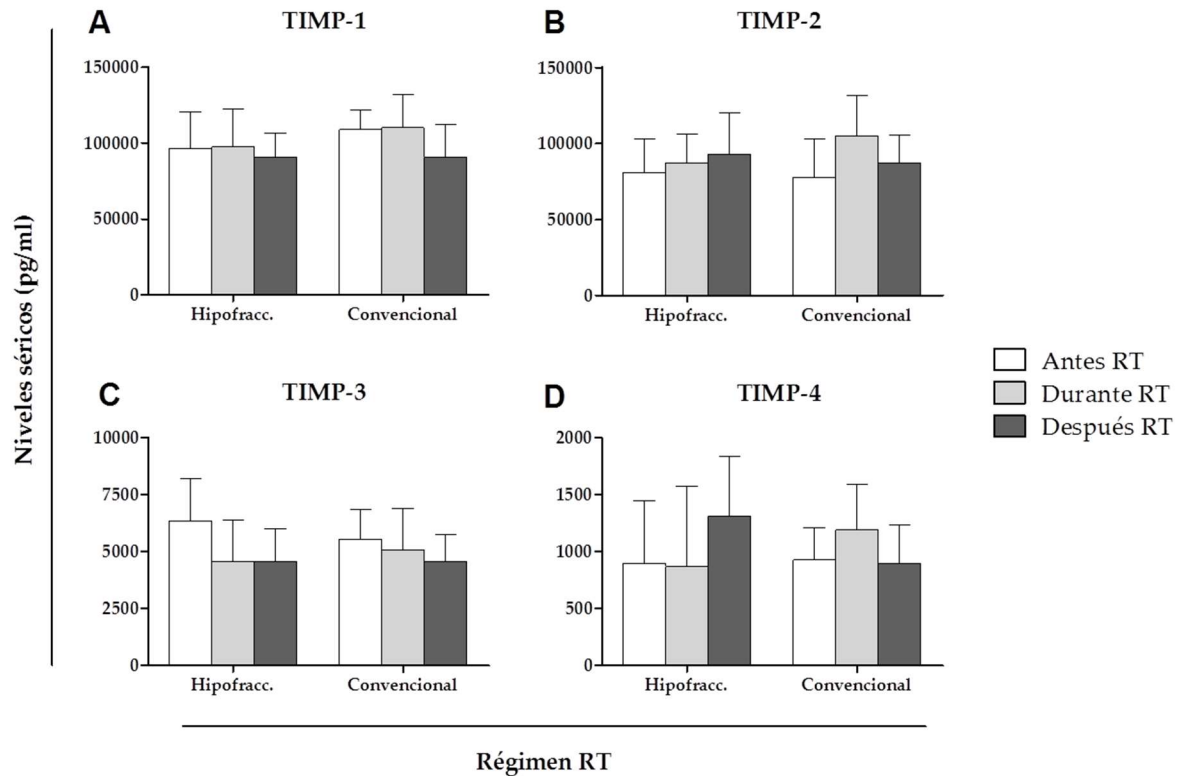
durante la RT y aumentó después de ella en pacientes con RT hipofraccionada. En pacientes con RT convencional, la MMP-3 aumentó durante la RT y disminuyó después de ella, volviendo a unos niveles parecidos a los de antes de la RT. La MMP-7 (**Fig. 33C**) varió levemente a lo largo del tratamiento en los dos grupos de pacientes. Tanto la MMP-8 (**Fig. 33D**) como la MMP-9 (**Fig. 33E**) siguieron la misma tendencia con la RT. En pacientes con RT hipofraccionada, ambas proteínas aumentaron sus niveles a lo largo del tratamiento; en pacientes con RT convencional, MMP-8 y MMP-9 aumentaron durante la RT y disminuyeron después de ella.



**Figura 33:** Niveles séricos de MMP-2 (A), MMP-3 (B), MMP-7 (C), MMP-8 (D) y MMP-9 (E) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el régimen radioterápico recibido. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error).

La **Figura 34** muestra los niveles séricos de TIMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el régimen radioterápico recibido. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, no se encontraron resultados estadísticamente significativos. El TIMP-1 (**Fig. 34A**) varió levemente a lo largo del tratamiento en pacientes con RT hipofraccionada; mientras que en pacientes con RT convencional apenas varió durante la RT y disminuyó después de ella. El TIMP-2 (**Fig. 34B**) aumentó a lo largo del tratamiento en pacientes con RT hipofraccionada. Sin embargo, en pacientes con RT convencional, el TIMP-2 aumentó durante la RT y disminuyó después de

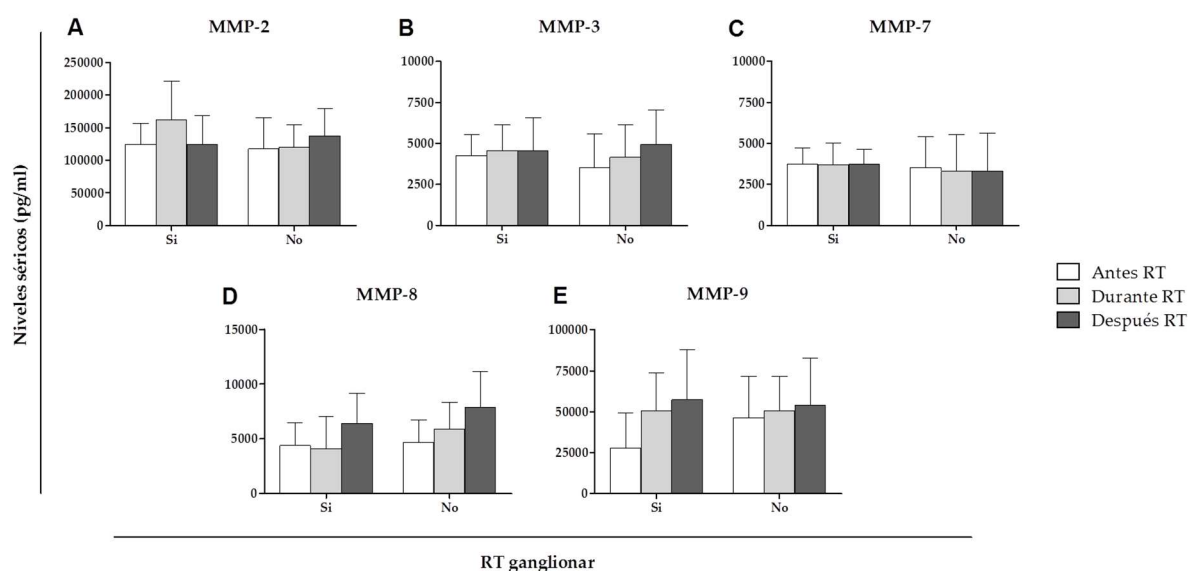
ella, siendo ambos niveles más altos que los de antes de la RT. El TIMP-3 (**Fig. 34C**) disminuyó durante y después de la RT con respecto a sus niveles antes de ella en los dos grupos de pacientes. El TIMP-4 (**Fig. 34D**) sólo aumentó después de la RT en pacientes con RT hipofraccionada, mientras que en pacientes con RT convencional aumentó durante la RT.



**Figura 34:** Niveles séricos de TIMP-1 (A), TIMP-2 (B), TIMP-3 (C) y TIMP-4 (D) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el régimen radioterápico recibido. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error).

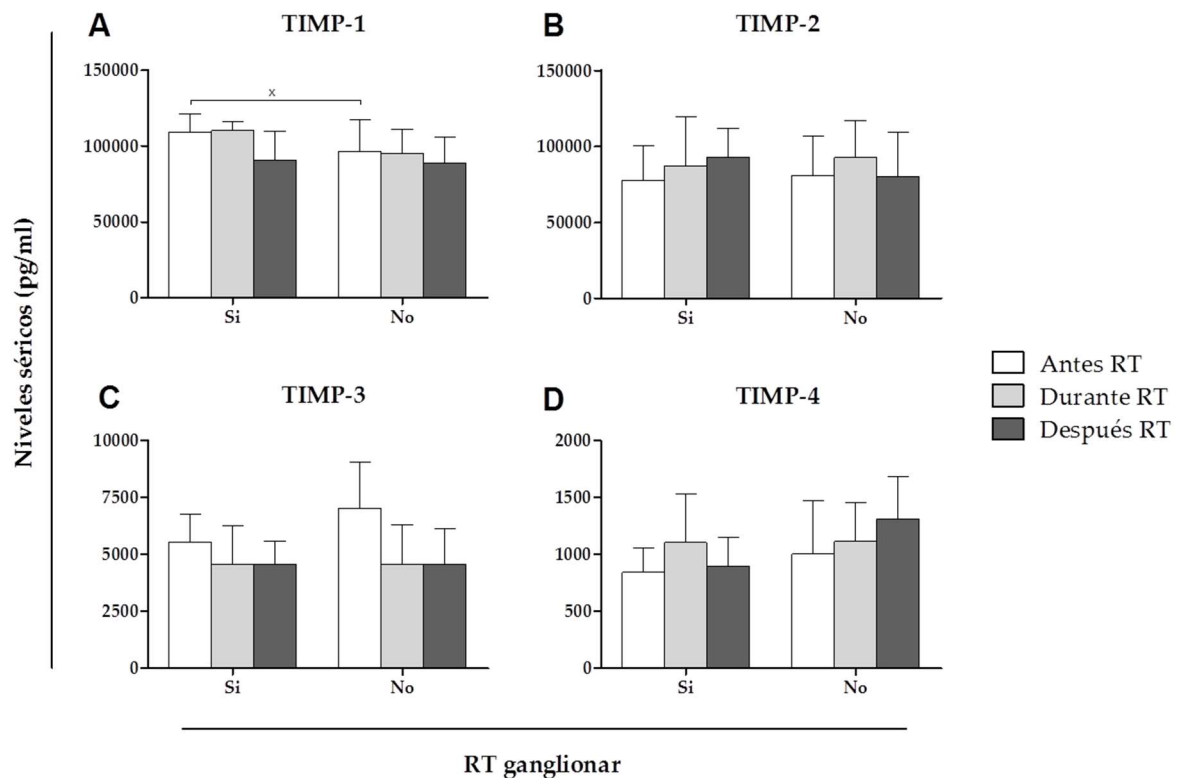
La **Figura 35** muestra los niveles séricos de MMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la administración de RT ganglionar. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, no se encontraron resultados estadísticamente significativos. La MMP-2 (**Fig. 35A**) aumentó durante la RT y disminuyó después de ella en pacientes que recibieron RT ganglionar. En las que no la recibieron, la MMP-2 aumentó a lo largo del tratamiento. Tanto la MMP-3 (**Fig. 35B**) como la MMP-9 (**Fig. 35E**) aumentaron a lo largo del tratamiento en los dos grupos de pacientes. La MMP-7 (**Fig. 35C**) prácticamente no presentó cambios en ningún momento del tratamiento en

ninguno de los grupos de pacientes. La MMP-8 (**Fig. 35D**) apenas varió durante la RT y aumentó después de ella en pacientes con RT ganglionar; mientras que en las pacientes sin RT ganglionar, la MMP-8 aumentó a lo largo del tratamiento.



**Figura 35:** Niveles séricos de MMP-2 (A), MMP-3 (B), MMP-7 (C), MMP-8 (D) y MMP-9 (E) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la administración de RT ganglionar. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error).

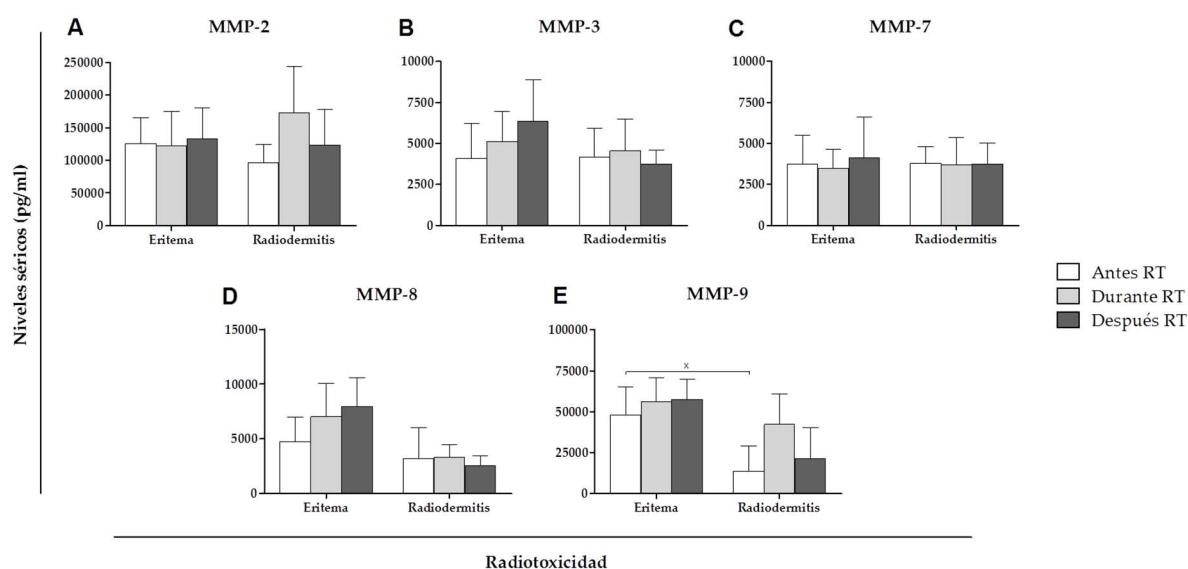
La **Figura 36** muestra los niveles séricos de TIMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la administración de RT ganglionar. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, sólo se encontraron resultados estadísticamente significativos en TIMP-1. El TIMP-1 (**Fig. 36A**) apenas varió durante la RT y sí disminuyó después de ella en pacientes con RT ganglionar. En cambio, en pacientes sin RT ganglionar el TIMP-1 disminuyó levemente a lo largo del tratamiento. El TIMP-2 (**Fig. 36B**) aumentó a lo largo del tratamiento en pacientes con RT ganglionar, mientras que en pacientes sin RT ganglionar el TIMP-2 aumentó durante la RT y volvió a los niveles iniciales después de ella. El TIMP-3 (**Fig. 36C**) disminuyó durante y después de la RT en ambos grupos de pacientes. El TIMP-4 (**Fig. 36D**) aumentó durante la RT y disminuyó después de ella en pacientes con RT ganglionar; mientras que en las pacientes con RT ganglionar el TIMP-4 aumentó a lo largo del tratamiento.



**Figura 36:** Niveles séricos de TIMP-1 (A), TIMP-2 (B), TIMP-3 (C) y TIMP-4 (D) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la administración de RT ganglionar. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error);  $^x p < 0.05$ .

La **Figura 37** muestra los niveles séricos de MMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la radiotoxicidad presentada. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, sólo se encontraron resultados estadísticamente significativos en MMP-9. La MMP-2 (**Fig. 37A**) disminuyó y aumentó, levemente, durante y después de la RT, respectivamente en pacientes con eritema. En pacientes con radiodermatitis, los cambios fueron más visibles donde la MMP-2 aumentó durante la RT y disminuyó después de ella, siendo sus niveles en ambos momentos del tratamiento mayores que antes de la RT. La MMP-3 (**Fig. 37B**) aumentó a lo largo del tratamiento en pacientes con eritema. En cambio, en pacientes con radiodermatitis la MMP-3 aumentó levemente durante la RT y disminuyó después de ella. La MMP-7 (**Fig. 37C**) apenas presentó cambios en ningún grupo de pacientes, aunque aumentó después de la RT en pacientes con eritema. Tanto la MMP-8 (**Fig. 37D**) como la MMP-9 (**Fig. 37E**) aumentaron durante la RT en pacientes con eritema. Sin embargo, en pacientes con radiodermatitis la

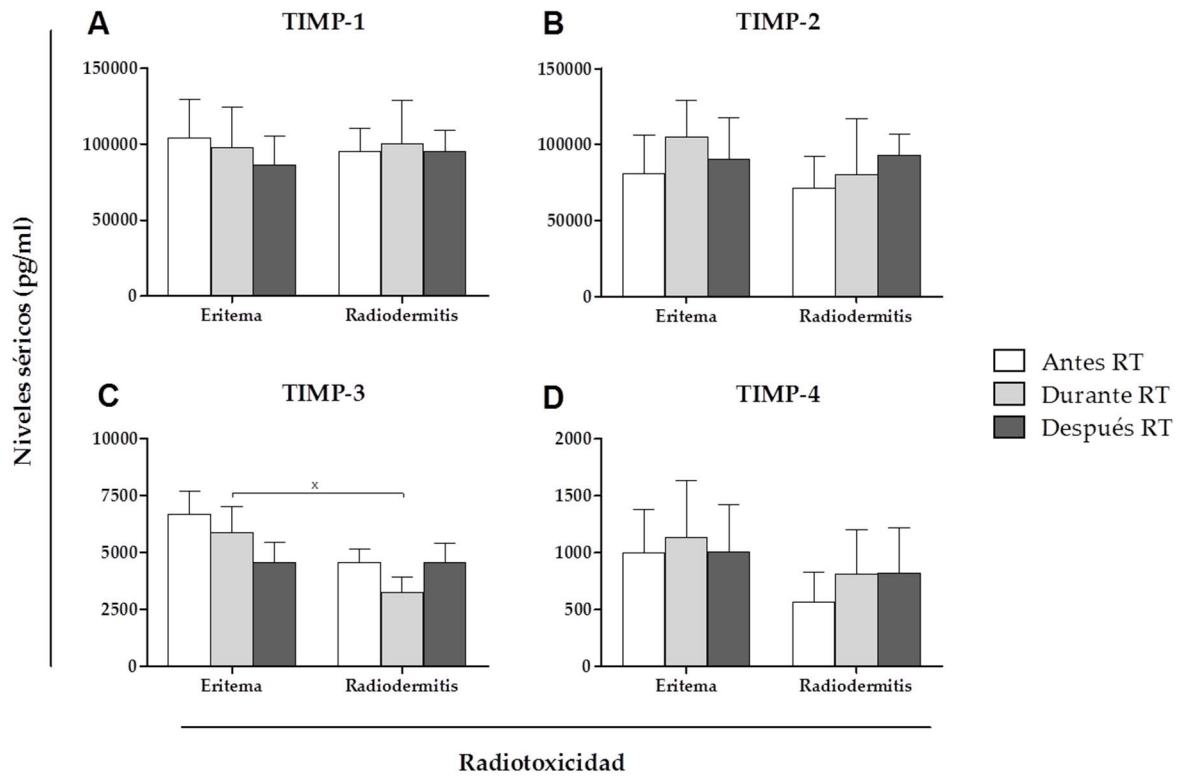
MMP-8 apenas varió durante la RT y disminuyó después de ella; y la MMP-9 aumentó durante la RT y disminuyó después de ella, presentando en ambos momentos niveles mayores que antes de la RT.



**Figura 37:** Niveles séricos de MMP-2 (A), MMP-3 (B), MMP-7 (C), MMP-8 (D) y MMP-9 (E) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la radiotoxicidad presentada. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error); \*  $p < 0.05$ .

La **Figura 38** muestra los niveles séricos de TIMPs antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la radiotoxicidad presentada. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, sólo se encontraron resultados estadísticamente significativos en TIMP-3. El TIMP-1 (**Fig. 38A**) disminuyó a lo largo del tratamiento en pacientes con eritema. En pacientes con radiodermatitis, el TIMP-1 tuvo niveles similares antes y después de la RT y, sin embargo, aumentó durante la RT. El TIMP-2 (**Fig. 38B**) tuvo niveles mayores durante y después de la RT con respecto a los de antes de la ella en ambos grupos de pacientes. El TIMP-3 (**Fig. 38C**) disminuyó a lo largo del tratamiento en pacientes con eritema. En pacientes con radiodermatitis, el TIMP-3 disminuyó durante la RT y volvió a los niveles iniciales después de ella. El TIMP-4 (**Fig. 38D**) tuvo niveles similares antes y después de la RT en pacientes con eritema y aumentó durante la RT. En cambio, en pacientes con radiodermatitis el TIMP-4 presentó niveles mayores tanto durante como después de la RT en comparación con los de antes de ella.





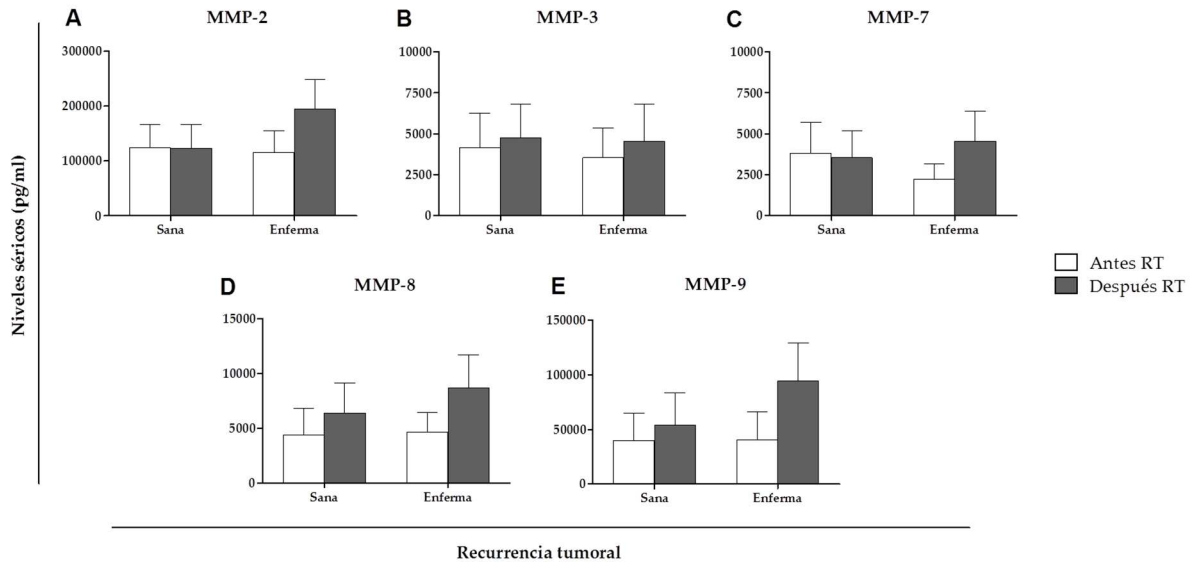
**Figura 38:** Niveles séricos de TIMP-1 (A), TIMP-2 (B), TIMP-3 (C) y TIMP-4 (D) antes, durante y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la radiotoxicidad presentada. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error); \*  $p < 0.05$ .

### 3.7. Recurrencia tumoral

A los 6 meses de finalizar la RT, se determinó la recurrencia tumoral de las pacientes de cáncer de mama. Para ello, las 20 pacientes se clasificaron en dos grupos: sanas (sin recurrencia) y enfermas (con recurrencia). La supervivencia global fue del 100% y la supervivencia libre de enfermedad fue del 85% (Tabla 4).

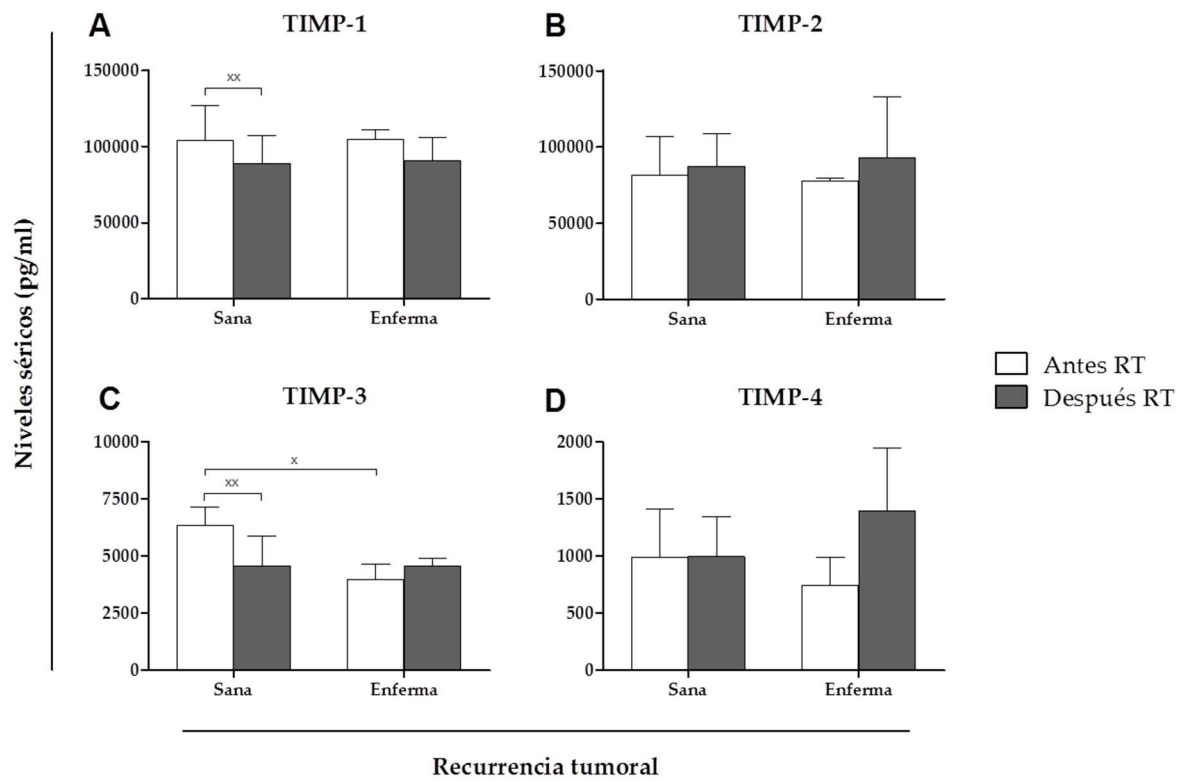
La Figura 39 muestra los niveles séricos de MMPs antes y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la recurrencia tumoral a los 6 meses del tratamiento. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, no se encontraron resultados estadísticamente significativos. La MMP-2 (Fig. 39A) apenas mostro variaciones una vez finalizado el tratamiento en pacientes sin recurrencia, mientras que en pacientes con recurrencia la MMP-2 aumentó después de la RT. Las MMP-3 (Fig. 39B), MMP-8 (Fig. 39D) y MMP-9 (Fig. 39E) aumentaron sus niveles después de la RT en ambos grupos de

pacientes. La MMP-7 (**Fig. 39C**) disminuyó levemente después de la RT en pacientes sanas pero aumentó en las pacientes enfermas.



**Figura 39:** Niveles séricos de MMP-2 (**A**), MMP-3 (**B**), MMP-7 (**C**), MMP-8 (**D**) y MMP-9 (**E**) antes y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la recurrencia tumoral a los 6 meses del tratamiento. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error).

La **Figura 40** muestra los niveles séricos de TIMPs antes y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la recurrencia tumoral a los 6 meses del tratamiento. Tras estudiar los valores proteicos de acuerdo con esta variable, se encontraron resultados estadísticamente significativos en TIMP-1 y TIMP-3. El TIMP-1 (**Fig. 40A**) disminuyó después de la RT tanto en pacientes sanas como enfermas, siendo esta disminución significativa en las sanas. El TIMP-2 (**Fig. 40B**) aumentó después de la RT en los dos grupos de pacientes. El TIMP-3 (**Fig. 40C**) disminuyó significativamente después de la RT en pacientes sin recurrencia, y aumentó levemente en pacientes con recurrencia. Además, hubo significancia al comparar los niveles de TIMP-3 antes de iniciar el tratamiento, en los 2 grupos de pacientes. El TIMP-4 (**Fig. 40D**) no presentó diferencias entre antes y después de la RT en pacientes sanas. Sin embargo, en pacientes enfermas el TIMP-4 aumentó bastante después de la RT pero sin valores significativos.



**Figura 40:** Niveles séricos de TIMP-1 (A), TIMP-2 (B), TIMP-3 (C) y TIMP-4 (D) antes y después de la RT en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la recurrencia tumoral a los 6 meses del tratamiento. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  SD (barras de error); \*  $p < 0.05$ .



# DISCUSIÓN

---



En primer lugar, en esta Tesis Doctoral se han usado las líneas celulares tumorales MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3 de cáncer de mama, en las que hemos evaluado la expresión de los marcadores de CSCs de mama ALDH1, CD44<sup>+</sup> y CD24<sup>-/low</sup> en cultivos 2D y 3D después de ser irradiados. La caracterización de las CSCs es esencial en la investigación debido a que estas células son candidatas como marcadores predictivos en el diagnóstico de cáncer de mama metastásico y, además, son un factor importante en el diseño de nuevos esquemas de tratamiento [43]. Nuestros resultados han puesto de manifiesto que los marcadores estudiados variaron su expresión en función del modelo de cultivo utilizado. En términos generales, el nivel de expresión de ALDH1 disminuyó con la radiación en ambos modelos de cultivo en las tres líneas celulares tumorales. Sin embargo, la expresión de CD44<sup>+</sup> aumentó con la radiación en el cultivo 3D, el cual contenía la subpoblación positiva, es decir, la subpoblación de CSCs. Dicho marcador se ha asociado con la EMT [33] y con un mal pronóstico en cáncer de mama y, además, está involucrado en la resistencia a la RT y la quimioterapia en varios tipos de cánceres [34-36]. Se ha propuesto que algunas isoformas de CD44 están involucradas en la metástasis, así como en la resistencia a ROS y a quimioterapia, lo cual se relaciona con un pronóstico desfavorable [184-187]. En este sentido, Tsubouchi *et al.* han investigado el papel de estas isoformas con respecto a la radioresistencia en células de cáncer pancreático irradiadas. Los mismos autores han demostrado que CD44s (isoforma estándar) está especialmente regulado al alza después de ser irradiado a alta dosis de rayos X. Esto contribuye a la supervivencia celular a largo plazo después de la radiación, a través del mantenimiento de la fosforilación de Erk y de cambios semejantes a la EMT inducidos por radiación en la expresión de proteínas [188]. Por tanto, CD44 juega un papel importante en la adquisición de radioresistencia.

La RT, es una modalidad de tratamiento altamente selectiva y efectiva en la mayoría de tumores, como es el caso del cáncer de mama. El éxito de la RT en la erradicación del tumor depende, principalmente, de la dosis total de radiación administrada, la cual viene limitada por la tolerancia de los tejidos normales que rodean el tumor. Pero también hay otras limitaciones debido a que la mayoría de las terapias contra el cáncer se centran en las células tumorales, sin considerar el papel del microambiente en la regulación del crecimiento celular y la metástasis tumoral [189-190] y sin considerar la proliferación de CSCs dentro del tumor [191]. Los componentes del microambiente facilitan el crecimiento tumoral a través

de la producción de ECM, citoquinas, factores de crecimiento, señales mecánicas y redes vasculares para el intercambio de nutrientes y desechos [190]. Por tanto, es de suma importancia comprender el papel del microambiente tumoral en la resistencia intrínseca y adquirida que presentan los tumores. Además, el microambiente es esencial en el mantenimiento de las células madre normales en estado de reposo, al mismo tiempo que conserva su potencial de proliferación y diferenciación. Por lo que también es importante identificar los procesos biológicos en los que las CSCs interactúan con el microambiente circundante para entender el papel de éstas en lo referente al fracaso del tratamiento y a la recurrencia del tumor [192].

En segundo lugar, en las mismas líneas celulares tumorales, también hemos estudiado la influencia de la RT en la expresión de MMPs y sus inhibidores (TIMPs y HDACs). Para ello se obtuvieron tres subpoblaciones celulares de cada línea tumoral, las cuales se cultivaron en dos modelos de cultivo 3D: esferas en suspensión y embebidas en Matrigel (IrECM). Los cultivos celulares 3D están siendo esenciales en el desarrollo celular y en la biología del cáncer debido a que son capaces de desarrollar un microambiente *in vitro* controlado y reproducible que imita el entorno *in vivo* [32], gracias a las interacciones célula-célula y célula-ECM. Algunos autores han demostrado que las células tumorales derivadas de cáncer de mama y sembradas en un modelo 3D con Matrigel, inicialmente se multiplican formando esferas altamente estructuradas. Estos autores han sugerido la posibilidad de que estos comportamientos estén relacionados con la carcinogénesis *in vivo* [193].

La obtención de las distintas subpoblaciones celulares se ha llevado a cabo para poder comparar el comportamiento del total celular (subpoblación general) con las fracciones de CSCs (subpoblación positiva) y no-CSCs (subpoblación negativa). Las CSCs son una pequeña porción de células dentro del tumor [11] y son un gran objetivo de estudio por ser capaces de originar, mantener y expandir tumores [11-12], debido a su capacidad de autorenovación, de supervivencia en el torrente sanguíneo y de resistencia a los tratamientos oncológicos como la RT y la quimioterapia [12-14]. Es decir, las CSCs, debido a su radioresistencia intrínseca, pueden sobrevivir a los regímenes de tratamiento convencionales y repoblar el tumor [194], contribuyendo a la recurrencia y la metástasis tumoral. Por lo que representan una población crítica en la predicción del resultado del tratamiento, y su número y



radiosensibilidad son importantes para el control del tumor después de la radiación. Se ha informado que el número de CSCs varía ampliamente en los tumores, y en modelos animales se ha demostrado que dicho número se correlaciona con la dosis de radiación única requerida para el control del tumor [195].

Las MMPs, cuya principal función es la remodelación de la ECM [22], se han relacionado con la progresión del cáncer de mama [140], interviniendo en la vascularización tumoral, la invasión y metástasis, la diferenciación, la proliferación y la apoptosis [196]; por lo que están bastante implicadas en la progresión del tumor. Aunque hay evidencias que indican que, según el tipo de cáncer, las propias MMPs también pueden jugar un papel opuesto en las diferentes etapas de la progresión tumoral [197-198]. También hay evidencias de que, tras el tratamiento con radiación, se produce una alteración en la actividad de estas MMPs, la cual necesita ser regulada por sus inhibidores (TIMPs y HDACs) [21]. Los TIMPs no sólo participan en la inhibición de las MMPs sino también en actividades biológicas independientes de ellas, teniendo un importante papel en la inducción de la proliferación y la inhibición de la apoptosis [199]. La mayoría de los estudios se han centrado en TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3; sin embargo, poco se sabe acerca de TIMP-4. Las HDACs han demostrado ser una categoría prometedora para los objetivos farmacológicos contra el cáncer en estudios preclínicos y clínicos [200-201]. La mayoría de las HDACs están sobreexpresadas en cáncer de mama, lo que conduce a la desacetilación de las histonas y al aumento de la proliferación celular, la angiogénesis y la invasión [202].

Respecto al estudio realizado mediante los cultivos 3D y 3D+lrECM, nuestros resultados mostraron que con la radiación los niveles de expresión de MMP-1 y MMP-3 aumentaron en la subpoblación positiva (CSCs) en la línea MDA-MB-231 en ambos modelos de cultivo, siendo más altos en las células cultivadas en 3D+lrECM. Por tanto, sugerimos que este modelo de cultivo podría contribuir a la aparición de un fenotipo de MDA-MB-231 más agresivo tras la radiación. Además, también destacaron los niveles de MMP-9 y MMP-13 en la misma línea tumoral en el cultivo 3D. La MMP-1 está altamente expresada en cáncer de mama [203] y algunos autores han encontrado que puede tener un efecto sobre el microambiente tumoral [204]. La alta expresión de MMP-1 también se ha relacionado con una tasa de supervivencia global más baja en cáncer de mama invasivo [205] y un peor

pronóstico en los pacientes tratados con terapia sistémica [206]. Se sabe la MMP-3 que está involucrada en la regulación de la EMT [207-208] y participa en la ruptura de las uniones mediadas por E-cadherina, favoreciendo la invasión [106, 209]. La MMP-9 es una de las principales responsables en la remodelación de la ECM, por lo que se está convirtiendo en un importante biomarcador para la metástasis [140-141]. Además, esta MMP se ha identificado como un factor predictivo de resultados adversos y se ha relacionado con escasa supervivencia [133-134]. La MMP-13 está fuertemente relacionada con la invasión y metástasis del tumor, y su expresión puede ayudar a predecir el pronóstico y la respuesta a la RT en pacientes con carcinoma oral de células escamosas [210]. Esta MMP también está involucrada en el crecimiento tumoral mediante una regulación de la actividad y la biodisponibilidad de los factores de crecimiento secuestrados en la ECM [38]. Además, se ha sugerido que, en glioblastoma, el potencial altamente invasivo de las CSCs depende de la actividad enzimática de la MMP-13 [211].

En cuanto a las HDACs, hemos encontrado que las alteraciones producidas por la radiación pueden depender de la dosis administrada y de la subpoblación celular estudiada. Las HDACs regulan la influencia de las MMPs en la carcinogénesis a través de cambios epigenéticos en el microambiente, los cuales tienen lugar tras la radiación [169]. Hay evidencias de que HDAC-1 puede desencadenar la proliferación y migración celular en cáncer de mama mediante la activación de Snail/IL-8 [212]. La HDAC-2 es más expresada en los subgrupos más agresivos de cáncer de mama [213] y es un factor clave en la regulación del fenotipo de CSCs y del crecimiento *in vivo* en osteosarcoma [214]. Algunos autores han demostrado la importancia de la interacción entre HDAC-4 y 53BP1 para mediar en la respuesta al daño del DNA [215], y han sugerido que HDAC-4 es un componente estratégico de la compleja maquinaria molecular responsable de la radioresistencia en algunos tumores agresivos como el glioblastoma multiforme [216].

En cuanto a los TIMPs, nuestros resultados mostraron, de forma general, un aumento en los niveles de expresión de TIMP-1 en el cultivo 3D+lrECM y de TIMP-2 en el cultivo 3D, mostrando significancia al comparar las subpoblaciones celulares. Cid *et al.* han estudiado la implicación de las MMPs y los TIMPs en la agresividad del cáncer de mama para mejorar la evaluación pronóstica de todos los subtipos dentro de esta enfermedad [217]. Y Zagouri

*et al.* han documentado la utilización de TIMP-2 en el diagnóstico precoz del cáncer de mama [218]. Hay evidencias de que la regulación al alza de TIMP-1 y TIMP-2 conduce a la inhibición de la migración y la invasión celular en carcinoma hepatocelular [219]. También se ha demostrado que la sobreexpresión de TIMP-1 tiene un efecto radiosensibilizante en una línea celular de carcinoma renal [220].

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha analizado la relación entre la RT y la expresión de MMPS, TIMPs y HDACs en co-cultivo con Matrigel mediante la mezcla de las líneas celulares tumorales citadas anteriormente con fibroblastos. El co-cultivo con fibroblastos es importante para acercarnos aún más al microambiente tumoral y entender los cambios que pudiera haber en el comportamiento de la expresión. Nuestros resultados mostraron un aumento significativo en la expresión de la mayoría de los genes a la dosis de 6 Gy en las tres líneas celulares tumorales, pero sobretodo, en la línea tumoral MDA-MB-231. Esto apoyaría la idea de que los componentes del microambiente entre los que se encuentran fibroblastos asociados al cáncer, células endoteliales y células inmunes, desempeñan un papel crucial en la regulación de la función de las células tumorales y en la progresión de la enfermedad [221].

En tercer lugar, hemos investigado el efecto que tiene la radiación sobre el crecimiento tumoral a través de la inoculación ortotópica de las distintas subpoblaciones celulares de MDA-MB-231 irradiadas. Nuestros resultados mostraron que el crecimiento tumoral no sólo depende de la dosis de radiación sino también de la subpoblación celular estudiada. De esta forma, hemos obtenido el tumor de mayor volumen en la subpoblación general, la cual contiene tanto CSCs como no-CSCs. Nuestros resultados también revelaron que los tumores obtenidos tras la irradiación a 2 Gy de las subpoblaciones general y positiva, conteniendo ambas la fracción de CSCs, han presentado un volumen mayor con respecto al control no irradiado. Por tanto, este hallazgo apoyaría la idea de que la dosis de 2 Gy es insuficiente para erradicar las CSCs debido a la radioresistencia que éstas presentan y, además, esta dosis es capaz de promover el crecimiento del tumor. Dicho efecto fue más pronunciado en los tumores correspondientes a la subpoblación general, lo que sugiere la importancia de las interacciones de CSCs y no-CSCs en la proliferación tumoral después de la radiación. Estos datos también apoyan la hipótesis de que las no-CSCs exhiben un grado notable de

plasticidad que les permite volver a adquirir los rasgos de CSCs, lo cual está especialmente relacionado con la radiación [222]. Además, las CSCs no erradicadas son responsables de la repoblación tumoral debido a su potencial tumorigénico [41], lo que contribuye a la recaída de la enfermedad. Por el contrario, las dosis más altas de radiación (6 Gy) se asocian con un retraso en el crecimiento del tumor, probablemente debido a la muerte de las CSCs. Estos resultados estarían sustentando la relevancia clínica de los regímenes hipofraccionados en cáncer de mama, los cuales presentan una eficacia similar a la RT convencional con la ventaja de disminuir la toxicidad [8].

La principal razón de no erradicar las CSCs a dosis bajas de RT es la capacidad de recuperarse frente a las lesiones inducidas por la radiación mediante una serie de mecanismos intrínsecos como son la reparación del DNA, los puntos de control en el ciclo celular, y las vías Hedgehog, Notch y Wnt/ $\beta$ -catenina; y mediante mecanismos extrínsecos procedentes del entorno extracelular (nicho y microambiente) [8, 15]. Hay evidencias de que la vía Hedgehog, en CSCs de glioblastoma, interviene en las recaídas tras la RT por su implicación en la autorenovación y la tumorigenicidad de las células [101]. La activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina favorece la proliferación de las CSCs y su estabilidad en los nichos después de la RT, provocándoles radioresistencia [95, 110-112]. En cuanto a la vía Notch, se ha demostrado que está asociada a los nichos de CSCs, y se activa después de la radiación provocando un aumento de la división celular y una repoblación acelerada de las CSCs [107]. Los propios nichos también pueden alterarse tras la radiación y afectar a la supervivencia de las CSCs [112, 114-116] mediante la producción de citoquinas de supervivencia (EGF, FGF y VEGF), las cuales son responsables de la radioresistencia y la radioprotección presentes en las células tumorales [114].

En cuarto lugar, la relación entre la RT y los niveles de MMPs y TIMPs también ha sido investigada mediante un estudio piloto en suero de pacientes con cáncer de mama. A nuestro entender, este es el primer trabajo que examina tal asociación en una gama tan amplia de MMPs y TIMPs en esta enfermedad. Con respecto a las MMPs, considerando el coeficiente  $\rho$  (rho), encontramos una correlación positiva entre los niveles séricos de MMPs antes, durante y después de la RT, la cual se hace más fuerte con la radiación. Además, al analizar sus niveles séricos con el curso temporal del tratamiento, nuestros resultados

mostraron un ligero aumento no significativo en los niveles séricos de la mayoría de las MMPs analizadas después de la radiación, destacando los niveles de MMP-2 y MMP-9. Sin embargo, algunos autores han encontrado que los niveles séricos de MMP-9 antes de la radiación fueron significativamente más altos en comparación con los obtenidos después de ella, lo que sugiere su utilidad como indicadores de la eficacia de la RT en pacientes con cáncer de pulmón [223]. Una alta actividad tanto de MMP-2 como de MMP-9 aumentaría la degradación de la membrana basal mediante la degradación final del colágeno, dando lugar a la liberación de las células tumorales y favoreciendo la invasión tumoral [37]. Ambas MMPs están también involucradas en la formación de nuevos vasos sanguíneos, cuya función pro- o antiangiogénica puede variar según la biodisponibilidad de sustrato y el momento de su actividad [157].

Con respecto a los TIMPs, según el coeficiente  $\rho$  (rho), encontramos correlaciones tanto positivas como negativas entre sus niveles séricos en función del tiempo en el que se realizaron las medidas en los pacientes a lo largo de la RT, con un aumento en las correlaciones negativas para TIMP-1 y TIMP-3 con la RT. Además, considerando la evolución temporal del tratamiento, nuestros resultados revelaron una disminución estadísticamente significativa en los niveles séricos de TIMP-1 y TIMP-3 tras la RT, lo cual podría estar asociado con el aumento de algunas MMPs estudiadas en este trabajo. Al analizar el efecto de diferentes enfoques de tratamiento en los niveles de TIMP-1 y MMP-9 para una etapa tardía en cáncer de mama, Yuan *et al.* encontraron que todos los pacientes mostraron niveles séricos de MMP-9 más bajos y niveles de TIMP-1 más altos después de la RT, al compararlos con los niveles antes del tratamiento [224]. Algunos autores han descrito que TIMP-1 estimula la invasión del cáncer al inhibir la apoptosis, promover el crecimiento de las células tumorales y regular la angiogénesis en cáncer de mama metastásico [225-226], y se ha descrito una relación entre niveles séricos elevados de TIMP-1 y un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama [227]. Otros estudios han documentado una correlación de los niveles bajos de TIMP-3 con un fenotipo más agresivo de cáncer de mama y una peor supervivencia sin recaída [228-229]. De Schutter *et al.* evaluaron un grupo de 46 pacientes con cáncer de células escamosas en cabeza y cuello tratados sólo con RT y encontraron que el silenciamiento epigenético de TIMP-3 era un factor predictivo de mejor resultado [230].

Las variables estudiadas en las pacientes de cáncer de mama fueron agrupadas dependiendo de las propias pacientes, de la biología del tumor o del tratamiento administrado. Con respecto a las MMPs, encontramos correlaciones significativas entre los niveles de MMP-3 y el estado menopáusico, la clasificación tumoral, el grado de diferenciación y la presencia de E-cadherina. Se ha visto que la MMP-3 participa en la ruptura de las uniones mediadas por E-cadherina, favoreciendo la invasión [26]. Además, algunos autores han sugerido un papel clave de la E-cadherina en el desarrollo y crecimiento de tumores en ganglios linfáticos [231]. La edad y el estado menopáusico de las pacientes en cáncer de mama son de gran importancia debido a que a edades avanzadas se produce ARLI y se disminuye el riesgo de cáncer de mama [59-60]. La clasificación tumoral y el grado de diferenciación también son importantes, ya que son los principales influyentes a la hora de decidir el tratamiento en los cánceres. Nuestros resultados también sugirieron que los niveles de MMP-9 podrían predecir la toxicidad de la RT. En el cáncer de mama, la toxicidad cutánea es el efecto adverso más común; y en las pacientes estudiadas, en particular, los efectos agudos como el eritema y la radiodermatitis fueron los más observados siendo los niveles de MMP-9 mayores en las pacientes con eritema.

Con respecto a los TIMPs, encontramos una correlación significativa entre los niveles séricos de TIMP-3 y la toxicidad presentada por los pacientes después de la RT. En este caso, tanto las pacientes con eritema como las pacientes con radiodermatitis presentaron niveles altos de TIMP-3. Nuestros resultados también mostraron una correlación significativa entre los niveles séricos de TIMP-1 y la RT de ganglios linfáticos, obteniendo niveles aumentados durante el tratamiento en comparación con los pacientes que no recibieron RT ganglionar. Y además, correlaciones significativas entre los niveles de TIMP-4 y la afectación del ganglio centinela, el porcentaje de Ki67 y la presencia de E-cadherina. Debido a estos resultados, estos TIMPs podrían considerarse como biomarcadores de pronóstico, ya que la proteína Ki67 está involucrada en la división celular [46], y la proteína E-cadherina media las adhesiones célula-célula y está relacionada con la progresión tumoral y la metástasis [53]. Además, el ganglio centinela es el primer ganglio alcanzado por las células tumorales una vez que tiene lugar la invasión celular, e interviene en la invasión y metástasis a los ganglios linfáticos [57].

En cuanto a la recurrencia tumoral a los 6 meses de finalizar la RT, nuestros resultados mostraron niveles séricos más altos después de la RT en la mayoría de MMPs y TIMPs detectados en las pacientes con recidiva tumoral. Aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, los niveles altos de estas proteínas apoyan su influencia en todos los procesos de la carcinogénesis descritos anteriormente (invasión y metástasis, EMT, crecimiento tumoral, evasión de la apoptosis, formación de vasos sanguíneos, inflamación y formación de nichos premetastásicos), y su relación con un mal pronóstico de la enfermedad.

En quinto lugar, aunque el estudio piloto realizado presenta limitaciones como consecuencia del pequeño tamaño muestral, estas evidencias preliminares tienen como objetivo realizar estudios adicionales para poder confirmar estos resultados preliminares. Aun así, con el objetivo de respaldar lo que habíamos obtenido, se realizaron búsquedas en diferentes bases de datos, sin encontrar estudios que correlacionaran las concentraciones séricas de MMPs y TIMPs con la RT. Ningún estudio ha evaluado la determinación de un número tan amplio de MMPs y TIMPs en el suero de pacientes con cáncer de mama antes, durante y después de la RT. Debido a ello, sólo pudimos usar el estudio GSE101920 [183], cuyos resultados corresponden al perfil de expresión génica de MMPs y TIMPs en biopsias de cáncer de mama tomadas tras la RT pre- y post-operatoria.

Para finalizar, en vista a nuestros resultados tras analizar la influencia de la RT en el comportamiento de las MMPs y sus inhibidores en distintos modelos de cultivo 3D, en un estudio *in vivo* en ratones y en el suero de pacientes con cáncer de mama, se necesitarían más estudios específicos para comprender los mecanismos de radioresistencia y conocer cómo conseguir una mayor radiosensibilización de las células tumorales, particularmente de las CSCs. A pesar de ello, podríamos proponer distintas MMPs y TIMPs como biomarcadores de predicción y pronóstico en cáncer de mama y, además, las MMPs y las CSCs podrían ser posibles dianas terapéuticas para mejorar la eficacia de la RT.





# CONCLUSIONES

---



Tras el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se establecen las siguientes conclusiones:

1. La expresión de los marcadores de CSCs de mama (ALDH1, CD44<sup>+</sup> y CD24<sup>-/low</sup>) varía con la dosis de radiación administrada. En la subpoblación positiva (CSCs), a dosis altas (6 Gy) aumenta el CD44<sup>+</sup>, el cual se asocia con la EMT y un mal pronóstico en cáncer de mama.
2. En los estudios *in vitro* de cultivo 3D y 3D+lrECM, la expresión de MMPs, TIMPs y HDACs varía en función de la línea tumoral (MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3), la dosis de radiación (0, 2 y 6 Gy), la subpoblación celular (general, positiva o CSCs, y negativa o no-CSCs) y el modelo de cultivo 3D (esferas en suspensión o embebidas en Matrigel).
3. Tras la irradiación celular y en ambos modelos de cultivo 3D, la MMP-1 aumenta su expresión en la subpoblación positiva (CSCs) de la línea triple negativa MDA-MB-231, la cual es la más radioresistente. Este hecho sugiere la importancia de MMP-1 en el proceso de invasión y metástasis tras el tratamiento con radiación.
4. El microambiente tumoral también se altera tras el tratamiento con radiación, afectando a la expresión de MMPs, TIMPs y HDACs.
5. En el estudio *in vitro* de co-cultivo (líneas celulares tumorales con fibroblastos), en general, la mayoría de genes estudiados aumentan su expresión a dosis altas de radiación. Este comportamiento apoya la importancia de los componentes del microambiente tumoral (entre ellos, fibroblastos) en la progresión de la enfermedad.
6. En el estudio *in vivo*, los tumores formados a partir de células MDA-MB-231 irradiadas a 2 Gy previo a la inoculación han sido de mayor volumen con respecto al control en las subpoblaciones general y positiva. Este hecho pone de manifiesto que dosis bajas de radiación serían insuficientes para erradicar las CSCs debido a su radioresistencia, contribuyendo al crecimiento tumoral.
7. En el desarrollo tumoral *in vivo*, los tumores formados a partir de células MDA-MB-231 irradiadas a 6 Gy previo a la inoculación han sido los más pequeños dentro de cada subpoblación celular. Este resultado sugiere que a dosis altas de

radiación (6 Gy) se reduce la velocidad de crecimiento tumoral y el volumen final del mismo.

8. El estudio piloto realizado en pacientes con cáncer de mama pone de manifiesto que la RT induce alteraciones en los niveles séricos de MMPs y TIMPs.
9. Las pacientes de cáncer de mama con recidiva tumoral muestran un aumento en los niveles séricos de todas las MMPs analizadas y una disminución en los niveles de TIMP-1. Este hecho apoya la teoría de que TIMP-1 es el principal inhibidor de las MMPs y el más afín a ellas. Es importante considerar que el tamaño muestral es pequeño y se requieren estudios adicionales para corroborar estos hallazgos.
10. Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo confirman la importancia del microambiente y sus componentes, y de las CSCs en el desarrollo tumoral y en la respuesta al tratamiento con radiación.

# CONCLUSIONI

---



Dopo lo sviluppo di questa Tesi di Dottorato, vengono stabilite le seguenti conclusioni:

1. L'espressione dei marcatori CSCs del seno (ALDH1, CD44<sup>+</sup> y CD24<sup>-/low</sup>) varia con la dose d'irradiazione somministrata. Nella sottopopolazione positiva (CSCs), alte dosi d'irradiazione (6 Gy) inducono l'aumento di CD44<sup>+</sup>, che è associato all'EMT e a una prognosi sfavorevole nel carcinoma mammario.
2. Negli studi di coltura 3D e 3D+lrECM *in vitro*, l'espressione di MMPs, TIMPs e HDACs varia a seconda della linea tumorale (MCF-7, MDA-MB-231 e SK-BR-3), la dose d'irradiazione (0, 2 e 6 Gy), la sottopopolazione di cellule (generale, positiva o CSC, e negativa o non-CSC) e il modello di coltura 3D (sfere in sospensione o incorporati in Matrigel).
3. Dopo l'irradiazione cellulare e in entrambi i modelli di coltura 3D, l'espressione di MMP-1 aumenta nella sottopopolazione positiva (CSCs) della linea tripla negativa MDA-MB-231, che è la più radioresistente. Questo fatto suggerisce l'importanza di MMP-1 nel processo d'invasione e metastasi dopo il trattamento con radiazioni.
4. Il microambiente tumorale viene alterato anche dopo il trattamento con radiazioni, influenzando l'espressione di MMPs, TIMPs e HDACs.
5. Nello studio di co-coltura *in vitro* (linee tumorali con fibroblasti), in generale, la maggior parte dei geni studiati aumentano la loro espressione a dosi elevate d'irradiazione. Questo comportamento supporta l'importanza dei componenti del microambiente tumorale (compresi i fibroblasti) nella progressione della malattia.
6. Nello studio *in vivo*, i tumori formati da cellule MDA-MB-231 irradiate a dose di 2 Gy prima dell'inoculazione sono risultati avere un volume maggiore rispetto al controllo nelle sottopopolazioni generale e positiva. Questo fatto dimostra che basse dosi d'irradiazione non sarebbero sufficienti a eradicare le CSCs a causa della loro radioresistenza, contribuendo alla crescita del tumore.
7. Nello sviluppo del tumore *in vivo*, i tumori formati da cellule MDA-MB-231 irradiate a dose di 6 Gy prima dell'inoculazione sono risultati avere un volume più piccolo all'interno di ogni sottopopolazione cellulare. Questo risultato suggerisce che a dosi

---

elevate d'irradiazione (6 Gy) il tasso di crescita del tumore e il volume finale del tumore sono ridotti.

8. Lo studio pilota condotto su pazienti con carcinoma mammario mostra che la RT induce alterazioni dei livelli sierici di MMPs e TIMPs.
9. I pazienti con carcinoma mammario con recidiva del tumore mostrano un aumento dei livelli sierici di tutte le MMPs analizzate e una diminuzione dei livelli di TIMP-1. Questo fatto supporta la teoria che TIMP-1 è il principale inibitore di MMPs e ha una maggiore affinità per queste. È importante considerare che le dimensioni del campione sono piccole e sono necessari ulteriori studi per confermare questi risultati.
10. Infine, i risultati ottenuti in questo lavoro confermano l'importanza del microambiente e dei suoi componenti, e delle CSCs nello sviluppo del tumore e nella risposta al trattamento con irradiazione.



# CONCLUSIONS

---



After the development of this Doctoral Thesis, the following conclusions are established:

1. The expression of the BCSCs markers (ALDH1, CD44<sup>+</sup> and CD24<sup>-/low</sup>) varies with the dose of radiation administered. In the positive subpopulation (CSCs), high doses of radiation (6 Gy) increases CD44<sup>+</sup>, which is associated with EMT and a poor prognosis in BC.
2. In the *in vitro* 3D and 3D+IrECM studies, the expression of MMPs, TIMPs and HDACs varies depending on the tumor line (MCF-7, MDA-MB-231 and SK-BR-3), the radiation dose (0, 2 and 6 Gy), the cell subpopulation (general, positive or CSCs, and negative or non-CSCs) and the 3D culture model (spheres suspended or embedded in Matrigel).
3. After cell irradiation and in both 3D culture models, MMP-1 increases its expression in the positive subpopulation (CSCs) of the MDA-MB-231 triple negative line, which is the most resistant. This fact suggests the importance of MMP-1 in the process of invasion and metastasis after radiation treatment.
4. The tumor microenvironment is also altered after radiation treatment, affecting the expression of MMPs, TIMPs and HDACs.
5. In the *in vitro* co-culture study (tumor lines with fibroblasts), in general, most of the genes studied increase their expression at high doses of radiation. This behavior supports the importance of the components of the tumor's microenvironment (including fibroblasts) in the progression of the disease.
6. In the *in vivo* study, tumors formed from MDA-MB-231 cells irradiated at 2 Gy prior to inoculation have been of higher volume with respect to the control in the general and positive subpopulations. This fact shows that low doses of radiation would be insufficient to eradicate CSCs due to their radioresistance, contributing to tumor growth.
7. In tumor development *in vivo*, tumors formed from MDA-MB-231 cells irradiated at 6 Gy prior to inoculation dose have been the smallest within each cell subpopulation.

This result suggests that at high doses of radiation (6 Gy) the tumor growth rate and the final volume of the tumor are reduced.

8. The pilot study carried out in BC patients shows that RT induces alterations in the serum levels of MMPs and TIMPs.
9. BC patients with tumor recurrence show an increase in serum levels of all MMPs analyzed and a decrease in TIMP-1 levels. This fact supports the theory that TIMP-1 is the main inhibitor of MMPs and the most related to them. The sample size is small and additional studies are required.
10. Finally, the results obtained in this work confirm the importance of the microenvironment and its components, and of the CSCs in tumor development and in the response to radiation treatment.

# ANEXOS

---



## 1. ABREVIATURAS

<b>2D</b>	Bidimensional
<b>3D</b>	Tridimensional
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>μl</b>	Microlitro
<b>μm</b>	Micrómetro
<b>ALDH</b>	<i>Aldehyde Dehydrogenase</i> Aldehído deshidrogenasa
<b>ALI</b>	<i>Air-Liquid Interfase</i> Interfase aire-líquido
<b>APC</b>	<i>Allophycocyanin</i> Aloficocianina
<b>ARLI</b>	<i>Age-Related Lobular Involution</i> Involución lobular relacionada con la edad
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>ATM</b>	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i> Ataxia telangiectasia mutada
<b>BCSCs</b>	<i>Breast Cancer Stem Cells</i> Células madre tumorales de mama
<b>BER</b>	<i>Base Excision Repair</i> Repación de escisión de bases
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i> Albúmina sérica bovina
<b>cDNA</b>	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i> Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>CIBM</b>	Centro de Investigación Biomédica
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CSCs</b>	<i>Cancer Stem Cells</i> Células madre tumoral
<b>DEAB</b>	<i>Diethylaminobenzaldehyde</i> Dietilaminobenzaldehído
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DMEM-F12</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>

---

	Ácido desoxirribonucleico
<b>ECM</b>	<i>Extracellular Matrix</i> Matriz extracelular
<b>EGF</b>	<i>Epidermal Growth Factor</i> Factor de crecimiento epidérmico
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>EMT</b>	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i> Transición epitelial-mesenquimal
<b>ER</b>	<i>Estrogen Receptor</i> Receptor de estrógeno
<b>FBS</b>	<i>Foetal Bovine Serum</i> Suero bovino fetal
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast Growth Factor</i> Factor de crecimiento fibroblástico
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i> Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>Gy</b>	Gray
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Agua oxigenada
<b>H&amp;E</b>	<i>Hematoxylin-Eosin</i> Hematoxilina-Eosina
<b>HAF</b>	<i>Human Adult Fibroblast</i> Fibroblastos humanos adultos
<b>HDAC</b>	<i>Histone Deacetylases</i> Histona desacetilasa
<b>HDACI</b>	<i>Histone Deacetylases Inhibitor</i> Inhibidor de histona desacetilasa
<b>hEGF</b>	<i>human Epidermal Growth Factor</i> Factor de crecimiento epidérmico humano
<b>HER</b>	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor</i> Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
<b>hFGF</b>	<i>human Fibroblast Growth Factor</i> Factor de crecimiento fibroblástico humano



<b>HIF</b>	<i>Hypoxia-Inducible Factor</i> Factor inducible por hipoxia
<b>HR</b>	<i>Homologous Recombination</i> Recombinación homóloga
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i> Agencia internacional para la investigación del cáncer
<b>IGF</b>	<i>Insulin-like Growth Factor</i> Factor de crecimiento insulínico
<b>IHC</b>	<i>Immunohistochemical</i> Inmunohistoquímica
<b>IMDM</b>	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
<b>ITS</b>	<i>Insulin-Transferin-Selenium</i> Insulina
<b>Kv</b>	Kilovoltios
<b>LET</b>	<i>Linear Energy Transfer</i> Transferencia lineal de energía
<b>LOX</b>	<i>Lysyl oxidase</i> Lisil oxidasa
<b>IrECM</b>	<i>laminin-rich Extracellular Matrix</i> Matriz extracelular rica en laminina
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Miliamperios
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> Proteína quinasa activada por mitógenos
<b>MFI</b>	<i>Median Fluorescence Intensity</i> Intensidad de fluorescencia media
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MMP</b>	<i>Matrix Metalloproteinase</i> Metaloproteasa de matriz
<b>NER</b>	<i>Nucleotide Excision Repair</i> Reparación de escisión de nucleótidos
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>NHEJ</b>	<i>Non-Homologous End Joining</i> Uniones finales no homólogas
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno

---

<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAR</b>	<i>Protease-Activated Receptor</i> Receptor activado por proteasas
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> Buffer fosfato salino
<b>PE</b>	<i>Phycoerythrin</i> Ficoeritrina
<b>pg</b>	Picogramo
<b>PFA</b>	<i>Paraformaldehyde</i> Paraformaldehído
<b>PR</b>	<i>Progesterone Receptor</i> Receptor de Progesterona
<b>qRT-PCR</b>	<i>quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction</i> Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
<b>RI</b>	Radiación ionizante
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i> Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Specie</i> Especie reactiva de oxígeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT</b>	<i>Radiation Therapy</i> Radioterapia
<b>RT-PCR</b>	<i>Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction</i> Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
<b>SA</b>	<i>Streptavidin</i> Estreptavidina
<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i> Desviación estándar
<b>SEM</b>	<i>Standard Error of the Mean</i> Error estándar de la media
<b>T<sup>a</sup></b>	Temperatura
<b>TBS</b>	<i>Tris Buffered Saline</i> Solución salina tamponada con Tris
<b>TGF</b>	<i>Transforming Growth Factor</i> Factor de crecimiento transformante

<b>TIMP</b>	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i> Inhibidor tisular de metaloproteasas
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i> Factor de necrosis tumoral
<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> Factor de crecimiento endotelial vascular

## **2. ÍNDICE DE ESQUEMAS**

<b>Esquema 1</b>	Sensibilizadores de CSCs en la RT .....	55
<b>Esquema 2</b>	Agentes antiangiogénicos dirigidos tanto al mantenimiento del nicho como a la formación de la vasculatura tumoral .....	58
<b>Esquema 3</b>	Papel de las MMPs en la carcinogénesis .....	61
<b>Esquema 4</b>	Técnicas de cultivo celular 3D.....	67

## **3. ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b>	Expresión de marcadores específicos de CSCs de mama .....	94
<b>Figura 2</b>	Expresión de MMPs en cultivo 3D .....	95
<b>Figura 3</b>	Expresión de HDACs en cultivo 3D.....	97
<b>Figura 4</b>	Expresión de TIMPs en cultivo 3D.....	98
<b>Figura 5</b>	Expresión de MMPs en cultivo 3D+lrECM .....	100
<b>Figura 6</b>	Expresión de HDACs en cultivo 3D+lrECM.....	101
<b>Figura 7</b>	Expresión de TIMPs en cultivo 3D+lrECM.....	102
<b>Figura 8</b>	Expresión de MMPs en co-cultivo lrECM .....	104
<b>Figura 9</b>	Expresión de HDACs en co-cultivo lrECM .....	105
<b>Figura 10</b>	Expresión de TIMPs en co-cultivo lrECM .....	105
<b>Figura 11</b>	Monitorización del crecimiento tumoral en ratones .....	107
<b>Figura 12</b>	Tinción histológica H&E en cortes tumorales de ratones .....	108
<b>Figura 13</b>	Tinción IHC de MMP-1 en cortes tumorales de ratones .....	109

<b>Figura 14</b>	Curso temporal de los niveles séricos de MMPs y TIMPs en pacientes de cáncer de mama .....	110
<b>Figura 15</b>	Perfil de expresión génica de MMPs y TIMPs en biopsias de cáncer de mama .....	111
<b>Figura 16</b>	Correlación entre los niveles séricos de MMPs y TIMPs en pacientes de cáncer de mama .....	112
<b>Figura 17</b>	Niveles séricos de MMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la edad .....	113
<b>Figura 18</b>	Niveles séricos de TIMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la edad .....	114
<b>Figura 19</b>	Niveles séricos de MMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el estado menopáusico .....	115
<b>Figura 20</b>	Niveles séricos de TIMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el estado menopáusico .....	116
<b>Figura 21</b>	Niveles séricos de MMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el estado de receptores hormonales .....	118
<b>Figura 22</b>	Niveles séricos de TIMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el estado de receptores hormonales .....	119
<b>Figura 23</b>	Niveles séricos de MMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el grado de diferenciación .....	120
<b>Figura 24</b>	Niveles séricos de TIMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el grado de diferenciación .....	121
<b>Figura 25</b>	Niveles séricos de MMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la positividad/negatividad de la E-cadherina .....	122
<b>Figura 26</b>	Niveles séricos de TIMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la positividad/negatividad de la E-cadherina .....	123
<b>Figura 27</b>	Niveles séricos de MMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la positividad/negatividad de p53 .....	124
<b>Figura 28</b>	Niveles séricos de TIMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la positividad/negatividad de p53 .....	125
<b>Figura 29</b>	Niveles séricos de MMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el porcentaje de Ki67 .....	126
<b>Figura 30</b>	Niveles séricos de TIMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el porcentaje de Ki67 .....	127
<b>Figura 31</b>	Niveles séricos de MMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la afectación del ganglio centinela .....	128

<b>Figura 32</b>	Niveles séricos de TIMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la afectación del ganglio centinela .....	129
<b>Figura 33</b>	Niveles séricos de MMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el régimen radioterápico recibido .....	130
<b>Figura 34</b>	Niveles séricos de TIMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según el régimen radioterápico recibido .....	131
<b>Figura 35</b>	Niveles séricos de MMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la administración de RT ganglionar .....	132
<b>Figura 36</b>	Niveles séricos de TIMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la administración de RT ganglionar .....	133
<b>Figura 37</b>	Niveles séricos de MMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la radiotoxicidad presentada .....	134
<b>Figura 38</b>	Niveles séricos de TIMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la radiotoxicidad presentada .....	135
<b>Figura 39</b>	Niveles séricos de MMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la recurrencia tumoral.....	136
<b>Figura 40</b>	Niveles séricos de TIMPs en pacientes de cáncer de mama agrupadas según la recurrencia tumoral.....	137

#### 4. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Clasificación de las MMPs basada en la especificidad de sustrato y localización celular .....	59
<b>Tabla 2</b>	Dosis y tiempos de radiación .....	79
<b>Tabla 3</b>	Secuencia y T <sup>a</sup> de <i>annealing</i> de los <i>primers</i> empleados en la qRT-PCR.....	82
<b>Tabla 4</b>	VARIABLES estudiadas en pacientes de cáncer de mama .....	87



# BIBLIOGRAFÍA

---





1. Organización Mundial de la Salud. Fecha de acceso: 21 Mayo 2019. Disponible online: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Global Cancer Observatory. Fecha de acceso: 21 Mayo 2019. Disponible online: <https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018>.
3. American Cancer Society. Fecha de acceso: 21 Mayo 2019. Disponible online: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer.html>
4. Hendry JH. Radiation biology and radiation protection. *Ann ICRP*. **2012**; 41 (3-4): 64-71. doi: 10.1016/j.icrp.2012.06.013.
5. de Felice F, Ranalli T, Musio D, *et al*. Relation between Hypofractionated Radiotherapy, Toxicity and Outcome in Early Breast Cancer. *Breast J*. **2017**; 23 (5): 563-8. doi: 10.1111/tbj.12792.
6. Vlashi E and Pajonk F. Cancer stem cells, cancer cell plasticity and radiation therapy. *Semin Cancer Biol*. **2015**; 31: 28-35. doi: 10.1016/j.semcancer.2014.07.001.
7. Valle LF, Agarwal S, Bickel KE, *et al*. Hypofractionated whole breast radiotherapy in breast conservation for early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Breast Cancer Res Treat*. **2017**; 162 (3): 409-17. doi: 10.1007/s10549-017-4118-7.
8. Deshmukh AA, Shirvani SM, Lal L, *et al*. Cost-effectiveness Analysis Comparing Conventional, Hypofractionated, and Intraoperative Radiotherapy for Early-Stage Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. **2017**; 109 (11). doi: 10.1093/jnci/djx068.
9. Hennequin C, Barillot I, Azria D, *et al*. [Radiotherapy of breast cancer]. *Cancer Radiother*. **2016**; 20 Suppl: S139-46. doi: 10.1016/j.canrad.2016.07.025.
10. Chi HC, Tsai CY, Tsai MM, *et al*. Roles of Long Noncoding RNAs in Recurrence and Metastasis of Radiotherapy-Resistant Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci*. **2017**; 18 (9). doi: 10.3390/ijms18091903.
11. Eguiara A, Elorriaga K, Rezola R, *et al*. Cancer stem cells: a therapeutic target in breast cancer. *Rev Senol Patol Mamar*. **2012**; 25 (3): 87-130. doi: 10.1016/S0214-1582(12)70024-5
12. Ogawa K, Yoshioka Y, Isohashi F, *et al*. Radiotherapy targeting cancer stem cells: current views and future perspectives. *Anticancer Res*. **2013**; 33 (3): 747-54.
13. Li X, Lewis MT, Huang J, *et al*. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. **2008**; 100 (9): 672-9. doi: 10.1093/jnci/djn123.
14. Meirelles K, Benedict LA, Dombkowski D, *et al*. Human ovarian cancer stem/progenitor cells are stimulated by doxorubicin but inhibited by Mullerian inhibiting substance. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2012**; 109 (7): 2358-63. doi: 10.1073/pnas.1120733109.
15. Sun L, Cabarcas SM and Farrar WL. Radioresistance and cancer stem cells: Survival of the fittest. *J Carcinog Mutagen*. **2011**; S1: 1-12. doi: 4172/2157-2518.S1-004

16. Lawson JC, Blatch GL and Edkins AL. Cancer stem cells in breast cancer and metastasis. *Breast Cancer Res Treat.* **2009**; 118 (2): 241-54. doi: 10.1007/s10549-009-0524-9.
17. Celià-Terrassa T, Meca-Cortés O, Mateo F, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *J Clin Invest.* **2012**; 122 (5): 1849-68. doi: 10.1172/JCI59218.
18. Tsuji T, Ibaragi S, Shima K, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth. *Cancer Res.* **2008**; 68 (24): 10377-86. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1444.
19. Floor S, van Staveren WC, Larsimont D, *et al.* Cancer cells in epithelial-to-mesenchymal transition and tumor-propagating-cancer stem cells: distinct, overlapping or same populations. *Oncogene.* **2011**; 30 (46): 4609-21. doi: 10.1038/onc.2011.184.
20. Nigam A. Breast cancer stem cells, pathways and therapeutic perspectives 2011. *Indian J Surg.* **2013**; 75 (3): 170-80. doi: 10.1007/s12262-012-0616-3.
21. Artacho-Cordón F, Ríos-Arrabal S, Lara PC, *et al.* Matrix metalloproteinases: potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy. *Surg Oncol.* **2012**; 21 (3): e143-51. doi: 10.1016/j.suronc.2012.06.001.
22. di Cara G, Marabeti MR, Musso R, *et al.* New Insights into the Occurrence of Matrix Metalloproteases -2 and -9 in a Cohort of Breast Cancer Patients and Proteomic Correlations. *Cells.* **2018**; 7 (8). doi: 10.3390/cells7080089.
23. Overall CM and López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer.* **2002**; 2 (9): 657-72.
24. Tauro M and Lynch CC. Cutting to the Chase: How Matrix Metalloproteinase-2 Activity Controls Breast-Cancer-to-Bone Metastasis. *Cancers (Basel).* **2018**; 10 (6). doi: 10.3390/cancers10060185.
25. Artacho-Cordón F, Ríos-Arrabal S, Olivares-Urbano MA, *et al.* Valproic acid modulates radiation-enhanced matrix metalloproteinase activity and invasion of breast cancer cells. *Int J Radiat Biol.* **2015**; 91 (12): 946-56. doi: 10.3109/09553002.2015.1087067.
26. Chabottaux V and Noel A. Breast cancer progression: insights into multifaceted matrix metalloproteinases. *Clin Exp Metastasis.* **2007**; 24 (8): 647-56.
27. Radisky ES and Radisky DC. Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. *Front Biosci (Landmark Ed).* **2015**; 20: 1144-63.
28. Brew K and Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta.* **2010**; 1803 (1): 55-71. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.003.
29. Hoshino I and Matsubara H. Recent advances in histone deacetylase targeted cancer therapy. *Surg Today.* **2010**; 40 (9): 809-15. doi: 10.1007/s00595-010-4300-6.

30. Bissell MJ and Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. **2001**; 1 (1): 46-54.
31. Wiseman BS and Werb Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science*. **2002**; 296 (5570): 1046-9.
32. Koledova Z. 3D Cell Culture: An Introduction. In: Koledova Z, editor. *3D Cell Culture: Methods and Protocols*. New York: Humana Press. **2017**; 1-11. doi: 10.1007/978-1-4939-7021-6\_1.
33. Brown RL, Reinke LM, Damerow MS, *et al*. CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *J Clin Invest*. **2011**; 121 (3): 1064-74. doi: 10.1172/JCI44540.
34. Li XP, Zhang XW, Zheng LZ, *et al*. Expression of CD44 in pancreatic cancer and its significance. *Int J Clin Exp Pathol*. **2015**; 8 (6): 6724-31.
35. Ohkoshi E and Umemura N. Induced overexpression of CD44 associated with resistance to apoptosis on DNA damage response in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol*. **2017**; 50 (2): 387-95. doi: 10.3892/ijo.2016.3821.
36. Kim MH, Kim MH, Kim KS, *et al*. In vivo monitoring of CD44+ cancer stem-like cells by  $\gamma$ -irradiation in breast cancer. *Int J Oncol*. **2016**; 48 (6), 2277-86. doi: 10.3892/ijo.2016.3493.
37. Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, *et al*. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer*. **2009**; 9: 188. doi: 10.1186/1471-2407-9-188.
38. Pendás AM, Uría JA, Jiménez MG, *et al*. An overview of collagenase-3 expression in malignant tumors and analysis of its potential value as a target in antitumor therapies. *Clin Chim Acta*. **2000**; 291 (2): 137-55.
39. Zheng T, Lu M, Wang T, *et al*. NRBE3 promotes metastasis of breast cancer by down-regulating E-cadherin expression. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. **2018**; 1865 (12): 1869-77. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.09.003.
40. Jemal A, Bray F, Center MM, *et al*. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. **2011**; 61 (2): 69-90. doi: 10.3322/caac.20107.
41. Yeo SK and Guan JL. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? *Trends Cancer*. **2017**; 3 (11): 753-60. doi: 10.1016/j.trecan.2017.09.001.
42. Dieci MV, Orvieto E, Dominici M, *et al*. Rare breast cancer subtypes: histological, molecular, and clinical peculiarities. *Oncologist*. **2014**; 19 (8): 805-13. doi: 10.1634/theoncologist.2014-0108.
43. Orecchia R. Tailoring radiotherapy according to cancer subtypes. *Breast*. **2017**; 34 Suppl 1: S91-4. doi: 10.1016/j.breast.2017.06.036.
44. Giovannelli P, di Donato M, Galasso G, *et al*. The Androgen Receptor in Breast Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. **2018**; 9: 492. doi: 10.3389/fendo.2018.00492.

45. Hicks DG, Yoder BJ, Pettay J, *et al.* The incidence of topoisomerase II-alpha genomic alterations in adenocarcinoma of the breast and their relationship to human epidermal growth factor receptor-2 gene amplification: a fluorescence in situ hybridization study. *Hum Pathol.* **2005**; 36 (4): 348-56.
46. Penault-Llorca F and Radosevic-Robin N. Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology.* **2017**; 49 (2): 166-71. doi: 10.1016/j.pathol.2016.11.006.
47. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, *et al.* Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst.* **2011**; 103 (22): 1656-64. doi: 10.1093/jnci/djr393.
48. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, *et al.* Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol.* **2015**; 26 (8): 1533-46. doi: 10.1093/annonc/mdv221.
49. Meek DW. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem J.* **2015**; 469 (3): 325-46. doi: 10.1042/BJ20150517.
50. Song H, Hollstein M and Xu Y. p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nat Cell Biol.* **2007**; 9 (5): 573-80.
51. Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, *et al.* Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell.* **2004**; 119 (6): 847-60.
52. Hoffman BD and Yap AS. Towards a Dynamic Understanding of Cadherin-Based Mechanobiology. *Trends Cell Biol.* **2015**; 25 (12): 803-14. doi: 10.1016/j.tcb.2015.09.008.
53. Azadi S, Tafazzoli-Shadpour M and Omidvar R. [Steered Molecular Dynamics Simulation Study of Quantified Effects of Point Mutation Induced by Breast Cancer on Mechanical Behavior of E-Cadherin]. *Mol Biol (Mosk).* **2018**; 52 (5): 836-45. doi: 10.1134/S002689841805004X.
54. Yang J and Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell.* **2008**; 14 (6): 818-29. doi: 10.1016/j.devcel.2008.05.009.
55. van Roy F and Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci.* **2008**; 65 (23): 3756-88. doi: 10.1007/s00018-008-8281-1.
56. Corso G, Pravettoni G, Galimberti V, *et al.* Clinical implication of E-cadherin deficiency in lobular breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* **2019**; 173 (3): 751-2. doi: 10.1007/s10549-018-5051-0.
57. Guo J, Yang H, Wang S, *et al.* Comparison of sentinel lymph node biopsy guided by indocyanine green, blue dye, and their combination in breast cancer patients: a prospective cohort study. *World J Surg Oncol.* **2017**; 15 (1): 196. doi: 10.1186/s12957-017-1264-7.

58. Loisel C, Eby PR, Kim JN, *et al.* Preoperative MRI improves prediction of extensive occult axillary lymph node metastases in breast cancer patients with a positive sentinel lymph node biopsy. *Acad Radiol.* **2014**; 21 (1): 92-8. doi: 10.1016/j.acra.2013.10.001.
59. Figueroa JD, Pfeiffer RM, Brinton LA, *et al.* Standardized measures of lobular involution and subsequent breast cancer risk among women with benign breast disease: a nested case-control study. *Breast Cancer Res Treat.* **2016**; 159 (1): 163-72. doi: 10.1007/s10549-016-3908-7.
60. Milanese TR, Hartmann LC, Sellers TA, *et al.* Age-related lobular involution and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* **2006**; 98 (22): 1600-7.
61. Hanna M, Dumas I, Orain M, *et al.* Association between local inflammation and breast tissue age-related lobular involution among premenopausal and postmenopausal breast cancer patients. *PLoS One.* **2017**; 12 (8): e0183579. doi: 10.1371/journal.pone.0183579.
62. Dörr W and Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol.* **2001**; 61 (3): 223-31.
63. Rosen JM and Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science.* **2009**; 324 (5935): 1670-3. doi: 10.1126/science.1171837.
64. Deng G, Lu Y, Zlotnikov G, *et al.* Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science.* **1996**; 274 (5295): 2057-9.
65. Lakhani SR, Slack DN, Hamoudi RA, *et al.* Detection of allelic imbalance indicates that a proportion of mammary hyperplasia of usual type are clonal, neoplastic proliferations. *Lab Invest.* **1996**; 74 (1): 129-35.
66. Tsai YC, Lu Y, Nichols PW, *et al.* Contiguous patches of normal human mammary epithelium derived from a single stem cell: implications for breast carcinogenesis. *Cancer Res.* **1996**; 56 (2): 402-4.
67. Kelly PN, Dakic A, Adams JM, *et al.* Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science.* **2007**; 317 (5836): 337.
68. Hernández-Camarero P, Jiménez G, López-Ruiz E, *et al.* Revisiting the dynamic cancer stem cell model: Importance of tumour edges. *Crit Rev Oncol Hematol.* **2018**; 131: 35-45. doi: 10.1016/j.critrevonc.2018.08.004.
69. Varela I, Menendez P and Sanjuan-Pla A. Intratumoral heterogeneity and clonal evolution in blood malignancies and solid tumors. *Oncotarget.* **2017**; 8 (39): 66742-6. doi: 10.18632/oncotarget.20279.
70. Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res.* **2012**; 22 (3): 457-72. doi: 10.1038/cr.2012.13.
71. Vermeulen L, de Sousa e Melo F, Richel DJ, *et al.* The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *Lancet Oncol.* **2012**; 13 (2): e83-9. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70257-1.

72. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, *et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. **2005**; 438 (7069): 820-7.
73. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, *et al.* ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. **2007**; 1 (5): 555-67. doi: 10.1016/j.stem.2007.08.014.
74. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, *et al.* Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2003**; 100 (7): 3983-8.
75. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. **2003**; 63 (18): 5821-8.
76. Sokolov MV and Neumann RD. Human embryonic stem cell responses to ionizing radiation exposures: current state of knowledge and future challenges. *Stem Cells Int*. **2012**; 2012: 579104. doi: 10.1155/2012/579104.
77. Dickey JS, Baird BJ, Redon CE, *et al.* Intercellular communication of cellular stress monitored by gamma-H2AX induction. *Carcinogenesis*. **2009**; 30 (10): 1686-95. doi: 10.1093/carcin/bgp192.
78. Sokolov MV, Dickey JS, Bonner WM, *et al.* gamma-H2AX in bystander cells: not just a radiation-triggered event, a cellular response to stress mediated by intercellular communication. *Cell Cycle*. **2007**; 6 (18): 2210-2.
79. Sokolov MV, Smilenov LB, Hall EJ, *et al.* Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts. *Oncogene*. **2005**; 24 (49): 7257-65.
80. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2006**; 7 (5): 335-46.
81. Kinsella TJ. Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. *Clin Cancer Res*. **2009**; 15 (6): 1853-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1307.
82. Vaish M. Mismatch repair deficiencies transforming stem cells into cancer stem cells and therapeutic implications. *Mol Cancer*. **2007**; 6: 26.
83. Dalhus B, Laerdahl JK, Backe PH, *et al.* DNA base repair--recognition and initiation of catalysis. *FEMS Microbiol Rev*. **2009**; 33 (6): 1044-78. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00188.x.
84. Sengupta S and Harris CC. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2005**; 6 (1): 44-55.
85. Svilar D, Goellner EM, Almeida KH, *et al.* Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid Redox Signal*. **2011**; 14(12):2491-507.
86. Wilson DM 3rd, Kim D, Berquist BR, *et al.* Variation in base excision repair capacity. *Mutat Res*. **2011**; 711 (1-2): 100-12. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2010.12.004.

87. Liu L, Lee J and Zhou P. Navigating the nucleotide excision repair threshold. *J Cell Physiol.* **2010**; 224 (3): 585-9. doi: 10.1002/jcp.22205.
88. Vermeulen W. Dynamics of mammalian NER proteins. *DNA Repair (Amst).* **2011**; 10 (7): 760-71. doi: 10.1016/j.dnarep.2011.04.015.
89. Holthausen JT, Wyman C and Kanaar R. Regulation of DNA strand exchange in homologous recombination. *DNA Repair (Amst).* **2010**; 9 (12): 1264-72. doi: 10.1016/j.dnarep.2010.09.014.
90. Kass EM and Jasin M. Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett.* **2010**; 584 (17): 3703-8. doi: 10.1016/j.febslet.2010.07.057.
91. Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem.* **2010**; 79: 181-211. doi: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131.
92. Mladenov E and Iliakis G. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res.* **2011**; 711 (1-2): 61-72. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.02.005.
93. Mathews LA, Cabarcas SM and Farrar WL. DNA repair: the culprit for tumor-initiating cell survival? *Cancer Metastasis Rev.* **2011**; 30 (2): 185-97.
94. Ralhan R, Kaur J, Kreienberg R, *et al.* Links between DNA double strand break repair and breast cancer: accumulating evidence from both familial and nonfamilial cases. *Cancer Lett.* **2007**; 248 (1): 1-17.
95. Eyler CE and Rich JN. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol.* **2008**; 26 (17): 2839-45. doi: 10.1200/JCO.2007.15.1829.
96. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, *et al.* Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature.* **2003**; 425 (6960): 846-51.
97. Evangelista M, Tian H and de Sauvage FJ. The hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* **2006**; 12 (20 Pt 1): 5924-8.
98. Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, *et al.* Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature.* **2004**; 431 (7009): 707-12.
99. Lai K, Kaspar BK, Gage FH, *et al.* Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci.* **2003**; 6 (1): 21-7.
100. Sims-Mourtada J, Izzo JG, Apisarnthanarax S, *et al.* Hedgehog: an attribute to tumor regrowth after chemoradiotherapy and a target to improve radiation response. *Clin Cancer Res.* **2006**; 12 (21): 6565-72.
101. Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, *et al.* HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol.* **2007**; 17 (2): 165-72.

102. Hsieh A, Ellsworth R and Hsieh D. Hedgehog/GLI1 regulates IGF dependent malignant behaviors in glioma stem cells. *J Cell Physiol.* **2011**; 226 (4): 1118-27. doi: 10.1002/jcp.22433.
103. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, *et al.* MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* **2007**; 26 (22): 3279-90.
104. Hittelman WN, Liao Y, Wang L, *et al.* Are cancer stem cells radioresistant? *Future Oncol.* **2010**; 6 (10): 1563-76. doi: 10.2217/fon.10.121.
105. Weng AP and Aster JC. Multiple niches for Notch in cancer: context is everything. *Curr Opin Genet Dev.* **2004**; 14 (1): 48-54.
106. Phillips TM, McBride WH and Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst.* **2006**; 98 (24): 1777-85.
107. Gupta R, Vyas P and Enver T. Molecular targeting of cancer stem cells. *Cell Stem Cell.* **2009**; 5 (2): 125-6. doi: 10.1016/j.stem.2009.07.006.
108. Ischenko I, Seeliger H, Schaffer M, *et al.* Cancer stem cells: how can we target them? *Curr Med Chem.* **2008**; 15 (30): 3171-84.
109. Rassi H. Stem cell therapy for hereditary breast cancer. *Tsitol Genet.* **2009**; 43 (3): 80-8.
110. Hurt EM, Kawasaki BT, Klarmann GJ, *et al.* CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br J Cancer.* **2008**; 98 (4): 756-65. doi: 10.1038/sj.bjc.6604242.
111. Takebe N and Ivy SP. Controversies in cancer stem cells: targeting embryonic signaling pathways. *Clin Cancer Res.* **2010**; 16 (12): 3106-12. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2934.
112. Woodward WA, Chen MS, Behbod F, *et al.* Wnt/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2007**; 104 (2): 618-23.
113. Bao S, Wu Q, McLendon RE, *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* **2006**; 444 (7120): 756-60.
114. Barcellos-Hoff MH, Park C and Wright EG. Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer.* **2005**; 5 (11): 867-75.
115. Ghotra VP, Puigvert JC and Danen EH. The cancer stem cell microenvironment and anti-cancer therapy. *Int J Radiat Biol.* **2009**; 85 (11): 955-62. doi: 10.3109/09553000903242164.
116. Lomonaco SL, Finniss S, Xiang C, *et al.* The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. *Int J Cancer.* **2009**; 125 (3): 717-22. doi: 10.1002/ijc.24402.



117. Blazek ER, Foutch JL and Maki G. Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **2007**; 67 (1): 1-5.
118. Borovski T, de Sousa e Melo F, Vermeulen L, *et al.* Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res.* **2011**; 71 (3): 634-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3220.
119. Soeda A, Park M, Lee D, *et al.* Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene.* **2009**; 28 (45): 3949-59. doi: 10.1038/onc.2009.252.
120. Harrison LB, Chadha M, Hill RJ, *et al.* Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *Oncologist.* **2002**; 7 (6): 492-508.
121. Keith B and Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell.* **2007**; 129 (3): 465-72.
122. Rich JN. Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Res.* **2007**; 67 (19): 8980-4.
123. Mazon R, Anderson B, Supiot S, *et al.* Current state of knowledge regarding the use of antiangiogenic agents with radiation therapy. *Cancer Treat Rev.* **2011**; 37 (6): 476-86. doi: 10.1016/j.ctrv.2011.03.004.
124. Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, *et al.* Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* **2006**; 66 (16): 7843-8.
125. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, *et al.* A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell.* **2007**; 11 (1): 69-82.
126. Rawlings ND1, Barrett AJ and Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **2012**; 40 (Database issue): D343-50. doi: 10.1093/nar/gkr987.
127. Chirco R, Liu XW, Jung KK, *et al.* Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev.* **2006**; 25 (1): 99-113.
128. Fan SQ, Wei QY, Li MR, *et al.* [Expression and clinical significance of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in breast carcinoma]. *Ai Zheng.* **2003**; 22 (9): 968-73.
129. Lambert E, Dasse E, Haye B, *et al.* TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol.* **2004**; 49 (3), 187-98.
130. Young DA, Lakey RL, Pennington CJ, *et al.* Histone deacetylase inhibitors modulate metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption. *Arthritis Res Ther.* **2005**; 7 (3), R503-12.
131. Seto E and Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2014**; 6 (4): a018713. doi: 10.1101/cshperspect.a018713.

132. Witt AE, Lee CW, Lee TI, *et al.* Identification of a cancer stem cell-specific function for the histone deacetylases, HDAC1 and HDAC7, in breast and ovarian cancer. *Oncogene*. **2017**; 36 (12): 1707-20. doi: 10.1038/onc.2016.337.
133. Roy DM and Walsh LA. Candidate prognostic markers in breast cancer: focus on extracellular proteases and their inhibitors. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. **2014**; 6: 81-91. doi: 10.2147/BCTT.S46020.
134. Curtis C, Shah SP, Chin SF, *et al.* The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. **2012**; 486 (7403): 346-52. doi: 10.1038/nature10983.
135. Zhang B, Cao X, Liu Y, *et al.* Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. *BMC Cancer*. **2008**; 8: 83. doi: 10.1186/1471-2407-8-83.
136. Vizoso FJ, González LO, Corte MD, *et al.* Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer*. **2007**; 96 (6): 903-11.
137. Johansson N, Ahonen M and Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci*. **2000**; 57 (1): 5-15.
138. Eck SM, Blackburn JS, Schmucker AC, *et al.* Matrix metalloproteinase and G protein coupled receptors: co-conspirators in the pathogenesis of autoimmune disease and cancer. *J Autoimmun*. **2009**; 33 (3-4): 214-21. doi: 10.1016/j.jaut.2009.09.011.
139. Boire A, Covic L, Agarwal A, *et al.* PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell*. **2005**; 120 (3): 303-13.
140. Jezierska A and Motyl T. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. *Med Sci Monit*. **2009**; 15 (2): RA32-40.
141. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. **2002**; 415 (6871): 530-6.
142. Ota I, Li XY, Hu Y, *et al.* Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2009**; 106 (48): 20318-23. doi: 10.1073/pnas.0910962106.
143. Tatti O, Arjama M, Ranki A, *et al.* Membrane-type-3 matrix metalloproteinase (MT3-MMP) functions as a matrix composition-dependent effector of melanoma cell invasion. *PLoS One*. **2011**; 6 (12): e28325. doi: 10.1371/journal.pone.0028325.
144. Nisticò P, Bissell MJ and Radisky DC. Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **2012**; 4 (2). doi: 10.1101/cshperspect.a011908.
145. Radisky ES and Radisky DC. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. **2010**; 15 (2): 201-12. doi: 10.1007/s10911-010-9177-x.

146. Illman SA, Lehti K, Keski-Oja J, *et al.* Epilysin (MMP-28) induces TGF-beta mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells. *J Cell Sci.* **2006**; 119 (Pt 18): 3856-65.
147. Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, *et al.* Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature.* **2005**; 436 (7047): 123-7.
148. Fuxe J, Vincent T and Garcia de Herreros A. Transcriptional crosstalk between TGF- $\beta$  and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle.* **2010**; 9 (12): 2363-74.
149. Yu Q and Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* **2000**; 14 (2): 163-76.
150. Kessenbrock K, Plaks V and Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* **2010**; 141 (1): 52-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015.
151. Chang HJ, Yang MJ, Yang YH, *et al.* MMP13 is potentially a new tumor marker for breast cancer diagnosis. *Oncol Rep.* **2009**; 22 (5): 1119-27.
152. Haro H, Crawford HC, Fingleton B, *et al.* Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor-alpha in a model of herniated disc resorption. *J Clin Invest.* **2000**; 105 (2): 143-50.
153. Vargo-Gogola T, Fingleton B, Crawford HC, *et al.* Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) selects for apoptosis-resistant mammary cells in vivo. *Cancer Res.* **2002**; 62 (19): 5559-63.
154. Fingleton B, Vargo-Gogola T, Crawford HC, *et al.* Matrilysin [MMP-7] expression selects for cells with reduced sensitivity to apoptosis. *Neoplasia.* **2001**; 3 (6): 459-68.
155. Pollard JW. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J Leukoc Biol.* **2008**; 84 (3): 623-30. doi: 10.1189/jlb.1107762.
156. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, *et al.* Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol.* **2000**; 18 (5): 1135-49.
157. Tabruyn SP and Griffioen AW. Molecular pathways of angiogenesis inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* **2007**; 355 (1): 1-5.
158. Ahn GO and Brown JM. Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells. *Cancer Cell.* **2008**; 13 (3): 193-205. doi: 10.1016/j.ccr.2007.11.032.
159. Sparmann A and Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell.* **2004**; 6 (5): 447-58.
160. Zong WX and Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* **2006**; 20 (1): 1-15.

161. Sun J. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases are essential for the inflammatory response in cancer cells. *J Signal Transduct.* **2010**; 2010: 985132. doi: 10.1155/2010/985132.
162. Drabsch Y and ten Dijke P. TGF- $\beta$  signaling in breast cancer cell invasion and bone metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* **2011**; 16 (2): 97-108. doi: 10.1007/s10911-011-9217-1.
163. Patel LR, Camacho DF, Shiozawa Y, *et al.* Mechanisms of cancer cell metastasis to the bone: a multistep process. *Future Oncol.* **2011**; 7 (11): 1285-97. doi: 10.2217/fon.11.112.
164. Erler JT, Bennewith KL, Cox TR, *et al.* Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell.* **2009**; 15 (1): 35-44. doi: 10.1016/j.ccr.2008.11.012.
165. Madani I, de Neve W and Mareel M. Does ionizing radiation stimulate cancer invasion and metastasis? *Bull Cancer.* **2008**; 95 (3): 292-300. doi: 10.1684/bdc.2008.0598.
166. Sofia Vala I, Martins LR, Imaizumi N, *et al.* Low doses of ionizing radiation promote tumor growth and metastasis by enhancing angiogenesis. *PLoS One.* **2010**; 5 (6): e11222. doi: 10.1371/journal.pone.0011222.
167. Kunigal S, Lakka SS, Joseph P, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 inhibition down-regulates radiation-induced nuclear factor-kappa B activity leading to apoptosis in breast tumors. *Clin Cancer Res.* **2008**; 14 (11): 3617-26. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-2060.
168. Kast RE and Halatsch ME. Matrix metalloproteinase-2 and -9 in glioblastoma: a trio of old drugs-captopril, disulfiram and nelfinavir-are inhibitors with potential as adjunctive treatments in glioblastoma. *Arch Med Res.* **2012**; 43 (3): 243-7. doi: 10.1016/j.arcmed.2012.04.005.
169. Tsai KK, Chuang EY, Little JB, *et al.* Cellular mechanisms for low-dose ionizing radiation-induced perturbation of the breast tissue microenvironment. *Cancer Res.* **2005**; 65 (15): 6734-44.
170. Klaunig JE and Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **2004**; 44: 239-67.
171. Shen KK, Ji LL, Chen Y, *et al.* Influence of glutathione levels and activity of glutathione-related enzymes in the brains of tumor-bearing mice. *Biosci Trends.* **2011**; 5 (1): 30-7.
172. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* **2006**; 160 (1): 1-40.
173. Cao Q, Cai W, Li T, *et al.* Combination of integrin siRNA and irradiation for breast cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* **2006**; 351 (3): 726-32.
174. Birgersdotter A, Baumforth KR, Porwit A, *et al.* Three-dimensional culturing of the Hodgkin lymphoma cell-line L1236 induces a HL tissue-like gene expression pattern. *Leuk Lymphoma.* **2007**; 48 (10): 2042-53.

175. Ghosh S, Spagnoli GC, Martin I, *et al.* Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study. *J Cell Physiol.* **2005**; 204 (2): 522-31.
176. Li C, Kato M, Shiue L, *et al.* Cell type and culture condition-dependent alternative splicing in human breast cancer cells revealed by splicing-sensitive microarrays. *Cancer Res.* **2006**; 66 (4): 1990-9.
177. Ernst A, Hofmann S, Ahmadi R, *et al.* Genomic and expression profiling of glioblastoma stem cell-like spheroid cultures identifies novel tumor-relevant genes associated with survival. *Clin Cancer Res.* **2009**; 15 (21): 6541-50. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0695.
178. dit Faute MA, Laurent L, Ploton D, *et al.* Distinctive alterations of invasiveness, drug resistance and cell-cell organization in 3D-cultures of MCF-7, a human breast cancer cell line, and its multidrug resistant variant. *Clin Exp Metastasis.* **2002**; 19 (2): 161-8.
179. Fischbach C, Chen R, Matsumoto T, *et al.* Engineering tumors with 3D scaffolds. *Nat Methods.* **2007**; 4 (10): 855-60.
180. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, *et al.* Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc.* **2009**; 4 (3): 309-24. doi: 10.1038/nprot.2008.226.
181. Mroue R and Bissell MJ. Three-dimensional cultures of mouse mammary epithelial cells. *Methods Mol Biol.* **2013**; 945: 221-50. doi: 10.1007/978-1-62703-125-7\_14.
182. Shamir ER and Ewald AJ. Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2014**; 15 (10): 647-64. doi: 10.1038/nrm3873.
183. Tanic M, Krivokuca A, Cavic M, *et al.* Molecular signature of response to preoperative radiotherapy in locally advanced breast cancer. *Radiat Oncol.* **2018**; 13 (1): 193. doi: 10.1186/s13014-018-1129-4.
184. Ishimoto T, Nagano O, Yae T, *et al.* CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell.* **2011**; 19 (3): 387-400. doi: 10.1016/j.ccr.2011.01.038.
185. Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, *et al.* Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. *Nat Commun.* **2012**; 3: 883. doi: 10.1038/ncomms1892.
186. Yoshikawa M, Tsuchihashi K, Ishimoto T, *et al.* xCT inhibition depletes CD44v-expressing tumor cells that are resistant to EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **2013**; 73 (6): 1855-66. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3609-T.
187. Sosulski A, Horn H, Zhang L, *et al.* CD44 Splice Variant v8-10 as a Marker of Serious Ovarian Cancer Prognosis. *PLoS One.* **2016**; 11 (6): e0156595. doi: 10.1371/journal.pone.0156595.

188. Tsubouchi K, Minami K, Hayashi N, *et al.* The CD44 standard isoform contributes to radioresistance of pancreatic cancer cells. *J Radiat Res.* **2017**; 58 (6): 816-26. doi: 10.1093/jrr/rrx033.
189. Swartz MA, Iida N, Roberts EW, *et al.* Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res.* **2012**; 72 (10): 2473-80. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0122.
190. Upreti M, Jyoti A and Sethi P. Tumor microenvironment and nanotherapeutics. *Transl Cancer Res.* **2013**; 2 (4): 309-19.
191. Nguyen GH, Murph MM and Chang JY. Cancer stem cell radioresistance and enrichment: where frontline radiation therapy may fail in lung and esophageal cancers. *Cancers (Basel).* **2011**; 3 (1): 1232-52. doi: 10.3390/cancers3011232.
192. Ailles LE and Weissman IL. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol.* **2007**; 18 (5): 460-6.
193. Ambrose J, Livitz M, Wessels D, *et al.* Mediated coalescence: a possible mechanism for tumor cellular heterogeneity. *Am J Cancer Res.* **2015**; 5 (11): 3485-504.
194. Gomez-Casal R, Bhattacharya C, Ganesh N, *et al.* Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes. *Mol Cancer.* **2013**; 12 (1): 94. doi: 10.1186/1476-4598-12-94.
195. Baumann M, Krause M and Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer.* **2008**; 8 (7): 545-54. doi: 10.1038/nrc2419.
196. Mehner C, Hockla A, Miller E, *et al.* Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget.* **2014**; 5 (9): 2736-49.
197. Overall CM and Kleinfeld O. Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* **2006**; 6 (3): 227-39.
198. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, *et al.* MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell.* **2000**; 103 (3): 481-90.
199. Jiang Y, Goldberg ID and Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene.* **2002**; 21 (14): 2245-52.
200. Wagner JM, Hackanson B, Lübbert M, *et al.* Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in recent clinical trials for cancer therapy. *Clin Epigenetics* **2010**; 1 (3-4): 117-36.
201. Li Y and Seto E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2016**; 6 (10). doi: 10.1101/cshperspect.a026831.
202. Müller BM, Jana L, Kasajima A, *et al.* Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer--overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC Cancer.* **2013**; 13: 215. doi: 10.1186/1471-2407-13-215.

203. Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer*. **2009**; 9: 188. doi: 10.1186/1471-2407-9-188.
204. Deryugina EI and Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. **2006**; 25 (1): 9-34.
205. Cheng S, Tada M, Hida Y, *et al.* High MMP-1 mRNA expression is a risk factor for disease-free and overall survivals in patients with invasive breast carcinoma. *J Surg Res*. **2008**; 146 (1): 104-9.
206. Shen CJ, Kuo YL, Chen CC, *et al.* MMP1 expression is activated by Slug and enhances multi-drug resistance (MDR) in breast cancer. *PLoS One*. **2017**; 12 (3): e0174487. doi: 10.1371/journal.pone.0174487.
207. He E, Pan F, Li G, *et al.* Fractionated Ionizing Radiation Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Esophageal Cancer Cells through PTEN Deficiency-Mediated Akt Activation. *PLoS One*. **2015**; 10 (5): e0126149. doi: 10.1371/journal.pone.0126149.
208. Kim E, Youn H, Kwon T, *et al.* PAK1 tyrosine phosphorylation is required to induce epithelial-mesenchymal transition and radioresistance in lung cancer cells. *Cancer Res*. **2014**; 74 (19): 5520-31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0735.
209. Noë V, Fingleton B, Jacobs K, *et al.* Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci*. **2001**; 114 (Pt 1): 111-8.
210. Singh SS, Bhatt MLB, Kushwaha VS, *et al.* Role of matrix metalloproteinase 13 gene expression in the evaluation of radiation response in oral squamous cell carcinoma. *J Carcinog*. **2017**; 16: 2. doi: 10.4103/jcar.JCar\_5\_16.
211. Inoue A, Takahashi H, Harada H, *et al.* Cancer stem-like cells of glioblastoma characteristically express MMP-13 and display highly invasive activity. *Int J Oncol*. **2010**; 37 (5): 1121-31.
212. Tang Z, Ding S, Huang H, *et al.* HDAC1 triggers the proliferation and migration of breast cancer cells via upregulation of interleukin-8. *Biol Chem*. **2017**; 398 (12): 1347-56. doi: 10.1515/hsz-2017-0155.
213. Bayat S, Mansoori Derakhshan S, Mansoori Derakhshan N, *et al.* Downregulation of HDAC2 and HDAC3 via oleuropein as a potent prevention and therapeutic agent in MCF-7 breast cancer cells. *J Cell Biochem*. **2019**; 120 (6): 9172-80. doi: 10.1002/jcb.28193.
214. la Noce M, Paino F, Mele L, *et al.* HDAC2 depletion promotes osteosarcoma's stemness both in vitro and in vivo: a study on a putative new target for CSCs directed therapy. *J Exp Clin Cancer Res*. **2018**, 37 (1) 296. doi: 10.1186/s13046-018-0978-x.
215. Kao GD, McKenna WG, Guenther MG, *et al.* Histone deacetylase 4 interacts with 53BP1 to mediate the DNA damage response. *J Cell Biol*. **2003**; 160 (7): 1017-27.

216. Marampon F, Megiorni F, Camero S, *et al.* HDAC4 and HDAC6 sustain DNA double strand break repair and stem-like phenotype by promoting radioresistance in glioblastoma cells. *Cancer Lett.* **2017**; 397: 1-11. doi: 10.1016/j.canlet.2017.03.028.
217. Cid S, Eiro N, Fernández B, *et al.* Prognostic Influence of Tumor Stroma on Breast Cancer Subtypes. *Clin Breast Cancer.* **2018**; 18 (1): e123-33. doi: 10.1016/j.clbc.2017.08.008.
218. Zagouri F, Sergentanis TN, Kalogera E, *et al.* Serum MMPs and TIMPs: may be predictors of breast carcinogenesis? *Clin Chim Acta.* **2011**; 412 (7-8): 537-40. doi: 10.1016/j.cca.2010.11.037.
219. Sung MT, Hsu HT, Lee CC, *et al.* Krüppel-like factor 4 modulates the migration and invasion of hepatoma cells by suppressing TIMP-1 and TIMP-2. *Oncol Rep.* **2015**; 34 (1): 439-46. doi: 10.3892/or.2015.3964.
220. Smyth A, Reid HM, Baker AH, *et al.* Modifications of the radiosensitivity of a renal cancer cell line as a consequence of stable TIMP-1 overexpression. *Int J Radiat Biol.* **2007**; 83 (1): 13-25.
221. Faurobert E, Bouin AP and Albiges-Rizo C. Microenvironment, tumor cell plasticity, and cancer. *Curr Opin Oncol.* **2015**; 27 (1): 64-70. doi: 10.1097/CCO.000000000000154.
222. Lagadec C, Vlashi E, della Donna L, *et al.* Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells.* **2012**; 30 (5): 833-44. doi: 10.1002/stem.1058.
223. Ding G, Liu Y and Liang C. Efficacy of radiotherapy on intermediate and advanced lung cancer and its effect on dynamic changes of serum vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9. *Oncol Lett.* **2018**; 16 (1): 219-224. doi: 10.3892/ol.2018.8622.
224. Yuan J, Xiao C, Lu H, *et al.* Effects of various treatment approaches for treatment efficacy for late stage breast cancer and expression level of TIMP-1 and MMP-9. *Cancer Biomark.* **2018**; 23 (1): 1-7. doi: 10.3233/CBM-170901.
225. Lipton A, Leitzel K, Chaudri-Ross HA, *et al.* Serum TIMP-1 and response to the aromatase inhibitor letrozole versus tamoxifen in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* **2008**; 26 (16): 2653-8. doi: 10.1200/JCO.2007.15.4336.
226. Lipton A, Ali SM, Leitzel K, *et al.* Elevated plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 level predicts decreased response and survival in metastatic breast cancer. *Cancer.* **2007**; 109 (10): 1933-9.
227. Talvensaaari-Mattila A and Turpeenniemi-Hujanen T. High preoperative serum TIMP-1 is a prognostic indicator for survival in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* **2005**; 89 (1); 29-34.
228. Mylona E, Magkou C, Giannopoulou I, *et al.* Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-3 protein in invasive breast carcinoma: relation to tumor phenotype and clinical outcome. *Breast Cancer Res.* **2006**; 8 (5): R57.



229. Lui EL, Loo WT, Zhu L, *et al.* DNA hypermethylation of TIMP3 gene in invasive breast ductal carcinoma. *Biomed Pharmacother.* **2005**; 59 Suppl 2: S363-5.
230. de Schutter H, Geeraerts H, Verbeken E, *et al.* Promoter methylation of TIMP3 and CDH1 predicts better outcome in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy only. *Oncol Rep.* **2009**; 21 (2): 507-13.
231. Younis LK, El Sakka H and Haque I. The Prognostic Value of E-cadherin Expression in Breast Cancer. *Int J Health Sci (Qassim).* **2007**; 1 (1): 43-51.

