



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

**Papel de los microRNAs en la Angiogénesis del
Cáncer de Mama y en la Respuesta Angiogénica
a la Quimioterapia**

D. Ginés Luengo Gil

2016



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA
Facultad de Medicina

D. **Francisco Ayala de la Peña**, Profesor Asociado Clínico, y D. **Vicente Vicente García**, Catedrático de Medicina en el Área de Hematología y Oncología del Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Murcia,

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Papel de los microRNA en la angiogénesis del cáncer de mama y en la respuesta angiogénica a la quimioterapia”, realizada por D. Ginés Luengo Gil bajo su inmediata dirección y supervisión, y que se presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 14 de diciembre de 2015.

Firmado: Dr. Francisco Ayala de la Peña

Firmado: Dr. Vicente Vicente García



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA
Facultad de Medicina

Los trabajos de investigación llevados a cabo en la presente memoria de Tesis Doctoral han sido financiados por los siguientes proyectos:

1. **“Papel del clúster miR-17-92 en la angiogénesis del cáncer de mama”**, proyecto de Investigación en Salud financiado por el Instituto de Salud Carlos III (PI12/02877).
2. **“Papel de los microRNA en la angiogénesis del cáncer de mama y en la respuesta angiogénica a la quimioterapia”**, proyecto de Investigación en Salud financiado por la Fundación Salud 2000 (Ayudas Merck-Serono de Investigación en Oncología 2012).

El firmante de esta memoria ha disfrutado durante el periodo de tesis de varios contratos de investigación financiados por el Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital General Universitario José María Morales Meseguer.

En Murcia, a 14 de diciembre de 2015

Firmado: Ginés Luengo Gil

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dedicar unas líneas de agradecimientos especiales a todas aquellas personas que de una forma u otra han contribuido a lo largo de toda mi carrera académica, que alcanza el nivel máximo con la consecución del grado de Doctor:

A la memoria de mis abuelos Ginés Luengo y Gabriel Gil, de los que intenté aprender todo lo que el tiempo me dejó.

A toda mi familia, con especial mención a mis hermanos Gabriel, Patricia y Pepe Luengo, a mis abuelas Ascensión Escobar y Ana López, a mi sobrina Sofía Luengo, a todos mis tíos Rosario Luengo y Pepe Paredes, Josefa Gil y Pepe Martínez, Pedro Gil y Conchi Oliva, Ana Gil y José Antonio Serrano, Ginés Luengo y Juani Mellina, Gabriel Gil, Mari Luengo, así como a mis primos Sergio y Jose Paredes, Ginés y Susi Luengo, Juan y María Martínez, Ana Gil, Gabriel y Ana Gil y Elisabeth Serrano.

A mi maestro Ginés Cabezos como referencia docente en Educación Primaria, así como a mis profesores Rafael Moreno, Joaquín Comas y Darío Santín como referencias docentes en mi etapa de Educación Secundaria, porque las Ciencias no pueden construirse sin el apoyo del razonamiento, las Matemáticas y la Filosofía.

A todos mis amigos de mi querida Cartagena, con los que tanto tiempo y buenos momentos he compartido, con especial mención a José Cañavate, Julián Arias, Remi Hernández y Jorge Rodríguez.

A todos mis compañeros y amigos de la Facultad de Biología y de la Universidad de Murcia, con los que crecí personal y profesionalmente, con especial mención a Lidia Crespo, M^a Ángeles García, Samuel Cantero, María Arques, Sandra Catalán, Elena Gómez, José Alcaraz, Chema Frutos, M^a Ángeles Bonmatí, Alberto Fuentes, Alberto Martínez, M^a Elena Pérez, Verónica Prieto, Sonia Águila, Miguel Arrebola, Mar Collado, Marta Abrisqueta, Pepe Cánovas, Fran Toral, David Mora, Amaia Talavera e Irene Castro. Gracias a todos por tantos y tantos años de buenos e inolvidables recuerdos.

A todos mis compañeros, amigos y profesores en el Departamento de Fisiología, donde pasé mi primer año de alumno interno y donde empecé a aventurarme en el mundo de la experimentación, con especial mención a Borja Blanco, Jorge de Costa y a Francisco Javier López.

A todos mis compañeros y amigos del Departamento de Genética y Microbiología, en donde comenzó mi aventura científica tras la licenciatura, con especial mención a José Pedro Guirao, Ruth Sánchez-Fresneda y Juan Carlos Argüelles.

A mis amigos del Servicio de Cultivos Celulares, con especial mención a Toñi Bernabéu, Juana García y Pepe Muñoz.

A todos mis compañeros y amigos del Máster en Biología Molecular y Biotecnología y del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, con especial mención a Jaime Guillén, Marta Guerrero, Tere Coronado, Magalí Sáez, Rubén López, Alessio Ausili, Curro Molina,

Antonio Egea, Ángel Pérez, Víctor Ortiz, Vanessa Ortiz, Alejandro Carrasco, Mar García, Jonatan Campillo, Rosa Carbonell, Aránzazu Gallego, Juan Carmelo Gómez y María Senena Corbalán.

A todos mis compañeros de trabajo del Servicio de Hematología y Oncología Médica, con los que tanto he crecido personal y profesionalmente, con especial mención a Salam Salloum, Irene Martínez, Alberto Carmona, Toñi Miñano, Nuria García, José Miguel Torregrosa, Natalia Bohdan, Lola Marras, Pepe Rivera, Raúl Teruel, Ana Hurtado, Rocío González-Conejero, José Padilla, Pepe Navarro, Mara Toderici, Isabel Sánchez, José Antonio Guerrero, Marisa Lozano, Enrique González, Andrés Jerez, Anabel Antón, Noelia Navarro, Gloria Soler, Isabel Sánchez, Constantino Martínez, Paqui Ferrer, Elisa García, Elena García, Marta Zafra, José Antonio Macías, Inma Ballester, Maia Dzhugashvili, Uge de la Morena, Pilar de la Morena, Salvador Espín, Jose Gálvez, M^ª Ángeles Vicente, Almudena Cascales, María José Candela, José Antonio López, Belén Campoy, Raquel Gálvez, Sergio Pérez, Carolina Carrillo, Eva Caparrós, Vanessa Roldán, Isabel Zuazu, Lorena Velázquez y Teresa García. Muchas gracias por haber compartido conmigo vuestro tiempo dentro y fuera del Servicio.

A todas las personas que me han ayudado en el desarrollo del apartado técnico de la tesis doctoral, con especial mención a Pablo Conesa, Fara Sáez, María José López, Charo Martínez y Miriam Lencina.

A mi gran amiga María Piedad Fernández, por tantos y tantos momentos que hemos compartido desde que empezamos la carrera, luchando por llegar a ser científicos y objetivo que por fin alcanzamos. Yo también espero que nuestra amistad sea para toda la vida.

A mis directores de tesis Francisco Ayala y Vicente Vicente, así como a Javier Corral, muchas gracias por abrirme las puertas del Servicio y haberme dado la oportunidad de trabajar en el mismo, ha sido sin duda una de las mejores experiencias de mi vida y que me ha permitido conocer la oncohematología no solo el mundo básico, sino también el mundo clínico y su conexión traslacional. Me ha hecho crecer mucho personal y profesionalmente.

A mi querida Ana Arroyo. Compartir este periodo contigo me ha ayudado mucho para superarlo, ha mejorado infinitas veces mi vida personal y me ha enseñado a ser más feliz. Muchas gracias por estar siempre ahí.

Y por último y en especial a mis padres Paca Gil y José Luengo. Nada de lo que soy se entiende sin vosotros. Me habéis formado como persona y siempre me habéis animado y apoyado para luchar por continuar el camino académico y científico. Todavía recuerdo con gran agrado el primer día que desperté para ir al colegio, o los cientos de libros, de juguetes, de documentales o de animales que despertaron mi curiosidad por la Naturaleza y que me condujeron hacia el estudio de las Ciencias de la Vida y la Salud. Son tantos y tantos años de esfuerzo y sacrificio los que hemos pasado juntos, que nunca existirán palabras escritas que puedan transmitir cuanto os agradeceré siempre todo lo que habéis hecho por mí. Esta Tesis Doctoral es un pequeño tributo para vosotros. Muchas gracias por todo.

Para mí ha sido un honor y un orgullo compartir con todos vosotros espacio y tiempo.

Gracias

“En la vastitud del espacio y en la inmensidad del tiempo, mi alegría es compartir contigo un lugar y una época.”

Carl Sagan

“La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso.”

Louis Pasteur

“No es el más fuerte de las especies el que sobrevive, tampoco es el más inteligente el que sobrevive. Es aquel que es más adaptable al cambio.”

Charles Darwin

“En primer lugar acabemos con Sócrates, porque ya estoy harto de este invento de que no saber nada es un signo de sabiduría.”

Isaac Asimov

“La única manera de descubrir los límites de lo posible es aventurarse un poco más allá de dichos límites, en lo imposible.”

Arthur C. Clarke

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”.

Albert Einstein

A mis padres

<u>ÍNDICE GENERAL</u>	PÁGINA
<u>RESUMEN</u>	2
<u>INTRODUCCIÓN</u>	5
1. CÁNCER: ORIGEN Y PROGRESIÓN TUMORAL	6
2. EL CÁNCER DE MAMA	10
3. SINTOMATOLOGÍA, CLASIFICACIÓN CLÍNICA Y PATOLÓGICA	11
4. CLASIFICACIÓN MOLECULAR	13
5. ABORDAJE TERAPÉUTICO	15
6. ANGIOGÉNESIS Y CÁNCER DE MAMA	18
7. METODOLOGÍA DE ESTUDIO DE LA ANGIOGÉNESIS	24
8. MICRORNA Y CÁNCER	29
9. MICRORNA Y CÁNCER DE MAMA	33
10. INTERRELACIONES ENTRE ANGIOGÉNESIS, MICRORNA Y CÁNCER: LA TRIPLE ENTENTE	38
<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	43
<u>PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS</u>	47
<u>RESULTADOS</u>	65
1. <u>CAPÍTULO I</u>	67
2. <u>CAPÍTULO II</u>	79
3. <u>CAPÍTULO III</u>	103
4. <u>CAPÍTULO IV</u>	125
5. <u>CAPÍTULO V</u>	139
6. <u>CAPÍTULO VI</u>	149
<u>DISCUSIÓN</u>	167
<u>CONCLUSIONES</u>	181
<u>APÉNDICE I: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA RELACIONADA CON LA TESIS</u>	184
<u>ANEXO I</u>	186
<u>ANEXO II</u>	188
<u>ANEXO III</u>	189
<u>ANEXO IV</u>	190
<u>REFERENCIAS</u>	191
<u>ABREVIATURAS</u>	216

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La angiogénesis es el proceso fundamental por el cual se forman nuevas redes capilares. Los tumores precisan de neovascularización para su crecimiento y progresión más allá de aproximadamente un milímetro de diámetro, de forma que las redes capilares permiten el aporte de nutrientes y oxígeno, así como la eliminación de sustancias de desecho, además de permitir la diseminación metastásica. Los microRNAs son pequeños RNA no codificantes que se encargan del bloqueo de la expresión génica mediante mecanismos de silenciamiento traduccional. Existen múltiples evidencias que muestran que los microRNAs desempeñan papeles importantes en la regulación del proceso angiogénico, actuando (dependiendo de sus dianas) como agentes pro- o antiangiogénicos. La angiogénesis ha demostrado ser una diana útil en el tratamiento antiangiogénico; sin embargo, sus resultados son todavía limitados y se necesita profundizar en los mecanismos moleculares que regulan la activación angiogénica, así como la búsqueda de factores predictivos y pronósticos que permitan la estratificación de las pacientes en el contexto del cáncer de mama.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS: La hipótesis de partida es que los microRNAs juegan un papel relevante en la angiogénesis del cáncer de mama, fundamentalmente a través de la modulación de los niveles de expresión de *VEGFA*, *THBS1* y otros genes claves de este proceso. El objetivo fue evaluar el papel del clúster miR-17-92, así como otros angiomicroRNAs en la angiogénesis del cáncer de mama.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se estudió una serie clínica con 121 pacientes con cáncer de mama localmente avanzado tratadas homogéneamente con quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas y taxanos secuenciales. Se obtuvo RNA de biopsias FFPE pre- y postquimioterapia y se analizó la expresión génica de microRNAs y mRNAs, estudiando la asociación entre la expresión de estos y las características anatomopatológicas de los tumores y su relevancia predictiva de respuesta y en supervivencia. Así mismo, se analizaron por técnicas inmunohistoquímicas y morfométricas las redes capilares peritumorales utilizando tinción con anticuerpo anti-CD34. Se realizó paralelamente un estudio *in silico* de interacción entre microRNAs y sus posibles mRNA dianas. Los resultados observados clínicamente se correlacionaron con los obtenidos en el laboratorio construyendo modelos mediante técnicas *in vitro* que incluyeron cultivo celular, transfección celular, tratamiento con taxanos, evaluación de la formación de redes capilares en medio condicionado tumoral, western-blot, RT-qPCR, migración, invasión, apoptosis, proliferación y microarrays de expresión génica. Los resultados obtenidos se validaron utilizando bases de datos externas y una serie de cáncer de mama adyuvante con RNA extraído de tejido fresco.

RESULTADOS: La serie clínica correspondió en su mayoría a tumores de subtipo luminal con estadios localmente avanzados, y la tasa global de respuestas completas patológicas (17%) fue comparable a la publicada. El RNA extraído de parafina fue suficiente para realizar análisis de la expresión génica en la mayoría de los casos. El estudio *in silico* permitió una buena selección

de genes candidatos para estudio *in vitro*. La mayoría de los microRNAs correlacionaron directamente con factores de proliferación e inversamente con factores implicados en quimiotaxis y angiogénesis. La expresión pre-tratamiento de los microRNAs y mRNAs seleccionados no tuvo valor predictivo de respuesta ni valor pronóstico, pero miR-429 tuvo valor pronóstico adverso para supervivencia libre de enfermedad y libre de recaída a distancia. Identificamos un perfil vascular de alto riesgo compuesto por tamaño vascular grande y presencia de proliferaciones microvasculares glomerulares. Cuando se analizó la relación entre la expresión de miRNA y el patrón vascular, observamos que miR-19b-1 y miR-20a se asociaban con el perfil de alto riesgo descrito. En general, la quimioterapia indujo un aumento de expresión de microRNAs y genes importantes en angiogénesis, mientras que provocó un descenso de genes de proliferación. En particular, la quimioterapia neoadyuvante aumentó la densidad microvascular y el área vascular, sin cambios en el tamaño medio de los vasos, aunque aproximadamente un tercio de los casos mostraron respuesta angiogénica, definida como disminución de microdensidad vascular. Solo miR-19b-1 tuvo valor predictivo de respuesta angiogénica. De forma independiente a la regulación de la angiogénesis, miR-18a mostró ser un oncomiR con impacto pronóstico en el tumor residual, reprogramando las células hacia un estado pro-proliferativo y disminuyendo los niveles de receptor de estrógenos alfa y de SDF-1.

CONCLUSIONES: MiR-17-92 desempeña un papel relevante en la angiogénesis tumoral, asociándose sus miembros de forma directa con un estado proangiogénico y proproliferativo, a través de biomarcadores tan importantes como el factor de crecimiento endotelio vascular o la trombospondina-1. Todos los angiomiRNA analizados en este trabajo de tesis (miR-17, miR-18a, miR-19b-1, miR-20a, miR-92a, miR-200c, miR-106b, miR-429, miR-141, miR-519c, miR-9 y miR-107) sufren un aumento de expresión consistente en el contexto del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas y taxanos. Mir-18a es potencialmente relevante como factor pronóstico en pacientes sin respuesta completa post-neoadyuvancia.

INTRODUCCIÓN

ORIGEN Y PROGRESIÓN TUMORAL

El cáncer supone uno de los mayores problemas de salud pública en los países con elevado índice de desarrollo (**Tabla 1**) [1, 2], así como su curación supone uno de los mayores retos científicos del siglo XXI. Se trata de una serie de enfermedades de etiología compleja que generalmente se asocian al envejecimiento celular y que provienen de la transformación maligna de las propias células del organismo donde se originan [3].

Tabla 1. El cáncer de pulmón es el cáncer más común en todo el mundo, contribuyendo con un 13% del número total de nuevos casos diagnosticados en 2012. El cáncer de mama (sólo mujeres) fue el segundo tipo de cáncer más común con cerca de 1,7 millones de casos nuevos en 2012. El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común con casi 1,4 millones de casos nuevos en 2012.

Ranking	Cáncer	Nuevos casos diagnosticados en 2012 (x1.000)	Porcentaje del total*
1	Pulmón	1.825	13,0
2	Mama	1.677	11,9
3	Colorrectal	1.361	9,7
4	Próstata	1.112	7,9
5	Estómago	952	6,8
6	Hígado	782	5,6
7	Cérvix uterino	528	3,7
8	Esófago	456	3,2
9	Vejiga	430	3,1
10	Linfoma no-Hodgkin	386	2,7
11	Leucemia	352	2,5
12	Páncreas	338	2,4
12	Riñón	338	2,4
14	Endometrial	320	2,3
15	Cavidad oral	300	2,1
16	Tiroides	298	2,1
17	Cerebro	256	1,8
18	Ovario	239	1,7
19	Melanoma cutáneo	232	1,6
20	Vesícula biliar	178	1,3
21	Laringe	157	1,1
22	Faringe	142	1,0
23	Mieloma múltiple	114	0,8
24	Nasofaringe	87	0,6
25	Linfoma de Hodgkin	66	0,5
26	Testículo	55	0,4
27	Sarcoma de Kaposi	44	0,3

*Excluyendo cáncer de piel no melanoma

La célula es el pilar básico que sustenta la vida en la Tierra. Supone la unidad básica fundamental a partir de la cual radiaron todas las especies vivas que conocemos actualmente, en concreto a partir de una célula procarionte ancestral denominada LUCA (del inglés, *Last Universal Common Ancestor*) [4].

La aparición de la vida pluricelular supuso un hito en la evolución biológica, fruto de dos pasos necesariamente críticos de incremento en complejidad: (1) la asociación en varias etapas de distintos organismos procariontes (las evidencias más recientes sugieren concretamente que una arquea y una bacteria fueron las que dieron lugar a célula y

mitocondria, respectivamente) [5], que permitió la aparición de la célula eucariótica y (2) la asociación cooperativa entre células eucariotas de la misma especie, que permitió la organización en comunidades con reparto de tareas específicas que requerían diferenciación celular y que supuso el paso hacia la pluricelularidad [6].

La pluricelularidad supone que a partir de una única célula indiferenciada se produzca un proceso embriogénico que consiste en su división masiva en más células que a su vez se van dividiendo y diferenciando en otros tipos celulares para dar origen a todas las capas embrionarias y a su vez a todos los tejidos que conforman a un individuo completo de una especie dada [7]. Tras este proceso, las células que componen al individuo nunca terminan su tarea, sino que siguen dividiéndose y diferenciándose para promover el crecimiento del organismo neonato y su desarrollo hasta la fase adulta. Una vez alcanzada la fase adulta, las células se encargan del mantenimiento del organismo, renovación de tejidos en muchos casos, reparación de daños, maduración de órganos especiales como pueden ser los reproductores y reabsorción de aquellos que no son necesarios [8].

En organismos pluricelulares la organización de cada división, cada diferenciación celular y cada muerte celular programada (proceso apoptótico) está estrictamente regulada, de forma que no se produce azarosamente, sino que sigue patrones preestablecidos codificados en el DNA de cada célula, y cuyo molde procede de la copia fidedigna a partir del cigoto inicial. De esta forma, con las instrucciones intactas, cada célula es capaz de cumplir sus funciones correctamente. Sin embargo, el proceso de copia no está exento de errores, así como el mantenimiento del DNA durante la vida de una célula puede sufrir eventos adversos que produzcan alteraciones en su código genético [9].

Los eventos que provocan alteraciones del código genético son tan ancestrales como la vida misma, y son a su vez potentes motores que intervienen en la diversidad y la evolución biológica. Sin embargo, para las células estos eventos son mayoritariamente deletéreos y por ello se han dotado de mecanismos que permiten reparar dichas alteraciones. En caso de no poder realizarse la reparación, existen mecanismos adicionales que permiten el suicidio o la muerte celular programada, proceso denominado también apoptosis. La apoptosis no solo es importante para eliminar tejidos embrionarios no necesarios como por ejemplo la membrana interdigital en mamíferos terrestres, sino que también es un mecanismo que asegura que células alteradas que pueden ser potencialmente peligrosas se autodestruyan de forma controlada.

Atendiendo a la fuente del origen del daño que se produce en el DNA, existen básicamente dos tipos: factores endógenos que son aquellos que provienen de errores que produce la maquinaria replicativa durante el proceso de copia y factores exógenos que son todos aquellos que son provocados por agentes externos, tales como radiación ultravioleta o ionizante, agentes químicos (que provocan alquilación, desaminación, reacción con radicales libres, etc.) o agentes biológicos que interfieren con la replicación o que alteran el genoma por inserción, edición o deleción (por ejemplo, virus) [10, 11].

Si la maquinaria de reparación celular falla en la reparación de un daño y no se activa el proceso apoptótico, la alteración en el código genético queda irremediablemente grabada en el genoma de dicha célula, y con las sucesivas divisiones es transmitida a todas las células

hijas [12]. A lo largo de la vida de un individuo de una especie dada se dan miles de divisiones celulares que permiten el crecimiento y renovación tisular. Esto permite que se acumulen progresivamente mutaciones no deletéreas en las células que están en proceso de división activa.

El **proceso tumorigénico** comienza cuando eventualmente progresan mutaciones que afectan a genes implicados en la edición de errores, en apoptosis, señalización celular y/o en genes implicados en ciclo celular, de forma irreversible. El daño en estos genes vitales provoca inicialmente un crecimiento y diferenciación atípicas que se puede apreciar molecular y fenotípicamente o bien como simples cambios histológicos (displasia con o sin hiperplasia asociada) o bien en forma de tumores benignos. Este tipo de tumores no malignos, no crecen descontroladamente más allá de la región donde se generan y no invaden otros tejidos, si bien en algunos casos pueden causar compresión de otros órganos y en ocasiones suponen un indicador de un proceso de malignización en curso [13-15].

Aunque muchos tumores benignos no progresan a tumor maligno a lo largo de la vida de los organismos, en algunos casos, el resultado de la acumulación de más mutaciones con la división parcialmente descontrolada provoca un efecto aditivo capaz de conducir a la transformación maligna. Este efecto aditivo a su vez puede propiciar un desajuste en la expresión génica, en el epigenoma, en el balance de isoformas normales y/o en el número normal de copias o repeticiones de una región del DNA. Estos cambios moleculares se pueden acompañar de lesiones patológicas apreciables fenotípicamente (displasias), ya que el crecimiento de estas células se acelera y a su vez se pierde parcialmente el control autocrino, así como el paracrino y endocrino que el resto de células normales ejercen sobre estas células precancerosas. Ya no responden a señales proapoptóticas y la consecuente acumulación de masa tumoral conforma áreas de baja vascularización, con la consiguiente hipoxia y ausencia de nutrientes esenciales, que desencadena un proceso de muerte celular traumática, denominado necrosis [16, 17]. La liberación del contenido celular de las células necróticas provoca a su vez lisis de células adyacentes y producción de citoquinas proinflamatorias, con el consiguiente reclutamiento de células del sistema inmune que en algunos casos son capaces de reconocer y destruir células precancerosas. Sin embargo, no siempre se produce el reconocimiento antigénico de la célula precancerosa, de forma que puede continuar la progresión pretumoral en las regiones distales no necróticas, manifestándose en algunos casos como hiperplasia. Si el proceso no se detiene, la progresión pretumoral acaba generalmente con la aparición de una célula tumoral maligna fundadora, que con el crecimiento totalmente descontrolado y con la cooperación del estroma tumoral, producen lo que se denomina tumor primario, compuesto por millones de células surgidas de la división sucesiva y descontrolada de la célula tumoral maligna iniciadora. Se considera que un tumor benigno ha progresado a maligno una vez que la célula tumoral ha adquirido una serie de propiedades biológicas que se manifiestan de forma clínica. Las propiedades biológicas esenciales de una célula maligna son la proliferación descontrolada, la capacidad invasiva sobre otros tejidos y órganos anexos y distales, la supresión de la apoptosis, la evasión del sistema inmune, así como la inmortalización [18, 19].

En las células eucariotas la gran cantidad de material genético se organiza dentro del núcleo en estructuras denominadas cromosomas. El DNA eucariótico está formado por una

doble hélice lineal, que contiene un principio y un final (a diferencia de algunos cromosomas circulares cerrados como los de las mitocondrias). Los extremos están organizados en unas estructuras especiales denominadas telómeros, compuestos de repeticiones denominadas secuencias teloméricas y proteínas accesorias estructurales. Durante la replicación, las DNA polimerasas debido a que necesitan un molde y un cebador para añadir nucleótidos, no son capaces de completar los extremos en la región 5', quedando incompletos y acortándose en cada ciclo replicativo [20]. Esto conlleva la pérdida de información génica esencial, y finalmente provoca la muerte celular. Para solventar este problema, las células eucariotas contienen unas enzimas denominadas telomerasas, capaces de extender los extremos en 3' tras la replicación celular. Las telomerasas son complejos ribonucleoproteicos que contienen una secuencia de RNA complementaria a la secuencia telomérica de DNA, esto le permite unirse a ella y elongarla. Este ciclo puede repetirse sucesivas veces, consiguiendo elongar el telómero y proteger al DNA del daño por acortamiento. En las células somáticas maduras la telomerasa es reprimida tras el nacimiento, así los telómeros se acortan en cada división y como consecuencia final tras sucesivas divisiones, las células mueren. Sin embargo, las células de la línea germinal poseen elevada actividad telomerasa protegiéndose del acortamiento de los telómeros y por tanto del envejecimiento celular. Gracias a este proceso puede perpetuarse el ciclo reproductivo de las especies [20]. Un paso fundamental en el progreso tumorigénico es por tanto la reactivación de la actividad telomerasa. Sin la actividad telomerasa activa los tumores sufren un proceso de senescencia asociada a la división celular similar al que sufren las células somáticas normales del organismo y no progresan [21-23]. Actualmente es un campo de investigación muy prometedor en Oncología con varios fármacos en desarrollo preclínico y también en ensayos clínicos [24].

Otro paso esencial para la progresión tumoral es **la angiogénesis**. La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos. Sin neovascularización adecuada, los tumores no son capaces de crecer más allá de unos milímetros, de manera que las células tumorales deben adquirir la capacidad de promover el proceso angiogénico. La angiogénesis es llevada a cabo por células progenitoras, que son reclutadas y diferenciadas a células endoteliales en respuesta a estímulos proangiogénicos. El estímulo proangiogénico está mayoritariamente promovido por el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), aunque se han caracterizado varias proteínas con funciones proangiogénicas que son importantes en progresión tumoral (factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor inducible por hipoxia 1, factor de crecimiento del tejido conectivo, etc.) [25, 26]. Existen a su vez varias proteínas con capacidad de producir el proceso contrario y se las conoce comúnmente como antiangiogénicas. Entre ellas encontramos la trombospondina-1. El proceso angiogénico depende por tanto del balance entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos, así como otras quimiocinas que permiten el reclutamiento de células endoteliales y pericitos y su diferenciación a vasos sanguíneos dentro del nicho tumoral.

Las células tumorales malignas adquieren durante el proceso tumoral la capacidad de modificar al estroma circundante, transformándolo en un estroma patológico que crece junto al tumor y que es capaz a su vez de modular de igual forma a las propias células tumorales. El conjunto de tumor más estroma patológico y su vascularización es conocido como **nicho tumoral**. El nicho tumoral al alcanzar un tamaño determinado y en respuesta al estímulo fisiológico de la hipoxia que se produce en el seno del mismo, incrementa la producción de

factores proangiogénicos y limita la de factores antiangiogénicos, de forma que promueven el reclutamiento y diferenciación de células endoteliales circulantes y pericitos, formándose una neovascularización que es capaz de aportar nutrientes y oxígeno al tumor y permite así su crecimiento sin restricciones, y además favoreciendo la diseminación metastásica de las células tumorales [27, 28]. El mecanismo de la angiogénesis en el contexto del cáncer de mama se desarrolla con mayor detalle en los próximos apartados.

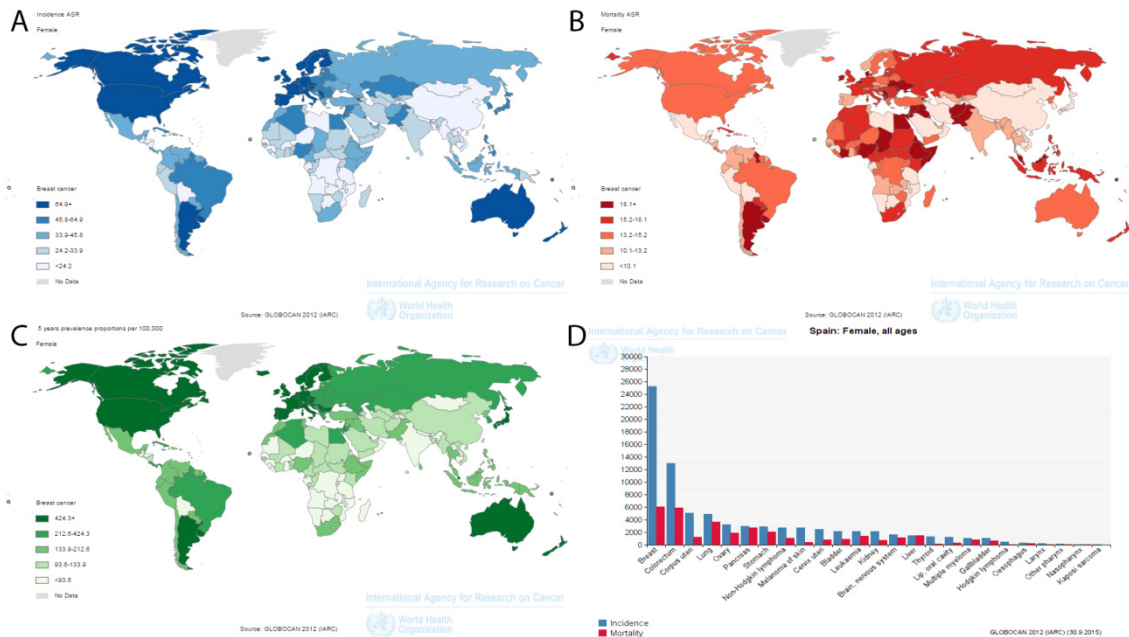
El paso último de la progresión tumoral normal es la generación de **metástasis**. El proceso metastásico depende de la capacidad que adquieren las células tumorales para producir nuevos focos tumorales en órganos distantes. La metástasis requiere en primer lugar que las células tumorales adquieran una mayor capacidad de movimiento. Generalmente la célula tumoral se mueve a favor de un gradiente de quimiocinas, factores de crecimiento que promueven la proliferación de éstas. La aparición de metástasis también requiere que las células tumorales adquieran la capacidad de extravasación, de forma que se introduzcan en el torrente sanguíneo y puedan viajar por el mismo hacia los órganos productores de quimiocinas (células tumorales circulantes o CTCs). Una vez en el órgano receptor, las células tumorales vuelven a extravasarse y se asientan en nuevos nichos o focos tumorales metastásicos. El establecimiento de nuevos focos tumorales en órganos distales, muchas veces no apreciables por sistemas de diagnóstico por imagen, transforma la enfermedad neoplásica en una enfermedad sistémica y genera los mayores problemas desde el punto de vista clínico, dada la necesidad de abordajes terapéuticos no locales y a la heterogeneidad biológica de las lesiones, que limita su erradicación con los tratamientos actuales [29, 30]. El crecimiento descontrolado de las células tumorales provoca daño en tejidos y órganos sanos por varios mecanismos: compresión, degradación de matriz extracelular promovida por proteasas tumorales, inflamación por liberación de citoquinas y reclutamiento de células de la serie blanca, citotoxicidad por destrucción de células sanas y tumorales que liberan su contenido intracelular, etc. La progresión tumoral finaliza con la destrucción de tejidos y órganos, lo que provoca fallo orgánico, en ocasiones múltiple, y finalmente la muerte [18, 31].

EL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una neoplasia generada a partir de células propias del órgano mamario [32] y el más frecuente en las mujeres en todo el mundo (**Figura 1**). Según los datos de 2012 de la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) [33], se diagnostican 1,68 millones de nuevos casos anuales a nivel mundial, de los que a España corresponden anualmente del orden de entre 26.000 y 27.000 nuevos casos [34] (GEICAM, 2015). La supervivencia en cáncer de mama es elevada y su evolución es ascendente en el tiempo, siendo en nuestro país del 81% a los 5 años, cifras ligeramente superiores a la mediana europea, que para el mismo periodo de observación son de un 79% [35-37]. Sin embargo, esta enfermedad continúa teniendo un elevado impacto en salud, provocando del orden de 6.000 fallecimientos anuales en España, lo cual supone un 18,2% de muertes por cáncer en mujeres y siendo la primera causa de muerte en mujeres entre 40 y 55 años. La mayor parte de los casos son diagnosticados en estadios iniciales de la enfermedad (90-95%), mientras que de un 5 a un 10% de los casos lo son en estadio metastásico (CMM). La mayor parte de la enfermedad

metastásica corresponde por tanto a pacientes (en torno al 30%) que sufren una recaída tras haber padecido enfermedad en estadios iniciales o localmente avanzados [34, 35]. Las localizaciones más frecuentes donde se suelen presentar las metástasis son huesos, seguido de pulmón e hígado [38].

Figura 1. Estadísticas de la WHO para el cáncer de mama en mujeres. A) Incidencia mundial de cáncer de mama (tasa estandarizada por edad). B) Mortalidad mundial por cáncer de mama. C) Prevalencia mundial de cáncer de mama. D) Gráfico de barras mostrando incidencia y mortalidad por tipo cáncer en mujeres en España, siendo el más importante tanto en incidencia como en mortalidad globales el cáncer de mama.



SINTOMATOLOGÍA, CLASIFICACIÓN CLÍNICA Y PATOLÓGICA

La presentación generalmente ocurre como tumoración mamaria, con o sin otros síntomas asociados, o bien como hallazgo radiológico en estudios mamográficos de cribado. La presentación como enfermedad metastásica es infrecuente (5-7% de casos) y los síntomas en dichos casos son muy variables dependiendo de la localización de la enfermedad.

Dado que la mayoría de las pacientes con cáncer de mama se presentan con enfermedad local o locorregional, generalmente operable, es necesario clasificarlas desde el punto de vista clínico y patológico para poder predecir la historia natural más probable de la enfermedad y tomar decisiones con respecto al tratamiento. El primer factor para establecer el pronóstico de las pacientes es la estadificación clínica y patológica, que se basa en el tamaño y la extensión del tumor primario, la presencia de metástasis ganglionares y la diseminación a distancia, de acuerdo al sistema TNM (clínico o cTNM, y patológico o pTNM) (**Anexo I**), establecido por la *Union for International Cancer Control* (UICC) y la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) [39]. Sin duda la presencia o ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos axilares resulta ser el mejor indicador pronóstico en pacientes con cáncer de mama de

estadios tempranos, existiendo una relación directa entre número de ganglios afectados, el riesgo de metástasis a distancia, y el pronóstico [40]. El tamaño del tumor además de correlacionarse directamente con la presencia y número de metástasis axilares, es un factor pronóstico independiente por sí solo, de forma que la tasa de recaída aumenta conforme aumenta el tamaño del tumor. Clínicamente, en función del TNM, distinguimos tres situaciones posibles en el cáncer de mama: enfermedad temprana, localmente avanzada y metastásica, que corresponden aproximadamente a los estadios I-II, III y IV, respectivamente.

En segundo lugar, la actual clasificación del cáncer de mama invasivo debe integrar criterios de valoración histológica, básicamente morfológicos como el subtipo histológico (**Anexo II**), la invasión vascular y el grado histológico, con criterios inmunohistoquímicos (IHQ). Los parámetros patológicos clásicos como el tipo histológico (generalmente carcinomas ductales o lobulillares), el tamaño del tumor, el grado histológico, la invasión vascular y/o linfática y la afectación de los ganglios linfáticos axilares ha demostrado correlación con el desenlace de la enfermedad, y por tanto proveen las bases para la evaluación del pronóstico clínico [41]. Los marcadores IHQ como son los receptores hormonales y la sobreexpresión de Her2 proveen valor terapéutico y predictivo adicional y por tanto son claves a la hora de guiar la selección de los pacientes para el abordaje terapéutico [42, 43]. Por tanto, los datos histopatológicos de obligado análisis para la toma de decisiones clínicas son: tamaño del tumor, grado de diferenciación, afectación ganglionar, invasión vascular, estado de receptores hormonales y presencia de sobreexpresión del receptor Her2.

El estudio inmunohistoquímico es la base para la clasificación biológica actualmente utilizada en la práctica clínica habitual, aunque es esperable su sustitución progresiva por clasificaciones moleculares en próximos años. Los cánceres de mama con receptores hormonales positivos abarcan desde un setenta y cinco a un ochenta por ciento de todos los casos, de forma que las técnicas inmunohistoquímicas sirven de guía para seleccionar a pacientes que pueden beneficiarse de tratamiento hormonal. El receptor Her2 representa actualmente el único marcador predictivo adicional incorporado de rutina. Entre un quince y un veinte por ciento de los tumores tienen sobreexpresión y/o amplificación de este receptor y aproximadamente la mitad de estos co-expresan receptores hormonales [44]. De esta forma, estos pacientes son seleccionados para poder beneficiarse de las inmunoterapias anti-Her2. El resto de tumores que no expresan ninguno de los marcadores anteriores (RE-, RP-, Her2-) suponen de un diez a un quince por ciento de los casos, y se definen como tumores triple negativo. Estos tumores representan un reto científico importante, pues en la actualidad no se disponen de opciones terapéuticas más allá de las clásicas (cirugía, quimioterapia convencional y radioterapia), además de ser los más agresivos y con mayor tasa de recaídas [45].

Así pues, a pesar de que la clasificación actual de los cánceres de mama humanos ha sido fundamental para una correcta evaluación predictiva y pronóstica, existen muchas limitaciones importantes que quedan por resolver. En primer lugar, se necesita comprender mejor la gran heterogeneidad que existe en la respuesta a la quimioterapia y en el resultado clínico, incluso entre tumores que en apariencia poseen mucha similitud en sus características clínicas y patológicas. En segundo lugar, la actual clasificación anatomopatológica sigue ofreciendo un conocimiento muy limitado de la complejidad biológica de estas entidades, así como de las vías moleculares directrices que guían la enfermedad en los diferentes fenotipos

[43], lo que ha llevado al desarrollo de nuevas clasificaciones moleculares, como se expone más adelante.

CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, divisible en un número variable de subtipos moleculares intrínsecos con relevancia clínica, cuya base está fundamentada en la biología molecular de las células tumorales y que fue inicialmente descrita por Charles Perou y colaboradores utilizando tecnología basada en microarrays de expresión génica [46-49]. Dicha clasificación distingue básicamente cinco componentes principales que a su vez presentan cierto grado de solapamiento entre ellos, dando lugar a un elevado nivel de complejidad que dificulta el abordaje clínico. Los cinco grandes grupos moleculares con relevancia clínica son [50, 51]:

- **Subtipos luminal A y B.** Se caracterizan por la expresión de receptores hormonales (receptores de estrógenos (RE+) y/o receptores de progesterona (RP+)). Los tumores luminal A y luminal B se distinguen básicamente por dos procesos biológicos fundamentales: vías de proliferación celular (como *MKI67* y *AURKA*) incrementadas y vías de regulación hormonal disminuidas (como el receptor de progesterona o *FOXA1*) en luminales B. En la práctica clínica se diferencian en función del nivel de expresión de la proteína antígeno Ki-67 (inferior al 14% o superior, respectivamente). A nivel de DNA, los luminales A son el grupo que posee menor estado mutacional a lo largo del genoma. Su origen ancestral está presumiblemente en las células diferenciadas del órgano mamario, lo cual hace que las células tumorales mantengan muchas características fenotípicas propias de la célula original que dio lugar al mismo. Son el subtipo más frecuentemente observado en clínica con alrededor del sesenta por ciento de los casos diagnosticados (con una prevalencia de un cuarenta por ciento de luminal A y un veinte por ciento de luminal B).

- **Subtipo Her2.** Estos tumores se caracterizan por la amplificación del protooncogén HER2/neu (Her2+), también conocido como *ERBB2* y designado como cúmulo de diferenciación CD340 y p185 y la consecuente sobreexpresión de la glicoproteína Her2 que codifica, que actúa como receptor del factor de crecimiento de tipo epidérmico humano. La sobreexpresión de esta proteína y otras similares (como *GRB7*) provocan que la vía de señalización de su dominio tirosina quinasa intracitosólico se amplifique, lo cual da lugar a un crecimiento acelerado de las células cancerígenas, con importante impacto clínico. Poseen expresión baja/intermedia de genes luminales (como *ESR1* o *PGR*) y baja expresión de genes típicos de células basales (como queratina 5 o *FOXC1*). A nivel de DNA son el grupo que presenta el mayor estado mutacional de todos los subtipos. Su origen ancestral parece estar ligado a células del compartimento luminal. Aproximadamente entre un diez y un quince por ciento de los cánceres de mama diagnosticados tienen sobreexpresión de Her2.

- **Subtipo similar a basal.** Se caracterizan por la ausencia o muy baja expresión de receptores hormonales y baja o intermedia de HER2/neu, así como expresión alta de marcadores de proliferación (como Ki-67) y de marcadores típicos expresados por el estrato basal de la piel (queratinas 5, 14 y 17). A nivel de DNA son el segundo subtipo con mayor

estado mutacional, presentan mayoritariamente hipometilación de genes, hasta el 80% presentan *TP53* mutado y un 9% *PIK3CA*. Su origen está presumiblemente ligado a las células basales o mioepiteliales localizadas en la mama y que actúan como reservorio de células madre que se encargan de la renovación del tejido mamario por diferenciación. Son los tumores más agresivos y con mayor plasticidad molecular, de forma que cambian más rápido que el resto y paradójicamente, pese a responder más a quimioterapia convencional, poseen mayor tasa de recaídas. Cabe reseñar que si bien casi todos los tumores basales son triple negativo (TNBC) y casi todos los triple negativo son basales, ni todos los tumores basales son triple negativo, ni todos los triple negativo son tumores basales. Entre un quince y un veinte por ciento de los cáncer de mama son de tipo basal o triple negativo (RE-, RP-, Her2-).

- **Subtipo similar a normal.** Este subtipo se caracteriza por ser molecularmente similar a células sanas del tejido mamario. Su existencia está cuestionada seriamente por la comunidad científica, alegándose que los resultados experimentales obtenidos podrían ser debidos a contaminación en exceso de tejido sano adyacente al tumor analizado.

Hasta la fecha el estudio más completo realizado sobre los subgrupos intrínsecos ha sido realizado por el Consorcio TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) [52], en el que se ha aumentado notablemente nuestro conocimiento de éstos, y en el que se ha evidenciado que diversas alteraciones genéticas y epigenéticas convergen fenotípicamente en cuatro clases principales de cáncer de mama (luminal A y B, HER2/neu y basales), y que esto no solo es consistente con la evolución convergente de los circuitos genéticos como se ve en múltiples organismos, sino también con modelos de cáncer de mama de expansión clonal y de selección de células *in vivo* propuestos para explicar la heterogeneidad fenotípica observada en estos subtipos. Así, sabemos con certeza que por ejemplo, los cánceres de mama luminal A presentan la mayor heterogeneidad en términos de expresión génica, espectro mutacional, cambios en el número de copias y resultado clínico en los pacientes.

En el caso de tumores Her2+, la amplificación de Her2 en el DNA junto a la sobreexpresión de genes asociados al amplicón *ERBB2* definen en parte el subtipo Her2+ por mRNA. Sin embargo, no todos los tumores clínicamente Her2+ (determinado por inmunohistoquímica en parafina y por FISH) se corresponden con el subtipo molecular y viceversa. El estudio integrado de expresión génica y de proteína define claramente el subtipo, revelándose que aproximadamente un 50% de los Her2+ clínicos pertenecen al subgrupo molecular Her2+. El resto caen predominantemente en subgrupo luminal. Se han identificado además mutaciones somáticas adicionales que representan potencial terapéutico en los tumores Her2+, incluyendo *PIK3CA* (39%), y la pérdida genómica de *PTEN* y de *INPP4B*.

En el caso de los cánceres de mama de subtipo basal, presentan una alta frecuencia de mutaciones en *TP53* (80%), y cuando el análisis se combina con la actividad de la vía de *TP53* se deduce que la gran mayoría (sino todos), de estos tumores tienen pérdida de la función de *TP53*. Los análisis del TCGA además confirman que la pérdida de *RB1* y *BRCA1/2* son características típicas del grupo Basal. Otras características típicas de este grupo son la sobreactivación de las vías de MYC e HIF1-alfa/*ARNT* o la hiperactivación de *FOXM1*, las mutaciones en *ATM/ATR* o la amplificación de ciclina E1.

Recientes estudios liderados por el grupo de Carlos Caldas han ahondado en los subtipos intrínsecos mediante el uso de grandes series clínicas de descubrimiento (n=997) y de validación (n=995), y estudiando masivamente número de copias y expresión génica han revelando nuevos subgrupos (diez grupos integrativos o IntClust 1-10) con distinto impacto clínico [53], que han sido validados a su vez posteriormente en una cohorte de 7.500 casos [54]. De este estudio en neoadyuvancia se observan a su vez distintos patrones de quimiosensibilidad. Esta nueva clasificación podría mejorar la práctica clínica, aportando nuevas dianas para nuevas terapias biológicas mejor dirigidas y una mejor y más profunda comprensión de la heterogeneidad del cáncer de mama [43, 54]. Por otra parte, se están realizando esfuerzos importantes para intentar trasladar la clasificación molecular a la práctica clínica mediante el desarrollo de test genéticos comerciales de uso en clínica, aunque su introducción está limitada por el todavía elevado coste y por la necesidad de validación de su utilización clínica [55].

ABORDAJE TERAPÉUTICO GENERAL DEL CÁNCER DE MAMA

Para resumir brevemente el abordaje del tratamiento del cáncer de mama, utilizaremos la categorización antes presentada de la enfermedad en tres grandes grupos: cáncer de mama precoz, enfermedad localmente avanzada y enfermedad metastásica. Dado que el modelo clínico en el que se basa el presente trabajo de tesis es el tratamiento neoadyuvante se expondrá de forma más detallada la enfermedad localmente avanzada y la quimioterapia neoadyuvante.

En el **cáncer de mama precoz**, la cirugía es el tratamiento de elección. Para estadios I y II la cirugía conservadora y la linfadenectomía seguida de radioterapia adyuvante han demostrado ser equivalentes a la mastectomía radical [56, 57]. A su vez, la realización de la biopsia selectiva de ganglio centinela para pacientes con N0 clínico reduce las complicaciones asociadas a la linfadenectomía, de forma que son equivalentes en términos de eficacia [58]. Actualmente se sabe que no es necesaria la linfadenectomía en pacientes cT1-2 con biopsia de ganglio centinela positiva que han sido sometidas a cirugía conservadora seguida de radioterapia adyuvante [59]. El tratamiento adyuvante (quimioterapia postoperatoria) ha demostrado ser eficaz para reducir recaídas locales y distales de la enfermedad, y debe ser individualizado según los distintos factores de riesgo. El tratamiento sistémico adyuvante del cáncer de mama ha demostrado ser eficaz para reducir las recaídas locales y sistémicas de la enfermedad, así como el riesgo de muerte por esta enfermedad [60-65]. Este tratamiento debe ser individualizado según los diferentes factores pronósticos y predictivos: edad de la paciente, número de ganglios afectados, hormonosensibilidad, sobreexpresión de HER2/neu, grado del tumor, afectación linfovascular e índice de proliferación (Ki-67) y estatus menopáusico. En función de las características biológicas de la neoplasia, el tratamiento sistémico puede consistir en quimioterapia, hormonoterapia o tratamiento anti-Her2, o una combinación de los anteriores, generalmente de acuerdo a niveles elevados de evidencia que se han reflejado en documentos de consenso y guías de práctica clínica [66, 67].

En la **enfermedad metastásica**, que presenta desde el punto de vista clínico manifestaciones muy diversas en función de la localización y la gravedad de la afectación a

distancia, requiere un enfoque de tratamiento individualizado, en el que el tratamiento sistémico constituye el elemento principal, pero en el que con frecuencia es necesario asociar tratamientos locales, paliativos y de soporte. Para estimar la eficacia de los tratamientos en este grupo de pacientes, la supervivencia global es la variable de elección [68]. Existen múltiples variedades de tratamientos, que combinan quimioterapia convencional sistémica, cirugía, tratamiento hormonal, anti Her2 y antiangiogénico con bevacizumab en función de las características de las pacientes y la biología de la neoplasia (estado menopáusico, edad, receptores hormonales en tumor, Her2, etc.). En la mayoría de las pacientes la enfermedad metastásica no es curable, aunque los tratamientos actuales permiten alargar considerablemente la supervivencia global de estas pacientes y mejorar su calidad de vida [69].

La **enfermedad localmente avanzada** se caracteriza por una extensión locorregional de la enfermedad que, además de dificultar el tratamiento local, se asocia a un riesgo elevado de diseminación a distancia, por lo que el tratamiento debe ser multimodal e integrar los objetivos de control local y sistémico. La administración de quimioterapia neoadyuvante (o preoperatoria) es la opción de tratamiento más frecuente tanto en tumores localmente avanzados (estadios IIIA, IIIB y IIIC, así como tumores inflamatorios) como en tumores operables pero que no son susceptibles de beneficiarse de la cirugía conservadora de inicio. Entre las ventajas observadas se han reportado la disminución de la masa tumoral y/o de la afectación ganglionar y la posibilidad de poder beneficiarse de cirugía conservadora. A su vez, la neoadyuvancia permite la evaluación de la respuesta del tumor a la quimioterapia administrada, puesto que se dispone de la biopsia previa al tratamiento y la muestra quirúrgica post-resección. Las tasas de respuesta clínica se sitúan en torno a un setenta y cinco por ciento, con tasas de respuesta completa muy variables dependiendo de las características biológicas del tumor (entre un tres y un cincuenta por ciento en tumor primario y en torno al veinticinco a treinta y cinco por ciento en las metástasis axilares) [70-74]. Tanto en supervivencia libre de enfermedad como en supervivencia global se obtienen resultados equivalentes, independientemente del manejo adyuvante o neoadyuvante del tumor. En la **Tabla 2** se reflejan las indicaciones y contraindicaciones de la quimioterapia neoadyuvante en el cáncer de mama operable.

Tabla 2. Indicaciones y contraindicaciones de la QT neoadyuvante.

Indicación de QT neoadyuvante	Contraindicaciones de QT neoadyuvante
Tumores localmente avanzados (T3-T4, N2-N3)	Enfermedades sistémicas con afectación del tejido conectivo (contraindicación de radioterapia)
Tumores T2 unicéntricos y sin CDIS extenso, con relación de tamaño tumor/mama que impida la cirugía conservadora	Microcalcificaciones extendidas por la mama

El esquema de tratamiento óptimo en neoadyuvancia parece ser el basado en el uso secuencial de antraciclinas y taxanos, objetivándose un aumento en el porcentaje de respuestas completas y en un aumento de cirugías conservadoras [75, 76]. La introducción del trastuzumab para pacientes Her2+ ha mejorado también la tasa de respuestas en el caso de tumores Her2 [77] como han demostrado múltiples estudios en neoadyuvancia [78-83]. La

amplificación de Her2 se ha convertido por tanto en un factor predictivo positivo para la respuesta al tratamiento neoadyuvante. Entre los factores predictivos clásicos de respuesta a quimioterapia neoadyuvante encontramos el tamaño mayor a tres centímetros, el tipo histológico ductal, el grado histológico alto y la no hormonosensibilidad [84-86]. Se sabe además que los tipos morfológicos lobulillares responden peor a tratamiento preoperatorio [87, 88]. Más recientemente, el subtipo tumoral se ha revelado como el principal factor predictivo de respuestas a la quimioterapia neoadyuvante y como el factor que determina el valor pronóstico de la respuesta completa patológica.

Los factores pronósticos más importantes son la respuesta completa patológica (RCp) y en ausencia de ésta, el estado axilar tras el tratamiento. La RCp sirve como marcador precoz de largos supervivientes sin recaídas [89, 90]. Los estudios NSABP B-18 y B-27 pusieron de manifiesto que la RCp es factor pronóstico de aumento de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global [91]. Recientemente se publicó un análisis de siete ensayos prospectivos (N=6377) de neoadyuvancia evaluando distintas definiciones de RCp y se llegó a la conclusión de que la definición como ypT0 + ypN0 permitía discriminar mejor la evolución posterior que tendrían las pacientes [92]. El análisis por subtipos IHQ al diagnóstico reveló a su vez que la RCp era marcador subrogado de supervivencia en pacientes con tumores no luminales. En dicho estudio queda patente que en las pacientes en las que se consigue RCp se consiguen mejores tasas de supervivencia de forma independiente al subtipo tumoral, mientras que en aquellas donde no se consigue una RCp, su pronóstico se corresponde con el subtipo del tumor al diagnóstico.

Tras el tratamiento, la evaluación del estadio patológico del tumor residual en aquellas pacientes en las que no se obtiene una RCp, es un importante factor pronóstico independiente para supervivencia libre de enfermedad, que permite estratificar a las pacientes teniendo en cuenta el tamaño de la enfermedad residual, la celularidad y la afectación ganglionar residual [93]. Así mismo, el estado axilar postquimioterapia es otro importante factor pronóstico, de manera que el número de ganglios positivos determina el impacto en supervivencia global a los cinco años [94]. Se sabe que el impacto en supervivencia de la RCp varía en función del estadio clínico al diagnóstico, y en este sentido se publicó una propuesta de puntuación que incluye datos clínicos al diagnóstico y datos biológicos y anatomopatológicos tras el tratamiento, que permite estimar de forma bastante precisa el impacto real que tendrá la quimioterapia neoadyuvante sobre el pronóstico de las pacientes [95, 96]. Así mismo, en otro trabajo se propuso un nomograma en el cual, según los resultados anatomopatológicos obtenidos en el tumor residual tras el tratamiento neoadyuvante, se establece la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad a cinco y a diez años [97].

La quimioterapia neoadyuvante es a su vez un buen modelo de estudio para valorar la sensibilidad del tumor a los agentes quimioterápicos, y también para la búsqueda de marcadores biológicos con valor predictivo o pronóstico [98]. De esta forma, las nuevas clasificaciones moleculares del cáncer de mama permiten el establecimiento de asociaciones entre subtipo biológico del tumor (luminal A y B, basal, Her2, normal) y la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante [99, 100].

Las claves del manejo neoadyuvante del cáncer de mama se aclaran en el último artículo de consenso publicado [101]. Entre los conceptos básicos, se aclara que:

1. La neoadyuvancia tiene como objetivo el aumento en supervivencia y el aumento de cirugías conservadoras.
2. Las pacientes candidatas a someterse a neoadyuvancia son aquellas con tumores localmente avanzados y aquellas con tumores operables pero no susceptibles de cirugía conservadora al diagnóstico y con mayor probabilidad de respuesta clínica.
3. El estudio de las pacientes debe incluir ecografía, mamografía y resonancia magnética nuclear al diagnóstico y antes de la cirugía. Debe realizarse una exploración física tras cada ciclo de quimioterapia.
4. Debe administrarse preferentemente antraciclinas y taxanos secuenciales durante seis meses, o concurrentes por seis ciclos.
5. Es imprescindible que se coloque un chip de marcaje antes de iniciarse el tratamiento quimioterápico, en ausencia de indicación de mastectomía tras tratamiento.
6. La indicación para dar radioterapia adyuvante debe establecerse según estadio clínico y patológico. La radioterapia tras la mastectomía solo debe realizarse en caso de tumores inflamatorios y N+.
7. La quimioterapia adyuvante no está indicada fuera de ensayo clínico.
8. Aquellas pacientes con tumores con receptores hormonales positivos deben recibir tratamiento hormonal adyuvante después de la cirugía.
9. Aquellas pacientes con tumores Her2+ deben recibir y completar el tratamiento anti-Her2 después de la cirugía.
10. La definición de la RCp es ypT0 + ypN0.
11. La RCp es un marcador subrogado de supervivencia. Aquellas pacientes con RCp tienen mayor tasa de supervivencia que el resto. En las pacientes en las que no se alcanza RCp, los factores pronósticos relevantes son las características tumorales al diagnóstico.
12. El estudio anatomopatológico del tumor residual debería realizarse tras la neoadyuvancia según la puntuación RBC (*Residual Cancer Burden*).

ANGIOGÉNESIS Y CÁNCER DE MAMA

Biología vascular y tipos de vasos

La angiogénesis produce señales para la organogénesis y permite la regeneración de ciertos tejidos, permite la circulación de las células sanguíneas y del sistema inmune, pero también es un proceso importante en patologías inflamatorias y esencial en la evolución del cáncer. La angiogénesis supone un proceso esencial para el crecimiento tumoral, así como para la generación de metástasis a distancia [18, 102]. Los tumores requieren un soporte vascular para crecer, que les permita el aporte de nutrientes y oxígeno, a la vez que retire del nicho tumoral las sustancias de desecho y el dióxido de carbono. Este proceso es tan importante para el crecimiento tumoral que en ausencia de angiogénesis, los tumores son incapaces de crecer más allá de un milímetro de diámetro [103]. Para desarrollar la neovascularización, dependiendo del tipo de tumor y del nicho donde se asienta, las

neoplasias siguen diversas estrategias que les permiten crecer, adaptarse a nuevos entornos, evitar la respuesta inmunitaria y resistir los tratamientos antitumorales. Hasta día de hoy, se han identificado diversos modelos de formación de vasos sanguíneos tanto en tejidos sanos como en tumores, entre los que cabe destacar [104]:

1. **Angiogénesis brotante:** Se produce cuando se forman nuevas ramificaciones en los vasos existentes a partir del brote de células apicales que perforan la membrana basal y avanzan invadiendo la matriz a la vez que van dividiéndose y se va formando con el avance de éstas el nuevo capilar con células endoteliales tapizadas por pericitos y/o con células musculares lisas vasculares que proveen estabilidad a la vez que controlan la perfusión. Existen señales específicas para diferenciación arterial o venosa. Proceso esencial durante el desarrollo embrionario [105].
2. **Vasculogénesis:** Se produce a partir del reclutamiento de progenitores de células endoteliales procedentes de la médula ósea o de angioblastos residentes de la pared vascular, que posteriormente se diferencian en células endoteliales, ensamblando un laberinto vascular.
3. **Intususcepción:** Se produce por un proceso de escisión interna de vasos preexistentes que generan dos o más ramificaciones vasculares. La relevancia fisiológica de este proceso en la vascularización de tejidos no es bien conocida.
4. **Cooptación vascular:** Se produce cuando las células tumorales secuestran a las redes vasculares preexistentes en el nicho tumoral donde se asientan.
5. **Mimetismo vascular:** Se produce cuando las células tumorales son capaces de mimetizar a las redes vasculares normales, tapizando las redes vasculares de células tumorales e incluso diferenciándose a células pseudoendoteliales.
6. **Diferenciación tumoral a célula endotelial:** En algunos casos, las células madre tumorales con anomalías cromosómicas, son capaces de diferenciarse en verdaderas células endoteliales tumorales para formar neovascularización tumoral [106].

En condiciones fisiológicas los tejidos normales pueden utilizar las tres primeras estrategias en los procesos angiogénicos (angiogénesis brotante, vasculogénesis e intususcepción), mientras que los tumores pueden utilizar las seis estrategias para formación de nuevas redes vasculares. Generalmente la reparación vascular de vasos capilares en el adulto y la expansión de vasos en procesos patológicos ocurre por vasculogénesis. El proceso de incorporación de nuevos progenitores endoteliales a la vasculatura preexistente en el adulto se denomina vasculogénesis postnatal.

En adultos sanos, las células endoteliales quiescentes tienen larga vida media y están protegidas contra los daños por la acción de señales autocrinas de mantenimiento que

incluyen vías como las de VEGF, NOTCH, angiopoyetina-1 (ANG-1) y los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs). Así mismo, las células endoteliales poseen sensores de oxígeno conocidos como factores inducibles por hipoxia (HIF) que les permiten reajustar su forma para la optimización del flujo sanguíneo. Las células endoteliales quiescentes forman una monocapa con superficie aerodinámica interconectada por VE-cadherina y claudinas. A su vez, los pericitos envuelven a las células endoteliales y liberan señales de supervivencia tales como VEGF y ANG-1 a través de una membrana basal común, que permiten el mantenimiento de las redes vasculares.

Cuando las células endoteliales quiescentes reciben estímulos proangiogénicos de factores como VEGFA, VEGFC, ANG-2, FGFs o algunas citoquinas, liberados por condiciones hipóxicas, inflamación o por células tumorales, en primer lugar los pericitos se sueltan de la pared vascular (en respuesta a ANG-2) degradando la membrana basal por proteólisis mediante metaloproteinasas. Las células endoteliales pierden entonces sus moléculas de adhesión y se dilata el nuevo vaso. VEGFA incrementa la permeabilidad de las células endoteliales, provocando la liberación de proteínas plasmáticas hacia la matriz extracelular, formando una nueva mezcla matriz que sirve de andamiaje para el crecimiento del nuevo vaso. Las células endoteliales migran hacia la matriz gracias a señales procedentes de integrinas, y las proteasas liberan más factores angiogénicos albergados en la matriz (VEGFA, FGF), formándose una matriz angiocompetente. Para evitar el movimiento masivo de células endoteliales hacia la señal proangiogénica, una célula endotelial, conocida como célula apical, es la que se encarga de liderar el avance del brote en presencia de dichos estímulos (receptores de VEGF, neurofilinas, ligandos de NOTCH, DLL4 y JAGGED1). Las células endoteliales vecinas a la apical asumen posiciones subsidiarias, conformando y elongando el tallo del brote gracias a estímulos proveídos por NOTCH, NRARP, WNT, PIGF y FGFs) y establecen a su vez el lumen (mediado por VE-cadherina, CD34, sialomucinas, VEGF y proteínas de la familia *hedgehog*). La célula apical a su vez emite filopodios que le permiten orientarse hacia el estímulo angiogénico gracias a efrinas y semaforinas, mientras que las células del tallo liberan proteínas como EGFL7 a la matriz que provee información de la posición de sus vecinas y que permite la elongación coordinada. El programa inducible por hipoxia es dirigido por HIF1 alfa: hace que las células endoteliales respondan a las señales angiogénicas. Gracias a la ayuda de células mieloides que actúan haciendo de puente, se permite la fusión con otras ramas vasculares preexistentes, permitiendo el inicio del flujo sanguíneo.

Para que el nuevo vaso sea funcional, debe madurar previamente y estabilizarse, gracias al establecimiento de la quiescencia de las nuevas células endoteliales. El nuevo tapizado de las células endoteliales con pericitos ocurre gracias a la secreción de factores como PDGFB, ANG-1, TGF beta, efrina B2 y NOTCH. Por último, la producción de inhibidores de proteasas tales como los TIMPs y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) permite la deposición de una nueva membrana basal y el restablecimiento de las uniones intercelulares, que en conjunto permiten el restablecimiento de la perfusión y un flujo óptimo. Los vasos se atrofian y retroceden si no son capaces de restablecer la perfusión [104].

Regulación de la angiogénesis

La regulación de la angiogénesis depende del equilibrio entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos y que en patologías como el cáncer, resulta alterado por las propias células tumorales y por su estroma circundante. De entre los factores importantes, caben destacar las siguientes familias de factores angiogénicos:

1. **Familia de VEGF:** Sin duda los factores proangiogénicos por antonomasia, predominantes en el proceso angiogénico. Esta familia consiste en un pequeño número de miembros que se distinguen del resto sobre todo por el gran número de funciones no redundantes que tienen. VEGFA (también conocido como VEGF) es el componente principal que estimula angiogénesis tanto en condiciones fisiológicas como patológicas a través del receptor VEGFR2 (también conocido como FLK1) [107, 108]. Las neurofilinas como NRP1 y 2 son a su vez correceptores que potencian la señal de VEGFR2, pero que pueden funcionar también en su ausencia [109]. Al igual que la pérdida de VEGFR2, la pérdida de VEGFA impide el desarrollo vascular [110]. Las formas solubles de VEGFA promueven el ensanchamiento de los vasos, mientras que las formas unidas a la matriz estimulan la brotación. Las formas paracrinas de VEGF liberadas por tumores, células mieloides u otras células estromales incrementan las brotaciones de los vasos y producen vasos anormales [111], mientras que el VEGF autocrino liberado por las células endoteliales permite el mantenimiento de la homeostasis vascular [112]. Mutaciones activadoras en *VEGFR2* causan tumores vasculares, mientras que existen polimorfismos genéticos en *VEGFA* y en sus receptores que provocan angiogénesis patológica [113, 114], mientras que el bloqueo de la ruta de señalización de VEGFA permite atacar a los vasos tumorales y enfermedades oculares en humanos. VEGFC, otro ligando de VEGFR2 y de VEGFR3, activa a las células apicales [115]. VEGFR3 es necesario durante la formación de la vasculatura en la embriogénesis, mientras que en adultos se encarga de regular la linfangiogénesis [116]. Los anticuerpos anti VEGFR3 pueden bloquear la dimerización del receptor o perjudicar su unión a ligando de forma sinérgica, potenciando el bloqueo del crecimiento tumoral que produce el bloqueo de VEGFR2, lo cual hace a VEGFR3 un candidato interesante a explorar en este el campo terapéutico con antiangiogénicos. Un homólogo de VEGFA es PIGF, que también posee propiedades angiogénicas, sin embargo y a diferencia de VEGFA, PIGF no es necesario para el desarrollo normal del organismo y parece ser relevante sólo en procesos patológicos [117, 118]. Las deficiencias de VEGFB en ratones parecen no perjudicar a la angiogénesis del desarrollo normal [117]. Su actividad parece restringida a algunos tejidos como son el corazón, y parece promover supervivencia neuronal y producir efectos metabólicos. En patología angiogénica parece producir crecimiento de vasos cardiacos, sin provocar efectos adversos [119]. La función de VEGFR1 en angiogénesis es menos conocida [117, 120], teniendo a su vez dos formas, una anclada a membrana y otra forma soluble. Aparece expresado ampliamente tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, y contribuye a la patogénesis en tumores y en enfermedades inflamatorias. En cáncer, su señalización media tanto en activación tumoral como

en angiogénesis. Es capaz de estimular a células tumorales de forma autocrina en respuesta a VEGFA e independientemente de angiogénesis [121]. Promueve a su vez sobreexpresión de MMP9 en las células endoteliales en el nicho premetastásico. Existen anticuerpos anti PIGF, VEGFR1 y VEGFR2 en desarrollo clínico.

2. **Familia de PDGF:** Esta familia de factores contribuyen a la correcta función de los vasos, permitiendo su maduración y el correcto tapizado de las células endoteliales, junto a angiopoyetinas y TGF beta [122]. PDGFB actúa como factor quimiotáctico para pericitos [123, 124]. La deficiencia en pericitos provocada por la deficiencia de PDGFB produce fugas en los capilares, tortuosidad, microaneurismas y sangrados en modelo murino [125]. A su vez, el PDGFB derivado de tumores es capaz de reclutar pericitos de forma indirecta incrementando los niveles de expresión de SDF-1, pudiendo ser reclutados bien del microambiente próximo o a partir de progenitores provenientes de la médula ósea. A su vez, VEGFA es capaz de reducir el tapiz de pericitos vascular por inhibición de PDGFRB, provocando redes vasculares anormales [126]. La inhibición de PDGFR disminuye el crecimiento tumoral al causar desprendimiento de pericitos, lo cual provoca vasos inmaduros anormales [127]. La sobreexpresión de PDGFB en ratones sin embargo inhibe el crecimiento tumoral provocando reclutamiento de pericitos e inducción de la inhibición del crecimiento de las células endoteliales [128]. Además de esto, la supervivencia de las células endoteliales depende del aporte de VEGFA por parte de los pericitos y a su vez les protegen del bloqueo de VEGFA, lo cual requiere de una interacción íntima entre ambos tipos celulares, de manera que el bloqueo de PDGFB reduce el número de pericitos y por tanto el número de vasos, efecto que puede ser suplido por el aporte de VEGFA de las células tumorales [129]. PDGFC, otro miembro de la familia, es liberado por los fibroblastos asociados a tumor en células tumorales resistentes al tratamiento con bevacizumab [130, 131]. La sobreexpresión de PDGFD por otra parte, normaliza los vasos tumorales y mejora la liberación de fármacos en el nicho tumoral. Por otro lado, PDGFA actúa como factor de crecimiento esencial en el desarrollo embrionario, proliferación, migración celular y quimiotaxis. Es un potente mitógeno para células de origen mesenquimal, esencial para la formación normal del septo de los alveolos pulmonares en la embriogénesis, desarrollo normal del tracto gastrointestinal, desarrollo de las células de Leydig y la espermatogénesis. También participa en el desarrollo normal de los oligodendrocitos y en la mielinización de la espina dorsal y del cerebelo. Participa también en el proceso de cicatrización de heridas, y su señalización es modulada formando heterodímeros con PDGFB.

3. **Familia de TGF beta:** Los miembros de esta familia tienen acciones contexto dependientes, de forma que pueden actuar como moléculas pro- o antiangiogénicas. TGF beta promueve diferenciación de las células musculares lisas vasculares, mientras que la deficiencia de endoglin (ENG) o del receptor ALK1 (receptores de la familia del TGF beta) perjudica el desarrollo vascular normal. Los

efectos del TGF beta no queda claro si son ejercidos *in vivo* sobre las células musculares lisas vasculares o sobre las células endoteliales [132]. Existen varios anticuerpos anti TGF beta en preclínica. Ensayos con anticuerpos anti ENG o ALK1 han demostrado potencial antiangiogénico y antiproliferativo. Otro miembro de la familia es el receptor del TGF beta 3 o betaglicano (TGFBR3). Se sabe que la deficiencia de betaglicano provoca malformaciones diferenciales en arterias y venas; sin embargo su función en el desarrollo de mamíferos es menos conocido [133]. La pérdida del betaglicano durante la progresión tumoral, así como sus efectos sobre la migración, invasión, proliferación y angiogénesis tumoral, apoyan la hipótesis de su papel como factor supresor de tumores [134, 135].

4. **Familia de trombospondina:** Las trombospondinas conforman una familia de proteínas multifuncionales. La trombospondina-1 es una conocida molécula antiangiogénica que actúa vía regulación negativa de la vía de señalización del óxido nítrico en las células endoteliales, plaquetas y células musculares lisas vasculares [136, 137]. Esta actividad está mediada por sus receptores de superficie CD36 y CD47 [138, 139]. Se trata de una enorme glicoproteína de matriz que es sobre-expresada por el estroma y circulante en algunos tipos de cáncer [140, 141]. A pesar de su papel como inhibidor de angiogénesis, la trombospondina-1 posee funciones pleiotrópicas dependientes del contexto tumoral. Debido a su complejidad estructural y a la multitud de ligandos y receptores, dificulta enormemente el abordaje terapéutico y el desarrollo de fármacos dirigidos. Sin embargo, se están desarrollando diversas estrategias que se centran en algunos receptores en preclínica. Se ha demostrado su capacidad para regular procesos como la adhesión celular [142], la proliferación [143], la supervivencia o la apoptosis [144-146], la invasión y diseminación metastásica [147, 148], la respuesta inmune [149], y la respuesta al tratamiento [150, 151]. En el caso del cáncer de mama, se sabe que la unión de la trombospondina-1 a CD47 induce muerte celular [152]. Diversos estudios apuntan a un papel supresor de tumores debido a su habilidad para inhibir la neovascularización [153].
5. **Familia de CTGF:** El factor de crecimiento del tejido conectivo o CTGF es una proteína de matriz extracelular perteneciente a la familia de proteínas asociadas a matriz extracelular con sitio de unión a heparina (familia CNN), caracterizadas por poseer cuatro dominios conservados ricos en cisteína. CTGF promueve progresión tumoral en cáncer de mama por inducción de EMT y deposición de fibras de colágeno I [154]. Participa en diversos mecanismos directos e indirectos en angiogénesis, y si bien su papel es menos conocido que otros factores, es esencial para el correcto desarrollo vascular en ratones, provocando la muerte al nacimiento por condrodisplasia y anomalías en los vasos sanguíneos [155, 156]. CTGF es intrínsecamente activo *in vitro*, promoviendo proliferación y migración de células endoteliales. Sin embargo, parece regular la producción y la actividad de otros factores angiogénicos como VEGFA o FGF, pudiendo actuar también como factor antiangiogénico dependiendo del contexto [157, 158].

METODOLOGÍA DE ESTUDIO DE LA ANGIOGÉNESIS

Estudio *in vitro*

Existen diversas estrategias que permiten el estudio tanto de la angiogénesis como de la vasculogénesis *in vitro*. La angiogénesis fue observada por primera vez *in vitro* por Folkman y Haudenschild en 1980 [159]: tras cultivar durante largo tiempo células endoteliales, observaron la formación espontánea de estructuras similares a capilares. Esta publicación permitió el desarrollo subsiguiente de los modelos de diferenciación angiogénica con células endoteliales.

Dependiendo de la forma en la cual las células endoteliales utilizadas se organizan (que pueden ser derivadas de cordón umbilical humano (HUVEC) o inmortalizadas (por ejemplo, EA.hy926)) los ensayos de diferenciación pueden clasificarse en dos categorías:

1. **Bidimensionales:** las células forman estructuras capilares sobre una superficie adecuada. Los ensayos bidimensionales nos permiten conocer el papel de estas matrices (como por ejemplo el matrigel) en la morfogénesis vascular o el condicionamiento del medio de cultivo para la evaluación del efecto de células tumorales o de sustancias sobre el patrón vascular. Sin embargo, estos ensayos no reflejan todos los pasos fisiológicos que caracterizan a la angiogénesis *in vivo*.
2. **Tridimensionales:** cuando las células invaden una matriz gelatinosa y se diferencian en su interior. La matriz que permite la diferenciación de las células endoteliales contiene factores proangiogénicos clave para este proceso. Los modelos tridimensionales nos permiten estudiar la capacidad de la célula endotelial para invadir sustratos tridimensionales y conformar estructuras vasculares en tres dimensiones. Además, nos permiten la inclusión de explantes tales como anillos aórticos para la observación de la formación de la íntima por células endoteliales. Otra ventaja frente a los modelos en dos dimensiones es que permiten la preservación de la arquitectura vascular para su estudio.

Las matrices deben ser químicamente definidas o evitar el uso de distintos lotes para evitar la variación inter-experimental debida a la variación en la concentración de factores angiogénicos de la matriz [160]. La vasculogénesis por su parte, puede ser estudiada mediante células mesodérmicas derivadas de embrión murino o por ensayos de diferenciación de células madre embrionarias, de forma muy similar al modelo *in vivo* con embriones animales. Otros ensayos que miden el potencial angiogénico *in vitro* son los ensayos de proliferación, de migración y el co-cultivo con células murales (pericitos) y el cultivo *ex vivo* [161].

Los ensayos angiogénicos *in vitro* y *ex-vivo* son de difícil interpretación debido a las dificultades en la reproducibilidad de los resultados. Esto se debe a múltiples factores que incluyen el origen de las células endoteliales, el número de pases, los sustratos utilizados y la composición de los medios de cultivo utilizados por los distintos grupos. En muchas ocasiones ocurre que un sustrato que muestra actividad angiogénica *in vitro*, posteriormente no muestra efecto alguno *in vivo*, o viceversa. Es por ello que es vital la evaluación experimental *in vivo* de cara a su correcta interpretación [161]. Entre los ensayos *in vivo* disponibles cabría citar los

estudios con **membrana corioalantoidea de pollo** [162-165], con el **pez cebra** (*Danio rerio*) [166-173], **la implantación de esponjas y biopolímeros** [174-176], **los ensayos de angiogénesis corneal** [177-180], **el modelo del saco aéreo dorsal** [181-183], **el ensayo con cámara transparente en pliegue cutáneo** [184-187], **los modelos tumorales** [188-190] y **los angiorratones** [191-195].

Estudio clínico: valor pronóstico de la vascularización y estudios de angiogénesis en cáncer de mama con tratamiento neoadyuvante

Desde una perspectiva clínica, la neovascularización permite al tumor crecer y metastatizar, lo que permite la manifestación de los primeros síntomas. Muchos tumores se muestran sintomáticos y clínicamente detectables una vez que se han neovascularizado. Sin embargo, se debe resaltar que el cambio a un fenotipo angiogénico no resulta siempre en un aumento de la tasa proliferativa. En ciertos tumores como los adenocarcinomas adrenales no existe una correlación entre tasa proliferativa e índice angiogénico. Otros tumores como ciertos melanomas pueden ver reducido su tamaño con la neovascularización, posiblemente debido al efecto inhibitorio de la interleucina 6 [196]. Por otra parte, en metástasis distales, en algunos casos ocurre que el tumor primario suprime la angiogénesis mediante moléculas inhibitorias circulantes, de forma que solo se hace aparente la neovascularización de las metástasis una vez es extirpado el tumor primario [197-199]. El objetivo clínico de la investigación en angiogénesis en el contexto del cáncer es la cuantificación de la angiogénesis para su uso en diagnóstico y pronóstico, así como la inhibición de la angiogénesis tumoral.

Existen diversas técnicas que permiten la cuantificación de la angiogénesis en pacientes oncológicos:

1. **Técnicas inmunohistoquímicas:** La forma clásica más utilizada es la tinción inmunohistoquímica a partir de las biopsias o de las resecciones quirúrgicas con anticuerpos monoclonales específicos de células endoteliales, que permiten la detección de las redes capilares peritumorales. Generalmente los vasos sanguíneos crecen en los bordes de los tumores concentrados en áreas denominadas puntos calientes (del inglés, *hot spots*) [200]. La cuantificación de dichos puntos calientes o el análisis de la densidad microvascular han sido los criterios más comúnmente utilizados, existiendo una correlación entre incremento de MVD y aparición de metástasis. Entre los antígenos más comúnmente utilizados para generar anticuerpos monoclonales para IHQ encontramos la glicoproteína CD31, comúnmente conocida como PECAM-1 o molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria-1; CD34 o antígeno celular de progenitores hematopoyéticos, el factor von Willebrand endotelial y el Factor VIII de la coagulación [201-203]. Los métodos de cuantificación elegidos incluyen el análisis de imágenes (manual o computarizado) y el conteo de Chalkley [204]. El método manual clásico contando número de vasos ha sido cuestionado en numerosas publicaciones debido al grado de subjetividad y la dependencia de un observador experimentado. Otras características morfológicas evaluables de la angiogénesis tumoral por el método de conteo manual son la aparición de proliferaciones microvasculares glomerulares (GMP) [205, 206]. La cuantificación de la angiogénesis en las biopsias al diagnóstico puede ayudar a predecir el riesgo de

recurrencia o de aparición de metástasis. De esta forma, la cuantificación de la densidad microvascular histológicamente en cáncer de mama invasivo provee información del riesgo de metástasis [207]. Los análisis multivariantes mostraron que la densidad microvascular en las pacientes sin afectación ganglionar es un mejor predictor de metástasis que el grado histológico, el tamaño del tumor, el subtipo HR+ u otros factores pronósticos. Estos resultados fueron confirmados por varios centros en estudios prospectivos y se confirmaron también para otros tipos de tumores. Los métodos computarizados y el conteo de Chalkley han mostrado ser superiores al método de conteo manual para la estimación de la angiogénesis en pacientes con cáncer de mama [202]. El análisis computarizado permite analizar la densidad microvascular de forma automatizada, minimizando la subjetividad y la dependencia de personal entrenado, y a la vez permite cuantificar otros parámetros angiogénicos como son el tamaño medio vascular y la complejidad media de la forma de los vasos [208, 209].

2. **Técnicas de Resonancia Magnética Nuclear:** El nivel de vascularización tumoral puede evaluarse también utilizando angiografía por resonancia magnética nuclear, bien con la técnica de realzado por contraste dinámico (DCE-MRI) o con la técnica de marcado arterial de espín (ASL-MRI), las cuales han mostrado una buena correlación con la MVD estimada por IHQ [210-212]. A diferencia de las técnicas inmunohistoquímicas, el análisis de imagen por RMN permite analizar *in vivo* en las propias pacientes tanto la morfología vascular del tumor como también parámetros fisiológicos relativos al flujo sanguíneo peritumoral o la permeabilidad microvascular. Estas técnicas no invasivas permiten a su vez evaluar la respuesta vascular tumoral tras el tratamiento antiangiogénico, y actualmente están en desarrollo en ensayos clínicos, especialmente en tumores eminentemente angiogénicos como es el carcinoma de células renales, que pueden beneficiarse en mayor medida de futuros fármacos antiangiogénicos. Su elevado coste y la necesidad de personal técnico especialista hace compleja su utilización experimental fuera de los ensayos clínicos.
3. **Evaluación de biomarcadores angiogénicos por análisis genómico y TMA:** Actualmente no disponemos de biomarcadores para probar la eficacia de los tratamientos antiangiogénicos. En los últimos años la experimentación clínica se ha enfocado en la búsqueda de posibles biomarcadores que se correlacionen con el estado angiogénico tumoral y que permitan actuar como variables predictoras de respuesta angiogénica y por tanto de beneficio terapéutico de los fármacos antiangiogénicos, y como factores pronósticos, para la estratificación de pacientes. Una de las formas por las cuales se están buscando es a nivel de RNA mensajero, mediante técnicas de análisis de la expresión génica, que incluyen mayoritariamente RT-qPCR, microarrays, y con el abaratamiento de los costes en los últimos años, la secuenciación masiva (NGS), que posiblemente acabará implantándose por su carácter masivo, ya que permite la búsqueda de miles de biomarcadores de forma simultánea [213-217]. Otras técnicas citogenéticas evalúan la amplificación o pérdida de genes o fragmentos de genes (FISH) [218] y/o grandes fragmentos cromosómicos por técnicas también masivas como es la hibridación genómica comparada (CGH). Por último, otros

grupos se han centrado en buscar biomarcadores a nivel proteico, de nuevo por técnicas inmunohistoquímicas clásicas o con microarrays de tejidos (TMA) [219, 220].

El esquema neoadyuvante en el estudio de la angiogénesis tumoral

La quimioterapia convencional ejerce efectos antiangiogénicos por sí misma, especialmente cuando es administrada en esquemas metronómicos o semanales [221, 222]. En el caso especial de los taxanos, parece probado su efecto antiangiogénico [223]. El caso de los esquemas preoperatorios para la evaluación de respuesta angiogénica es muy interesante debido a la disponibilidad de biopsias antes y después del tratamiento, que nos permite no solo evaluar el estado basal angiogénico del tumor, sino también la respuesta a la quimioterapia tras el tratamiento. Unos cuantos estudios utilizando esta aproximación han mostrado efectos mixtos, con una relación inconsistente entre respuesta angiogénica (definida por descenso en la MVD) y la RCp o el pronóstico (**Tabla 3**). Sin embargo, la mayoría de los estudios clínicos que se han centrado en los efectos vasculares de la quimioterapia o bien son pequeños en cuanto a número de pacientes [224-227], o bien incluyen combinación de agentes antiangiogénicos [228, 229] o bien fueron publicados previamente a la inclusión de la combinación de antraciclinas y taxanos para el tratamiento en el caso del cáncer de mama [230, 231]. Hasta donde sabemos, además del recientemente publicado por nuestro grupo, solo dos estudios publicados en esquema neoadyuvante incluyen taxanos (docetaxel) [228, 232], y ninguno de estos mostró cambios en MVD tras la quimioterapia. El trabajo publicado por Miller y colaboradores es el único que incluye un régimen similar a los estándares actuales y que exploró algunos biomarcadores angiogénicos circulantes (VCAM-1, FGF, MMP-2, MMP-9), de entre los cuales solo FGF mostró un incremento con el tratamiento, pero de nuevo sin correlación con la MVD.

Tabla 3. Cambios inducidos por quimioterapia en esquemas neoadyuvantes

Serie	Características	Resultado	Referencias
<i>Malkis et al.</i>	N=90 neoadyuvancia N=105 adyuvancia	Leve descenso de MVD	[224]
<i>Honkoop et al.</i>	N=42, IIA-IIIIB ACx4 seis ciclos IHQ CD31	Descenso en MVD Sin valor pronóstico	[226, 227]
<i>Bottini et al.</i>	N=120 CMF+Tamoxifeno Epi+Tamoxifeno CD34	Sin cambios en MVD Sin asociación con RCp o datos clínicos	[230]
<i>Miller et al.</i>	N=70 ACx3-DOCx6 semanal	Sin cambios en MVD Sin correlación de marcadores angiogénicos circulantes con MVD	[232]
<i>Beresford et al.</i>	N=57 CD34, CD105	Sin asociación con RCp Asociación de CD105 bajo con respuesta clínica	[231]
<i>Baena-Cañada et al.</i>	N=41, II-III AC CD34	Sin cambios en MVD Sin asociación con respuesta o pronóstico	[225]
<i>Wedam et al.</i>	N=16	Sin cambios en MVD tras el	[228, 229]

	CD31 Bevacizumab+Doxorrubicina + DOC	tratamiento Asociación entre mayor expresión de VEGFA y CD31 con respuesta clínica	
<i>Akslen et al.</i>	N=112 GMP (CD34)	Asociación de GMP con progresión durante el tratamiento	[206]
<i>Mikalsen et al.</i>	N=394 Parámetros vasculares morfométricos	Asociación del tamaño de los vasos y su solidez con el pronóstico del cáncer de mama	[209]

Desarrollo de estrategias antiangiogénicas

El desarrollo de tratamientos antiangiogénicos como son el bevacizumab o los inhibidores de tirosín-quinasa de *VEGFR/PDGFR* ha mejorado el pronóstico de muchos tipos de cáncer como el de colon o el de riñón. En el cáncer de mama sabemos que la existencia de un perfil tumoral proangiogénico, determinado por incremento de la neovascularización tumoral o de factores proangiogénicos como VEGF, contribuyen a la progresión de la enfermedad y se asocian a un peor pronóstico [203]. Sin embargo, a día de hoy el beneficio obtenido con el tratamiento antiangiogénico en cáncer de mama ha sido muy limitado, no traduciéndose en un incremento de la supervivencia global de las pacientes, reflejando así la existencia de importantes lagunas en el conocimiento de este mecanismo que permita un mejor abordaje terapéutico. Tampoco se dispone de marcadores predictivos de respuesta a este tipo de tratamiento, y esto unido a la toxicidad y el elevado coste de los fármacos, supone un alto impacto social de la investigación en este área [233, 234].

Por otro lado, el diseño de esquemas de tratamiento adecuados es complejo debido al hecho de que no solo los agentes antiangiogénicos son capaces de modificar la neovascularización tumoral, sino que también la quimioterapia convencional provoca efectos antiangiogénicos que en ocasiones se traducen en una disminución de dicha vascularización tumoral, descrito en el contexto del tratamiento preoperatorio del cáncer de mama [230]. Este efecto parece especialmente relevante en el contexto del tratamiento con taxanos, que forman parte del arsenal terapéutico de primera línea para el tratamiento del cáncer de mama, y que utilizados en esquemas convencionales pueden ejercer efecto sobre el endotelio tumoral, de forma análoga a los disruptores vasculares convencionales, produciendo un descenso brusco del flujo sanguíneo intratumoral que deriva en necrosis del mismo [221].

En lo que respecta a las combinaciones con bevacizumab, el único agente antiangiogénico aprobado en Europa para el tratamiento del cáncer de mama metastásico, solo las combinaciones con paclitaxel son consideradas adecuadas actualmente, mientras que las combinaciones con docetaxel han sido descartadas por obtenerse peores resultados. Así, un mejor conocimiento de los mecanismos y los efectos antiangiogénicos de la quimioterapia convencional, y en particular en el contexto del tratamiento con docetaxel, podría traducirse en un mejor diseño de combinaciones adecuadas o en la estratificación de pacientes para la selección de aquellos que podrían obtener un beneficio neto positivo. De esta forma, la regulación de la angiogénesis se sabe que depende de un delicado equilibrio entre factores

proangiogénicos como VEGF y antiangiogénicos como trombospondina-1. La disrupción de este equilibrio para acabar dando paso a un fenotipo pro-angiogénico (*switch* angiogénico) es un proceso clave en la progresión neoplásica y parece que ocurre en las fases iniciales de la transformación maligna mamaria (fases de hiperplasia ductal o de carcinoma *in situ*) [235].

Teniendo en cuenta que ciertos mecanismos de resistencia antiangiogénica ligados a la hipoxia tumoral participan también en la resistencia al tratamiento con quimioterapia convencional [236] o pueden aumentar la agresividad de la neoplasia [237, 238], es posible que el fenotipo angiogénico prequimioterapia, pero sobre todo postquimioterapia, pueda tener relevancia pronóstica o predictiva del beneficio de tratamientos posteriores dirigidos a la angiogénesis tumoral. Algunas series previas basadas en el análisis de la densidad microvascular han mostrado resultados discordantes con respecto a su disminución, aunque pocas de ellas han incluido taxanos y no se analizó la morfología vascular. El grado de activación angiogénica y su duración podría también condicionar el tipo de vasculatura formada, que es heterogénea, pero en general existe una tendencia a ser mayores y más tortuosos, incluyendo estructuras vasculares anómalas específicas como son los vasos madre y las proliferaciones microvasculares glomerulares o *Glomeruloid Microvascular Proliferation* (GMP) [239]. Así, un trabajo reciente mostró que la presencia de estructuras vasculares tumorales anómalas (GMP) se asociaban a una menor respuesta clínica al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante convencional [206].

MICRORNA Y CÁNCER

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNAs no codificantes implicados en la regulación post-transcripcional de múltiples genes relacionados con procesos biológicos celulares clave como desarrollo, proliferación, diferenciación celular y apoptosis [240-242]. Su descubrimiento se remonta a más de veinte años atrás, de manos de la colaboración estrecha entre los científicos Ambros, Feinbaum y Lee, que describieron lin-4 en el nemátodo rhabdítico *Caenorhabditis elegans* [243, 244].

Una gran cantidad de RNA pequeños han evolucionado a lo largo de la filogenia de los eucariotas con el fin de suprimir material genético y transcritos no deseados [245]. Los RNA pequeños vienen definidos por su longitud (de 20 a 30 nucleótidos de tamaño promedio) y su asociación a proteínas de la familia Argonauta (AGO), clasificándose en animales como microRNAs (miRNAs), RNAs de interferencia pequeños (siRNAs) y RNAs de interacción con PIWI (piRNAs) (**Tabla 4**) [241]. Los miRNAs constituyen la clase dominante de RNA pequeño en muchos tejidos, constando de 22 nucleótidos de tamaño promedio y estando producidos por dos RNAsas tipo III: Drosha y Dicer.

Tabla 4. Clasificación de los RNA pequeños y algunas de sus características. Adaptado de Minju Ha y colaboradores.

Característica	miRNA	siRNA	piRNA
Longitud	~22 nucleótidos	~21 nucleótidos	24–30 nucleótidos
Enzimas de procesamiento	Drosha y Dicer	Dicer	Zucchini y enzimas de corte desconocidas
Subclado AGO	AGO	AGO	PIWI

Mecanismo de acción	<ul style="list-style-type: none"> • Represión traduccional • Degradación del mRNA 	Escisión del RNA	<ul style="list-style-type: none"> • Represión transcripcional o post-transcripcional de los trasposones • Fenómenos epigenéticos multigeneracionales en gusanos
Función	Regulación de genes codificantes de proteínas	<ul style="list-style-type: none"> • Regulación de genes codificantes de proteínas y de trasposones • Defensa antiviral 	<ul style="list-style-type: none"> • Silenciamiento de trasposones mediado por piRNAs en pre-paquiteno • piRNAs en paquiteno: desconocido • RNA pequeños similares a piRNA en células somáticas: desconocida

Su biogénesis comprende al menos dos rutas de síntesis caracterizadas actualmente: las rutas de síntesis de miRNAs **canónicas** y las **no canónicas**.

1. Ruta canónica de síntesis de miRNA

En humanos, la mayoría de los miRNAs sintetizados por la vía **canónica** de síntesis se encuentran codificados por intrones de regiones codificantes o no codificantes, sin embargo algunos miRNAs también están codificados por regiones exónicas. A menudo estos miRNAs se encuentran muy próximos unos de otros, constituyendo las denominadas unidades transcripcionales policistrónicas (un caso de ello es miR-17-92) [246]. Estos miRNAs son cotranscritos inicialmente como largos fragmentos denominados primiRNAs, sin embargo, la regulación post-traduccional posterior puede provocar que la concentración final de miRNAs maduros no sea equimolecular. Los primiRNAs son posteriormente procesados por la endonucleasa RNAsa tipo III denominada Drosha junto con DGCR8 (que conforman el llamado complejo microprocesador), dando fragmentos más pequeños con forma de horquilla que pueden contener generalmente uno o dos miRNAs (premiRNAs). Estos premiRNAs son transportados al citosol vía exportina-5 con gasto de GTP, donde son cedidos a la enzima Dicer, que se encarga de su maduración final (cortando los extremos flanqueantes a los miRNAs e integrándolos entonces en el complejo ribonucleoproteico denominado RISC (del inglés, *RNA-induced silencing complex*), donde Ago2 y otras proteínas se encargan de la selección de uno de los miRNA ya maduros, que actuará como guía para el silenciamiento de la diana adecuada.

2. Rutas no canónicas de síntesis de miRNAs

Existen al menos tres rutas alternativas de síntesis de miRNAs que fueron descritas con posterioridad a la vía de síntesis canónica:

- **Vías independientes del complejo microprocesador (Drosha/DGCR8):**
 - Algunos microRNAs como miR-320 se generan directamente como premiRNAs con caperuza 7-metilguanosa por transcripción clásica, sin necesidad de ser procesados por Drosha y siendo exportados al citoplasma vía Exportina-1.
 - Otros miRNAs que están localizados en intrones de mRNAs codificantes (denominados *loci* mirtrones) pueden también eludir al complejo microprocesador. A partir de estos *loci* se producen premiRNAs directamente por empalme y desramificación. Algunos

mirtrones contienen colas de RNA en 5' o 3' que precisan ser cortadas previamente al procesamiento por Dicer.

- Algunos RNA pequeños nucleolares (snoRNAs) como ACA45 y tRNAs y similares pueden ser cortados para producir premiRNAs.
- **Vía dependiente de TUTasa:**
 - El grupo II de primiRNAs dependientes de la uridil transferasa terminal (TUTasa) producen premiRNAs con un extremo 3' excedente más corto de lo normal, siendo subóptimos para el procesamiento por Dicer. Por tanto, estos premiRNAs requieren ser previamente monouridilados por la TUTasa para un eficiente procesamiento posterior por Dicer.
- **Vía independiente de Dicer:**
 - En la ruta independiente de Dicer, premiRNAs más cortos de lo normal (por ejemplo premiR-451) son producidos por Drosha y exportados al citosol (posiblemente por Exportina-5) y cargados en Argonauta-2 (AGO2) sin el preprocesamiento por Dicer. AGO2 corta el lazo del premiR-451, generando el premiR-451 cortado por AGO2 (ac-premiR-451), que es posteriormente cortado por la ribonucleasa exonucleasa 3'-5' poli(A) específica PARN, dando miR-451 maduro.

En cuanto a su nomenclatura moderna, al miRNA maduro que queda más cercano al extremo cinco prima fosfato en el premiRNA se le denomina con la terminación "-5p", mientras que al miRNA maduro que queda más cercano al extremo tres prima hidroxilo se le denomina con la terminación "-3p". En general, a todos los miRNAs descritos se les va asignando un número que va precedido de un prefijo abreviado que denota la especie seguido de un guión (por ejemplo, hsa- de *Homo sapiens* en humanos, mmu- de *Mus musculus* en ratón o rnu- de *Rattus norvegicus* en rata). De esta forma, en el caso del clúster miR-17-92, encontramos que existen los miRNAs: miR-17 (que contiene los miRNA maduros hsa-miR-17-5p y hsa-miR-17-3p), miR-18a (que contiene los miRNA maduros hsa-miR-18a-5p y hsa-miR-18a-3p), miR-19a (que contiene los miRNA maduros hsa-miR-19a-5p y hsa-miR-19a-3p), miR-20a (que contiene los miRNA maduros hsa-miR-20a-5p y hsa-miR-20a-3p), miR-19b-1 (que contiene los miRNA maduros hsa-miR-19b-1-5p y hsa-miR-19b-3p) y miR-92a-1 (que contiene los miRNA maduros hsa-miR-92a-1-5p y hsa-miR-92a-3p). Cuando existen miRNA parálogos en distintas regiones cromosómicas producidos por duplicaciones genéticas pasadas y que están por tanto evolutivamente relacionados, pero que no tienen secuencia idéntica, se asigna después del número una letra (a, b, c; por ejemplo: mmu-miR-20a y mmu-miR-20b). Cuando el producto maduro de dos miRNAs genera secuencias idénticas, se asigna un guión seguido de un número (por ejemplo, hsa-miR-92a-1-5p y hsa-miR-92a-2-5p). A los primeros miRNAs que se descubrieron, cuando no se conocía que existían más de mil diferentes, se les asignó una denominación clásica que a día de hoy mantienen (por ejemplo, *lin-4* y *let-7*), pero que no se utiliza para nuevos miRNA descritos. Actualmente el mayor repositorio de microRNAs descritos está contenido en la base de datos de miRBase, siendo a día de hoy el número de miRNA descritos a lo largo de la filogenia de 28645 (Versión 21), si bien contiene inevitablemente un

número sustancial de anotaciones dudosas, ya que han sido deducidas de los análisis de secuenciación masiva con un número insuficiente de lecturas y con extremos 5' altamente heterogéneos [241, 247-253].

Se estima que al menos un tercio de los genes codificantes de proteínas humanas podrían estar regulados por miRNAs y a su vez cada miRNA podría regular en torno a doscientos genes [254]. El mecanismo de acción de los miRNA es común y depende de su unión al mRNA (preferentemente a la zona 3'UTR), de forma no totalmente complementaria, lo que conduce a la degradación del mRNA y/o a la inhibición de la traducción.

El papel de los microRNAs en las neoplasias incluye efectos tanto oncogénicos como supresores, que pueden contribuir al desarrollo y progresión del cáncer. No es por ello extraño que ciertos miRNAs puedan ser marcadores útiles para su diagnóstico o valoración pronóstica, e incluso potenciales dianas o herramientas terapéuticas en oncología [255, 256]. Recientemente, a su vez se ha descrito una nueva especie de RNA circulares que actúan como esponjas de miRNAs, que también podrían jugar papeles específicos en cáncer, lo que aumenta aún más el nivel de complejidad biológica [257-261]. Esta regulación cruzada entre genes codificantes, miRNAs, circRNAs y además pseudogenes y RNA no codificantes largos, se unifica en lo que actualmente se conoce como la hipótesis ceRNA (de *competing endogenous RNA*), y se sabe que esta red regulatoria juega un papel muy importante en mecanismos patológicos como el cáncer [262].

En los últimos años se están desarrollando nuevas clasificaciones moleculares basadas en los perfiles de expresión de miRNAs, con importante interés clínico, que se cree que permitirán una mejor individualización del tratamiento en cáncer de mama [263]. Entre los procesos celulares que regulan en cáncer, se han descrito en: proliferación [264, 265], transición epitelio mesénquima (TEM) [266, 267], resistencia a apoptosis [268], resistencia o susceptibilidad a fármacos [269, 270], tumorigénesis y progresión tumoral [271-273].

Actualmente un campo de desarrollo con miRNAs muy importante es el que pretende su utilización como biomarcadores para diagnóstico en pacientes con cáncer, habiendo decenas de ensayos clínicos registrados en *clinicaltrials.gov*. Tanto es así que para el caso concreto del cáncer de mama hay registrados múltiples ensayos clínicos observacionales en los que se incluye la utilización de éstos: un ensayo clínico fase 1 (NCT01957332), cuatro ensayos fase 2 (NCT01957332, NCT02288806, NCT01965522 y NCT00773695), dos ensayos fase 3 (NCT02539615 y NCT01724450) y un estudio en fase cuatro (NCT01612871), lo cual demuestra su relevancia en el campo concreto del cáncer de mama. Agrupando todos los tipos de cáncer existen más de cien ensayos clínicos registrados.

A nivel terapéutico, actualmente solo encontramos un microRNA en ensayos clínicos desarrollado por *Mirna Therapeutics, Inc.*: el fármaco **MRX34** es un microRNA sintético de miR-34, que actualmente se está ensayando en un estudio multicéntrico fase 1 para investigar la seguridad, farmacocinética y farmacodinámica en cáncer hepático primario no resecable o metastásico, enfermedades hematológicas y melanoma (NCT01829971). Los resultados preliminares del ensayo se esperan tener para diciembre de 2016.

MICRORNA Y CÁNCER DE MAMA

La desregulación de los miRNAs se ha asociado con iniciación tumoral, resistencia a drogas y metástasis, y de ahí el creciente interés por conseguir estrategias terapéuticas basadas en la modulación de sus niveles de expresión, así como la identificación de sus dianas para el desarrollo de nuevas aproximaciones para su tratamiento.

MiRNAs y células madre tumorales en cáncer de mama

Existen numerosos estudios que sugieren que las células madre tumorales (CMT) son las responsables del desarrollo y la progresión tumoral. Entre las propiedades biológicas que muestran estas células y que comparten con las células madre somáticas, encontramos su capacidad para dividirse asimétricamente, y su habilidad para la expulsión de algunos fármacos [274]. Sin embargo, se diferencian de las células madre somáticas de la mama en su alta capacidad de diseminación metastásica. La plasticidad fenotípica de las CMT les permite a su vez diferenciarse en células tumorales diferenciadas, lo cual se considera que podría ser un factor importante para disminuir la agresividad tumoral [275]. Las primeras CMT se identificaron y se aislaron en 2003 a partir de tumores mamarios, siendo identificadas como estirpes $CD44^+/CD24^{-/bajo}$ que mostraban alta capacidad de diseminación [276]. En 2007 se descubrió que el miRNA let-7 es un regulador clave de propiedades de las CMT como son la elevada capacidad de proliferación y de diseminación [277]. Posteriormente se confirmó utilizando mamíferos en cultivo y dando tratamiento antitumoral, que las CMT eran poblaciones $CD44^+/CD24^{-/bajo}$ y que además tenían niveles de expresión muy bajos de let-7. A su vez se demostró que sobreexpresando a let-7 se inhibía la proliferación y el estado indiferenciado vía bloqueo del oncogén de *HRAS* y del gen de alta movilidad *HMG2*, respectivamente.

En el año 2008 se descubre que las CMT $CD44^+/CD24^{-/bajo}$ tienen la habilidad de producir transición epitelio mesénquima (TEM) y una alta capacidad tumorigénica [278]. El proceso de transición epitelio mesénquima es un paso fundamental para la invasión y la metástasis, y de ahí que este campo sea de un alto interés científico. El fenotipo TEM se caracteriza por la pérdida de marcadores epiteliales como es la E-cadherina y la sobreexpresión de marcadores mesenquimales como la N-cadherina y la vimentina. A su vez se pierden la capacidad de adhesión célula-célula y la polaridad celular, junto con la capacidad aumentada para invasión celular. En la **Tabla 5** se resumen algunos de los miRNAs relacionados con CMT y con TEM. En el caso del cáncer de mama, el fenotipo TEM es inducido por la sobreexpresión de miR-103 y miR-107 [279], que silencian a su vez a Dicer y provocan una disminución general de los miRNAs dependientes del procesamiento por ésta, entre los que se incluyen los miRNA de la familia de miR-200, que son reguladores negativos de la TEM, vía silenciamiento de la expresión de los factores de transcripción ZEB1 y ZEB2, que a su vez son represores transcripcionales de la expresión de E-cadherina [280, 281]. Recientemente se sabe que la expresión de los miembros de la familia de miR-200 está regulada epigenéticamente por los factores de la familia TET (metilcitosina dioxigenasas); factores implicados en la desmetilación del DNA (convirtiendo la 5-metil-citosina en 5-hidroximetilcitosina), que liberan al promotor de los miRNA de la familia de miR-200. Se sabe que el silenciamiento de éstos está mediado por la sobreexpresión de miR-22, que tiene como diana directa a los factores *TET* (1-

3) [282]. De esta forma, miR-22 promovería la adquisición de propiedades de CMT como son la TEM y el fenotipo pro-metastásico mediante la supresión de la familia de miR-200 [283].

Tabla 5. MicroRNA reguladores de genes diana asociados con CMT y con TEM en cáncer de mama.

microRNA	Genes diana	Referencia
Familia de miR-200	ZEB1 y ZEB2	[280]
Let-7	HRAS, HMGA2	[277]
miR-22	TET 1 a 3	[282]
miR-103/107	DICER1	[279]
miR-200c	BMI1	[284]
miR-205	ZEB1 y ZEB2	[280]

MiRNAs y resistencia a fármacos

La resistencia a quimioterapia y a nuevos fármacos biológicos dirigidos es un complejo problema al que se enfrenta la investigación oncológica actual [285]. Los mecanismos que subyacen bajo la adquisición de resistencia se clasifican en dos categorías que incluyen la alteración de los transportadores que permiten expulsar los fármacos [286, 287] y la activación de rutas antiapoptóticas y de supervivencia celular [288]. Se han identificado a algunos miRNAs como reguladores críticos de la resistencia a fármacos en cáncer de mama, algunos de los cuales se resumen en la **Tabla 6**. Los perfiles de expresión diferencial entre respondedores y no respondedores son utilizados a menudo para identificar miRNAs asociados a resistencia, así como sus dianas [289, 290].

Tabla 6. MicroRNA reguladores de genes diana claves en resistencia a fármacos en cáncer de mama.

microRNA	Gen diana	Referencia
miR-30c	TWF1, IL11	[289]
miR-31	PKC epsilon	[288]
miR-221/222	CDKN1B	[291]
miR-326	ABCC1	[292]
miR-451	ABCB1	[293]
miR-487a	ABCG2	[294]

Una de las mayores fuentes de resistencia a fármacos descrita es la sobreexpresión de los transportadores de tipo ABC (*ATP binding cassette*) [286, 287, 290]. Estos transportadores permiten a las células expulsar pequeñas moléculas de su interior, incluyendo agentes anticancerígenos. Hasta la fecha se han identificado 49 miembros dentro de esta familia [285]. Las funciones de tres de estos transportadores (ABCB1, ABCG2 y ABCC1) en multirresistencia a fármacos se asocian con la expulsión de varios compuestos de carácter hidrofóbico como son los taxanos, las antraciclinas y los antimetabolitos [285, 295]. El transportador ABCB1 fue el primero en ser identificado [296] asociándose con la ausencia de respuesta al tratamiento en varios tipos de cáncer, incluido el de mama [297-299]. ABCC1 se asocia con resistencia en cáncer de mama, próstata y pulmón [300-302], mientras que el transportador ABCG2 se asocia

con quimiorresistencia en cáncer de mama y en leucemias [290, 303]. Estudios recientes mostraron que las CMT de varios tipos de cáncer tienen niveles de expresión elevados de estas proteínas transportadoras [277, 304]. Algunos estudios han demostrado que los miRNAs están implicados en la regulación post-transcripcional de estos genes de la familia de transportadores ABC. En el caso del cáncer de mama, miR-326 y miR-451 incrementan la quimiosensibilidad de las células a la doxorubicina vía silenciamiento de ABCC1 y de ABCB1, respectivamente [292-294]. De forma similar, miR-487a regula la quimiosensibilidad de las células de cáncer de mama a la mitoxantrona vía silenciamiento de ABCG2 [294].

Algunos estudios a su vez muestran que los miRNAs están asociados con otros mecanismos de resistencia [289, 291, 305]. Recientemente se demostró que miR-221 y miR-222 se sobre expresan en células de cáncer de mama luminales resistentes a tamoxifeno. Debido a que miR-221/222 son reguladores negativos directos de *CDKN1B*, un bloqueante del ciclo celular y un supresor tumoral, las células de cáncer de mama resistentes a tamoxifeno muestran niveles muy bajos de *CDKN1B*. Otro estudio mostró que la expresión de estos dos microRNAs están modulados específicamente a nivel post-transcripcional por nucleolina, y se demostró a su vez que silenciando directamente a la nucleolina se puede suprimir de forma efectiva la resistencia a tamoxifeno [291]. En otro estudio se mostró que miR-30c suprime la expresión de interleucina 11 e inhibe la resistencia de los cánceres de mama a Paclitaxel y a doxorubicina, vía silenciamiento directo de la proteína de unión a actina twinfilina-1, que promueve el fenotipo TEM [289].

MiRNAs y metástasis en cáncer de mama

La aparición de metástasis es un proceso que ocurre en varias etapas y que está asociado con la agresividad tumoral, siendo la principal causa de muerte por esta enfermedad [306]. Las metástasis ocurren a partir del tumor primario [307] iniciándose junto con la vascularización del mismo. Las células muestran una pérdida de adhesión y la adquisición de fenotipo invasivo, promoviendo su movilidad hacia tejidos y órganos distales. La TEM es importante para la fase de movilización de las células tumorales e invasión del torrente sanguíneo. Tras circular por la sangre, las células llegan hasta nuevos órganos adecuados para su colonización donde se asientan realizando el proceso inverso (transición mesénquima epitelio, TME) y comienzan a proliferar de forma descontrolada nuevamente.

Algunos de los miRNAs que están implicados en el proceso metastásico se resumen en la **Tabla 7**. Por ejemplo, miR-10b se encuentra sobre-expresado en líneas celulares con capacidad metastásica frente a líneas celulares sin capacidad metastásica. La expresión ectópica de miR-10b en células de cáncer de mama no metastásicas induce la sobre-expresión de *RHOC*, vía silenciamiento génico de *HOXD10*, promoviendo así el fenotipo metastásico [308]. Otro estudio identificó a miR-126, miR-206 y miR-335 como miRNAs supresores de metástasis tumoral [309]. La normalización de los niveles de expresión de miR-126 reduce la proliferación y el crecimiento tumoral, mientras que miR-206 y miR-335 inhiben la capacidad invasiva de las células tumorales. MiR-335 muestra sus efectos inhibitorios en las metástasis de cáncer de mama vía supresión de la expresión de *SOX4*, así como de la tenascina C. Por otro lado, miR-31 aparece infraexpresado en células de cáncer de mama metastásicas, y su

expresión bloquea la invasión y la metástasis vía silenciamiento de múltiples genes asociados con metástasis como *RHOA* e *ITGA5* [310].

Tabla 7. MicroRNA reguladores de genes diana claves en el proceso metastásico en cáncer de mama.

microRNA	Gen diana	Referencia
miR-10b	<i>HOXD1</i>	[308]
miR-29b	<i>VEGFA, ANGPTL4, LOX</i>	[311]
miR-31	<i>RHOA, ITGA5</i>	[310]
miR-34	<i>SNAI1</i>	[312]
miR-335	<i>SOX4, TNC</i>	[309]
miR-708	<i>NNAT</i>	[313]

El programa de TEM se activa frecuentemente durante la invasión y la metástasis, y por tanto los cambios genéticos y moleculares por los que las células tumorales adquieren características invasivas y metastásicas son áreas de absoluto interés en investigación oncológica. MiR-34a por ejemplo, que es una diana transcripcional de p53, inhibe la capacidad invasiva de las células de cáncer de mama por supresión de la TEM y del silenciamiento del represor transcripcional SNAI1 [312, 314]. Otro estudio demostró que el factor de transcripción GATA3 suprime las metástasis de cáncer de mama por inducción de la expresión de miR-29b [311]. Este factor de transcripción es necesario para el mantenimiento del fenotipo epitelial luminal en la glándula mamaria, y así la pérdida de expresión de miR-29b está asociada con un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama [315-317]. MiR-29b a su vez inhibe la metástasis en cáncer de mama suprimiendo una red de reguladores prometastásicos asociados con angiogénesis, remodelación del colágeno y proteólisis. En otro estudio se mostró que miR-708 inhibe la migración celular y la metástasis por silenciamiento de la proteína de retículo endoplasmático neuronatina (*NNAT*), que se encarga de la regulación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} [313]. La desregulación de la neuronatina por miR-708 produce una regulación aberrante de los niveles de calcio, provocando la inactivación de las proteínas implicadas en migración celular como son la quinasa regulada por señal extracelular o la quinasa de adhesión focal [318]. Otros autores mostraron que en condiciones hipóxicas los receptores de EGF inhiben la interacción física entre la proteína AGO2 y Dicer vía fosforilación de AGO2 en el residuo Tirosina 393, bloqueándose así el procesamiento de miRNAs dependientes de la ruta de AGO2 y de Dicer. La fosforilación de AGO2 en la tirosina 393 se asocia a su vez con peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama [319].

MiRNAs circulantes

En 1979 se describieron por primera vez varios tipos de células tumorales que secretaban microvesículas (también conocidas como micropartículas) que contenían proteínas de membrana [320]. Posteriormente se aislaron microvesículas a partir de varios tipos celulares, así como en fluidos biológicos como son la sangre, la orina, la leche y la saliva, y se sabe que estas vesículas juegan un papel importante como herramientas para la comunicación intercelular de forma tanto paracrina como exocrina [321-323]. Dependiendo del tamaño, marcadores, carga que portan, así como función que ejercen, las microvesículas han sido definidas en tres grupos: cuerpos apoptóticos, vesículas extracelulares y exosomas. Los

exosomas en concreto son aquellas vesículas con un diámetro definido entre 50 y 100 nanómetros, que derivan de diversos tipos celulares, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas [324]. En 2007 se demostró que los miRNAs empaquetados en los exosomas, que además pueden transportar proteínas, DNA y mRNA, pueden ser transferidos funcionalmente hacia otras células [325]. Múltiples líneas de evidencia en biología del cáncer han mostrado que los componentes secretados por los exosomas de las células tumorales se asocian con desarrollo tumoral y malignización [326-328] y por tanto, muchos grupos de investigación están estudiando como neutralizar o silenciar los exosomas tumorales como una posible aproximación terapéutica antitumoral [329]. Adicionalmente, se están desarrollando a nivel experimental nuevos equipos y sistemas de aislamiento y análisis de exosomas para el estudio de perfiles de su contenido, con el fin último de utilizarlos en diagnóstico clínico no invasivo.

Los exosomas han sido asociados con diversos aspectos del desarrollo tumoral del cáncer de mama [326, 330, 331]. En las metástasis en la médula ósea por parte de las células de cáncer de mama, la recurrencia décadas tras el diagnóstico inicial y tratamiento, implican la supervivencia a largo plazo de las células de cáncer de mama en un estado quiescente. Los miRNAs exosomales miR-127, miR-197, miR-222 y miR-223 derivados del estroma de la médula ósea inhiben el crecimiento y proliferación de las células de cáncer de mama, vía silenciamiento directo de *CXCL12*, provocando la inducción de un estado de quiescencia en las células de cáncer de mama [330]. Por otra parte, otros autores han mostrado que los macrófagos asociados al tumor (activados por la interleucina 4 liberada por los linfocitos T CD4⁺), transfieren miR-223 a las células de cáncer de mama vía exosomal y miR-223 induce la acumulación nuclear de beta-catenina, vía silenciamiento directo del factor potenciador específico de miocito 2C (*MEF2C*), lo que provoca la potenciación de la capacidad invasiva [331].

Un estudio reciente demostró a su vez que los miRNAs exosomales promueven la metástasis en cáncer de mama. Los altos niveles de expresión de miR-105 secretado se asocian con alta capacidad metastásica en cáncer de mama. El miR-105 secretado por las células cancerígenas rompe las uniones estrechas por silenciamiento de la expresión de la proteína ZO-1 en órganos distales. De esta forma las células tumorales que sobreexpresan miR-105 inducen permeabilización vascular y muestran alta actividad metastásica [326].

Los miRNAs exosomales han sido asociados también con la adquisición de resistencia a fármacos. Se demostró que aquellos liberados por las células de cáncer de mama resistentes, reducen la quimiosensibilidad de las células quimiosensibles: de entre los miRNAs exosomales miR-17, miR-30a, miR-100 y miR-222, éste último se transfiere a las células diana y en ellas suprime la expresión de PTEN, factor supresor de tumores que está implicado en la resistencia a adriamicina y a docetaxel [283, 332, 333].

INTERRELACIONES ENTRE ANGIOGÉNESIS, MICRORNA Y CÁNCER: LA TRIPLE ENTENTE

Los mecanismos moleculares que participan en el proceso de la angiogénesis son múltiples, pero en los últimos años existe una evidencia creciente de trabajos que muestran el papel de ciertos microRNAs (miRNAs) en su regulación.

En el caso de las células endoteliales, existen multitud de trabajos publicados donde se muestra el papel de los miRNAs como reguladores funcionales de éstas. Los cambios provocados por el desbalance en los niveles de expresión de los miRNAs dependen del miRNA alterado y muchas veces es contexto-dependiente (situación fisiológica vs. situación patológica; tipo de tejido y de órgano, etc.). En 2015 se ha demostrado por ejemplo que VEGF es capaz de inducir la expresión de miR-17-92 en células endoteliales vía activación de ERK/ELK1 [334]. En 2012 se mostró que miR-15a, un miRNA específico de células endoteliales, reduce la capacidad angiogénica de éstas mediante la reducción de los niveles de expresión de *FGF2* y *VEGFA* [335]. Algunos miRNAs como miR-206 son capaces de atacar dianas importantes en la señalización celular de la célula endotelial. En el caso de este miRNA tiene como diana al mRNA de la proteína quinasa PIK3C2 alfa, disminuyendo la capacidad angiogénica global de la célula endotelial [336].

Algunos miRNAs son capaces de modular su activación mediante la regulación de la vía de HIF1 alfa, como sucede en los casos de miR-519c y de miR-107 [337]. Otros miRNA, como miR-9, modulan vías centrales para la progresión neoplásica, que secundariamente pueden afectar a la expresión de VEGF u otros mediadores de angiogénesis [338]. En la **Tabla 8** se muestra un resumen de miRNAs implicados en la regulación de la angiogénesis en cáncer.

Tabla 8. Algunos miRNAs implicados en angiogénesis en el contexto tumoral.

microRNA	Inductores	Dianas	Efecto biológico	Referencias
miR-107	<i>TP53</i>	<i>HIF1A</i>	Antiangiogénico	[337]
miR-519c	-	<i>HIF1A</i>	Antiangiogénico	[339]
miR-9	<i>Exosomal</i>	<i>SOCS5</i>	Proangiogénico	[338]
miR-17-92	<i>MYC, KRAS, VEGFA</i>	<i>THBS1, PTEN, CTGF, SMAD4, TGFBR, F3</i>	Contexto dependiente	[334, 340-346]
miR-194	<i>TP53</i>	<i>THBS1</i>	Proangiogénico	[347]
miR-506	-	<i>SPHK1</i>	Antiangiogénico	[348]
miR-27b	-	<i>VEGFC</i>	Antiangiogénicos	[349]
miR-101				
miR-128				
miR-125a	-	<i>VEGFA</i>	Antiangiogénico	[350]
miR-497	-	<i>VEGFA, AEG1</i>	Antiangiogénico	[351]

Sin embargo, quizá los miRNA más relevantes de los relacionados con la regulación de la angiogénesis tumoral son los pertenecientes al clúster miR-17-92. Este clúster policistrónico incluye al menos 7 miRNAs maduros con relevancia en oncología: miR-17-5p (miR-17), miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b y miR-92a, que son transcritos de forma común [352] y está muy conservado en todos los vertebrados. Hay también dos clúster homólogos producidos por duplicación génica, con miRNA policistrónicos similares y con secuencias

iguales de unión a mRNA (miR-106a-363 y miR-106b-25), aunque incluyen solo un subgrupo de los miRNAs presentes en el clúster 17-92.

La activación de la transcripción de miR-17-92 por los oncogenes MYC y KRAS, explica su frecuente sobreexpresión en múltiples neoplasias [352, 353]. Distintos miembros de este clúster pueden ejercer tanto acciones de estimulación de la angiogénesis tumoral [341-343], como efectos de contrarregulación angiogénica en distintos contextos celulares [344]. Sus efectos angiogénicos son por tanto complejos, dependientes del contexto celular y tisular, y su conocimiento es todavía incompleto. Por otra parte, los distintos miembros del clúster miR-17-92 pueden tener efectos pro-tumorales pleiotrópicos no relacionados con la angiogénesis, y se ha demostrado su participación en procesos de proliferación, reparación del DNA, apoptosis, e hipoxia [354], así como su mayor expresión en lesiones metastásicas.

En el caso del cáncer de mama, sin embargo, algunos trabajos han mostrado efectos inhibitorios sobre la progresión tumoral [355] y por tanto el papel de miR-17-92 sigue siendo controvertido. Con respecto a los posibles efectos del tratamiento antineoplásico sobre la expresión de miR-17-92 y su repercusión en la angiogénesis, solo existe un trabajo experimental en cáncer de colon que ha mostrado que el tratamiento con quimioterapia (5FU) puede disminuir su expresión, modulando así la expresión de trombospondina-1, mediador clave en la contrarregulación angiogénica [340]. Estos datos parecen sugerir que los cambios en la expresión miR-17-92 pueden ser un mecanismo clave para la inducción de efectos anti-angiogénicos por la quimioterapia.

Se conoce todavía muy poco acerca de la regulación por microRNA de la angiogénesis inducida por los carcinomas de mama. Los datos de expresión de miR-17-92 tanto en líneas celulares como en muestras clínicas de cáncer de mama apuntan a diferencias entre los distintos subtipos moleculares de la neoplasia, con una expresión menor en tumores con expresión de receptores hormonales y mayor en el grupo de carcinomas triple negativo [353]. Aunque hay otros estudios en los que no se encontraron diferencias de expresión relacionadas con la expresión de receptores hormonales, la expresión de miR-17-92 y de los niveles de trombospondina-1 están relacionados con la vía del receptor de estrógenos alfa a través de los cambios en c-Myc [356]. Algunos trabajos recientes han mostrado la posible regulación de la expresión de factores pro-angiogénicos como el F3 (factor tisular) o VEGF por miembros del clúster miR-17-92 [346, 357], bien de forma directa o bien a través de la inhibición de la vía de TGF-beta [342].

Datos de nuestro grupo también muestran que en líneas de cáncer de mama triple negativo como MDA-MB-231 existe una regulación similar por miR-20a de los niveles de factor tisular [358], un mediador relevante para la angiogénesis tumoral, sobre la que ejerce tanto efectos pro-angiogénicos directos como mediados a través de la activación de la coagulación. La relevancia de estos hallazgos es de difícil interpretación todavía, dado que la multiplicidad de dianas de los miRNA relacionados con angiogénesis frecuentemente implica otros mecanismos, como los relacionados con la capacidad invasiva o la proliferación celular.

Además, dada la relación entre la expresión de algunos angiomiRNA, en especial los miembros del miR-17-92, la regulación hormonal [359] y el tipo de neoplasia [353, 360], es posible que el papel angiogénico de este grupo de miRNAs sea distinto en los diversos grupos

de cáncer de mama (luminal, Her2, basal). Sin embargo, no existen hasta donde conocemos estudios clínicos que hayan evaluado la relación entre el fenotipo proangiogénico tumoral del cáncer de mama y la expresión de miR-17-92, y los datos *in vitro* son también limitados.

En la presente tesis doctoral analizamos por una parte la relación entre el fenotipo angiogénico del cáncer de mama, definido tanto por las características de la vascularización tumoral como por el perfil de expresión de mediadores de la angiogénesis y la expresión de miR-17-92 y otros angiomiRNA. Así mismo, profundizamos en el conocimiento de los efectos antiangiogénicos del tratamiento antineoplásico con taxanos en el cáncer de mama y su relación con la respuesta tumoral y con el cambio en miRNAs relacionados con angiogénesis. El contexto de la quimioterapia neoadyuvante, nos ofrece como ventajas la ausencia de tratamiento local previo que pueda modificar el lecho vascular tumoral, la accesibilidad de muestras histológicas previas y posteriores al tratamiento, y la posibilidad de una evaluación anatomopatológica de la respuesta. Esta evaluación de respuesta permite la identificación de un grupo de pacientes con bajo riesgo de recaída, que son aquellas que alcanzan una respuesta completa patológica. Sin embargo, el grupo con enfermedad residual y sobre todo con afectación ganglionar es más heterogéneo desde el punto de vista pronóstico y, a pesar de la disponibilidad de material anatomopatológico postquimioterapia, no hay factores claramente predictivos del posible beneficio de un tratamiento adicional, más allá de los factores clásicos de expresión de receptores hormonales y sobreexpresión de Her2.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La angiogénesis es una característica clave para la progresión y la generación de metástasis a distancia en las neoplasias malignas. En el cáncer de mama, además de su valor pronóstico, la angiogénesis ha demostrado ser una diana terapéutica útil, aunque los resultados de los tratamientos antiangiogénicos y de su integración con la quimioterapia convencional son todavía limitados. Por ello, conocer con más profundidad los mecanismos que regulan la activación angiogénica en los carcinomas de mama puede facilitar el desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos y la identificación de factores predictivos de respuesta al tratamiento. Existen resultados recientes que demuestran el papel de los microRNA, y más específicamente del clúster miR-17-92, en la modulación de la angiogénesis tumoral. Sin embargo, los datos sobre su expresión y su papel regulador de la angiogénesis en el cáncer de mama son escasos y en algunos casos contradictorios. La hipótesis de partida de este estudio es que los microRNA del clúster miR-17-92, así como otros angiomicroRNAs, pueden desempeñar un papel central en su regulación, con efectos básicamente pro-angiogénicos a través de la modificación de la expresión de *THBS1*, *VEGFA* y otros mediadores angiogénicos. Esta regulación angiogénica también puede ser relevante para la resistencia al tratamiento con quimioterapia, y específicamente para la quimioterapia basada en taxanos, que es capaz de modificar el fenotipo angiogénico del cáncer de mama. La demostración de la modulación de la respuesta angiogénica a la quimioterapia por estos microRNA y su posible modificación de la biología de la neoplasia podría abrir nuevas vías para la identificación de las pacientes que puedan beneficiarse de los tratamientos antiangiogénicos y para el diseño racional de esquemas combinados de tratamiento.

OBJETIVOS

El **objetivo principal** de esta tesis doctoral fue evaluar el papel del clúster miR-17-92 y otros angiomicroRNAs en la angiogénesis del cáncer de mama, determinando su relevancia funcional y sus modificaciones con el tratamiento antineoplásico neoadyuvante.

Los **objetivos específicos** de la tesis doctoral fueron:

- 1) Caracterizar clínica y anatomopatológicamente la serie clínica objeto de estudio.
- 2) Caracterizar el estado basal de los marcadores moleculares relacionados con angiogénesis y su asociación con el pronóstico y la respuesta al tratamiento.
- 3) Evaluar el efecto del tratamiento basado en antraciclinas y taxanos sobre los mediadores angiogénicos en el nicho tumoral del cáncer de mama.
- 4) Evaluar el efecto de la quimioterapia neoadyuvante sobre la angiogénesis y sus principales biomarcadores en cáncer de mama utilizando un modelo de enfermedad localmente avanzada.
- 5) Estudiar *in vitro* la regulación angiogénica por miRNAs utilizando líneas celulares representativas de cáncer de mama y endoteliales, así como analizar los cambios en la expresión de miR-17-92 y en el fenotipo angiogénico del tumor inducidos por la quimioterapia neoadyuvante con taxanos, y estudiar su relación con la respuesta tumoral y con el pronóstico de la neoplasia.
- 6) Profundizar *in vitro* en el conocimiento de los mecanismos moleculares que desencadena la sobreexpresión de miR-18a, un miembro representativo del clúster miR-17-92, sobre la célula tumoral.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES

Características generales de las pacientes y esquema de tratamiento

Se reclutaron retrospectivamente en el Hospital General Universitario José María Morales Meseguer un total de 121 pacientes consecutivas con carcinoma infiltrante de mama, tratadas con quimioterapia preoperatoria con antraciclinas y taxanos secuenciales, de las que se disponía de bloques de parafina con biopsia tumoral pre- y post-tratamiento.

Las características clínicas al diagnóstico y tras evaluación anatomopatológica, así como el esquema de tratamiento se muestran en la sección de **Resultados**. El estudio pre-tratamiento incluyó mamografía y análisis por imagen de resonancia magnética nuclear (RMN), biopsia tumoral y aspiración con aguja fina axilar o biopsia de ganglio centinela. Tras quimioterapia neoadyuvante se evaluó la respuesta clínica mediante RMN y se procedió con la cirugía. Se administró terapia hormonal, radioterapia y trastuzumab (cuando estaba indicado) de acuerdo a la práctica clínica común. Se definió la respuesta completa patológica (RCp) como la ausencia de tumor invasivo, tanto en la mama como en la axila (ypT0/Tis, ypN0, M0). La reducción del estadio se definió como cualquier descenso de categoría pT, tomando como referencia el cT. De todas las pacientes se obtuvo consentimiento informado. El estudio fue aprobado previamente por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del H.G.U. Morales Meseguer.

MATERIAL Y MÉTODOS

Análisis in silico de mediadores angiogénicos y proliferativos dianas de miR-17-92 y otros miRNA de interés

Para el estudio de potenciales mediadores angioproliferativos que fuesen susceptibles de regulación por miR-17-92, y para la búsqueda de otros candidatos adicionales, se realizó un estudio *in silico* utilizando el sumatorio de diversas herramientas predictivas de interacción (disponibles online), incluido en el algoritmo de miRWalk 2.0 (que incluye el sumatorio de los algoritmos predictivos de miRWalk, diana-microT 4.0, miRanda, RNA22, RNAhybrid y Targetscan), obteniéndose valores desde 0 (muy baja probabilidad de interacción) a 6 (muy alta probabilidad de interacción). Para la búsqueda de los sitios concretos de interacción se utilizó FindTar3 [361-372].

Análisis bioinformático de predicción de funciones por asociación

Se realizó utilizando grupos de genes seleccionados por estudios de correlación directa o indirecta con los microRNA candidatos. Para ello se utilizó el software Genemania, que utiliza datos públicos disponibles, que incluyen interacciones genéticas y proteicas, rutas, co-expresión, co-localización y similitud de dominios proteicos [373].

Marcadores genéticos seleccionados

Durante el desarrollo de los proyectos de investigación de los que se sustenta esta tesis doctoral se seleccionaron y analizaron por RT-qPCR los marcadores genéticos que se listan en la **Tabla 9** utilizando sondas comerciales (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). La justificación de su selección se basó en su potencial como reguladores angiogénicos y/o proliferativos, en base a la bibliografía existente, así como en los resultados del análisis *in silico* (ver sección de **Resultados** para más detalle).

Tabla 9. Sondas qPCR utilizadas para el análisis de la expresión génica.

Genes codificantes	Proteína codificada	ID Thermo Fisher	microRNAs	Secuencia madura	ID Thermo Fisher
VEGFA	Factor de crecimiento endotelio vascular A	Hs00900055_m1	hsa-mir-17	hsa-miR-17-5p	002308
THBS1	Trombospondina-1	Hs00962908_m1	hsa-mir-18a	hsa-mir-18a-5p	002422
CXCL12	Factor derivado de células estromales 1	Hs00171022_m1	hsa-mir-19b-1	hsa-mir-19b-3p	000396

F3	Factor tisular	Hs01076029_m1	hsa-mir-20a	hsa-mir-20a-5p	000580
HIF1A	Factor inducible por hipoxia 1	Hs00153153_m1	hsa-mir-92a	hsa-mir-92a-3p	000431
PDGFA	Factor de crecimiento derivado de plaquetas A	Hs00964426_m1	hsa-mir-106b	hsa-mir-106b-5p	000442
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo	Hs01026927_g1	hsa-mir-200c	hsa-mir-200c-3p	002300
CDH1	Cadherina-1	Hs01023894_m1	hsa-mir-141	hsa-mir-141-3p	000463
VIM	Vimentina	Hs00185584_m1	hsa-mir-429	hsa-mir-429	001024
TGFBR3	Receptor del factor de crecimiento transformante beta 3	Hs01114253_m1	hsa-mir-519c	hsa-mir-519c-3p	001163
BIRC5	Proteína contenedora de repeticiones IAP baculovirales	Hs03043574_m1	hsa-mir-107	hsa-mir-107	000443
CCNB1	Ciclina B1 específica de fase mitótica G2	Hs00259126_m1	hsa-mir-9	hsa-mir-9-5p	000583
MKI67	Antígeno KI-67	Hs01032443_m1			
MYBL2	Proteína relacionada con MYB B	Hs00942543_m1			
TFPI	Inhibidor de la ruta del factor tisular	Hs00196731_m1			
ACTB	Actina beta	Hs01060665_g1			

Extracción de RNA a partir de muestras fijadas e incluidas en parafina (FFPE)

Se obtuvieron de dos a tres cortes de ocho micras a partir de los bloques de parafina tras su desbastado y se etiquetaron y almacenaron en viales de 1,5 ml hasta extracción posterior. Para la extracción se realizaron dos lavados consecutivos añadiendo 1 ml de xileno y mezclando en vórtex durante un mínimo de 10 segundos o hasta aclaramiento completo de la parafina, tras lo cual se centrifugó a 20.000g durante 2 minutos y a continuación se descartó el xileno, manteniendo el precipitado de tejido. A continuación se realizaron dos lavados consecutivos utilizando etanol absoluto, procediendo de igual forma que en los pasos de

xileno. Tras descartar el etanol, las muestras se sometieron a desecación en cámara de concentración (CentriVap Concentrator, Labconco, Kansas, MO, USA) durante 10 minutos a 30°C. Cuando el procedimiento no pudo ser continuado tras este paso, las muestras fueron almacenadas a -80°C.

Para las etapas posteriores se utilizó en todo momento los reactivos y componentes incluidos en el kit miRNeasy FFPE (QIAGEN, Madrid, España). A las muestras desecadas se le añadieron 240 µl de tampón PKD y se mezcló en vórtex durante 10 segundos, tras lo cual se añadieron 10 µl de proteinasa K y se mezcló utilizando la misma punta de micropipeta. Las muestras a continuación se incubaron en termobloque a 56°C durante 15 minutos en agitación a 300 rpm y a continuación se incubaron de igual forma a 80°C durante otros 15 minutos. Tras dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente, se automatizó el resto del proceso de extracción en equipo QIAcube (QIAGEN, Madrid, España), incluyendo la digestión con DNasa I y la purificación por columna, según el protocolo proveído por el fabricante. El RNA obtenido (20 µl) se cuantificó espectrofotométricamente en Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) registrando su concentración (ng/µl) y su calidad (ratios A260/A280 y A260/A230) y se almacenó a -80°C.

Extracción de RNA a partir de líneas celulares

Líneas celulares utilizadas en los experimentos se lisaron utilizando como agente de lisis compuestos de tiocianato de guanidinio y fenol (RNAzol®RT, Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA). La relación fue de 500 µl de RNAzol para pocillos de 24 y 1 ml para pocillos de 6. Cuando la extracción no fue posible inmediatamente después de la lisis, las muestras se almacenaron a -30°C hasta la posterior extracción. El RNA se extrajo utilizando columnas compatibles con RNAzol según recomendaciones del fabricante (Direct-zol™ RNA MiniPrep Kit, Zymo Research, Irvine, CA, USA). El RNA obtenido (50 µl) se cuantificó espectrofotométricamente en Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) registrando su concentración (ng/µl) y su calidad (ratios A260/A280 y A260/A230) y se almacenó a -80°C.

Líneas celulares

En la presente tesis doctoral se utilizaron las líneas celulares adherentes reflejadas en la **Tabla 10**. En todos los casos se cultivaron de forma estándar en incubador (Forma Scientific 3164) con CO₂ a 37°C en medio de cultivo DMEM 1 g/l glucosa con 10% de suero bovino fetal, 1% glutamax, 1% piruvato, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de gentamicina y sin rojo fenol (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Para todos los experimentos se utilizaron células con pase de laboratorio inferior a 40. El control de micoplasmas se realizó mediante PCR utilizando el kit *VenorGeM Mycoplasma Detection Kit* (Minerva Biolabs, Berlín, Alemania).

Tabla 10. Líneas celulares utilizadas

Variable

Línea celular	Origen	Fenotipo
MCF7	ATCC, SAI	RE+,PR+,Her2-
MDA-MB-231	ATCC, SAI	RE-,PR-, Her2-
EA.hy926	ATCC, SAI	Endotelial (hibridoma)

Transfección celular

Para las transfecciones celulares se utilizaron dos estrategias en función del material genético a introducir en las células:

- 1) Para sobreexpresión o silenciamiento de miRNAs se utilizaron *miRNA mimics* (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) o *miRNA inhibitors* (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) respectivamente. Como agente transfectante se utilizó *siPORT™ NeoFX™ Transfection Agent* (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). El protocolo para la transfección se realizó siempre según recomendaciones del fabricante en placas de 6 y/o 24 pocillos por triplicado. Todas las transfecciones se realizaron a concentraciones de 50 o 100 nM de *mimic* o de *inhibitor*.
- 2) Para la introducción de plásmidos de expresión (mayores de 6 kilobases en todos los casos) se utilizó *Lipofectamine® LTX* (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). El protocolo específico de transfección para cada línea celular se realizó de igual forma siempre según recomendaciones del fabricante. Para la selección de clones que hubiesen incorporado el plásmido se utilizaron agentes selectivos según requiriese el gen de selección incorporado en el plásmido (geneticina o higromicina). Todas las transfecciones con plásmidos se realizaron a concentración final de 500 nanogramos por pocillo.

En ambos casos el medio de cultivo utilizado fue DMEM 1 g/l glucosa con 10% de suero bovino fetal, 1% glutamax, 1% piruvato, 1% de aminoácidos no esenciales, sin rojo fenol y sin antibióticos (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Para los experimentos en presencia de estímulo estrogénico, se suplementó el medio de cultivo con 10 nM de 17 β -estradiol (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y se sustituyó el suero bovino fetal estándar por suero bovino fetal bajo en hormonas (depurado con carbón activo) (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España).

Retrotranscripción de RNA de células o tejido fresco

Para la obtención del cDNA a partir del RNA extraído de células o tejido fresco se utilizaron dos estrategias en función de si se quería obtener cDNA de miRNAs o de genes codificantes:

1. **Obtención de cDNA a partir de miRNA:** Se utilizó la estrategia del cebador específico contenido en los kits *MicroRNA & Non-coding RNA Assays* (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), retrotranscribiendo en bloques de cuatro miRNAs por cada reacción (tres dianas y el RNA nuclear pequeño *snU6* como control endógeno de referencia). Como retrotranscriptasa se utilizó *MultiScribe™*

Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Las condiciones de la reacción se definieron según instrucciones del fabricante.

2. **Obtención de cDNA a partir de mRNA:** Se utilizó la estrategia de RT masiva utilizando hexámeros aleatorios (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Como transcriptasa inversa se utilizó la enzima *SuperScript® III Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Las condiciones de la reacción y reactivos que se utilizaron se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Condiciones utilizadas para RT de hexámeros y los reactivos y volúmenes añadidos por reacción. Todo el proceso se realizó en dos pasos, en termociclador MasterCycler Nexus Gradient (Eppendorf Ibérica, Madrid, España).

Pasos	Condiciones de RT	Reactivos y volúmenes										
Primer paso	5 min/65°C 1 min/4°C Infinito a 4°C	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Primer paso</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>dNTPs (10 mM)</td> <td>1,00</td> </tr> <tr> <td>Hexámeros</td> <td>1,00</td> </tr> <tr> <td>RNA (30ng/μL)</td> <td>3,00</td> </tr> <tr> <td>Agua</td> <td>8,00</td> </tr> </tbody> </table>	Primer paso		dNTPs (10 mM)	1,00	Hexámeros	1,00	RNA (30ng/μL)	3,00	Agua	8,00
		Primer paso										
dNTPs (10 mM)	1,00											
Hexámeros	1,00											
RNA (30ng/μL)	3,00											
Agua	8,00											
Segundo paso	1 min/25°C 50 min/50°C 5 min/85°C Infinito a 4°C	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Segundo paso</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5x buffer</td> <td>4,00</td> </tr> <tr> <td>DTT</td> <td>1,00</td> </tr> <tr> <td>SSIII</td> <td>1,00</td> </tr> <tr> <td>Agua</td> <td>1,00</td> </tr> </tbody> </table>	Segundo paso		5x buffer	4,00	DTT	1,00	SSIII	1,00	Agua	1,00
Segundo paso												
5x buffer	4,00											
DTT	1,00											
SSIII	1,00											
Agua	1,00											

En todos los casos el cDNA obtenido se diluyó diez veces y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis por PCR cuantitativa.

Retrotranscripción de RNA obtenido a partir de tejido parafinado

1. **Obtención de cDNA a partir de miRNAs:** Puesto que los microRNAs aparentemente no sufren degradación en el tejido fijado e incluido en parafina, la estrategia para la obtención de cDNA fue la misma que la utilizada en tejido fresco y de células (ver apartado anterior).
2. **Obtención de cDNA a partir de mRNA:** Puesto que el mRNA obtenido a partir de tejido fijado e incluido en parafina aparece altamente degradado, quedando fragmentos que no suelen superar las 150 bases y con frecuentes modificaciones covalentes (entrecruzamientos), diseñamos unas condiciones de termociclado alternativas a las de la RT de hexámeros convencional

(apartado anterior) para la eficiente retrotranscripción de los mRNA: en el primer paso de hexámeros en lugar de 5' a 65°C se dieron **20' a 70°C**. Este proceso a 70°C/20' permite romper las modificaciones covalentes que se forman en el RNA durante el proceso de fijación (fundamentalmente la adición de grupos monometilol a las bases nitrogenadas que perjudican el alineamiento y entrecruzamientos), que limitan la capacidad de la RT para rendir cDNA y a su vez se consigue que adopte una conformación extendida [374, 375]. Los 20 µl finales de la reacción de RT se almacenaron a -80°C. Los reactivos y cantidades de RNA no fueron modificadas respecto al apartado anterior. En este caso no se diluyó nunca el producto de la RT.

Preamplificación de cDNA de genes codificantes en muestras parafinadas

El RNA mensajero parafinado además de aparecer altamente fragmentado, presenta una elevada degradación que hace que no puedan ser detectados la gran mayoría de los genes codificantes, de manera que diseñamos un sistema de preamplificación previa a la cuantificación por qPCR. Se utilizaron las sondas Taqman convencionales de la PCR cuantitativa. La concentración inicial de las sondas Taqman comerciales individuales es de 20X. Para la preamplificación se construyó un *pool* (o mezcla), quedando cada una de ellas diluida a una concentración de 0'2X en agua DEPC. La concentración final en la reacción de preamplificación quedó fijada en 0'05X. De esta forma se consiguió analizar la gran mayoría de los genes objetivo de nuestro proyecto. La reacción consiste en veinte ciclos de preamplificado con las condiciones que se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Condiciones de preamplificado utilizadas y los reactivos y volúmenes añadidos por reacción. Todo el proceso se realizó en termociclador MasterCycler Nexus Gradient (Eppendorf Ibérica, Madrid, España).

Pasos	Condiciones de preamplificado	Reactivos y volúmenes														
Paso único	30 seg/95°C <u>20 ciclos</u> 15 seg/95°C 4 min/60°C Al terminar Infinito a 4°C	<table border="1"> <tr> <td colspan="2">Pre-Amplificación</td> </tr> <tr> <td colspan="2">PCR</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Taqman Probe</td> </tr> <tr> <td>Máster mix Takara</td> <td>2,50</td> </tr> <tr> <td>Pool Sondas (0'2X)</td> <td>1,25</td> </tr> <tr> <td>cDNA</td> <td>1,25</td> </tr> <tr> <td>Agua</td> <td>0,00</td> </tr> </table>	Pre-Amplificación		PCR		Taqman Probe		Máster mix Takara	2,50	Pool Sondas (0'2X)	1,25	cDNA	1,25	Agua	0,00
Pre-Amplificación																
PCR																
Taqman Probe																
Máster mix Takara	2,50															
Pool Sondas (0'2X)	1,25															
cDNA	1,25															
Agua	0,00															

Al finalizar la reacción se diluyó **al menos 6 veces** el producto de la preamplificación.

Cuantificación relativa de la expresión génica mediante PCR cuantitativa

Para el análisis de la expresión génica se realizó PCR cuantitativa en equipo *LightCycler 480* (Roche Farma, Madrid, España) en placa de 384 pocillos. Como mezcla de reacción se

utilizaron 2,5 µl de *Premix Ex Taq* (Clontech, Takara, Kusatsu, Japón), 0,25 µl de sonda comercial (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) y 0,25 µl de ddH₂O libre de RNAsas (**Tabla 13**). Como genes de control endógeno se utilizaron actina beta (*ACTB*) en el caso de genes codificantes, así como *snU6* para microRNAs. Las reacciones se realizaron por triplicado y tras la amplificación a tiempo real se tomaron los valores Ct de cada marcador, teniendo en cuenta como criterio de calidad las desviaciones estándar de los triplicados menores de 0'3. Para el cálculo del valor de expresión relativa se utilizó la técnica del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [376].

Tabla 13. Condiciones utilizadas en la PCR cuantitativa, reactivos y volúmenes añadidos por reacción. Todo el proceso se realizó en LightCycler 480 (Roche Farma, Madrid, España).

Pasos	Condiciones de qPCR	Reactivos y volúmenes												
Paso único	30 seg/95°C	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">PCR cuantitativa</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Taqman</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Máster mix Takara</td> <td>2,50</td> </tr> <tr> <td>Sonda taqman</td> <td>0,25</td> </tr> <tr> <td>Agua</td> <td>0,25</td> </tr> <tr> <td>cDNA</td> <td>2,00</td> </tr> </tbody> </table>	PCR cuantitativa		Taqman		Máster mix Takara	2,50	Sonda taqman	0,25	Agua	0,25	cDNA	2,00
	PCR cuantitativa													
	Taqman													
	Máster mix Takara		2,50											
	Sonda taqman		0,25											
Agua	0,25													
cDNA	2,00													
40 ciclos														
3 seg/95°C														
20 seg/60°C														
Al terminar														
	30 seg/4°C													

Técnicas electroforéticas y cuantificación de la expresión proteica por Western-blot

En todos los casos las electroforesis se realizaron en geles de SDS en condiciones reducidas (con ditiotreitól) e incubación de las muestras a 100°C en tampón de carga durante 5 minutos. Las concentraciones de acrilamida fueron entre el 10 y el 15% en función del tamaño de la proteína a cuantificar. Los ensayos se realizaron utilizando material de electroforesis y fuentes de alimentación de *Bio-Rad Laboratories* (Madrid, España). Los lisados celulares se realizaron en tampón RIPA suplementado con 1% de inhibidor de proteasas y 1% de inhibidor de fosfatasa.

Las electroforesis se realizaron a 150V durante una hora, tras lo cual se realizó transferencia semi-seca de gel a membrana de PVDF en equipo TE 77 PWR (Amersham, GE Healthcare, Madrid, España) durante una hora a 56 mA. Tras la transferencia, las membranas se bloquearon en PBST con leche al 5% durante media hora y a continuación el anticuerpo primario se añadió a la concentración especificada por el fabricante en PBS-Tween 1X con leche en polvo al 5% (P/V) y se incubó durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se realizaron tres lavados de la membrana de diez minutos cada uno en PBST y se añadió el anticuerpo secundario a la concentración especificada por el fabricante en PBST con leche al 5%. Previo al revelado, se realizaron tres lavados de la membrana de diez minutos cada uno en PBST y se reveló utilizando como reactivo de detección *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare, Madrid, España) en equipo de revelado *ImageQuant™ LAS 4000* (GE Healthcare, Madrid, España). Como proteína de control endógena para la normalización se utilizó actina beta. En la **Tabla 14** se reflejan todas las características de los tampones, anticuerpos y reactivos utilizados durante el proceso.

Tabla 14. Tampones, reactivos y anticuerpos utilizados para western-blot. Los anticuerpos se diluyeron siempre en PBS-Tween 1x suplementado con un 5% de leche.

Producto/Anticuerpo	Descripción	Casa comercial	Referencia
Tampón de electroforesis	(3g trizma, 14,4g glicina, 1g SDS) / litro	N/D	N/D
Tampón de transferencia	3g trizma, 14,4g glicina, 100ml metanol, 900ml agua	N/D	N/D
Tampón de extracción (stripping buffer)	(2,9g NaCl, 3,7g glicina)/500 ml agua; pH=2,8	N/D	N/D
Acrilamida/Bisacrilamida	ProtoGel 40%	National diagnostics	EC-891
Tampón de bloqueo	PBS-Tween 1x + 5% leche en polvo	N/D	N/D
Tampón de carga		N/D	N/D
Membrana de PVDF	Amersham Hybond PVDF 0,45 µm	GE Healthcare	10600023
Papel de filtro	Whatman qualitative filter paper	GE Healthcare	1003-917
Medio de activación	Metanol 1 minuto sobre PVDF	Merck	1.06009.1000
Ditiotreitol	DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich	D5545-5G
Anti ER alfa	Monoclonal de conejo; 1/500	Abcam	ab32063
Anti SDF1	Policlonal de cabra; 0,2 µg/ml	Abcam	ab10395
Anti-F3	Monoclonal de ratón; 1:500	Abcam	ab17375
Anti-THBS1	Monoclonal de ratón; 1/500	Abcam	ab1823
Anti-PDGF	Policlonal de conejo; 0,2 µg/ml	Abcam	ab9704
Anti-HIF1A	Monoclonal de ratón; 1/2000	Abcam	ab16066
Anti-MYBL2	Policlonal de conejo; 1/2500	Abcam	ab12296
Anti-VEGFA	Policlonal de conejo; 1 µg/ml	Abcam	ab46154
Anti actina beta	Monoclonal de ratón; 1:5000	Sigma-Aldrich	A5441-2ML
Secundario anti conejo	Anti-Rabbit ECL; 1:5000	GE Healthcare	NA9340V
Secundario anti cabra	Anti Goat/Sheep; 1:5000	Sigma-Aldrich	A-9452
Secundario anti ratón	Anti-Mouse ECL; 1:5000	GE Healthcare	NA931V

Análisis de la proliferación celular mediante métodos colorimétricos (XTT)

Dos días previos al día de inicio del ensayo se sembraron 5000 células por pocillo en un volumen final de 100 µl de medio de cultivo, así como dos blancos conteniendo 100 µl de medio de cultivo sin células. Un día previo al inicio del ensayo se transfectaron las células con miRNA *mimics* o inhibidores, así como los controles adecuados. La proliferación celular se evaluó utilizando el kit *XTT Cell Proliferation Kit II* (Roche Life Science, Madrid, España) en placas de 96 pocillos, cada condición por octuplicado.

Previo al ensayo los reactivos de XTT y el acoplador de electrones se agitaron e incubaron a 37°C hasta equilibrar la temperatura. La mezcla de ambos reactivos se realizó en función del número de pocillos siguiendo una relación de 5 ml de XTT y 0,1 ml de acoplador de electrones por cada 96 pocillos. Los reactivos una vez mezclados se volvieron a agitar vigorosamente y se dispensaron con pipeta multicanal a razón de 50 µl por pocillo. La placa se incubó a 37°C; 5%CO₂ durante 4 horas tras lo cual se realizaron lecturas de absorbancia a 450 nm en lector de placas Synergy HT (Biotek, Winooski, VT, USA), previa agitación durante 30 segundos. Se tomaron medidas en los tiempos: 0, 24, 48 y 72 horas. Las condiciones utilizadas en cada caso se muestran en la sección de **Resultados**.

Estudios de apoptosis por fluorimetría

El estatus apoptótico celular en presencia de miRNA *mimics*, inhibidores y controles se ensayó utilizando el kit *Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay* (Promega Biotech Ibérica,

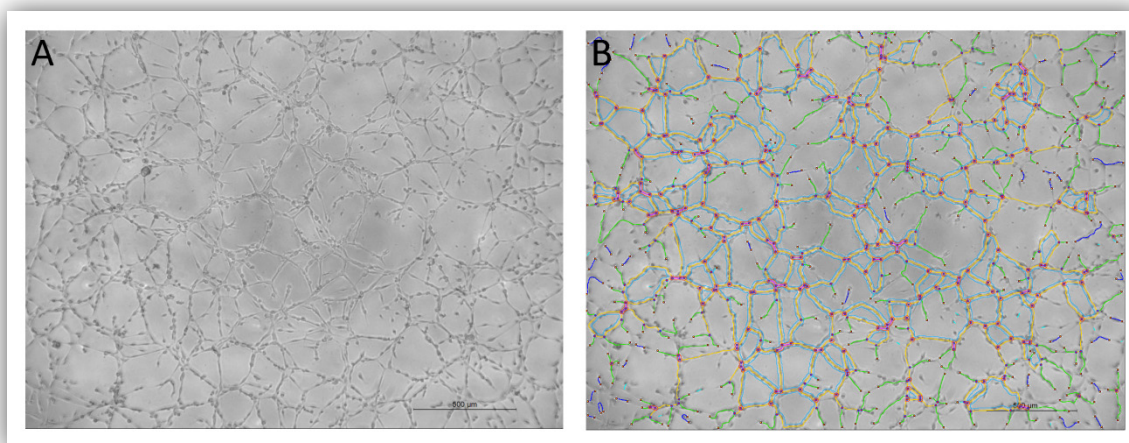
Madrid, España). Previamente al inicio del ensayo se sembraron en placas de cultivo aptas para fluorimetría 5000 células por pocillo en un volumen final de 100 µl de medio de cultivo, así como dos blancos conteniendo 100 µl de medio de cultivo sin células. Al día siguiente se transfectaron las células con miRNA *mimics* o inhibidores, así como los controles adecuados y se dejaron crecer hasta 48 horas. Cada condición se ensayó por cuadruplicado. Además se estudió el efecto en presencia de 1 y 10 nM de docetaxel (Actavis, Dublín, Irlanda). Se agitaron y mezclaron el reactivo sustrato de caspasas y el tampón apo-ONE. Se añadieron 100 µl de la mezcla por pocillo, se agitó a 300 rpm durante 30 segundos y se incubó durante 30 minutos en oscuridad. La lectura de fluorescencia se realizó con longitud de onda de excitación a 485 nm y de emisión de 530 nm.

Evaluación in vitro del potencial angiogénico

Para el análisis *in vitro* del efecto que las células tumorales ejercen sobre la capacidad de formación de redes vasculares de células modelo endoteliales, se transfectaron MCF7 y MDA-MB-231 con miRNA *mimics* o inhibidores y sus respectivos controles. Al día siguiente de la transfección, éstas se lavaron dos veces con PBS y se añadió DMEM 1 g/l glucosa sin suero bovino fetal, 1% glutamax, 1% piruvato, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de gentamicina y sin rojo fenol (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Se incubaron durante 24 horas y el medio de cultivo condicionado se recogió, se centrifugó a 10.000g por 10 minutos y se concentró 10 veces con columnas de 10 MWCO (GE Healthcare, Madrid, España), tras lo cual se almacenó a -30°C hasta la realización del ensayo de angiogénesis.

El día de inicio del ensayo, se añadieron 9 µl de *Matrigel™ Basement Membrane Matrix* (BD Biosciences, Madrid, España) directamente sobre la superficie de pocillos de placa de 96 (cada condición se ensayó por octuplicado) y se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante una hora. Se sembraron entonces 15.000 células EA.hy926 (en fase de crecimiento exponencial) por pocillo en un volumen total de 200 µl de medio de cultivo condicionado por las células tumorales. Se agitaron y se incubaron entonces por 18 horas, tras lo cual se tomó una fotografía de las redes de cada pocillo y se analizó posteriormente la longitud total de las redes vasculares utilizando el módulo para ImageJ *Angiogenesis analyzer* [377, 378] (**Figura 2**).

Figura 2. La evaluación de la longitud total de los vasos formados por células EA.hy926 (modelo endotelial) creciendo en medio condicionado se evaluó utilizando el programa ImageJ. De cada pocillo se tomó una imagen y se analizó con el módulo *Angiogenesis Analyzer*. Posteriormente los datos se registraron en una base de datos de IBM SPSS 21.0 y se analizaron mediante test no paramétricos. A: imagen modelo de formación de redes vasculares *in vitro*. B: Resultado visual del análisis de la longitud total de la red vascular (naranja).



Imunohistoquímica y digitalización de imágenes

Para la realización de IHQ de parafina de cultivos celulares, a partir de células crecidas en placas de 6 pocillos y tratadas con miRNA *mimics* o inhibidores por triplicado se despegaron utilizando tripsina, se centrifugaron a 200g durante 5 minutos y se fijaron durante 24 horas en formaldehído al 37% estabilizado con 15% de metanol. Tras el proceso de fijación, las células aglutinadas se incluyeron en parafina y se cortaron en micrótopo de anatomía patológica. Las células se tiñeron posteriormente en autoteñidor AutostainerLink 48 con el anticuerpo anti receptor de estrógenos *Flex REα clone EP1* utilizado en la práctica clínica habitual de nuestro Servicio (Dako, Barcelona, España).

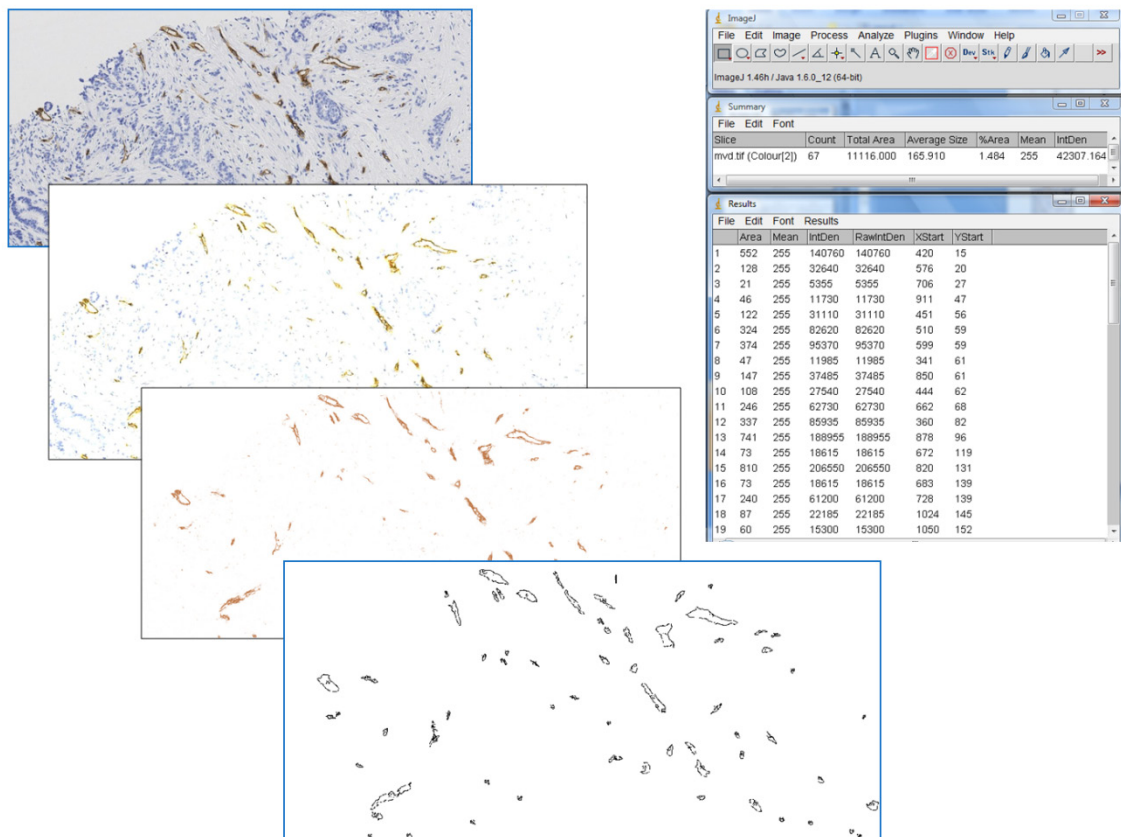
Patología y evaluación vascular

La evaluación vascular se realizó en secciones completas de 4 µm obtenidas de los bloques tumorales incluidos en parafina, tras desbastar y desechar las primeras secciones, tanto de biopsia prequimioterapia (aspirado con aguja) como de biopsia postquimioterapia (bloque quirúrgico). En los casos en los que se obtuvo RCp, las secciones se obtuvieron a partir del lecho tumoral, previamente marcado por un anatomopatólogo especializado en cáncer de mama.

Para la tinción inmunohistoquímica (IHQ) de los capilares presentes en las secciones se utilizó un anticuerpo anti-CD34 (Clon QBEnd-10; #M7165; DAKO, Glostrup, Dinamarca). La IHQ se realizó en un autoteñidor (Autostainer Link 48, DAKO, Carpintería, CA, USA), según recomendaciones del fabricante. Para minimizar la variabilidad analítica se realizaron en paralelo las tinciones para pre- y postquimioterapia de cada paciente. Para el sistema de anticuerpo secundario y revelado se utilizaron los estándares de DAKO Envision.

Cada porta teñido se digitalizó utilizando un sistema de escáner automático de portas (Leica SCN400F) disponible en el Servicio de Análisis de Imagen del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. Los datos se almacenaron codificados en los servidores en red del SAI hasta su análisis posterior. Por cada sección se obtuvieron entre tres y cinco fotografías digitales (para un área total de 2,40–4,00 mm²) por dos observadores independientes. Aquellas secciones teñidas inadecuadamente o con menos de tres campos evaluables se excluyeron del estudio. En colaboración con la Dra. Fara Sáez Belmonte (SAI-Universidad de Murcia) se implementó un método automatizado de análisis de imagen para determinar la densidad microvascular (MVD, normalizada a 0,20 mm² por campo) y el tamaño promedio de vasos (MVS, área de vaso por vaso, en μm²) utilizando el sistema de macros del programa ImageJ (NIH) [378] (**Figura 3**) y **Anexo III**.

Figura 3. Flujo esquemático de trabajo para la evaluación vascular.



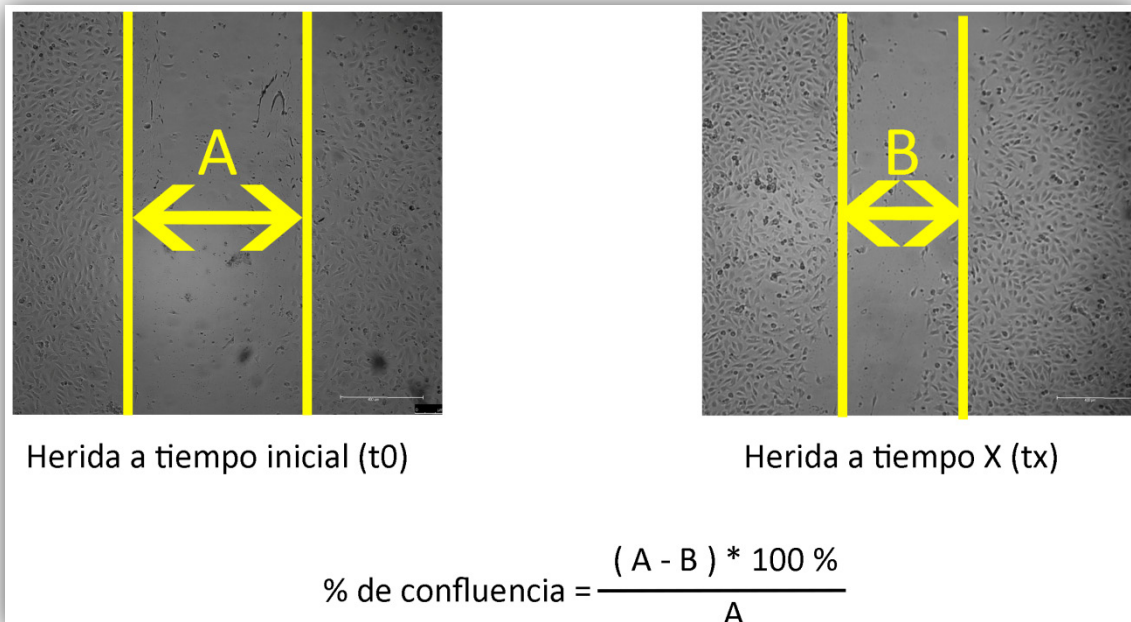
Se evaluó a su vez la presencia de proliferaciones microvasculares glomeruloides (GMP), según la definición de Akslen y colaboradores [206] en secciones completas. Los casos fueron considerados como GMP+ si se observaba al menos una estructura GMP. Al no existir criterios estandarizados disponibles para la evaluación de los cambios vasculares, la respuesta

angiogénica se definió arbitrariamente como cualquier descenso en la MVD basal tras quimioterapia neoadyuvante.

Ensayos de migración celular

Los ensayos de migración celular se realizaron utilizando células MDA-MB-231 (con capacidad de movimiento) transfectadas con miRNA *mimics* o inhibidores y sus respectivos controles. Se sembraron $5 \cdot 10^4$ células por pocillo en placas de 96 (por cuadruplicado) para conseguir confluencia máxima. Al día siguiente se practicó un trazado o herida sobre el césped celular utilizando una punta de 10 μ l estéril y se adquirieron las imágenes de ésta a tiempo cero en microscopio con contraste de fases Leica AF6000. Transcurridas ocho horas se adquirieron imágenes en el mismo punto para la determinación del área invadida por las células. La cuantificación del área invadida se determinó utilizando ImageJ (NIH) [378]. El cálculo del área invadida o porcentaje de confluencia se realizó de acuerdo a la **Figura 4**.

Figura 4. Para el análisis de migración celular se practica un trazado o herida sobre un césped confluyente de células adherentes con capacidad migratoria y se toma una imagen (definida como imagen a tiempo 0). Pasado un tiempo determinado que depende de factores como la línea celular y las condiciones experimentales, se toma una nueva imagen (definida como imagen a tiempo X). El % de confluencia (o área de la herida invadida) se calcula por la fórmula $\% \text{ confluencia} = ((A - B) / A) * 100 \%$. Para la normalización de los datos se tomó como referencia el valor migrado por el control experimental.



Ensayos de invasión celular

Los ensayos de invasividad se realizaron utilizando células MDA-MB-231 transfectadas con miRNA *mimics* o inhibidores y sus respectivos controles. Para el ensayo se utilizaron placas de invasión celular de 24 pocillos con insertos cubiertos por Matrigel en su base (*BD BioCoat Matrigel Invasion Chamber*) y con un tamaño de poro de ocho micrómetros. Se sembraron $2,5 \times 10^5$ células por pocillo (por triplicado) en medio DMEM sin suero bovino fetal en la capa superior del inserto de invasión. Como quimioatrayente se utilizó DMEM con suero bovino fetal en la parte inferior de los insertos. Pasadas 24 horas se retiraron las células de la capa superior que no habían migrado, y las células de la capa inferior se fijaron, tiñeron con cristal violeta y se contaron utilizando microscopio óptico con contraste de fases Leica AF6000.

Construcción de serie clínica de validación

Para la validación parcial de los resultados obtenidos en nuestra serie, se construyó una serie clínica de adyuvancia con RNA obtenido a partir de muestras de tejido fresco con cáncer de mama criopreservado, amablemente cedida para su análisis por el Dr. Pablo Conesa Zamora del Hospital General Universitario Santa Lucía de Cartagena. El RNA fue extraído utilizando el kit RNeasy FFPE (QIAGEN, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las características de la Serie se muestran en el **Anexo IV**.

Construcción de bases de datos externas

Para la construcción de las bases de datos de validación de resultados se utilizaron las bases de datos de cáncer de mama: GSE19536, GSE22219, GSE25066 depositadas en GEO [379-383], así como la base de datos del TCGA [52] (**Tabla 15**). Los datos brutos recopilados se utilizaron para construir series de datos clínico-biológicos en IBM SPSS Statistics 21 (IBM, Armonk, NY, USA) y se analizaron de forma análoga y en paralelo a nuestra serie del Hospital Morales Meseguer.

Tabla 15. Resumen de las series clínicas de cáncer de mama utilizadas a lo largo de la tesis doctoral para el contraste de hipótesis.

Serie	ID	Número de casos*	Tipo de serie	Referencias
Oslo	GSE19536	116	Adyuvancia	[380]
Oxford	GSE22219	216	Adyuvancia	[381]
Woburn	GSE25066	508	Neoadyuvancia	[382, 383]
TCGA	TCGA	1098	Adyuvancia	[52]

*Casos totales, incluyendo tumor primario, metástasis y tejido sano.

Análisis de la expresión génica por microarray de tejidos

Para profundizar en mecanismos genómicos que desencadenan la sobre-expresión o el silenciamiento de microRNAs, se realizaron microarrays de expresión génica (3 por grupo) a partir de RNA de células cultivadas durante 48 horas y previamente transfectadas (200.000 por

pocillo) con 100 nM demir-18a *mimic*, LNA antimir-18a y dos controles de transfección (para *mimic* y para LNA) utilizando *Human Gene 2.1 ST Array Strips (902114)* (Affymetrix, Santa Clara, Estados Unidos) en la plataforma de Affymetrix del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia. Los resultados se analizaron con los paquetes de software *Transcriptome Analysis Console* (Affymetrix, Santa Clara, Estados Unidos) y con *Partek Genomics Suite* (Partek, St. Louis, Estados Unidos).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando IBM SPSS Statistics 21 (IBM, Armonk, NY, USA). Para todo tamaño muestral menor a treinta se utilizaron test no paramétricos. Para tamaños muestrales mayores o iguales a treinta se aplicaron test paramétricos siempre que se cumpliesen criterios de normalidad y homocedasticidad, en caso contrario, se aplicaron test no paramétricos. Para la comprobación de la heterogeneidad de dos muestras nominales se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Para la comprobación de la heterogeneidad de tres o más muestras nominales se utilizó la prueba H de Kruskal-Wallis. La comparación de proporciones se realizó utilizando la prueba Chi cuadrado. El grado de correlación entre variables continuas se analizó con el coeficiente de correlación de Spearman.

Los cambios en los parámetros vasculares y en la expresión de los biomarcadores se evaluaron entre los dos puntos temporales utilizando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Para las comparaciones múltiples se ajustó el valor p mediante el procedimiento de Holm-Bonferroni [384]. El análisis de asociación con respuesta se realizó mediante regresión logística binaria. La supervivencia global (SG), supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia libre de recaída a distancia (SLRD) se analizaron mediante el método de Kaplan-Meier. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el test de log-rango. Para el análisis multivariante de supervivencia, se construyeron modelos de regresión de Cox, en las que todas las variables fueron introducidas directamente, seleccionándose las significativas. En todos los casos el contraste estadístico fue bilateral. El nivel de significación estadística para la verificación de las hipótesis se definió como p valor de 0,05.

RESULTADOS

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y ANATOMOPATOLÓGICA DE LA SERIE CLÍNICA OBJETO DE ESTUDIO

1.1 Análisis descriptivo de las características tumorales

Se incluyeron 121 mujeres diagnosticadas con cáncer de mama entre 2001 y 2008 (la mayoría entre 2004 y 2008), en estadios II-III. Todas ellas fueron sometidas a tratamiento con quimioterapia preoperatoria. Las características clínicas y anatomopatológicas se muestran en la **Tabla 16**. Las pacientes tenían una mediana de edad de 56 años (rango 21-79). El 50% eran premenopáusicas al diagnóstico. Un 54,5% de las pacientes se incluyeron en el programa de tratamiento neoadyuvante por presentar al diagnóstico cáncer de mama operable no susceptible de cirugía conservadora; el resto, por corresponder a tumores localmente avanzados. Los estadios clínicos de la serie fueron: IIA: 15,7%; IIB: 28%; IIIA: 33%; IIIB 6,6%; IIIC: 16,5%. El tumor presentó un tamaño mayor de 5 cm en el 47% de los casos. El 93% presentó tumores con tipo histológico ductal. Un 49,6% de los casos presentaron grado histológico 3. La afectación linfovascular al diagnóstico se presentó en un 17,4% de las pacientes. Las muestras de tejido tumoral FFPE (fijadas e incluidas en parafina) se obtuvieron del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Morales Meseguer.

Tabla 16. Características clínico-patológicas al diagnóstico

Variable	Número	%
N	121	100%
Edad (mediana; min-max)	56,4 (21-79)	
Antecedentes familiares cáncer mama		
No	97	80,2
Sí	23	19,0
Desconocido	1	,8
Status menopáusico		
Postmenopausia	60	49,6
Premenopausia	61	50,4
Motivo de neoadyuvancia		
Cáncer de mama operable	66	54,5
Cáncer de mama localmente avanzado	55	45,5
Motivo de consulta		
Cribado	23	19,0
Síntomas	98	81,0
Estadio clínico		
IIA	19	15,7
IIB	34	28,1
IIIA	40	33,1
IIIB	8	6,6
IIIC	20	16,5
Estadio clínico tumor primario		
T1-2	52	43,0
T3-4	69	57,0
Estadio clínico ganglionar		
N0-1	75	62,0

N2-3	46	38,0
Tipo histológico		
Ductal	113	93,4
Lobulillar	5	4,1
Otros	3	2,5
Grado histológico		
GI-II	46	38,0
GIII	61	54,4
No disponible	14	11,6
Afectación linfovascular		
No	90	74,4
Sí	22	18,2
No disponible	9	7,4
Carcinoma in situ en BAG diagnóstica		
Ausente	50	45,5
Presente	60	54,5
No disponible	11	9,1
Receptores hormonales		
Negativo	39	32,2
Positivo	80	66,1
No disponible	2	1,7
Sobreexpresión Her2		
Negativo	87	71,9
Positivo	29	24,0
No disponible	5	4,1
Triple negativo		
No	90	74,4
Sí	26	21,5
No disponible	5	4,1
Subtipos IHQ prequimioterapia		
HR+	61	50,4
HR+ HER2+	16	13,2
HER2NEU+	13	10,7
Triple Negativo	26	21,5
No disponible	5	4,1
Estudio axilar al diagnóstico		
Axila clínicamente palpable	62	51,0
Axila ecográficamente positiva	81	67,5
Axila ecográficamente dudosa	5	4,2
PAAF positiva	67	72,8
BSGC realizada	28	23,1
Positividad BSGC	9	7,4

El estudio IHQ objetivó un 32% de negatividad para receptor de estrógenos (RE-), progesterona (PR-) o ambos (RE-RP-) y se observó sobreexpresión de Her2 (Her2+) en el 24% de los tumores. En total, un 50,4% de las pacientes presentaron tumores con expresión positiva de receptores hormonales, un 13,2% de los casos Her2+. Un 10,7% de los casos fueron RE-RP-Her2+ y un 21,5% fueron triple negativo (RE-RP-Her2-). Un 4% de los casos no fueron clasificables por insuficiencia de datos.

Las metástasis ganglionares se confirmaron citológicamente al diagnóstico en un 55% de las pacientes. En la mayor parte de los casos restantes se realizó biopsia selectiva de ganglio centinela como parte del estudio de extensión tumoral (23% de las pacientes), siendo positiva la prueba en el 32% de los casos analizados (un 7,4% del total de la serie). La causa del bajo número de casos positivos en la técnica utilizada se atribuyó al estudio radio- y citológico detallado en la axila, realizado habitualmente en nuestro Servicio.

El esquema de tratamiento quimioterápico administrado y la cirugía realizada se resumen en la **Tabla 17**. Un 80,2% de las pacientes recibieron quimioterapia preoperatoria con el esquema de tratamiento ACx4 (antraciclinas) seguido de DOCx4 (docetaxel). En un 8,3% de los casos se administró Paclitaxel semanal tras antraciclinas. Un 1,7% fueron tratadas sin antraciclinas y el 3,3% recibieron esquemas sin taxanos. Un 4% (5 pacientes) recibieron trastuzumab adyuvante. Ocho de las pacientes con sobreexpresión de Her2 al diagnóstico no recibieron trastuzumab debido a que el diagnóstico fue anterior a la aprobación del fármaco.

El tipo de cirugía tras quimioterapia fue conservadora en el 41,3% de los casos, con ampliación de márgenes en un 2,5% de estos y necesitándose en un 4% de las mismas mastectomía de rescate tras cirugía conservadora inicial. Se realizó linfadenectomía en el 86% de los casos, siendo el número de ganglios linfáticos obtenidos de al menos diez en un 97,5% de las pacientes (**Tabla 17**).

Tabla 17. Datos de tratamiento.

Variable	Número	%
N	121	100%
Esquema de tratamiento		
ACx4 – Docetaxelx4	97	80,2
Antraciclinas y Paclitaxel semanal	10	8,3
Esquemas sin antraciclinas	2	1,7
Esquemas con antraciclinas sin taxanos	4	3,3
Esquemas antraciclinas y taxanos concomitantes	8	6,6
Quimioterapia adyuvante		
No	107	88,4
Sí	14	11,6
Tratamiento con trastuzumab		
No	99	81,8
Neoadyuvante y adyuvante	17	14,0
Sólo adyuvante	5	4,1
Cirugía		
Mastectomía	62	51,7
Cirugía conservadora	50	41,3
Cirugía conservadora y mastectomía de rescate	5	4,1
Cirugía conservadora y ampliación de márgenes	3	2,5
No disponible	1	,8

Linfadenectomía	104	86,0
<5 ganglios resecaos	1	,8
6-9 ganglios resecaos	2	1,7
10-15 ganglios resecaos	28	23,1
16-20 ganglios resecaos	29	24,0
21-25 ganglios resecaos	19	15,7
>25 ganglios resecaos	25	20,7
No disponible	2	1,7

La respuesta completa patológica (RCp, definida como ypT0/ypTis ypN0) se alcanzó en un 17,4% de los casos. En un 20,8% de las pacientes se alcanzó RCp a nivel de tumor primario y en un 26,4% se obtuvieron RCp axilares. La distribución de estadios patológicos post-QT fue de un 17,4% estadio 0, 9,9% estadio IA, 24% estadio IIA, 16,5% estadio IIB, 22,3% estadio IIIA, 2,5% IIIB y 5,8% estadio IIIC. Por estudio IHQ del tumor residual se encontraron un 52,1% con RH+ Her2-, un 5% RH+ Her2+, un 2,5% RH- Her2+ y un 13,2% triple negativo. Un 6,6% de las pacientes no fueron clasificables (**Tabla 18**).

Tabla 18. Datos anatomopatológicos del tumor residual.

Variable	Número	%
N	121	100 %
Estadio patológico		
0	20	17,4
IA	12	9,9
IB	0	0
IIA	29	24,0
IIB	20	16,5
IIIA	27	22,3
IIIB	3	2,5
IIIC	7	5,8
No disponible	1	1,7
Respuesta completa patológica		
RCp global (ypT0/Tis ypN0)	21	17,4
RCp tumor primario (ypT0/Tis)	25	20,7
RCp ganglionar (ypN0)	32	26,4
Estadio patológico tumor primario		
ypT0	17	14,0
ypTis	8	6,6
ypTmic	4	3,3
ypT1a	5	4,1
ypT1b	6	5,0
ypT1c	11	9,1
ypT2	42	34,7
ypT3	20	16,5
ypT4a	0	0
ypT4b	1	,8
ypT4c	0	0
ypT4d	5	4,1
ypTx	1	,8
No disponible	1	,8

Estadio patológico ganglionar		
pN0i-	43	37,2
pN0i+	0	0
pN1mic	6	5,0
pN1a	22	18,2
pN1b	0	0
pN1c	1	,8
pN2a	23	19,0
pN2b	0	0
pN3a	7	5,8
pN3b	0	0,0
pN3c	0	0,0
No realizada linfadenectomía	16	13,2
Grado histológico		
G1	18	15,5
G2	40	34,5
G3	31	26,7
No disponible	32	26,4
Multicentricidad en tumor residual		
Ausente	86	71,1
Presente	11	9,1
No disponible	24	19,8
Afectación linfovascular		
No	74	61,2
Sí	43	35,5
No disponible	4	3,3
Multifocalidad en tumor residual		
Ausente	66	54,5
Presente	32	26,4
No disponible	23	19,0
Carcinoma in situ en tumor residual		
Ausente	32	26,4
Presente	85	70,2
No disponible	4	3,3
Receptores hormonales		
Negativo	21	17,4
Positivo	70	57,9
No disponible (RCp y No disponible)	30	24,8
Sobreexpresión HER2NEU		
Negativo	79	65,3
Positivo	8	6,6
No disponible (RCp y No disponible)	34	28,1
Triple negativo		
No	72	59,5
Sí	16	14,3
No disponible (RCp y No disponible)	33	27,3
Subtipos IHQ en el grupo sin RCp		
HR+HER2-	63	52,1
HR+HER2+	4	3,3
HR-HER2+	5	4,1
Triple negativo	16	13,2

No disponibles

7

5,8

1.2 Valor predictivo de respuesta según las características tumorales

El subtipo tumoral se asoció al estadio patológico 0 ($p < 0,001$) y a la RCp en tumor primario ($p < 0,001$), pero no a la RCp axilar ($p = 0,4$) (Tabla 19). En el análisis univariante de las características clínico-patológicas en relación con RCp se observó que eran variables predictoras de RCp la expresión de receptores hormonales, el grado histológico tumoral, la sobreexpresión de Her2 y los subtipos IHQ (Tabla 20). En el análisis multivariante para la RCp se incluyó el fenotipo tumoral y el grado histológico, manteniéndose únicamente el fenotipo tumoral como variable predictiva de RCp (Tabla 21).

Tabla 19. Asociación entre respuesta patológica y fenotipo tumoral.

Variable	N	RCp	ypT0/ypTis	ypN0
Todas las pacientes	121 (100%)	21 (17,4%)	25 (20,8%)	32 (26,4%)
HR+ HER2-	61 (50,4%)	2 (3,3%)	3 (4,9%)	12 (19,7%)
HR+ HER2+	16 (13,2%)	3 (18,8%)	3 (18,8%)	4 (25,0%)
HR- Her2+	13 (10,7%)	8 (61,5%)	8 (61,5%)	6 (46,2%)
Triple negativo	26 (21,5%)	7 (26,9%)	7 (26,9%)	10 (38,5%)

Tabla 20. Análisis univariante: características clínicas/anatomopatológicas y RCp.

Variable independiente	OR	IC95%	p
Estatus menopáusico: premenopausia	1,87	,71 - 4,91	,20
Edad:>40 años	,75	,22 - 2,57	,65
Estadio clínico: IIIA-IIIC	1,30	,49 - 3,41	,59
Estadio clínico tumor primario: T3-4	1,66	,61 - 4,48	,31
Estadio clínico ganglionar: N2-3	1,59	,61 - 4,11	,33
Tipo histológico	1,03	,29 - 3,67	,96
Grado histológico: Grado III	6,14	1,68 - 22,40	,006
Afectación linfovascular	,18	,02 - 1,49	,11
HR positivos	,13	,04 - ,37	,0001
HER2 positivo	5,22	1,88 - 14,49	,001
Fenotipo tumoral	2,08	1,38 - 3,14	,0004

Tabla 21. Análisis multivariante: características clínicas/anatomopatológicas y RCp.

Variable independiente	OR	IC95%	p
Grado histológico	3,49	,88 - 13,81	,075
Fenotipo tumoral	1,87	1,19 - 2,93	,006

1.3 Valor pronóstico de las características tumorales

La mediana de seguimiento de las pacientes fue de sesenta meses. No se alcanzó la mediana de seguimiento para supervivencia global (SG), supervivencia libre de enfermedad (SLE) ni para la supervivencia libre de recaída a distancia (SLRD) (**Figura 5**). En el momento de la última actualización, han fallecido 22 pacientes (18%): 19 de ellas a causa de la enfermedad, una por toxicidad durante el tratamiento (fiebre neutropénica), una por insuficiencia cardiaca tardía y otra debido a un carcinosarcoma uterino que se desarrolló a lo largo del seguimiento de su cáncer de mama. Se observaron un 23,1% de recaídas, siendo un 13,3% a distancia, un 5,8% locales y a distancia concomitadamente y un 3,3% locales. La localización más frecuente de recaída fue ósea (9,2%), pulmonar (7,5%) y ganglionar (6,7%) (**Tablas 22 y 23**). La **Figura 5** muestra las curvas de supervivencia para el grupo completo.

Figura 5. Gráficas de supervivencia general de la serie. No se alcanzó la mediana de seguimiento en ningún caso.

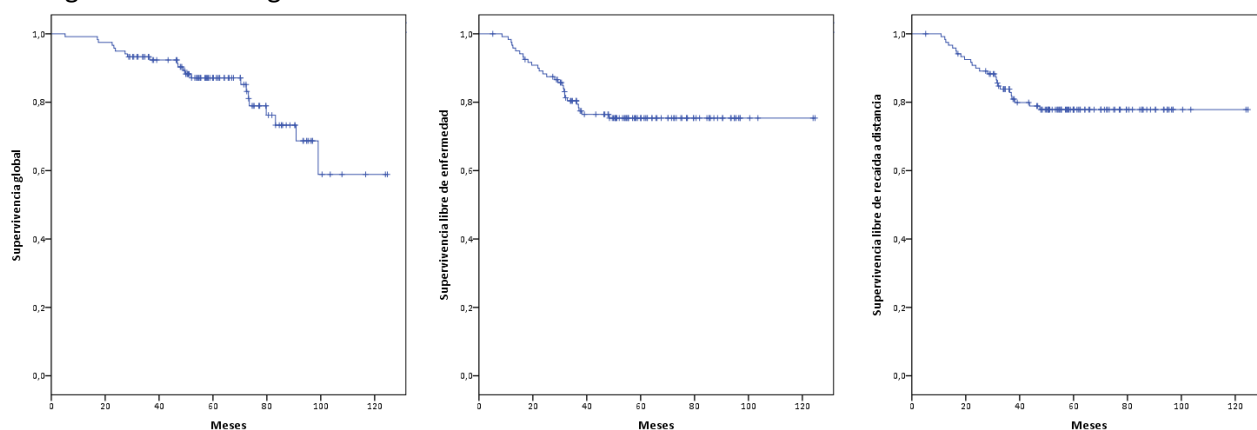


Tabla 22. Recaídas.

Variable	Número	%
N	121	100%
Recaída	28	23,1
Totales	4	3,3
Locales	1	,8
Contralateral	16	13,3
A distancia	7	5,8

Tabla 23. Recaídas a distancia.

Variable	Número	%
N	121	100%
Recaídas a distancia		
Pulmonar	9	7,5
Ósea	11	9,2
Hepática	6	5,0
Ganglionar	8	6,7

Cerebral	3	2,5
Otras	3	2,5

El análisis de supervivencia objetivó la presencia de RCp ganglionar como factor de buen pronóstico para SLE ($p < 0,001$), SLRD ($p < 0,001$) y SG ($p = 0,02$). La RCp fue factor de buen pronóstico para SLE ($p < 0,04$) (**Figura 6**). Al analizar según las características clínico-patológicas relevantes se observó que la presencia de afectación linfovascular al diagnóstico se correlacionó con peor SLE ($p = 0,03$) y SLRD ($p = 0,04$). La afectación ganglionar voluminosa al diagnóstico fue de mal pronóstico para SG ($p = 0,01$), SLE ($p = 0,004$) y SLRD ($p = 0,002$) (**Tabla 24**). En el análisis multivariante por regresión de Cox para SLE se incluyó el estadio clínico ganglionar al diagnóstico, la RCp y el fenotipo, asociándose solo los dos primeros, de forma independiente al fenotipo. Para SG solo el estadio ganglionar al diagnóstico se asoció de forma independiente (**Tabla 25**).

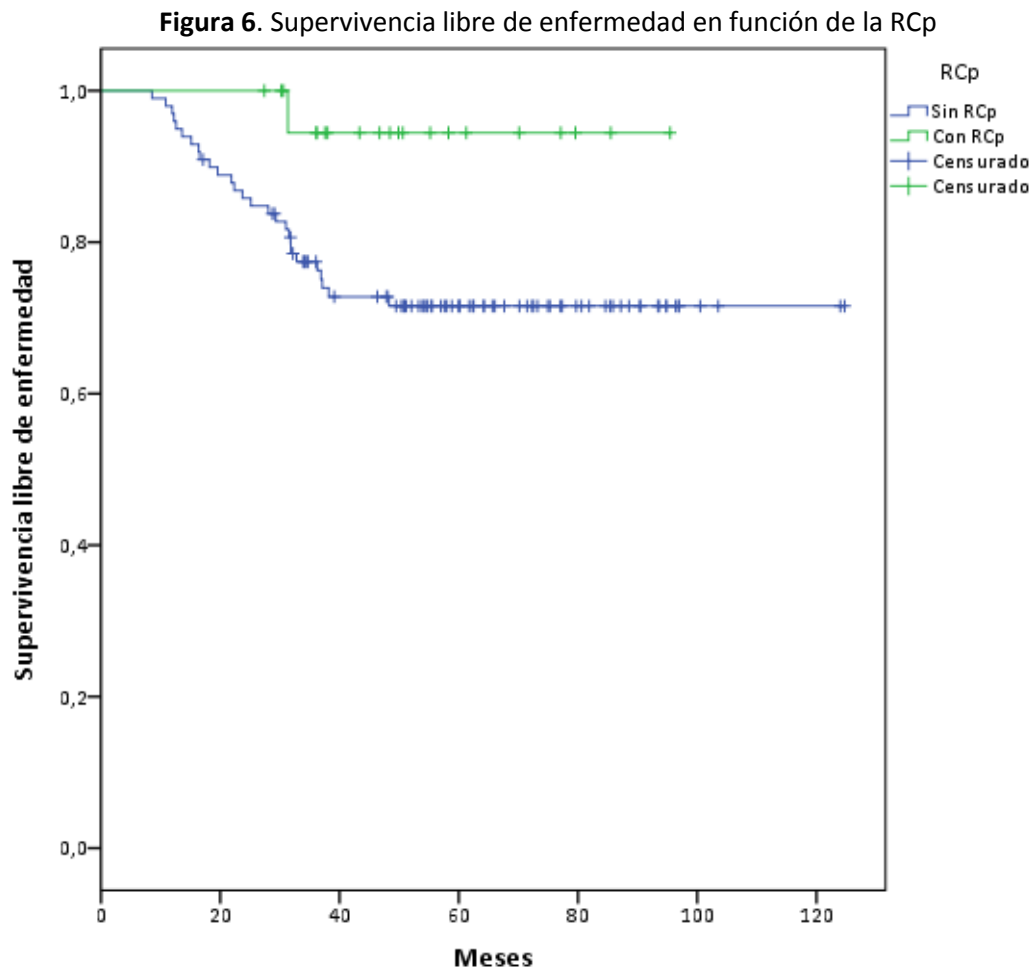


Tabla 24. Análisis de supervivencia por variables clínicas y anatomopatológicas.

Variable	SLE	SLRD	SG
----------	-----	------	----

RCp	,04	,06	,68
ypNO	,00006	,00001	,02
ypT0/ypTis	,16	,23	,86
HR+	,26	,78	,10
Grado histológico: GIII	,09	,23	,11
Afectación linfovascular	,03	,04	,11
Sobreexpresión Her2	,74	,92	,73
Fenotipo tumoral	,43	,91	,22
Estadio clínico: IIIA-IIIC	,16	,13	,31
E. clínico tumoral: T3-4	,06	,07	,12
E. clínico ganglionar: N2-3	,004	,002	,01
Estatus menopáusico: premenopausia	,75	,82	,58
Edad: >40 años	,33	,17	,35

Tabla 25. Análisis multivariante de supervivencia para características clínicas y anatomopatológicas.

Variable	SLE			SG		
	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p
Variable independiente						
Estadio clínico ganglionar:N2-3	2,84	1,25 – 6,43	,01	3,86	1,38 – 10,77	,01
RCp	,10	,01 - ,79	,02	,21	,02 – 1,70	,14
Fenotipo tumoral	1,22	,90 - 1,65	,19	1,20	,81 – 1,76	,34

1.4 Conclusiones del Capítulo I

Como conclusión del primer capítulo de resultados, nuestra serie de pacientes con cáncer de mama localmente avanzado (n=121) presenta un buen balance de pre- y postmenopáusicas. Hay buena representación del fenotipo luminal y escasa en Her2+ y triple negativo. La mayoría de los tumores presentaron histología ductal. El tratamiento fue homogéneo, basado en antraciclinas y taxanos; consiguiéndose una tasa de RCp del 17%. El subtipo tumoral fue la mejor variable predictiva de RCp. La RCp fue un factor de buen pronóstico para SLE. La afectación ganglionar extensa fue un factor de mal pronóstico para SLE. No se alcanzó la mediana de seguimiento para SG, SLE ni SLRD.

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN BASAL DEL ESTADO DE LOS BIOMARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS CON ANGIOGÉNESIS Y SU ASOCIACIÓN CON EL PRONÓSTICO Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

2.1 Análisis *in silico* de microRNAs y sus potenciales mRNA diana

Para evaluar la posible relevancia de los microRNA estudiados en la regulación de factores relacionados con la angiogénesis, se realizó un estudio *in silico* centrado en angiogénesis. Además de los miembros del clúster miR-17-92, se seleccionaron otros microRNAs interesantes que se conoce que pueden jugar un papel relevante en la angiogénesis del cáncer de mama, bien por lo descrito previamente en la literatura en otras neoplasias, o bien por sus mRNA diana. El estudio *in silico* con herramientas bioinformáticas (**Tabla 26**) presenta una heterogeneidad importante en las predicciones según se utilice una u otra herramienta. Por ello, realizamos un estudio combinado aprovechando el algoritmo de miRWalk 2.0, que permite encontrar valores positivos para la interacción de pares miRNA:mRNA de forma simultánea en varias bases de datos. Así, encontramos que en general los miRNA seleccionados obtuvieron puntuaciones altas para factores implicados directa o indirectamente en angiogénesis y proliferación, con especial atención a *VEGFA* y *THBS1*.

Tabla 26. Matriz mostrando los resultados del análisis *in silico* de los microRNAs y sus posibles mRNA diana. A mayor número de coincidencias en bases de datos, mayor probabilidad de existir una regulación cruzada.

mRNA/miRNA	-200c	-429	-141	-18a	-19b	-20a	-519c	-107	-17	-92a	-106b	-9
<i>CXCL12</i>	3	2	6	6	5	1	5	2	6	4	4	6
<i>F3</i>	4	4	1	5	5	6	6	0	6	3	6	1
<i>HIF1A</i>	2	1	2	5	3	4	4	1	5	1	4	1
<i>PDGFA</i>	3	4	5	2	3	3	2	4	4	3	5	1
<i>THBS1</i>	3	2	5	5	5	5	3	2	4	1	2	2
<i>VEGFA</i>	4	4	5	5	1	1	3	5	5	1	5	2
<i>BIRC5</i>	2	0	3	3	1	3	4	4	4	3	3	1
<i>CCNB1</i>	1	1	2	1	1	1	1	3	3	2	2	1
<i>MKI67</i>	4	4	3	5	2	4	4	2	4	1	4	2
<i>MYBL2</i>	2	1	2	2	1	1	2	2	2	0	1	2
<i>CTGF</i>	2	0	1	5	5	2	2	0	2	1	2	2
<i>CDH1</i>	2	2	2	4	1	4	2	2	6	4	3	3
<i>TGFBR3</i>	5	5	5	6	6	4	3	6	5	2	4	5
<i>VIM</i>	1	1	0	2	4	3	2	0	4	3	1	1
<i>TFPI</i>	4	4	3	1	5	2	2	3	3	6	2	2

Suma de los algoritmos: miRWalk, MicroT4, miRanda, RNA22, RNAhybrid y Targetscan.

2.2 Estudio descriptivo de los microRNAs analizados

El análisis descriptivo de la expresión de los microRNAs en esta serie clínica (**Tabla 27**) mostró que existe un gran rango de variabilidad en la expresión, siendo miR-200c el más expresado en tumor primario, seguido de miR-19b-1 y de miR-141, mientras que los microRNAs con menor expresión fueron miR-519c, miR-107 y miR-9.

Tabla 27. Análisis descriptivo de los miRNA determinados por RT-qPCR (prequimioterapia)

microRNA	Recuento	Perdidos	Media	Mediana	Mínimo	Máximo
miR-200c	121	27	,485979	,267686	,008051	9,126110
miR-429	121	27	,004173	,001736	,000020	,054221
miR-141	121	27	,101700	,048650	,002000	2,100000
miR-18a	121	26	,004713	,000856	,000016	,217000
miR-19b	121	26	,115690	,032100	,006460	3,790000
miR-20a	121	26	,064002	,024600	,003230	1,970000
miR-519c	121	31	,000497	,000079	,000007	,010300
miR-107	121	29	,000875	,000287	,000026	,013700
miR-17	121	27	,096229	,039353	,004754	2,037312
miR-92a	121	27	,081312	,051297	,009685	,692555
miR-106b	121	29	,030569	,016900	,001980	,540000
miR-9	121	28	,003844	,000899	,000080	,059100

2.3 Estudio descriptivo de los genes codificantes analizados

En genes codificantes encontramos que los que presentaban mayor nivel de expresión fueron genes reguladores de la proliferación celular: *MKI67* y *MYBL2*, mientras que los genes con menor grado de expresión fueron genes importantes en angiogénesis como *PDGFA* (Tabla 28).

Tabla 28. Análisis descriptivo de los mRNA determinados por RT-qPCR (prequimioterapia)

mRNA	Recuento	Perdidos	Media	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>CXCL12</i>	121	33	,032937	,021543	,003679	,257623
<i>F3</i>	121	37	,004813	,003047	,000517	,032804
<i>HIF1A</i>	121	33	,028765	,023577	,001400	,167000
<i>PDGFA</i>	121	35	,00093	,00051	,00003	,00778
<i>THBS1</i>	121	33	,544393	,450636	,093428	2,116480
<i>VEGFA</i>	121	33	,177445	,115959	,032918	1,162046
<i>BIRC5</i>	121	42	,114647	0	0	6,630000
<i>CCNB1</i>	121	42	2,261482	,639000	0	31,800000
<i>KI67</i>	121	42	48,358639	9,210000	0	598,000000
<i>MYBL2</i>	121	42	35,413062	8,020000	,067900	535,000000
<i>CTGF</i>	121	30	,162167	,114000	0	,993000
<i>CDH1</i>	121	30	,110159	,088400	0	,354000
<i>TGFBR3</i>	121	30	,014148	,005730	0	,111000
<i>VIM</i>	121	30	,245271	,189000	,009140	2,330000
<i>TFPI</i>	121	40	6,139741	1,370783	0	61,960000

2.4 Análisis basal de correlaciones entre microRNAs y mRNAs

El estudio de correlaciones (Tabla 29) mostró una potente correlación inversa de buen número de miRNAs con *CXCL12* o *PDGFA*, mientras que fue directa para dianas importantes como *VEGFA*, *CCNB1*, *MKI67* o *MYBL2*, lo cual descarta a estos últimos en concreto, como genes que puedan estar regulados directamente por estos microRNAs, al menos a nivel de tumor primario previo al tratamiento. No se aplicó test para comparaciones múltiples y en su

lugar para la validación de correlación de pares de interés biológico y/o clínico, se estudió si se repetían las observaciones en el tumor residual y en series externas. Dichos resultados se discuten en los capítulos siguientes.

Tabla 29. Estudio global de la correlación entre los genes codificantes y microRNAs en tumor primario a nivel basal.

Variable		miR-200	miR-429	miR-141	miR-18a	miR-19b	miR-20a	miR-519c	miR-107	miR-17	miR-92a	miR-106	miR-9
CXCL12	r	-.292**	-.329**	-.300**	-.219*	-.255*	-.259*	-.057	-.159	-.131	-.046	-.329**	-.188
	p	,006	,002	,005	,045	,019	,017	,605	,142	,228	,673	,002	,085
	n	87	87	86	84	84	84	85	87	87	87	85	85
F3	r	-.105	-.101	-.236*	-.148	-.097	-.131	,078	-.025	-.061	-.039	-.142	-.073
	p	,346	,364	,033	,187	,391	,242	,487	,819	,584	,726	,206	,517
	n	83	83	82	81	81	81	81	83	83	83	81	81
HIF1A	r	-.212*	-.141	-.144	-.098	-.008	-.045	,121	,011	,105	,007	-.020	,113
	p	,048	,193	,187	,375	,945	,686	,271	,922	,333	,951	,855	,304
	n	87	87	86	84	84	84	85	87	87	87	85	85
PDGFA	r	-.178	-.342**	-.270*	-.298**	-.289**	-.288**	-.247*	-.275*	-.249*	-.320**	-.395**	-.203
	p	,102	,001	,013	,006	,008	,008	,025	,011	,022	,003	,000	,066
	n	85	85	84	83	83	83	83	85	85	85	83	83
THBS1	r	,189	,248*	,162	-.007	,250*	,216*	,097	,104	,049	,022	,093	,079
	p	,079	,021	,135	,953	,022	,049	,378	,336	,651	,839	,399	,470
	n	87	87	86	84	84	84	85	87	87	87	85	85
VEGFA	r	,226*	,137	,087	,241*	,283**	,404**	,025	,195	,102	,018	,217*	,249*
	p	,035	,204	,423	,027	,009	,000	,822	,070	,349	,865	,046	,022
	n	87	87	86	84	84	84	85	87	87	87	85	85
BIRC5	r	,016	-.042	-.068	,016	-.023	,010	-.294*	-.105	-.047	-.153	-.058	,048
	p	,890	,714	,558	,891	,845	,933	,010	,362	,684	,181	,616	,682
	n	78	78	77	77	77	77	76	78	78	78	76	76
CCNB1	r	,563**	,355**	,345**	,302**	,376**	,427**	,235*	,375**	,315**	,314**	,430**	,271*
	p	,000	,001	,002	,008	,001	,000	,041	,001	,005	,005	,000	,018
	n	78	78	77	77	77	77	76	78	78	78	76	76
MKI67	r	,493**	,427**	,414**	,280*	,397**	,413**	,288*	,432**	,375**	,364**	,487**	,254*
	p	,000	,000	,000	,014	,000	,000	,012	,000	,001	,001	,000	,027
	n	78	78	77	77	77	77	76	78	78	78	76	76
MYBL2	r	,461**	,361**	,440**	,317**	,448**	,468**	,328*	,473**	,409**	,469**	,506**	,192
	p	,000	,001	,000	,005	,000	,000	,004	,000	,000	,000	,000	,096
	n	78	78	77	77	77	77	76	78	78	78	76	76
CTGF	r	-.164	-.122	-.146	-.263*	-.068	-.072	-.195	-.212*	-.074	-.129	-.205	-.033
	p	,120	,247	,170	,015	,534	,508	,071	,045	,485	,223	,054	,760
	n	91	91	90	86	86	86	87	90	91	91	89	89
CDH1	r	,213*	,186	-.009	-.261*	-.147	-.134	-.268*	-.135	-.206	-.199	-.144	-.069
	p	,043	,077	,931	,015	,177	,218	,012	,204	,050	,058	,177	,521
	n	91	91	90	86	86	86	87	90	91	91	89	89
TGFB3	r	,006	-.251*	-.149	-.131	-.076	-.089	,004	-.113	-.038	,050	-.097	-.148
	p	,955	,016	,161	,231	,486	,413	,972	,287	,719	,636	,368	,166
	n	91	91	90	86	86	86	87	90	91	91	89	89
VIM	r	-.284**	-.169	-.330**	-.167	-.123	-.094	-.041	-.173	-.148	-.033	-.234*	-.031
	p	,006	,109	,001	,125	,259	,387	,707	,102	,163	,753	,028	,776
	n	91	91	90	86	86	86	87	90	91	91	89	89
TFPI	r	,239*	,067	,139	-.103	,032	,012	,312**	,118	,053	,219*	,213	,042
	p	,031	,554	,219	,370	,784	,919	,006	,295	,636	,049	,059	,714
	n	81	81	80	78	78	78	77	81	81	81	79	80

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

2.5 Análisis basal de la relación entre la expresión de los marcadores con variables clínicas y anatomopatológicas

El estudio de asociación entre expresión de marcadores en tumor primario, y las variables clínicas y anatomopatológicas, mostró que no había asociación con el estatus menopáusico de las pacientes (Tabla 30).

Tabla 30. Asociación entre marcadores y status menopáusico al diagnóstico.

Marcador	Menopausia	N	Rango promedio	Suma de rangos	p
miR-200	Postmenopausia	51	48,00	2448,00	,847
	Premenopausia	43	46,91	2017,00	
	Total	94			

miR-429	Postmenopausia	51	43,95	2241,50	,170
	Premenopausia	43	51,71	2223,50	
	Total	94			
miR-141	Postmenopausia	51	47,41	2418,00	,973
	Premenopausia	43	47,60	2047,00	
	Total	94			
miR-18a	Postmenopausia	52	47,04	2446,00	,709
	Premenopausia	43	49,16	2114,00	
	Total	95			
miR-19b	Postmenopausia	52	47,58	2474,00	,869
	Premenopausia	43	48,51	2086,00	
	Total	95			
miR-20a	Postmenopausia	52	46,88	2437,50	,662
	Premenopausia	43	49,36	2122,50	
	Total	95			
miR-519c	Postmenopausia	51	47,85	2440,50	,328
	Premenopausia	39	42,42	1654,50	
	Total	90			
miR-107	Postmenopausia	50	45,99	2299,50	,842
	Premenopausia	42	47,11	1978,50	
	Total	92			
miR-17	Postmenopausia	51	46,56	2374,50	,716
	Premenopausia	43	48,62	2090,50	
	Total	94			
miR-92a	Postmenopausia	51	45,14	2302,00	,360
	Premenopausia	43	50,30	2163,00	
	Total	94			
miR-106b	Postmenopausia	49	44,29	2170,00	,396
	Premenopausia	43	49,02	2108,00	
	Total	92			
miR-9	Postmenopausia	51	49,37	2518,00	,350
	Premenopausia	42	44,12	1853,00	
	Total	93			
CXCL12	Postmenopausia	48	41,69	2001,00	,258
	Premenopausia	40	47,88	1915,00	
	Total	88			
F3	Postmenopausia	45	41,14	1851,50	,584
	Premenopausia	39	44,06	1718,50	
	Total	84			
HIF1A	Postmenopausia	48	43,28	2077,50	,624
	Premenopausia	40	45,96	1838,50	
	Total	88			
PDGFA	Postmenopausia	47	42,80	2011,50	,775
	Premenopausia	39	44,35	1729,50	
	Total	86			
THBS1	Postmenopausia	48	43,48	2087,00	,681
	Premenopausia	40	45,73	1829,00	
	Total	88			
VEGFA	Postmenopausia	48	45,33	2176,00	,737
	Premenopausia	40	43,50	1740,00	
	Total	88			

BIRC5	Postmenopausia	43	40,49	1741,00	,763
	Premenopausia	36	39,42	1419,00	
	Total	79			
CCNB1	Postmenopausia	43	40,06	1722,50	,980
	Premenopausia	36	39,93	1437,50	
	Total	79			
KI67	Postmenopausia	43	39,51	1699,00	,836
	Premenopausia	36	40,58	1461,00	
	Total	79			
MYBL2	Postmenopausia	43	39,13	1682,50	,712
	Premenopausia	36	41,04	1477,50	
	Total	79			
CTGF	Postmenopausia	48	43,28	2077,50	,300
	Premenopausia	43	49,03	2108,50	
	Total	91			
CDH1	Postmenopausia	48	44,04	2114,00	,455
	Premenopausia	43	48,19	2072,00	
	Total	91			
TGFBR3	Postmenopausia	48	44,60	2141,00	,594
	Premenopausia	43	47,56	2045,00	
	Total	91			
VIM	Postmenopausia	48	43,08	2068,00	,266
	Premenopausia	43	49,26	2118,00	
	Total	91			
TFPI	Postmenopausia	44	44,97	1978,50	,098
	Premenopausia	37	36,28	1342,50	
	Total	81			

El estudio por subtipo de cáncer de mama (definido por inmunohistoquímica) mostró diferencias en los miRNAs -17, -18a, -19b y -20a así como en los genes *HIF1a*, *THBS1*, *VEGFA* y *CXCL12* (Tabla 31).

Tabla 31. Asociación entre marcadores y subtipo tumoral al diagnóstico.

miRNA/Gen	N válido	Subtipo	N	Rango promedio	Chi ²	gl	p*
miR-200c	92	HR+Her2-	45	45,02	,867	3	,833
		HR+Her2+	12	49,29			
		HR-Her2+	12	42,79			
		HR-Her2-	23	49,87			
miR-429	92	HR+Her2-	45	45,14	2,007	3	,571
		HR+Her2+	12	54,21			
		HR-Her2+	12	39,83			
		HR-Her2-	23	48,61			
miR-141	92	HR+Her2-	45	47,58	,276	3	,964
		HR+Her2+	12	47,67			
		HR-Her2+	12	45,67			
		HR-Her2-	23	44,22			
miR-18a	95	HR+Her2-	45	38,51	15,570	3	,001
		HR+Her2+	14	42,29			
		HR-Her2+	13	59,08			

miR-19b		HR-Her2-	23	63,78			
	95	HR+Her2-	45	41,64	9,405	3	,024
		HR+Her2+	14	39,96			
		HR-Her2+	13	59,92			
		HR-Her2-	23	58,59			
miR-20a	95	HR+Her2-	45	38,21	17,326	3	,001
		HR+Her2+	14	40,82			
		HR-Her2+	13	62,65			
		HR-Her2-	23	63,24			
miR-519c	88	HR+Her2-	43	42,16	1,835	3	,607
		HR+Her2+	10	39,85			
		HR-Her2+	12	46,04			
		HR-Her2-	23	50,09			
miR-107	90	HR+Her2-	44	42,67	4,298	3	,231
		HR+Her2+	11	36,82			
		HR-Her2+	12	47,29			
		HR-Her2-	23	54,13			
miR-17	92	HR+Her2-	45	37,98	13,543	3	,004
		HR+Her2+	12	40,46			
		HR-Her2+	12	58,83			
		HR-Her2-	23	59,89			
miR-92a	92	HR+Her2-	45	41,64	4,436	3	,218
		HR+Her2+	12	45,92			
		HR-Her2+	12	47,00			
		HR-Her2-	23	56,04			
miR-106b	90	HR+Her2-	44	42,59	2,195	3	,533
		HR+Her2+	11	41,32			
		HR-Her2+	12	48,54			
		HR-Her2-	23	51,48			
miR-9	91	HR+Her2-	45	39,49	9,687	3	,021
		HR+Her2+	12	42,25			
		HR-Her2+	12	47,50			
		HR-Her2-	22	60,55			
CXCL12	86	HR+Her2-	43	50,88	7,929	3	,048
		HR+Her2+	9	40,17			
		HR-Her2+	12	36,96			
		HR-Her2-	22	34,00			
F3	82	HR+Her2-	42	43,12	1,639	3	,651
		HR+Her2+	8	45,25			
		HR-Her2+	12	33,83			
		HR-Her2-	20	41,20			
HIF1A	86	HR+Her2-	43	43,47	9,509	3	,023
		HR+Her2+	9	20,78			
		HR-Her2+	12	48,21			
		HR-Her2-	22	50,30			
PDGFA	84	HR+Her2-	43	46,65	2,613	3	,455
		HR+Her2+	9	38,22			
		HR-Her2+	12	36,75			
		HR-Her2-	20	38,95			
THBS1	86	HR+Her2-	43	45,88	13,930	3	,003
		HR+Her2+	9	36,00			

VEGFA	86	HR-Her2+	12	21,83	10,044	3	,018
		HR-Her2-	22	53,73			
		HR+Her2-	43	38,26			
		HR+Her2+	9	38,89			
CTGF	89	HR-Her2+	12	39,08	2,458	3	,483
		HR-Her2-	22	58,05			
		HR+Her2-	44	47,90			
		HR+Her2+	11	41,68			
CDH1	89	HR-Her2+	12	35,33	6,233	3	,101
		HR-Her2-	22	46,14			
		HR+Her2-	44	47,35			
		HR+Her2+	11	57,45			
TGFB3	89	HR-Her2+	12	43,17	1,931	3	,587
		HR-Her2-	22	35,07			
		HR+Her2-	44	48,45			
		HR+Her2+	11	42,82			
VIM	89	HR-Her2+	12	44,75	4,601	3	,203
		HR-Her2-	22	39,32			
		HR+Her2-	44	47,61			
		HR+Her2+	11	37,77			
BIRC5	79	HR-Her2+	12	44,92	2,761	3	,430
		HR-Her2-	18	36,78			
		HR+Her2-	39	41,01			
		HR+Her2+	10	35,95			
CCNB1	79	HR-Her2+	12	43,83	1,325	3	,723
		HR-Her2-	18	43,58			
		HR+Her2-	39	37,28			
		HR+Her2+	10	39,55			
MKI67	79	HR-Her2+	12	37,83	,234	3	,972
		HR-Her2-	18	41,83			
		HR+Her2-	39	39,69			
		HR+Her2+	10	40,50			
MYBL2	79	HR-Her2+	12	42,00	1,155	3	,764
		HR-Her2-	18	43,28			
		HR+Her2-	39	37,22			
		HR+Her2+	10	42,55			
TFPI	80	HR-Her2+	12	31,67	2,079	3	,556
		HR-Her2-	17	42,59			
		HR+Her2-	42	42,13			
		HR+Her2+	9	40,72			

Cuando se estudió por subtipos específicos, se confirmó que la expresión elevada de todos los miembros del clúster miR-17-92 y miR-9, así como la de los genes *THBS1* y *VEGFA* se asociaban con tumores triple negativo (**Tabla 32**) y en general con subtipos más agresivos, de acuerdo con la bibliografía previa; mientras que la expresión de *CXCL12* se asoció al subtipo luminal (**Tabla 33**), en general de menor agresividad.

Tabla 32. Asociación entre marcadores y subtipo triple negativo (prequimioterapia).

Marcador	Triple negativo	N	Rango promedio	Suma de rangos	p
miR-200	No	69	45,38	3131,00	,485
	Sí	23	49,87	1147,00	
	Total	92			
miR-429	No	69	45,80	3160,00	,662
	Sí	23	48,61	1118,00	
	Total	92			
miR-141	No	69	47,26	3261,00	,636
	Sí	23	44,22	1017,00	
	Total	92			
miR-18a	No	72	42,96	3093,00	,002
	Sí	23	63,78	1467,00	
	Total	95			
miR-19b	No	72	44,62	3212,50	,034
	Sí	23	58,59	1347,50	
	Total	95			
miR-20a	No	72	43,13	3105,50	,002
	Sí	23	63,24	1454,50	
	Total	95			
miR-519c	No	65	42,52	2764,00	,222
	Sí	23	50,09	1152,00	
	Total	88			
miR-107	No	67	42,54	2850,00	,066
	Sí	23	54,13	1245,00	
	Total	90			
miR-17	No	69	42,04	2900,50	,005
	Sí	23	59,89	1377,50	
	Total	92			
miR-92a	No	69	43,32	2989,00	,048
	Sí	23	56,04	1289,00	
	Total	92			
miR-106b	No	67	43,45	2911,00	,203
	Sí	23	51,48	1184,00	
	Total	90			
miR-9	No	69	41,36	2854,00	,003
	Sí	22	60,55	1332,00	
	Total	91			
CXCL12	No	64	46,77	2993,00	,039
	Sí	22	34,00	748,00	
	Total	86			
F3	No	62	41,60	2579,00	,948
	Sí	20	41,20	824,00	
	Total	82			
HIF1A	No	64	41,16	2634,50	,139
	Sí	22	50,30	1106,50	
	Total	86			
PDGFA	No	64	43,61	2791,00	,456
	Sí	20	38,95	779,00	
	Total	84			
THBS1	No	64	39,98	2559,00	,026

VEGFA	Sí	22	53,73	1182,00	
	Total	86			
	No	64	38,50	2464,00	,002
BIRC5	Sí	22	58,05	1277,00	
	Total	86			
	No	61	40,95	2498,00	,322
CCNB1	Sí	18	36,78	662,00	
	Total	79			
	No	61	38,94	2375,50	,451
KI67	Sí	18	43,58	784,50	
	Total	79			
	No	61	39,46	2407,00	,700
MYBL2	Sí	18	41,83	753,00	
	Total	79			
	No	61	39,03	2381,00	,490
CTGF	Sí	18	43,28	779,00	
	Total	79			
	No	67	44,63	2990,00	,812
CDH1	Sí	22	46,14	1015,00	
	Total	89			
	No	67	48,26	3233,50	,038
TGFBR3	Sí	22	35,07	771,50	
	Total	89			
	No	67	46,87	3140,00	,234
VIM	Sí	22	39,32	865,00	
	Total	89			
	No	67	43,41	2908,50	,311
TFPI	Sí	22	49,84	1096,50	
	Total	89			
	No	63	39,94	2516,00	,676
	Sí	17	42,59	724,00	
	Total	80			

Tabla 33. Asociación entre marcadores y receptores hormonales (prequimioterapia).

Marcador	Receptores hormonales	N	Rango promedio	Suma de rangos	p
miR-200	Negativos	35	47,53	1663,50	,883
	Positivos	58	46,68	2707,50	
	Total	93			
miR-429	Negativos	35	45,74	1601,00	,727
	Positivos	58	47,76	2770,00	
	Total	93			
miR-141	Negativos	35	44,74	1566,00	,531
	Positivos	58	48,36	2805,00	
	Total	93			
miR-18a	Negativos	36	62,08	2235,00	<,001
	Positivos	59	39,41	2325,00	
	Total	95			
miR-19b	Negativos	36	59,07	2126,50	,002
	Positivos	59	41,25	2433,50	
	Total	95			

miR-20a	Negativos	36	63,03	2269,00	<,001
	Positivos	59	38,83	2291,00	
	Total	95			
miR-519c	Negativos	35	48,70	1704,50	,277
	Positivos	54	42,60	2300,50	
	Total	89			
miR-107	Negativos	35	51,81	1813,50	,097
	Positivos	56	42,37	2372,50	
	Total	91			
miR-17	Negativos	35	59,64	2087,50	<,001
	Positivos	58	39,37	2283,50	
	Total	93			
miR-92a	Negativos	35	53,00	1855,00	,096
	Positivos	58	43,38	2516,00	
	Total	93			
miR-106b	Negativos	35	50,59	1770,50	,190
	Positivos	56	43,13	2415,50	
	Total	91			
miR-9	Negativos	34	55,97	1903,00	,009
	Positivos	58	40,95	2375,00	
	Total	92			
CXCL12	Negativos	34	35,07	1192,50	,008
	Positivos	53	49,73	2635,50	
	Total	87			
F3	Negativos	32	38,50	1232,00	,295
	Positivos	51	44,20	2254,00	
	Total	83			
HIF1A	Negativos	34	49,56	1685,00	,100
	Positivos	53	40,43	2143,00	
	Total	87			
PDGFA	Negativos	32	38,13	1220,00	,157
	Positivos	53	45,94	2435,00	
	Total	85			
THBS1	Negativos	34	42,47	1444,00	,651
	Positivos	53	44,98	2384,00	
	Total	87			
VEGFA	Negativos	34	51,35	1746,00	,030
	Positivos	53	39,28	2082,00	
	Total	87			
BIRC5	Negativos	30	40,03	1201,00	,988
	Positivos	49	39,98	1959,00	
	Total	79			
CCNB1	Negativos	30	43,68	1310,50	,264
	Positivos	49	37,74	1849,50	
	Total	79			
KI67	Negativos	30	40,23	1207,00	,944
	Positivos	49	39,86	1953,00	
	Total	79			
MYBL2	Negativos	30	42,77	1283,00	,402
	Positivos	49	38,31	1877,00	
	Total	79			

CTGF	Negativos	34	43,32	1473,00	,538
	Positivos	56	46,82	2622,00	
	Total	90			
CDH1	Negativos	34	38,93	1323,50	,063
	Positivos	56	49,49	2771,50	
	Total	90			
TGFBR3	Negativos	34	42,21	1435,00	,351
	Positivos	56	47,50	2660,00	
	Total	90			
VIM	Negativos	34	44,96	1528,50	,878
	Positivos	56	45,83	2566,50	
	Total	90			
TFPI	Negativos	29	38,34	1112,00	,448
	Positivos	52	42,48	2209,00	
	Total	81			

Solo *THBS1* y *VIM* presentaron niveles de expresión menores en tumores Her2 positivos (Tabla 34).

Tabla 34. Asociación entre marcadores y sobreexpresión de Her2 (prequimioterapia).

Marcador	Her2	N	Rango promedio	Suma de rangos	p
miR-200	Negativo	68	46,66	3173,00	,922
	Positivo	24	46,04	1105,00	
	Total	92			
miR-429	Negativo	68	46,32	3149,50	,911
	Positivo	24	47,02	1128,50	
	Total	92			
miR-141	Negativo	68	46,44	3158,00	,972
	Positivo	24	46,67	1120,00	
	Total	92			
miR-18a	Negativo	68	47,06	3200,00	,597
	Positivo	27	50,37	1360,00	
	Total	95			
miR-19b	Negativo	68	47,38	3221,50	,726
	Positivo	27	49,57	1338,50	
	Total	95			
miR-20a	Negativo	68	46,68	3174,00	,458
	Positivo	27	51,33	1386,00	
	Total	95			
miR-519c	Negativo	66	44,92	2965,00	,787
	Positivo	22	43,23	951,00	
	Total	88			
miR-107	Negativo	67	46,60	3122,50	,494
	Positivo	23	42,28	972,50	
	Total	90			
miR-17	Negativo	68	45,39	3086,50	,502
	Positivo	24	49,65	1191,50	
	Total	92			
miR-92a	Negativo	68	46,51	3163,00	,993

miR-106b	Positivo	24	46,46	1115,00	
	Total	92			
	Negativo	67	45,64	3058,00	,930
miR-9	Positivo	23	45,09	1037,00	
	Total	90			
	Negativo	67	46,40	3109,00	,808
CXCL12	Positivo	24	44,88	1077,00	
	Total	91			
	Negativo	65	45,17	2936,00	,275
F3	Positivo	21	38,33	805,00	
	Total	86			
	Negativo	62	42,50	2635,00	,503
HIF1A	Positivo	20	38,40	768,00	
	Total	82			
	Negativo	65	45,78	2975,50	,137
PDGFA	Positivo	21	36,45	765,50	
	Total	86			
	Negativo	63	44,21	2785,00	,267
THBS1	Positivo	21	37,38	785,00	
	Total	84			
	Negativo	65	48,54	3155,00	,001
VEGFA	Positivo	21	27,90	586,00	
	Total	86			
	Negativo	65	44,95	2922,00	,342
BIRC5	Positivo	21	39,00	819,00	
	Total	86			
	Negativo	65	44,95	2922,00	,342
CCNB1	Positivo	21	39,00	819,00	
	Total	86			
	Negativo	65	44,95	2922,00	,342
KI67	Positivo	21	39,00	819,00	
	Total	86			
	Negativo	65	44,95	2922,00	,342
MYBL2	Positivo	21	39,00	819,00	
	Total	86			
	Negativo	65	44,95	2922,00	,342
CTGF	Positivo	21	39,00	819,00	
	Total	86			
	Negativo	65	44,95	2922,00	,342
CDH1	Positivo	21	39,00	819,00	
	Total	86			
	Negativo	65	44,95	2922,00	,342
TGFBR3	Positivo	21	39,00	819,00	
	Total	86			
	Negativo	65	44,95	2922,00	,342
VIM	Positivo	21	39,00	819,00	
	Total	86			
	Negativo	65	44,95	2922,00	,342
TFPI	Positivo	21	39,00	819,00	
	Negativo	59	42,26	2493,50	,255

Positivo	21	35,55	746,50
Total	80		

En relación al tamaño del tumor primario, solo se observaron mayores niveles de expresión de miR-519c en tumores pequeños (cT1-2) (**Tabla 35**), lo cual podría ser indicativo de que podría actuar como supresor tumoral, sin embargo, no se han encontrado más evidencias en esta serie que sustenten dicha hipótesis.

Tabla 35. Asociación entre marcadores y tamaño del tumor primario (prequimioterapia).

Marcador	cT3-4	N	Rango promedio	Suma de rangos	p
miR-200	cT1-2	44	51,82	2280,00	,150
	cT3-4	50	43,70	2185,00	
	Total	94			
miR-429	cT1-2	44	51,41	2262,00	,192
	cT3-4	50	44,06	2203,00	
	Total	94			
miR-141	cT1-2	44	53,06	2334,50	,064
	cT3-4	50	42,61	2130,50	
	Total	94			
miR-18a	cT1-2	41	49,63	2035,00	,615
	cT3-4	54	46,76	2525,00	
	Total	95			
miR-19b	cT1-2	41	47,78	1959,00	,946
	cT3-4	54	48,17	2601,00	
	Total	95			
miR-20a	cT1-2	41	45,99	1885,50	,535
	cT3-4	54	49,53	2674,50	
	Total	95			
miR-519c	cT1-2	42	51,92	2180,50	,029
	cT3-4	48	39,89	1914,50	
	Total	90			
miR-107	cT1-2	42	49,37	2073,50	,345
	cT3-4	50	44,09	2204,50	
	Total	92			
miR-17	cT1-2	44	44,97	1978,50	,398
	cT3-4	50	49,73	2486,50	
	Total	94			
miR-92a	cT1-2	44	48,92	2152,50	,636
	cT3-4	50	46,25	2312,50	
	Total	94			
miR-106b	cT1-2	42	48,45	2035,00	,520
	cT3-4	50	44,86	2243,00	
	Total	92			
miR-9	cT1-2	43	49,24	2117,50	,457
	cT3-4	50	45,07	2253,50	
	Total	93			
CXCL12	cT1-2	40	43,64	1745,50	,772
	cT3-4	48	45,22	2170,50	
	Total	88			

F3	cT1-2	37	39,57	1464,00	,328
	cT3-4	47	44,81	2106,00	
	Total	84			
HIF1A	cT1-2	40	42,53	1701,00	,508
	cT3-4	48	46,15	2215,00	
	Total	88			
PDGFA	cT1-2	38	45,42	1726,00	,526
	cT3-4	48	41,98	2015,00	
	Total	86			
THBS1	cT1-2	40	49,16	1966,50	,118
	cT3-4	48	40,61	1949,50	
	Total	88			
VEGFA	cT1-2	40	44,80	1792,00	,920
	cT3-4	48	44,25	2124,00	
	Total	88			
BIRC5	cT1-2	34	38,37	1304,50	,422
	cT3-4	45	41,23	1855,50	
	Total	79			
CCNB1	cT1-2	34	41,04	1395,50	,725
	cT3-4	45	39,21	1764,50	
	Total	79			
KI67	cT1-2	34	40,63	1381,50	,831
	cT3-4	45	39,52	1778,50	
	Total	79			
MYBL2	cT1-2	34	41,47	1410,00	,621
	cT3-4	45	38,89	1750,00	
	Total	79			
CTGF	cT1-2	43	47,85	2057,50	,527
	cT3-4	48	44,34	2128,50	
	Total	91			
CDH1	cT1-2	43	45,79	1969,00	,943
	cT3-4	48	46,19	2217,00	
	Total	91			
TGFBR3	cT1-2	43	41,80	1797,50	,151
	cT3-4	48	49,76	2388,50	
	Total	91			
VIM	cT1-2	43	45,03	1936,50	,741
	cT3-4	48	46,86	2249,50	
	Total	91			
TFPI	cT1-2	34	41,60	1414,50	,844
	cT3-4	47	40,56	1906,50	
	Total	81			

El estudio de asociación entre marcadores y la afectación ganglionar mostró que los miRNAs -200c, -19b y -20a, así como los genes *MKI67* y *MYBL2* se asociaban directamente con mayor grado de afectación ganglionar, lo cual podría indicar que estos genes actúan como marcadores importantes en el proceso metastásico, mientras que *PDGFA* y *CTGF* lo hicieron inversamente (**Tabla 36**).

Tabla 36. Asociación entre marcadores y afectación ganglionar (prequimioterapia).

Marcador	cN	N	Rango promedio	Suma de rangos	p
miR-200	cN0-1	61	42,77	2609,00	,022
	cN2-3	33	56,24	1856,00	
	Total	94			
miR-429	cN0-1	61	46,84	2857,00	,748
	cN2-3	33	48,73	1608,00	
	Total	94			
miR-141	cN0-1	60	47,07	2824,00	,838
	cN2-3	34	48,26	1641,00	
	Total	94			
miR-18a	cN0-1	62	44,02	2729,50	,054
	cN2-3	33	55,47	1830,50	
	Total	95			
miR-19b	cN0-1	62	43,77	2714,00	,041
	cN2-3	33	55,94	1846,00	
	Total	95			
miR-20a	cN0-1	62	42,10	2610,00	,004
	cN2-3	33	59,09	1950,00	
	Total	95			
miR-519c	cN0-1	58	43,59	2528,00	,349
	cN2-3	32	48,97	1567,00	
	Total	90			
miR-107	cN0-1	59	43,26	2552,50	,120
	cN2-3	33	52,29	1725,50	
	Total	92			
miR-17	cN0-1	61	44,37	2706,50	,130
	cN2-3	33	53,29	1758,50	
	Total	94			
miR-92a	cN0-1	61	45,47	2773,50	,326
	cN2-3	33	51,26	1691,50	
	Total	94			
miR-106b	cN0-1	58	45,50	2639,00	,639
	cN2-3	34	48,21	1639,00	
	Total	92			
miR-9	cN0-1	60	46,33	2780,00	,748
	cN2-3	33	48,21	1591,00	
	Total	93			
CXCL12	cN0-1	57	47,15	2687,50	,187
	cN2-3	31	39,63	1228,50	
	Total	88			
F3	cN0-1	54	43,69	2359,00	,550
	cN2-3	30	40,37	1211,00	
	Total	84			
HIF1A	cN0-1	57	44,86	2557,00	,858
	cN2-3	31	43,84	1359,00	
	Total	88			
PDGFA	cN0-1	56	47,96	2685,50	,024
	cN2-3	30	35,18	1055,50	
	Total	86			
THBS1	cN0-1	57	46,14	2630,00	,414

VEGFA	cN2-3	31	41,48	1286,00	
	Total	88			
	cN0-1	57	41,51	2366,00	,136
BIRC5	cN2-3	31	50,00	1550,00	
	Total	88			
	cN0-1	50	39,59	1979,50	,761
CCNB1	cN2-3	29	40,71	1180,50	
	Total	79			
	cN0-1	50	36,15	1807,50	,050
KI67	cN2-3	29	46,64	1352,50	
	Total	79			
	cN0-1	50	36,12	1806,00	,048
MYBL2	cN2-3	29	46,69	1354,00	
	Total	79			
	cN0-1	50	33,93	1696,50	,002
CTGF	cN2-3	29	50,47	1463,50	
	Total	79			
	cN0-1	59	50,57	2983,50	,025
CDH1	cN2-3	32	37,58	1202,50	
	Total	91			
	cN0-1	59	44,95	2652,00	,606
TGFBR3	cN2-3	32	47,94	1534,00	
	Total	91			
	cN0-1	59	46,09	2719,50	,964
VIM	cN2-3	32	45,83	1466,50	
	Total	91			
	cN0-1	59	48,30	2849,50	,260
TFPI	cN2-3	32	41,77	1336,50	
	Total	91			
	cN0-1	59	48,30	2849,50	,260
	cN2-3	29	47,33	1372,50	
	Total	81			
	cN0-1	52	37,47	1948,50	,071

En relación al grado histológico del tumor, la expresión de miR-17, miR-18a y miR-20a se asoció con tumores indiferenciados, mientras que los genes *PDGFA*, *THBS1*, *CTGF* y *TFPI* se asociaron con tumores moderadamente o bien diferenciados (**Tabla 37**).

Tabla 37. Asociación entre marcadores y grado histológico (prequimioterapia).

Marcador	Grado 3	N	Rango promedio	Suma de rangos	p
miR-200	Grado 1-2	37	46,30	1713,00	,367
	Grado 3	49	41,39	2028,00	
	Total	86			
miR-429	Grado 1-2	37	45,04	1666,50	,619
	Grado 3	49	42,34	2074,50	
	Total	86			
miR-141	Grado 1-2	36	48,67	1752,00	,103
	Grado 3	50	39,78	1989,00	
	Total	86			

miR-18a	Grado 1-2	36	36,97	1331,00	,016
	Grado 3	53	50,45	2674,00	
	Total	89			
miR-19b	Grado 1-2	36	38,92	1401,00	,067
	Grado 3	53	49,13	2604,00	
	Total	89			
miR-20a	Grado 1-2	36	38,19	1375,00	,041
	Grado 3	53	49,62	2630,00	
	Total	89			
miR-519c	Grado 1-2	34	40,72	1384,50	,687
	Grado 3	49	42,89	2101,50	
	Total	83			
miR-107	Grado 1-2	36	39,42	1419,00	,316
	Grado 3	48	44,81	2151,00	
	Total	84			
miR-17	Grado 1-2	37	34,14	1263,00	,003
	Grado 3	49	50,57	2478,00	
	Total	86			
miR-92a	Grado 1-2	37	39,19	1450,00	,164
	Grado 3	49	46,76	2291,00	
	Total	86			
miR-106b	Grado 1-2	34	41,65	1416,00	,792
	Grado 3	50	43,08	2154,00	
	Total	84			
miR-9	Grado 1-2	36	39,32	1415,50	,239
	Grado 3	49	45,70	2239,50	
	Total	85			
CXCL12	Grado 1-2	33	47,02	1551,50	,056
	Grado 3	48	36,86	1769,50	
	Total	81			
F3	Grado 1-2	31	41,02	1271,50	,516
	Grado 3	46	37,64	1731,50	
	Total	77			
HIF1A	Grado 1-2	33	35,55	1173,00	,084
	Grado 3	48	44,75	2148,00	
	Total	81			
PDGFA	Grado 1-2	32	47,89	1532,50	,012
	Grado 3	47	34,63	1627,50	
	Total	79			
THBS1	Grado 1-2	33	50,12	1654,00	,004
	Grado 3	48	34,73	1667,00	
	Total	81			
VEGFA	Grado 1-2	33	41,12	1357,00	,969

BIRC5	Grado 3	48	40,92	1964,00	
	Total	81			
	Grado 1-2	30	35,63	1069,00	,272
CCNB1	Grado 3	45	39,58	1781,00	
	Total	75			
	Grado 1-2	30	36,70	1101,00	,673
KI67	Grado 3	45	38,87	1749,00	
	Total	75			
	Grado 1-2	30	36,18	1085,50	,556
MYBL2	Grado 3	45	39,21	1764,50	
	Total	75			
	Grado 1-2	30	33,55	1006,50	,149
CTGF	Grado 3	45	40,97	1843,50	
	Total	75			
	Grado 1-2	30	33,55	1006,50	,149
CDH1	Grado 1-2	36	50,17	1806,00	,007
	Grado 3	47	35,74	1680,00	
	Total	83			
TGFBR3	Grado 1-2	36	44,26	1593,50	,454
	Grado 3	47	40,27	1892,50	
	Total	83			
VIM	Grado 1-2	36	43,67	1572,00	,581
	Grado 3	47	40,72	1914,00	
	Total	83			
TFPI	Grado 1-2	36	47,63	1714,50	,063
	Grado 3	47	37,69	1771,50	
	Total	83			
	Grado 1-2	32	43,39	1388,50	,040
	Grado 3	42	33,01	1386,50	
	Total	74			

2.6 Estudio basal del valor predictivo de respuesta de los marcadores analizados

No se encontró que la expresión génica de ningún marcador (dicotomizada por mediana de expresión) se asociase con respuesta completa patológica al tratamiento (**Tabla 38**).

Tabla 38. Asociación entre marcadores (dicotomizados por la mediana de expresión) y respuesta completa patológica (ypT0/ypTis + ypN0).

Marcador	OR	I.C. 95%	p
miR-200	1,490	,539-4,119	,443
miR-429	,510	,181-1,439	,204

miR-141	,876	,320-2,401	,797
miR-18a	2,185	,783-6,097	,136
miR-19b	1,671	,612-4,563	,316
miR-20a	1,765	,646-4,819	,268
miR-519c	1	,356-2,809	1
miR-107	,876	,319-2,406	,797
miR-17	2,613	,897-7,608	,078
miR-92a	1,490	,539-4,119	,443
miR-106b	,708	,255-1,962	,506
miR-9	1,027	,367-2,874	,959
CXCL12	,629	,225-1,755	,376
F3	,663	,236-1,862	,436
HIF1A	1,982	,697-5,638	,200
PDGFA	1,145	,413-3,175	,795
THBS1	,667	,239-1,860	,439
VEGFA	1,144	,414-3,162	,796
BIRC5	ND	ND	ND
CCNB1	,656	,221-1,946	,447
KI67	,479	,158-1,459	,195
MYBL2	,889	,303-2,603	,830
CTGF	,688	,248-1,910	,473
CDH1	,688	,248-1,910	,473
TGFBR3	,813	,293-2,258	,691
VIM	1,537	,553-4,268	,410
TFPI	,709	,236-2,133	,541

ND: No Disponible por exceso de casos sin expresión.

2.7 Estudio basal del valor pronóstico de respuesta de los marcadores analizados

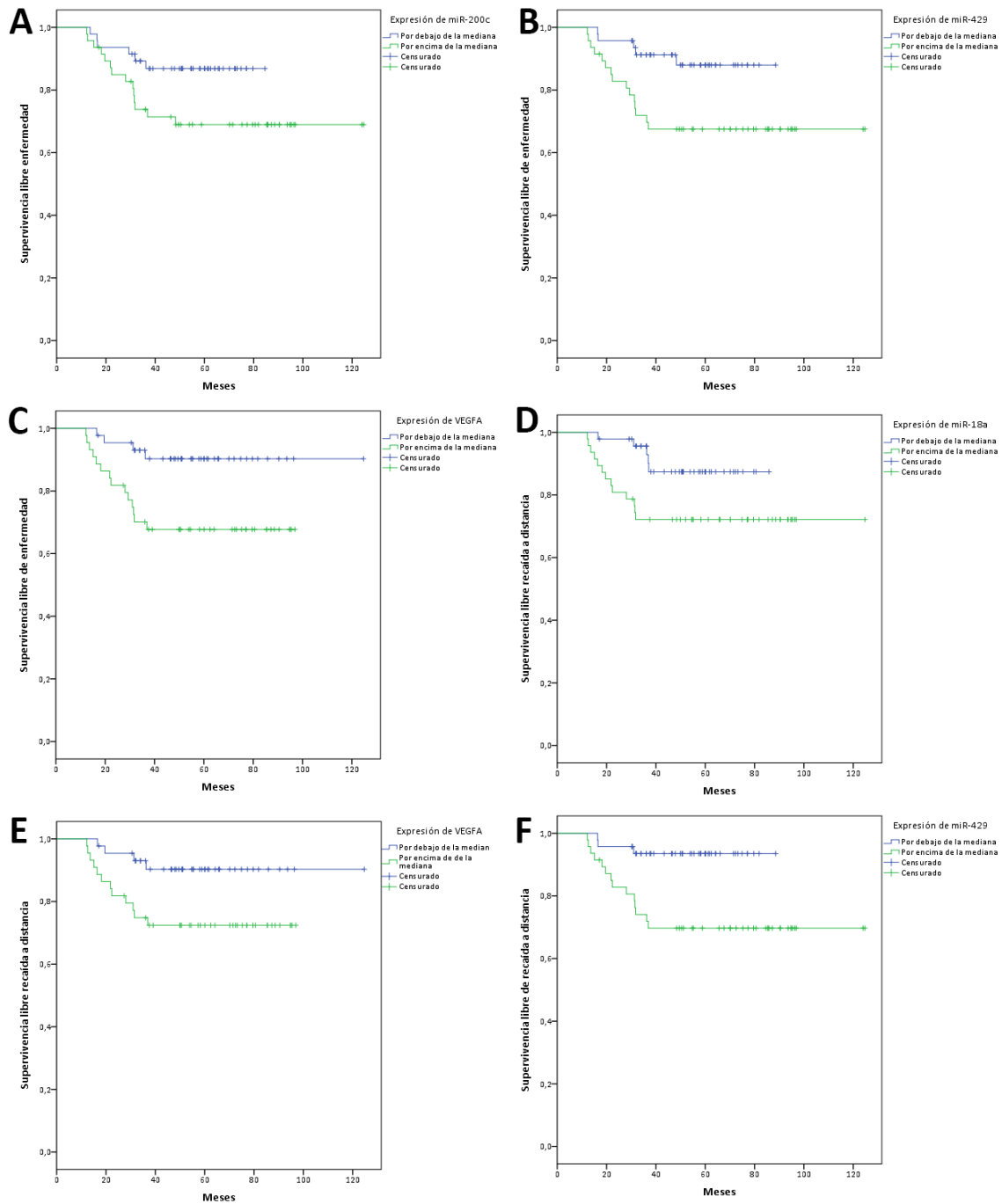
El estudio pronóstico (dicotomizado) mostró que fueron factores de mal pronóstico, relevantes para supervivencia libre de enfermedad, la expresión elevada miR-200c y miR-429, así como VEGFA (Tabla 39 columna SLE y Figura 7-ABCD). Fueron factores de mal pronóstico, relevantes para supervivencia libre de recaída a distancia, la expresión elevada de miR-18a, VEGFA y miR-429 (Tabla 39 columna SLRD y Figura 7-EFG).

Tabla 39. Asociación entre marcadores (dicotomizados por mediana de expresión) y supervivencia global, libre de enfermedad y libre de recaída a distancia.

Marcador	SG (valor-p, log-rango)	SLE (valor-p, log-rango)	SLRD(valor-p, log-rango)
miR-200	,346	,045	,059
miR-429	,173	,014	,004
miR-141	,200	,429	,947
miR-18a	,307	,079	,037
miR-19b	,538	,801	,990
miR-20a	,780	,621	,465
miR-519c	,092	,524	,720
miR-107	,447	,087	,111
miR-17	,437	,347	,798
miR-92a	,716	,186	,235
miR-106b	,390	,736	,557

miR-9	,699	,780	,677
CXCL12	,854	,281	,551
F3	,765	,187	,399
HIF1A	,632	,562	,948
PDGFA	,904	,135	,123
THBS1	,383	,884	,518
VEGFA	,129	,009	,028
BIRC5	ND	ND	ND
CCNB1	,321	,184	,172
KI67	,324	,161	,151
MYBL2	,511	,064	,055
CTGF	,518	,724	,713
CDH1	,862	,808	,444
TGFBR3	,324	,594	,580
VIM	,910	,241	,474
TFPI	,483	,331	,662

Figura 7. Gráficas de supervivencia para los factores pronósticos relevantes en el análisis univariante. (A-C) Supervivencia libre de enfermedad. (D-F) Supervivencia libre de recaída a distancia.



El análisis multivariante, incluyendo las variables clínicamente relevantes, mostró que solo miR-429 fue factor pronóstico relevante para supervivencia libre de enfermedad y supervivencia libre de recaída a distancia, así como VEGFA para supervivencia libre de enfermedad (**Tabla 40**). Ninguno de los marcadores mostró en el tumor primario pretratamiento valor pronóstico para supervivencia global.

Tabla 40. Análisis multivariante incluyendo las variables clínicas y los marcadores pronósticamente relevantes en el análisis univariante previo. (A-C) Supervivencia libre de enfermedad. (D-F) Supervivencia libre de recaída a distancia.

A		SLE		
Variable	HR	IC95%	p	
N2-3	2,665	1,096-6,480	,031	
RCp	,147	,019-1,122	,065	
miR-200c	2,335	,896-6,085	,083	

B		SLE		
Variable	HR	IC95%	p	
N2-3	2,870	1,176-7,007	,021	
RCp	,141	,018-1,082	,060	
miR-429	3,195	1,158-8,811	,025	

C		SLE		
Variable	HR	IC95%	p	
N2-3	2,137	,829-5,508	,116	
RCp	,159	,021-1,199	,074	
VEGFA	3,566	1,148-11,07	,028	

D		SLRD		
Variable	HR	IC95%	p	
N2-3	2,255	,867-5,863	,095	
miR-429	4,897	1,405-17,070	,013	

E		SLRD		
Variable	HR	IC95%	p	
N2-3	2,286	,887-5,894	,087	
miR-18a	2,438	,853-6,963	,096	

F		SLRD		
Variable	HR	IC95%	p	
N2-3	2,461	,909-6,662	,076	
VEGFA	2,953	,945-9,227	,063	

2.8 Conclusiones del Capítulo II

Como conclusión del segundo capítulo de resultados, los miembros del clúster miR-17-92 muestran un buen número de predicciones *in silico* positivas de interacción con factores angiogénicos en diversas bases de datos públicas. A nivel basal, el microRNA con mayor expresión entre los estudiados fue miR-200c, mientras que miR-519c fue el de menor expresión global. Entre los genes codificantes, el mayormente expresado de forma global fue *MKI67*, mientras que el que mostró menores niveles de expresión fue *PDGFA*. El estudio de correlaciones mostró que los miRNAs correlacionaban directamente con factores de proliferación, e inversamente con genes implicados en quimiotaxis y angiogénesis. No hubo diferencias de ningún marcador en función del estatus menopáusico. Los miembros de miR-17-92 mostraron diferencias de expresión entre los subtipos tumorales, así como en genes importantes en angiogénesis. La expresión de miR-17-92, *THBS1* y *VEGFA* se asoció con el subtipo triple negativo. MiR-200c, miR-19b-1 y miR-20a y los genes de proliferación *MKI67* y *MYBL2* se asociaron con mayor afectación ganglionar. MiR-18a, miR-20a y miR-17 se asociaron con tumores indiferenciados, mientras que *PDGFA*, *THBS1* y *CTGF* se asociaron con tumores mayormente diferenciados. Ningún marcador fue predictor de respuesta completa patológica. La expresión de miR-429 tuvo valor pronóstico adverso para SLE y SLRD.

CAPÍTULO III

CAPÍTULO III: EVALUACIÓN DEL EFECTO QUE EJERCE LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE BASADA EN ANTRACICLINAS Y TAXANOS SOBRE LOS MEDIADORES ANGIOGÉNICOS EN EL NICHOS TUMORAL DEL CÁNCER DE MAMA

3.1 Estudio descriptivo de los microRNAs analizados

El análisis descriptivo de los miRNAs en las muestras de tumor residual mostró nuevamente que el miRNA con mayor expresión en tejido tumoral mamario de los analizados fue miR-200c, seguido de miR-92a y miR-141, mientras que los miRNAs con menor grado de expresión fueron miR-107, miR-18a y miR-9, existiendo diferencias respecto al estado basal del tumor prequimioterapia (**Tabla 41**).

Tabla 41. Análisis descriptivo de los miRNA determinados por RT-qPCR (postquimioterapia).

microRNA	Recuento*	Perdidos	Media	Mediana	Mínimo	Máximo
miR-200c	95	18	2,348912	,323836	,002893	92,839488
miR-429	95	17	,319637	,002195	,000023	24,000624
miR-141	95	18	,726796	,104000	,000712	32,300000
miR-18a	95	14	,009211	,001040	,000015	,373000
miR-19b	95	14	,175711	,064700	,006990	4,860000
miR-20a	95	14	,168556	,058900	,004290	4,090000
miR-519c	95	22	,039900	,000150	,000006	2,880000
miR-107	95	17	,003081	,000425	,000023	,081900
miR-17	95	16	,236245	,078927	,006960	5,553254
miR-92a	95	16	,859422	,120742	,012174	44,170155
miR-106b	95	17	,110395	,049400	,001580	2,790000
miR-9	95	18	,018628	,002130	,000050	,576000

*Solo se analizaron los casos sin ypT0.

3.2 Estudio descriptivo de los genes codificantes analizados

En el caso de los genes codificantes, se observó de nuevo que los genes con mayor grado de expresión fueron *MKI67* y *MYBL2*; así mismo, los genes con menor grado de expresión fueron *PDGFA* y *F3* (**Tabla 42**).

Tabla 42. Análisis descriptivo de los mRNA determinados por RT-qPCR (postquimioterapia).

mRNA	Recuento*	Perdidos	Media	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>CXCL12</i>	95	16	,107090	,079476	,000816	,439317
<i>F3</i>	95	20	,011811	,009775	,000954	,049037
<i>HIF1A</i>	95	17	,040060	,037379	,008315	,113178
<i>PDGFA</i>	95	17	,001327	,000988	,000003	,004364
<i>THBS1</i>	95	16	,892070	,795536	,066370	2,828427
<i>VEGFA</i>	95	16	,201360	,161544	,030607	,698985
<i>BIRC5</i>	95	36	1,224865	0	0	46,100000
<i>CCNB1</i>	95	33	,941435	,136000	0	12,600000
<i>KI67</i>	95	33	14,639942	,899500	0	327,000000
<i>MYBL2</i>	95	33	12,398560	,773000	0	303,000000
<i>CTGF</i>	95	17	,829917	,645500	,000192	3,540000
<i>CDH1</i>	95	17	,085323	,070600	0	,514000

TGFBR3	95	17	,033344	,026100	0	,153000
VIM	95	17	,471885	,433000	,103000	2,330000
TFPI	95	42	8,076537	3,917681	,077841	53,941859

*Solo se analizaron los casos sin ypT0.

3.3 Análisis de correlaciones entre microRNAs y mRNAs

El estudio de correlaciones mostró nuevamente una potente correlación inversa entre prácticamente todos los miRNAs con *CXCL12*, mientras que se perdieron prácticamente todas las asociaciones con *PDGFA*. A su vez, otras dianas que en el tumor basal no correlacionaban inversamente, mostraron una fuerte correlación en el tejido tumoral residual, entre ellos *F3*, *TGFBR3* o *VIM*. Por otra parte, no se observó correlación directa alguna entre ningún miRNA y *VEGFA*, a diferencia de lo que ocurría en el tejido tumoral pretratamiento. Las correlaciones directas con genes implicados en proliferación celular se mantuvieron en el tejido tumoral residual para *MKI67* y *MYBL2*, pero no así en el caso de *CCNB1* (Tabla 43).

Tabla 43. Estudio de la correlación entre los genes codificantes y microRNAs en tumor residual.

Variable§		miR-200	miR-429	miR-141	miR-18a	miR-19b	miR-20a	miR-519c	miR-107	miR-17	miR-92a	miR-106	miR-9
CXCL12	r	-,262*	-,374**	-,296*	-,407**	-,273*	-,318**	-,222	-,386**	-,354*	-,260*	-,374**	-,352**
	p	,021	,001	,009	,000	,015	,004	,060	,001	,001	,022	,001	,002
	n	77	77	77	79	79	79	72	77	78	78	78	77
F3	r	-,375**	-,472**	-,395**	-,492**	-,452**	-,465**	-,393**	-,521**	-,469**	-,316**	-,436**	-,414**
	p	,001	,000	,001	,000	,000	,000	,001	,000	,000	,006	,000	,000
	n	73	73	73	75	75	75	68	73	74	74	74	73
HIF1A	r	-,010	-,091	-,080	-,037	-,093	-,090	-,103	-,112	-,049	-,068	-,083	-,241*
	p	,932	,434	,492	,746	,416	,432	,393	,334	,675	,558	,472	,036
	n	76	76	76	78	78	78	71	76	77	77	77	76
PDGFA	r	-,191	-,257*	-,135	-,180	-,206	-,202	-,233	-,295**	-,203	-,203	-,179	-,176
	p	,098	,025	,247	,115	,071	,077	,051	,010	,077	,077	,120	,129
	n	76	76	76	78	78	78	71	76	77	77	77	76
THBS1	r	,079	-,009	,025	-,118	-,026	,024	,037	-,060	-,097	-,019	,017	-,173
	p	,492	,937	,830	,301	,820	,834	,757	,604	,400	,866	,886	,133
	n	77	77	77	79	79	79	72	77	78	78	78	77
VEGFA	r	-,075	-,129	-,073	-,011	-,042	-,029	,020	-,045	,028	,061	-,021	-,144
	p	,516	,264	,525	,926	,716	,799	,866	,696	,808	,593	,859	,211
	n	77	77	77	79	79	79	72	77	78	78	78	77
BIRC5	r	,093	,013	-,013	-,107	,011	,042	-,055	,010	,066	-,020	,011	,051
	p	,490	,925	,922	,419	,936	,750	,691	,944	,622	,883	,933	,701
	n	57	57	58	59	59	59	54	57	58	58	59	58
CCNB1	r	,232	,259*	,181	,094	,104	,151	-,026	,048	,181	,001	,104	,209
	p	,075	,046	,162	,467	,420	,241	,850	,716	,164	,995	,422	,107
	n	60	60	61	62	62	62	57	60	61	61	62	61
MKI67	r	,380**	,421**	,434**	,341**	,356**	,398**	,321**	,436**	,395**	,305*	,425**	,318*
	p	,003	,001	,000	,007	,005	,001	,015	,000	,002	,017	,001	,012
	n	60	60	61	62	62	62	57	60	61	61	62	61
MYBL2	r	,375**	,365**	,361**	,292*	,259*	,310*	,261	,327*	,334**	,278*	,376**	,365**
	p	,003	,004	,004	,021	,042	,014	,050	,011	,009	,030	,003	,004
	n	60	60	61	62	62	62	57	60	61	61	62	61
CTGF	r	-,340**	-,358**	-,224	-,436**	-,246*	-,293**	-,283*	-,339**	-,345**	-,334**	-,302**	-,264*
	p	,003	,002	,051	,000	,030	,009	,017	,003	,002	,003	,008	,021
	n	76	76	76	78	78	78	71	76	77	77	77	76
CDH1	r	,315**	,316**	,263*	,010	,085	,091	-,067	,069	,023	,028	,116	,178
	p	,006	,005	,022	,929	,461	,429	,579	,554	,843	,810	,314	,124
	n	76	76	76	78	78	78	71	76	77	77	77	76
TGFBR3	r	-,542**	-,575**	-,466**	-,424**	-,473**	-,510**	-,472**	-,553**	-,538**	-,444**	-,530**	-,379**
	p	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,001
	n	76	76	76	78	78	78	71	76	77	77	77	76
VIM	r	-,347**	-,481**	-,461**	-,346**	-,363**	-,366**	-,192	-,372**	-,443**	-,234*	-,422**	-,466**
	p	,002	,000	,000	,002	,001	,001	,109	,001	,000	,040	,000	,000
	n	76	76	76	78	78	78	71	76	77	77	77	76
TFPI	r	,174	,215	,176	,315*	,345*	,309*	,409**	,310*	,243	,372**	,298*	,252
	p	,216	,126	,207	,022	,011	,024	,003	,025	,083	,007	,030	,069
	n	52	52	53	53	53	53	51	52	52	52	53	53

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

§ Solo se analizaron los casos sin ypT0.

3.4 Análisis de la relación entre la expresión de los marcadores con las variables anatomopatológicas

El estudio de asociación entre expresión de marcadores en tumor residual y subtipo global mostró nuevamente diferencias para los miRNAs -17, -18a, -20a, -92a y -9, así como en los genes *THBS1* y *VEGFA*. Otros miRNAs que mostraron diferencias que no fueron observadas en el tumor antes del tratamiento fueron miR-200c y -429 (Tabla 44).

Tabla 44. Asociación entre marcadores y subtipo en tumor residual.

miRNA/Gen	N válido	Subtipo	N	Rango promedio	Chi ²	gl	p*
miR-200c	71	HR+Her2-	53	32,38	8,752	3	,033
		HR+Her2+	3	59,00			
		HR-Her2+	3	55,00			
		HR-Her2-	12	41,50			
miR-429	72	HR+Her2-	54	32,50	8,554	3	,036
		HR+Her2+	3	54,67			
		HR-Her2+	3	53,67			
		HR-Her2-	12	45,67			
miR-141	71	HR+Her2-	52	32,53	7,133	3	,068
		HR+Her2+	3	50,00			
		HR-Her2+	3	57,67			
		HR-Her2-	12	41,65			
miR-18a	75	HR+Her2-	55	33,20	10,334	3	,016
		HR+Her2+	3	57,33			
		HR-Her2+	4	52,25			
		HR-Her2-	13	49,46			
miR-19b	75	HR+Her2-	55	34,17	6,466	3	,091
		HR+Her2+	3	51,00			
		HR-Her2+	4	45,75			
		HR-Her2-	13	48,81			
miR-20a	75	HR+Her2-	55	33,63	8,347	3	,039
		HR+Her2+	3	50,83			
		HR-Her2+	4	48,00			
		HR-Her2-	13	50,46			
miR-519c	67	HR+Her2-	49	31,80	4,195	3	,241
		HR+Her2+	3	43,33			
		HR-Her2+	3	52,67			
		HR-Her2-	12	36,00			
miR-107	72	HR+Her2-	54	33,06	7,317	3	,062
		HR+Her2+	3	42,00			
		HR-Her2+	3	60,00			
		HR-Her2-	12	44,75			
miR-17	73	HR+Her2-	54	32,56	9,685	3	,021
		HR+Her2+	3	42,00			
		HR-Her2+	4	54,25			
		HR-Her2-	12	50,00			
miR-92a	73	HR+Her2-	54	32,99	9,443	3	,024
		HR+Her2+	3	37,00			
		HR-Her2+	4	59,75			
		HR-Her2-	12	47,46			
miR-106b	72	HR+Her2-	52	32,73	6,592	3	,086

miR-9		HR+Her2+	3	43,67			
		HR-Her2+	4	53,00			
		HR-Her2-	13	44,85			
	71	HR+Her2-	52	32,04	10,579	3	,014
CXCL12		HR+Her2+	3	44,67			
		HR-Her2+	3	67,00			
		HR-Her2-	13	42,69			
	73	HR+Her2-	53	40,06	5,053	3	,168
F3		HR+Her2+	3	32,00			
		HR-Her2+	4	19,25			
		HR-Her2-	13	31,15			
	70	HR+Her2-	52	37,21	2,391	3	,495
HIF1A		HR+Her2+	3	20,33			
		HR-Her2+	3	35,00			
		HR-Her2-	13	32,00			
	72	HR+Her2-	53	38,62	4,968	3	,174
PDGFA		HR+Her2+	3	41,00			
		HR-Her2+	4	15,75			
		HR-Her2-	12	32,92			
	72	HR+Her2-	53	37,43	3,663	3	,300
THBS1		HR+Her2+	3	21,33			
		HR-Her2+	4	23,50			
		HR-Her2-	12	40,50			
	73	HR+Her2-	53	39,81	9,045	3	,029
VEGFA		HR+Her2+	3	35,00			
		HR-Her2+	4	7,00			
		HR-Her2-	13	35,23			
	73	HR+Her2-	53	39,02	9,431	3	,024
CTGF		HR+Her2+	3	31,33			
		HR-Her2+	4	6,00			
		HR-Her2-	13	39,62			
	72	HR+Her2-	52	39,71	6,081	3	,108
CDH1		HR+Her2+	3	34,33			
		HR-Her2+	4	37,75			
		HR-Her2-	13	23,77			
	72	HR+Her2-	52	36,70	1,378	3	,711
TGFBR3		HR+Her2+	3	35,33			
		HR-Her2+	4	46,75			
		HR-Her2-	13	32,81			
	72	HR+Her2-	52	39,22	3,180	3	,365
VIM		HR+Her2+	3	30,67			
		HR-Her2+	4	28,75			
		HR-Her2-	13	29,35			
	72	HR+Her2-	52	40,17	7,056	3	,070
BIRC5		HR+Her2+	3	35,33			
		HR-Her2+	4	33,25			
		HR-Her2-	13	23,08			
	53	HR+Her2-	41	25,83	4,113	3	,250
	HR+Her2+	2	36,25				
	HR-Her2+	2	21,50				
	HR-Her2-	8	32,06				

CCNB1	56	HR+Her2-	42	27,98	1,945	3	,584
		HR+Her2+	2	17,00			
		HR-Her2+	2	27,00			
		HR-Her2-	10	33,30			
MKI67	56	HR+Her2-	42	25,43	6,407	3	,093
		HR+Her2+	2	41,50			
		HR-Her2+	2	43,00			
		HR-Her2-	10	35,90			
MYBL2	56	HR+Her2-	42	27,10	2,922	3	,404
		HR+Her2+	2	29,50			
		HR-Her2+	2	46,50			
		HR-Her2-	10	30,60			
TFPI	49	HR+Her2-	38	26,13	4,250	3	,236
		HR+Her2+	2	33,00			
		HR-Her2+	1	2,00			
		HR-Her2-	8	20,50			

La expresión elevada de los miRNAs -17 -18a, -19b y -20a se asoció con el subtipo triple negativo (Tabla 45).

Tabla 45. Asociación entre marcadores y subtipo triple negativo.

Marcador	Triple negativo	N	Rango promedio	Suma de rangos	p
miR-200	No	59	34,88	2058,00	,311
	Sí	12	41,50	498,00	
	Total	71			
miR-429	No	60	34,67	2080,00	,096
	Sí	12	45,67	548,00	
	Total	72			
miR-141	No	58	34,73	2014,50	,274
	Sí	13	41,65	541,50	
	Total	71			
miR-18a	No	62	35,60	2207,00	,037
	Sí	13	49,46	643,00	
	Total	75			
miR-19b	No	62	35,73	2215,50	,049
	Sí	13	48,81	634,50	
	Total	75			
miR-20a	No	62	35,39	2194,00	,023
	Sí	13	50,46	656,00	
	Total	75			
miR-519c	No	55	33,56	1846,00	,695
	Sí	12	36,00	432,00	
	Total	67			
miR-107	No	60	34,85	2091,00	,135
	Sí	12	44,75	537,00	
	Total	72			
miR-17	No	61	34,44	2101,00	,020
	Sí	12	50,00	600,00	
	Total	73			

miR-92a	No	61	34,94	2131,50	,062
	Sí	12	47,46	569,50	
	Total	73			
miR-106b	No	59	34,66	2045,00	,112
	Sí	13	44,85	583,00	
	Total	72			
miR-9	No	58	34,50	2001,00	,196
	Sí	13	42,69	555,00	
	Total	71			
CXCL12	No	60	38,27	2296,00	,273
	Sí	13	31,15	405,00	
	Total	73			
F3	No	58	36,22	2101,00	513
	Sí	12	32,00	384,00	
	Total	70			
HIF1A	No	60	37,22	2233,00	,516
	Sí	12	32,92	395,00	
	Total	72			
PDGFA	No	60	35,70	2142,00	,468
	Sí	12	40,50	486,00	
	Total	72			
THBS1	No	60	37,38	2243,00	,740
	Sí	13	35,23	458,00	
	Total	73			
VEGFA	No	60	36,43	2186,00	,624
	Sí	13	39,62	515,00	
	Total	73			
BIRC5	No	45	26,10	1174,50	,156
	Sí	8	32,06	256,50	
	Total	53			
CCNB1	No	46	27,46	1263,00	,301
	Sí	10	33,30	333,00	
	Total	56			
KI67	No	46	26,89	1237,00	,113
	Sí	10	35,90	359,00	
	Total	56			
MYBL2	No	46	28,04	1290,00	,653
	Sí	10	30,60	306,00	
	Total	56			
CTGF	No	59	39,31	2319,00	,015
	Sí	13	23,77	309,00	
	Total	72			
CDH1	No	59	37,31	2201,50	,482
	Sí	13	32,81	426,50	
	Total	72			
TGFBR3	No	59	38,08	2246,50	,173
	Sí	13	29,35	381,50	
	Total	72			
VIM	No	59	39,46	2328,00	,011
	Sí	13	23,08	300,00	
	Total	72			

TFPI	No	41	25,88	1061,00	,330
	Sí	8	20,50	164,00	
	Total	49			

La expresión de miR-429, clúster 17-92, miR-106b y miR-9, así como los genes *CTGF* y *VIM* se asoció con expresión elevada de receptores de estrógenos, mientras que se detectaron niveles de expresión más bajos de *MKI67* en tumores con ausencia de expresión de éstos (Tabla 46).

Tabla 46. Asociación entre marcadores y expresión de receptores hormonales.

Marcador	Receptores hormonales	N	Rango promedio	Suma de rangos	p
miR-200	Positivo	56	33,80	1893,00	,083
	Negativo	15	44,20	663,00	
	Total	71			
miR-429	Positivo	57	33,67	1919,00	,025
	Negativo	15	47,27	709,00	
	Total	72			
miR-141	Positivo	55	33,48	1841,50	,057
	Negativo	16	44,66	714,50	
	Total	71			
miR-18a	Positivo	58	34,45	1998,00	,009
	Negativo	17	50,12	852,00	
	Total	75			
miR-19b	Positivo	58	35,04	2032,50	,030
	Negativo	17	48,09	817,50	
	Total	75			
miR-20a	Positivo	58	34,52	2002,00	,011
	Negativo	17	49,88	848,00	
	Total	75			
miR-519c	Positivo	52	32,46	1688,00	,229
	Negativo	15	39,33	590,00	
	Total	67			
miR-107	Positivo	57	33,53	1911,00	,019
	Negativo	15	47,80	717,00	
	Total	72			
miR-17	Positivo	57	33,05	1884,00	,003
	Negativo	16	51,06	817,00	
	Total	73			
miR-92a	Positivo	57	33,20	1892,50	,004
	Negativo	16	50,53	808,50	
	Total	73			
miR-106b	Positivo	55	33,33	1833,00	,021
	Negativo	17	46,76	795,00	
	Total	72			
miR-9	Positivo	55	32,73	1800,00	,013
	Negativo	16	47,25	756,00	
	Total	71			
CXCL12	Positivo	56	39,63	2219,00	,055

F3	Negativo	17	28,35	482,00	
	Total	73			
	Positivo	55	36,29	1996,00	,534
HIF1A	Negativo	15	32,60	489,00	
	Total	70			
	Positivo	56	38,75	2170,00	,088
PDGFA	Negativo	16	28,63	458,00	
	Total	72			
	Positivo	56	36,57	2048,00	,957
THBS1	Negativo	16	36,25	580,00	
	Total	72			
	Positivo	56	39,55	2215,00	,062
VEGFA	Negativo	17	28,59	486,00	
	Total	73			
	Positivo	56	38,61	2162,00	,240
BIRC5	Negativo	17	31,71	539,00	
	Total	73			
	Positivo	43	26,31	1131,50	,344
CCNB1	Negativo	10	29,95	299,50	
	Total	53			
	Positivo	44	27,48	1209,00	,366
KI67	Negativo	12	32,25	387,00	
	Total	56			
	Positivo	44	26,16	1151,00	,040
MYBL2	Negativo	12	37,08	445,00	
	Total	56			
	Positivo	44	27,20	1197,00	,255
CTGF	Negativo	12	33,25	399,00	
	Total	56			
	Positivo	55	39,42	2168,00	,033
CDH1	Negativo	17	27,06	460,00	
	Total	72			
	Positivo	55	36,63	2014,50	,926
TGFBR3	Negativo	17	36,09	613,50	
	Total	72			
	Positivo	55	38,75	2131,50	,100
VIM	Negativo	17	29,21	496,50	
	Total	72			
	Positivo	55	39,91	2195,00	,013
TFPI	Negativo	17	25,47	433,00	
	Total	72			
	Positivo	40	26,48	1059,00	,128
	Negativo	9	18,44	166,00	
	Total	49			

Cuando se analizaron los niveles de expresión génica de los marcadores en función del tamaño del tumor tras tratamiento, se observó mayor nivel de expresión de miR-200c, miR-429, miR-141, miR-17, miR-19b, miR-20a, miR-92a, miR-106b y miR-9 en tumores más grandes (Tabla 47).

Tabla 47. Asociación entre marcadores y tamaño del tumor primario en tumor residual.

Marcador	ypT	N	Rango promedio	Suma de rangos	p
miR-200	ypT1-2	56	35,29	1976,00	,017
	ypT3-4	21	48,90	1027,00	
	Total	77			
miR-429	ypT1-2	57	35,82	2042,00	,018
	ypT3-4	21	49,48	1039,00	
	Total	78			
miR-141	ypT1-2	57	35,52	2024,50	,021
	ypT3-4	20	48,93	978,50	
	Total	77			
miR-18a	ypT1-2	59	37,67	2222,50	,068
	ypT3-4	21	48,45	1017,50	
	Total	80			
miR-19b	ypT1-2	59	35,89	2117,50	,003
	ypT3-4	21	53,45	1122,50	
	Total	80			
miR-20a	ypT1-2	59	36,14	2132,50	,005
	ypT3-4	21	52,74	1107,50	
	Total	80			
miR-519c	ypT1-2	53	34,26	1816,00	,073
	ypT3-4	20	44,25	885,00	
	Total	73			
miR-107	ypT1-2	57	37,11	2115,50	,126
	ypT3-4	21	45,98	965,50	
	Total	78			
miR-17	ypT1-2	58	35,38	2052,00	,003
	ypT3-4	21	52,76	1108,00	
	Total	79			
miR-92a	ypT1-2	58	36,13	2095,50	,013
	ypT3-4	21	50,69	1064,50	
	Total	79			
miR-106b	ypT1-2	58	36,27	2103,50	,032
	ypT3-4	20	48,88	977,50	
	Total	78			
miR-9	ypT1-2	57	34,35	1958,00	,002
	ypT3-4	20	52,25	1045,00	
	Total	77			
CXCL12	ypT1-2	58	38,54	2235,50	,348
	ypT3-4	21	44,02	924,50	
	Total	79			
F3	ypT1-2	56	40,08	2244,50	,156
	ypT3-4	19	31,87	605,50	
	Total	75			
HIF1A	ypT1-2	57	38,52	2195,50	,528
	ypT3-4	21	42,17	885,50	
	Total	78			
PDGFA	ypT1-2	57	39,13	2230,50	,813
	ypT3-4	21	40,50	850,50	
	Total	78			

THBS1	ypT1-2	58	42,03	2437,50	,192
	ypT3-4	21	34,40	722,50	
	Total	79			
VEGFA	ypT1-2	58	40,07	2324,00	,965
	ypT3-4	21	39,81	836,00	
	Total	79			
BIRC5	ypT1-2	46	28,86	1327,50	,158
	ypT3-4	13	34,04	442,50	
	Total	59			
CCNB1	ypT1-2	47	31,16	1464,50	,791
	ypT3-4	15	32,57	488,50	
	Total	62			
KI67	ypT1-2	47	31,10	1461,50	,755
	ypT3-4	15	32,77	491,50	
	Total	62			
MYBL2	ypT1-2	47	31,36	1474,00	,915
	ypT3-4	15	31,93	479,00	
	Total	62			
CTGF	ypT1-2	57	39,06	2226,50	,778
	ypT3-4	21	40,69	854,50	
	Total	78			
CDH1	ypT1-2	57	39,25	2237,50	,875
	ypT3-4	21	40,17	843,50	
	Total	78			
TGFBR3	ypT1-2	57	40,38	2301,50	,573
	ypT3-4	21	37,12	779,50	
	Total	78			
VIM	ypT1-2	57	40,98	2336,00	,341
	ypT3-4	21	35,48	745,00	
	Total	78			
TFPI	ypT1-2	41	25,05	1027,00	,089
	ypT3-4	12	33,67	404,00	
	Total	53			

No se observaron diferencias en los niveles de expresión génica en función de la afectación ganglionar tras el tratamiento (**Tabla 48**).

Tabla 48. Asociación entre marcadores y afectación ganglionar en tumor residual.

Marcador	ypN	N	Rango promedio	Suma de rangos	p
miR-200	ypN0-1	45	29,78	1340,00	,128
	ypN2-3	18	37,56	676,00	
	Total	63			
miR-429	ypN0-1	46	30,59	1407,00	,189
	ypN2-3	18	37,39	673,00	
	Total	64			
miR-141	ypN0-1	45	30,66	1379,50	,357
	ypN2-3	18	35,36	636,50	
	Total	63			

miR-18a	ypN0-1	47	30,61	1438,50	,054
	ypN2-3	19	40,66	772,50	
	Total	66			
miR-19b	ypN0-1	47	31,93	1500,50	,295
	ypN2-3	19	37,39	710,50	
	Total	66			
miR-20a	ypN0-1	47	32,19	1513,00	,384
	ypN2-3	19	36,74	698,00	
	Total	66			
miR-519c	ypN0-1	42	29,02	1219,00	,317
	ypN2-3	18	33,94	611,00	
	Total	60			
miR-107	ypN0-1	46	30,55	1405,50	,181
	ypN2-3	18	37,47	674,50	
	Total	64			
miR-17	ypN0-1	47	31,34	1473,00	,253
	ypN2-3	18	37,33	672,00	
	Total	65			
miR-92a	ypN0-1	47	31,49	1480,00	,298
	ypN2-3	18	36,94	665,00	
	Total	65			
miR-106b	ypN0-1	46	31,43	1446,00	,464
	ypN2-3	18	35,22	634,00	
	Total	64			
miR-9	ypN0-1	45	29,94	1347,50	,159
	ypN2-3	18	37,14	668,50	
	Total	63			
CXCL12	ypN0-1	46	33,84	1556,50	,579
	ypN2-3	19	30,97	588,50	
	Total	65			
F3	ypN0-1	43	33,07	1422,00	,159
	ypN2-3	18	26,06	469,00	
	Total	61			
HIF1A	ypN0-1	46	33,83	1556,00	,584
	ypN2-3	19	31,00	589,00	
	Total	65			
PDGFA	ypN0-1	45	33,82	1522,00	,382
	ypN2-3	19	29,37	558,00	
	Total	64			
THBS1	ypN0-1	46	35,14	1616,50	,155
	ypN2-3	19	27,82	528,50	
	Total	65			
VEGFA	ypN0-1	46	34,57	1590,00	,299
	ypN2-3	19	29,21	555,00	
	Total	65			
BIRC5	ypN0-1	33	22,06	728,00	,121
	ypN2-3	13	27,15	353,00	
	Total	46			
CCNB1	ypN0-1	35	22,97	804,00	,212
	ypN2-3	13	28,62	372,00	
	Total	48			

KI67	ypN0-1	35	24,66	863,00	,898
	ypN2-3	13	24,08	313,00	
	Total	48			
MYBL2	ypN0-1	35	23,66	828,00	,494
	ypN2-3	13	26,77	348,00	
	Total	48			
CTGF	ypN0-1	45	33,36	1501,00	,572
	ypN2-3	19	30,47	579,00	
	Total	64			
CDH1	ypN0-1	45	32,82	1477,00	,831
	ypN2-3	19	31,74	603,00	
	Total	64			
TGFBR3	ypN0-1	45	33,47	1506,00	,523
	ypN2-3	19	30,21	574,00	
	Total	64			
VIM	ypN0-1	45	32,13	1446,00	,808
	ypN2-3	19	33,37	634,00	
	Total	64			
TFPI	ypN0-1	28	21,21	594,00	,555
	ypN2-3	12	18,83	226,00	
	Total	40			

3.5 Estudio del valor pronóstico de los marcadores seleccionados

El estudio de supervivencia univariante mostró que la expresión alta de miR-18a, miR-17 y *MYBL2* tenía un impacto pronóstico negativo en supervivencia global (**Tabla 49 primera fila y Figura 8**). En supervivencia libre de enfermedad, la expresión alta de miR-200c, miR-141, miR-18a, miR-19b, miR-17, miR-106b y *MYBL2* se asoció a un peor pronóstico (**Tabla 49 segunda fila y Figura 9**). En supervivencia libre de recaída a distancia, la expresión alta de miR-200c, miR-141, miR-18a, miR-19b, miR-20a, miR-17, miR-106b y *MYBL2* así mismo, se asoció con un peor pronóstico (**Tabla 49 tercera fila y Figura 10**).

Tabla 49. Análisis univariante de marcadores y supervivencia postquimioterapia.

Marcador	SG (valor- <i>p</i> , log-rango)	SLE (valor- <i>p</i> , log-rango)	SLRD (valor- <i>p</i> , log-rango)
miR-200	,321	,037	,016
miR-429	,393	,056	,084
miR-141	,110	,008	,004
miR-18a	,041	,004	,003
miR-19b	,053	,022	,004
miR-20a	,051	,063	,015
miR-519c	,638	,213	,114
miR-107	,129	,146	,082
miR-17	,029	,009	,004
miR-92a	,160	,337	,215
miR-106b	,107	,014	,002
miR-9	,774	,892	,505
<i>CXCL12</i>	,799	,592	,880
<i>F3</i>	,500	,069	,147

HIF1A	,395	,476	,492
PDGFA	,126	,752	,770
THBS1	,271	,193	,411
VEGFA	,690	,993	,965
BIRC5	ND	ND	ND
CCNB1	,050	,096	,260
KI67	,088	,101	,068
MYBL2	,013	,003	,011
CTGF	,550	,621	,961
CDH1	,106	,237	,223
TGFBR3	,675	,147	,299
VIM	,774	,257	,443
TFPI	,638	,925	,420

ND: Análisis No Disponible

Figura 8. Gráficas de supervivencia global para los marcadores pronósticamente relevantes en el análisis univariante en el tumor residual.

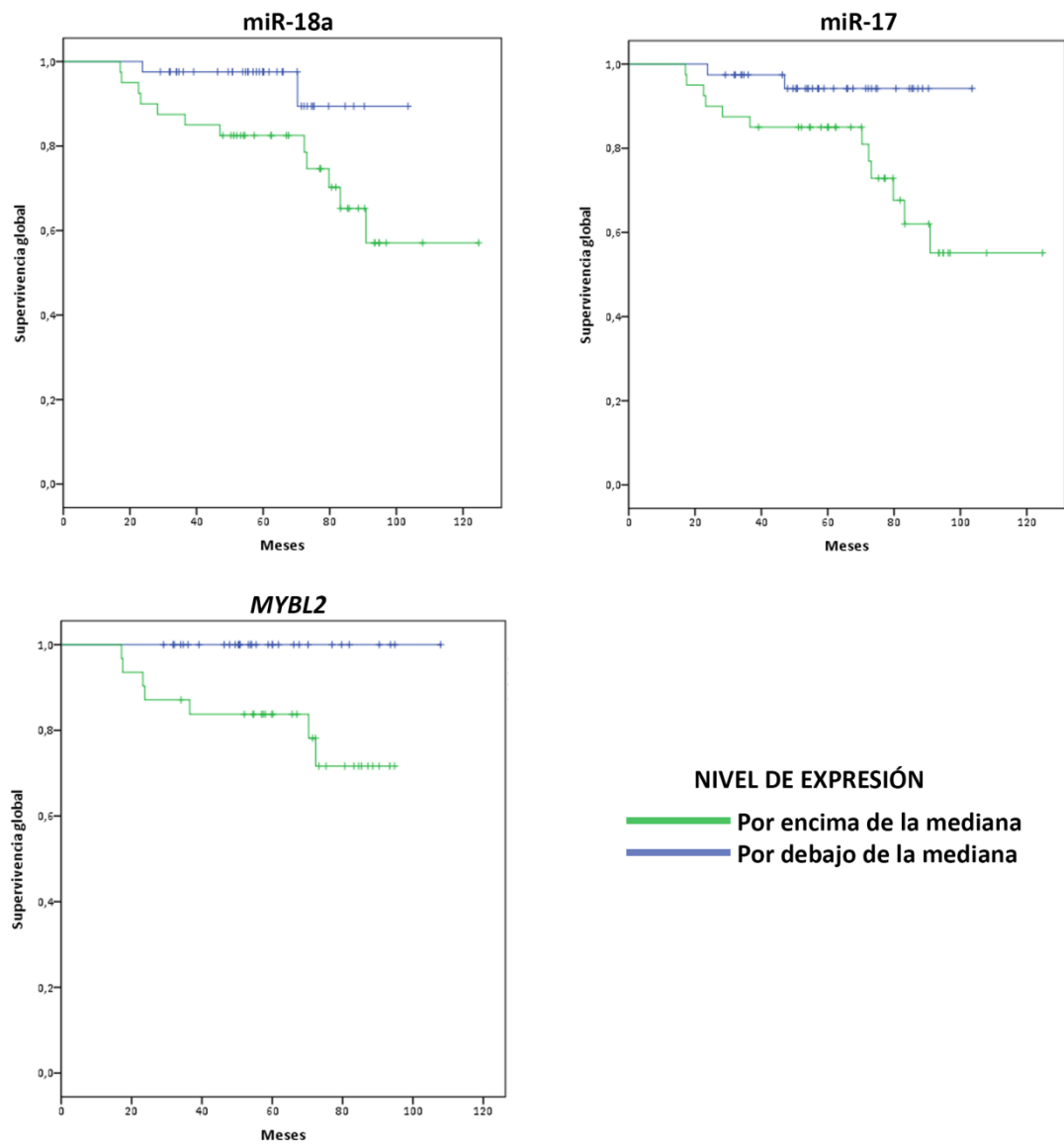


Figura 9. Gráficas de supervivencia libre de enfermedad para los marcadores pronósticamente relevantes en el análisis univariante en el tumor residual.

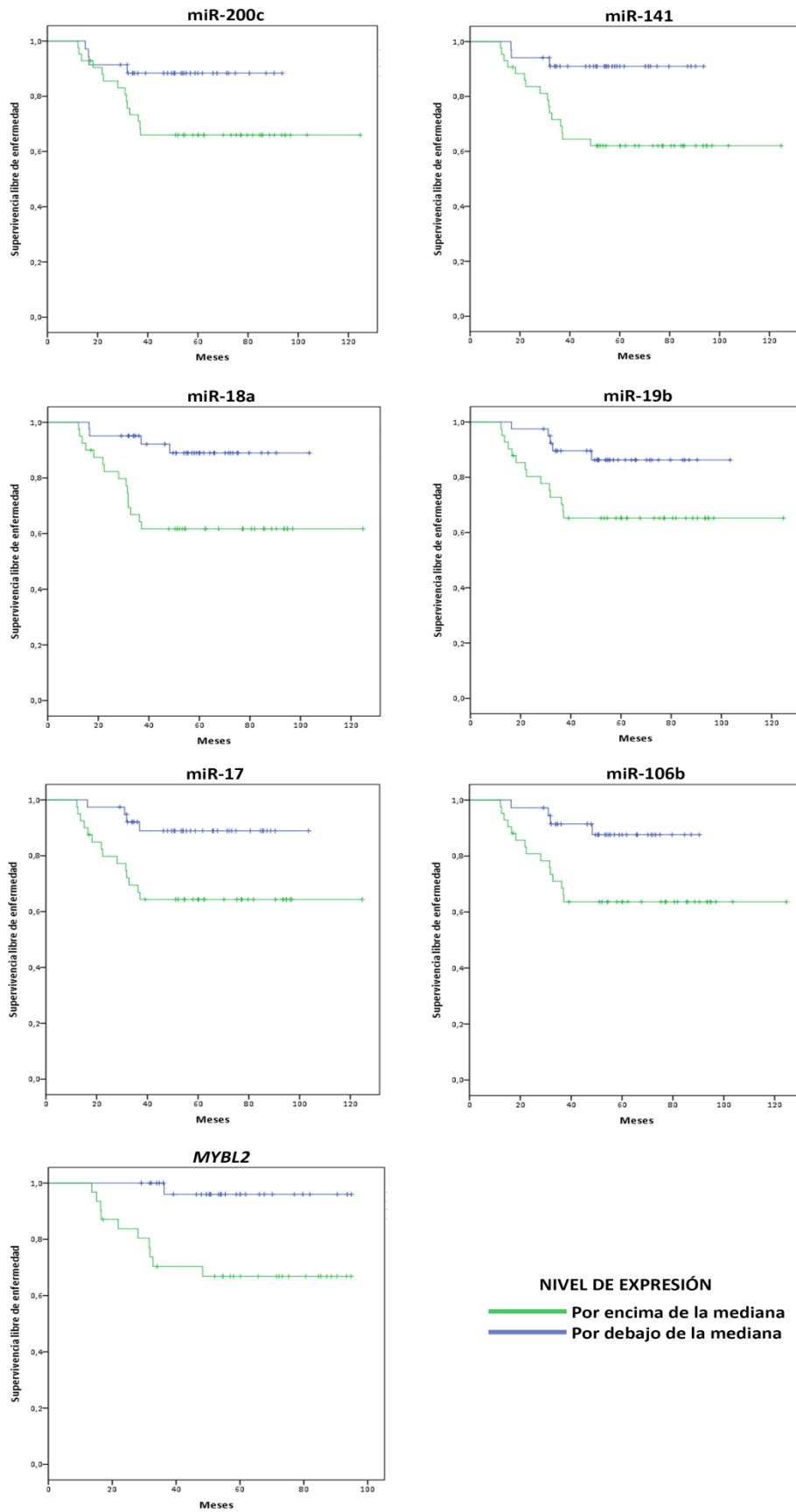
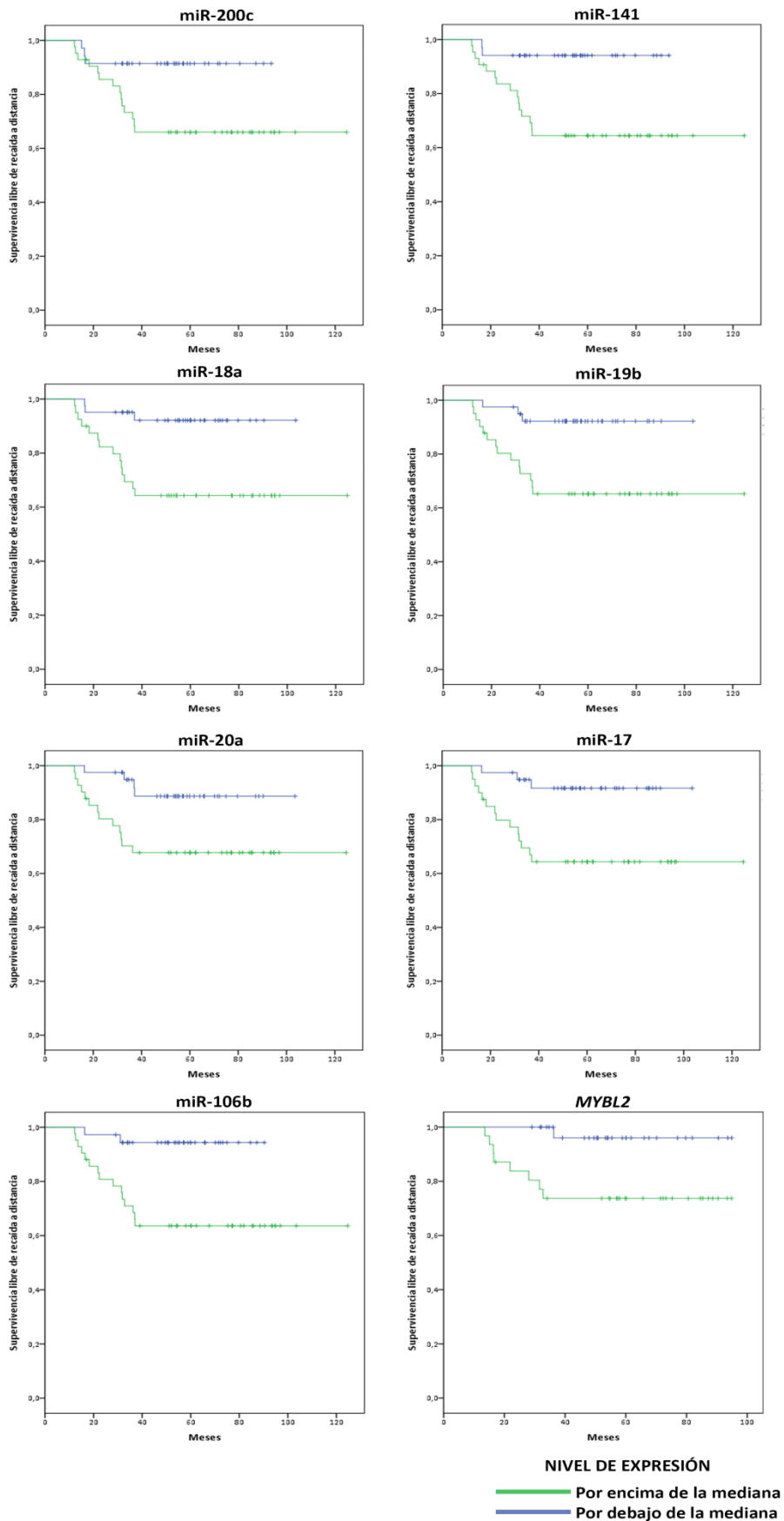


Figura 10. Gráficas de supervivencia libre de recaída a distancia para los marcadores pronósticamente relevantes en el análisis univariante en el tumor residual.



El análisis multivariante, incluyendo las variables clínicamente relevantes, descartó en el caso de la supervivencia global la asociación independiente de miR-18a, miR-17 y MYBL2. En el caso de la supervivencia libre de enfermedad y libre de recaída a distancia, miR-18a mostró ser el único marcador con valor pronóstico en el modelo multivariante, dependiendo también de subtipo y afectación ganglionar (Tabla 50).

Tabla 50. Análisis multivariante incluyendo las variables clínicas y los marcadores pronósticamente relevantes en el análisis univariante previo. (A-C) Supervivencia global. (D-J) Supervivencia libre de enfermedad. (K-Q) Supervivencia libre de recaída a distancia.

A		SG		
Variable	HR	IC95%	<i>p</i>	
Fenotipo	1,785	1,174-2,714	,007	
ypN+	10,004	1,274-78,581	,029	
miR-18a	2,591	,549-12,234	,229	

J		SLE		
Variable	HR	IC95%	<i>p</i>	
Fenotipo	1,639	1,032-2,603	,036	
ypN+	3,206	,675-15,238	,143	
MYBL2	7,860	,976-63,289	,053	

B		SG		
Variable	HR	IC95%	<i>p</i>	
Fenotipo	1,872	1,215-2,884	,004	
ypN+	10,044	1,262-79,946	,029	
miR-18a	1,808	,383-8,537	,454	

K		SLRD		
Variable	HR	IC95%	<i>p</i>	
Fenotipo	1,655	1,136-2,410	,009	
ypN+	13,896	1,773-108,92	,012	
miR-200c	2,025	,566-7,249	,278	

C		SG		
Variable	HR	IC95%	<i>p</i>	
Fenotipo	2,251	1,132-4,478	,021	
ypN+	5,292	,606-46-206	,132	
MYBL2	<10	0-1x10 ¹⁴⁴	,942	

L		SLRD		
Variable	HR	IC95%	<i>p</i>	
Fenotipo	1,409	,973-2,042	,070	
ypN+	10,900	1,329-89,432	,026	
miR-141	2,404	,50911,362	,268	

D		SLE		
Variable	HR	IC95%	<i>p</i>	
Fenotipo	1,733	1,209-2,485	,003	
ypN+	7,427	1,639-33,661	,009	
miR-200c	1,662	,531-5,208	,383	

E		SLE		
Variable	HR	IC95%	<i>p</i>	
Fenotipo	1,591	1,125-2,252	,009	
ypN+	6,629	1,384-31,742	,018	
miR-141	1,750	,460-6,665	,412	

M		SLRD		
Variable	HR	IC95%	<i>p</i>	
Fenotipo	1,407	,968-2,046	,073	
ypN+	13,277	1,747-100,88	,012	
miR-18a	3,879	1,105-13,621	,034	

F		SLE		
Variable	HR	IC95%	<i>p</i>	
Fenotipo	1,578	1,113-2,237	,010	
ypN+	7,299	1,675-31,809	,008	
miR-18a	3,092	1,015-9,416	,047	

N		SLRD		
Variable	HR	IC95%	<i>p</i>	
Fenotipo	1,456	1,001-2,117	,049	
ypN+	11,706	1,519-90,215	,018	
miR-19b	2,696	,764-9,511	,123	

G		SLE		
Variable	HR	IC95%	<i>p</i>	
Fenotipo	1,642	1,160-2,324	,005	
ypN+	7,111	1,611-31,384	,010	
miR-19b	1,649	,585-4,649	,344	

Ñ		SLRD		
Variable	HR	IC95%	<i>p</i>	
Fenotipo	1,480	1,024-2,139	,037	
ypN+	12,419	1,599-96,468	,016	
miR-20a	1,862	,5985,799	,284	

O		SLRD		
Variable	HR	IC95%	<i>p</i>	
Fenotipo	1,514	1,032-2,221	,034	
ypN+	12,561	1,601-98,562	,016	
miR-17	2,116	,589-7,603	,251	

H		SLE			P		SLRD		
Variable	HR	IC95%	p	Variable	HR	IC95%	p		
Fenotipo	1,620	1,117-2,352	,011	Fenotipo	1,463	1,007-2,128	,046		
ypN+	6,842	1,509-31,029	,013	ypN+	10,136	1,287-79,847	,028		
miR-17	1,634	,513-5,196	,406	miR-106b	3,459	,770-15,547	,106		

I		SLE			Q		SLRD		
Variable	HR	IC95%	p	Variable	HR	IC95%	p		
Fenotipo	1,624	1,148-2,298	,006	Fenotipo	1,358	,822-2,243	,233		
ypN+	6,664	1,479-30,023	,014	ypN+	6,371	,773-52,514	,085		
miR-106b	1,847	,596-5,723	,288	MYBL2	5,640	,686-46,372	,108		

3.6 Análisis del cambio de la expresión inducido por quimioterapia

Cuando se estudio el cambio inducido por quimioterapia, se observó un aumento global de los miRNAs a excepción de miR-200c. La quimioterapia indujo aumento de expresión también en los genes codificantes *CXCL12*, *F3*, *HIF1A*, *THBS1*, *CTGF*, *TGFBR3*, *VIM* y *TFPI*, así como disminución de la expresión en los genes *CDH1*, *CCNB1*, *MKI67* y *MYBL2* mientras que los genes *PDGFA*, *VEGFA* y *BIRC5* no modificaron sus niveles de expresión con el tratamiento (Tabla 51).

Tabla 51. Cambios sobre la expresión génica en el tumor primario inducidos por la quimioterapia (PreQT-PostQT)

miRNA/Gen	N pareado válido§	Rangos	N	Rango promedio	Suma de rangos	Z	Cambio inducido	p*
miR-200c	65	Negativos	33	38,97	1286	- 1,395	Sin cambio	,163
		Positivos	32	26,84	859			
miR-429	66	Negativos	37	39,57	1464	- 2,290	Aumento	,022
		Positivos	29	25,76	747			
miR-141	66	Negativos	43	38,65	1662	- 3,555	Aumento	<,001
		Positivos	23	23,87	549			
miR-18a	70	Negativos	49	37,31	1828	- 3,426	Aumento	<,001
		Positivos	21	31,29	657			
miR-19b	70	Negativos	52	39,00	2028	- 4,597	Aumento	<,001
		Positivos	18	25,39	457			
miR-20a	70	Negativos	54	40,09	2165	- 5,399	Aumento	<,001
		Positivos	16	20,00	320			
miR-519c	59	Negativos	34	34,19	1162	- 2,095	Aumento	,036
		Positivos	25	24,30	607			

miR-107	64	Negativos	34	41,62	1415	-	Aumento	,012
		Positivos	30	22,17	665	2,508		
miR-17	67	Negativos	50	38,04	1902	-	Aumento	<,001
		Positivos	17	22,12	376	4,766		
miR-92a	67	Negativos	55	36,24	1993	-	Aumento	<,001
		Positivos	12	23,75	285	5,335		
miR-106b	65	Negativos	49	36,02	1765	-	Aumento	<,001
		Positivos	16	23,75	380	4,525		
miR-9	66	Negativos	41	37,56	1540	-	Aumento	,006
		Positivos	25	26,84	671	2,776		
CXCL12	62	Negativos	58	32,67	1895	-	Aumento	<,001
		Positivos	4	14,50	58	6,440		
F3	55	Negativos	47	29,57	1390	-	Aumento	<,001
		Positivos	8	18,75	150	5,195		
HIF1A	61	Negativos	44	34,32	1510	-	Aumento	<,001
		Positivos	17	22,41	381	4,055		
PDGFA	60	Negativos	38	30,50	1159	-	Sin cambio	,072
		Positivos	22	30,50	671	1,796		
THBS1	62	Negativos	42	37,24	1564	-	Aumento	<,001
		Positivos	20	19,45	389	4,119		
VEGFA	62	Negativos	37	32,30	1195	-	Sin cambio	0,126
		Positivos	25	30,32	758	1,532		
CTGF	63	Negativos	55	34,11	1876	-	Aumento	<,001
		Positivos	7	11,00	77	6,306		
		Empates	1					
CDH1	63	Negativos	17	28,85	490	-	Disminución	,001
		Positivos	45	32,50	1462	3,407		
		Empates	1					
TGFBR3	63	Negativos	46	35,11	1615	-	Aumento	<,001
		Positivos	16	21,13	338	4,477		
		Empates	1					

VIM	63	Negativos	55	34,22	1882	-	Aumento	<,001
		Positivos	7	10,14	71	6,349		
		Empates	1					
BIRC5	43	Negativos	7	9,43	66	-	Sin cambio	,152
		Positivos	6	4,17	25	1,433		
		Empates	30					
CCNB1	45	Negativos	13	21,08	274	-	Disminución	,009
		Positivos.	31	23,10	716	2,579		
		Empates	1					
MKI67	45	Negativos	6	24,17	145	-	Disminución	<,001
		Positivos	39	22,82	890	4,205		
MYBL2	45	Negativos	7	24,43	171	-	Disminución	<,001
		Positivos	38	22,74	864	3,911		
TFPI	41	Negativos	29	23,55	683	-	Aumento	,001
		Positivos	12	14,83	178	3,272		

§ Solo se analizaron los casos sin ypT0.

*Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

3.7 Conclusiones del Capítulo III

Como conclusión del tercer capítulo de resultados, analizando el tumor residual, miR-200c se confirmó como el miRNA mayormente expresado en nuestra serie mientras que miR-107 fue el que menor nivel de expresión mostró. Los genes mayormente expresados fueron nuevamente genes implicados en proliferación celular (*MKI67* y *MYBL2*) mientras que los que tuvieron menor nivel de expresión fueron *PDGFA* y *F3*. Los miRNAs analizados mostraron una fuerte correlación directa con genes implicados en proliferación, e inversa con genes importantes en quimiotaxis y angiogénesis. Nuevamente miR-17-92a se asoció con los subtipos tumorales, así como *THBS1* y *VEGFA*. MiR-17-92a se asociaron fuertemente con subtipo triple negativo, mientras que *CTGF* y *VIM* lo hicieron con subtipo luminal. MiR-17-92a, miR-200c, miR-106b y miR-9 se asociaron con tumores mayores. Ningún marcador se asoció con la afectación ganglionar. La expresión de miR-18a fue factor de mal pronóstico para SLE y SLRD en el modelo multivariante. La quimioterapia indujo un aumento general de la expresión de todos los microRNAs, así como de factores importantes en angiogénesis, mientras que provocó una disminución de la expresión de factores importantes en proliferación celular.

CAPÍTULO IV

CAPÍTULO IV: EFECTO DE LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL DEL CÁNCER DE MAMA

4.1 Características de la subserie clínica

A partir de las muestras de las cuales se pudieron obtener datos suficientes para los análisis se construyó una subserie de 108 pacientes. Los resultados de las características y tratamiento de las pacientes no variaron significativamente: mediana de edad de 56 años, el 97,2% recibió tratamiento basado en antraciclinas y taxanos con una respuesta clínica del 87%, observándose una reducción del estadio de la enfermedad en un 56,9% de los casos. El 47,2% de las pacientes recibió cirugía conservadora, obteniéndose RCp en el 19,4% de los casos. En la **Tabla 52** se muestran los resultados del análisis de la subserie. De igual forma no se alcanzó la mediana de seguimiento tras cinco años de observación.

Tabla 52. Características de las pacientes en la subserie (pretratamiento).

Característica	N	%
N	108	100%
Edad (mediana; min-max)	56.5 (21-79)	
Historia familiar de cáncer de mama		
No	85	78,7
Sí	22	20,4
Desconocido	1	,9
Estatus menopáusico		
Post-menopausia	54	50,0
Pre-menopausia	54	50,0
Estadio clínico		
IIA	19	17,6
IIB	32	29,6
IIIA	35	32,4
IIIB	4	3,7
IIIC	18	16,7
Estadio clínico del tumor primario		
T1-2	50	46,3
T3-4	58	53,7
Estadio clínico de los nódulos linfáticos		
N0-1	71	65,7
N2-3	37	34,3
Tipo histológico		
Ductal	102	94,4
Lobulillar	4	3,7
Otros	2	1,9
Grado histológico del tumor		
GI-II	41	38,0
GIII	56	51,9
No disponible	11	10,1
Afectación linfovascular		
No	85	78,7
Sí	17	15,7
No disponible	6	5,6

Subtipos IHQ prequimioterapia			
HR+ HER2-		53	49,1
HR+ HER2+		14	13,0
HR - HER2+		13	12,0
Triple negativo		24	22,2
No disponible		4	3,7
Tratamiento			
Antraciclinas x4 – Docetaxelx4		90	83,3
Antraciclinas y Paclitaxel semanal		9	8,3
Esquema sin antraciclinas		2	1,9
Esquema con antraciclinas sin taxanos		1	,9
Esquema con antraciclinas y taxanos concomitantes		6	5,6
Tratamiento con Trastuzumab			
No		86	79,6
Neoadyuvante y adyuvante		17	15,7
Solo adyuvante		5	4,7
Cirugía			
Mastectomía		57	52,8
Cirugía conservadora		51	47,2
Respuesta completa patológica (RCp)			
ypT0/Tis + ypN0 + M0		21	19,4
ypT0/Tis		23	21,3
ypN0		42	38,9
yPN+			
Negativo		59	54,6
Positivo		49	45,4

4.2 Perfil angiogénico y vascular basal

El análisis vascular pudo realizarse en 86 casos (79,6%) en los que había suficiente tejido para la evaluación de la IHQ para vasos teñidos con anti-CD34 (**Figura 11-A**). La mediana del tamaño medio vascular (MVS) fue de 102,5 μm^2 (rango: 51,7-273). El MVS fue mayor en el grupo de pacientes con afectación ganglionar extensa (cN2-3; $p=0,025$) y también en pacientes con cáncer de mama triple negativo ($p=0,049$) (**Figura 11-BC**). No se observó asociación con otras variables clínicas ni con supervivencia (**Tabla 53**).

Tabla 53. Asociación del tamaño vascular medio (MVS) y la densidad microvascular (MVD) con características clínicas y patológicas.

n=86		MVS pre-QT		MVD Pre-QT	
		Mediana; rango	p^*	Mediana; rango	p^*
Menopausia	Postmen.	104,39; 51,71-208,06	0,64	24,55; 5,73-97,24	0,52
	Premen.	97,87; 61,68-237,14		29,33; 10,38-85,98	
Grado histológico	Grado 1-2	104,39; 51,71-167,88	0,94	22,09; 8,65-74,69	0,054
	Grado 3	98,22; 58,76-237,14		31,49; 5,73-97,24	
cN2-3	cN0-1	95,64; 51,71-164,73	0,1	28,90; 8,65-97,24	0,30

cT3-4	cN2-3	118,92; 58,76-237,14		23,38; 5,73-82,67	
	cT1-2	109,9158; 51,71-189,16	0,75	25,90; 10,38-85,98	0,53
	cT3-4	101,48; 65,00-237,14		27,63; 5,73-97,24	
Subtipo tumoral	HR+ Her2-	97,19; 61,68-189,16	0,06	28,75; 8,65-97,24	0,79
	HR+ Her2+	91,62; 51,71-162,33		26,07; 13,44-72,92	
	HR- Her2+	123,54; 58,76-178,60		20,55; 14,42-82,67	
	HR- Her2-	120,70; 75,03-237,14		24,38; 5,73-54,87	
Triple negativo	No	97,70; 51,71-189,16	0,049	26,18; 8,65-97,24	0,39
	Sí	120,70; 75,03-237,14		24,38; 5,73-54,87	
yPN	ypN0	94,08; 51,71-237,14	0,032	29,05; 10,38-97,24	0,29
	ypN1-3	106,75; 65,00-208,06		23,88; 5,73-78,19	
RCp	No RCp	102,7; 51,7-237,1	0,53	26,1; 5,7-86,0	0,50
	RCp	93,7; 58,7-171,5		26,5; 14,4-97,2	
Respuesta clínica	Sí	102,1; 51,7-208,1	0,26	26,2; 5,7-97,2	0,96
	No	149,5; 68,5-237,1		26,1; 12,2-72,9	

*U Mann-Whitney/Kruskal-Wallis test (Holm-Bonferroni, ajuste de p para comparaciones múltiples).

Se encontraron proliferaciones microvasculares glomerulares (GMP) en el 32,5% de los casos, estando su presencia asociada con mayor tamaño vascular ($p=0,012$) (**Figura 11-D y Tabla 54**). La presencia de GMP no se asoció con pronóstico adverso; sin embargo, la presencia simultánea de tamaño vascular alto y GMP+ (24,4% de los casos) fue más frecuente en el grupo de no expresión de receptores hormonales (45,8% vs. 15,1%; $p=0,01$), definiendo un grupo de pacientes con un patrón vascular de alto riesgo, con una menor supervivencia libre de enfermedad (log-rango; HR: 2,78, IC95%: 0,96-8,03; $p=0,048$) (**Figura 11-E**).

Tabla 54. Asociación prequimioterapia de las proliferaciones microvasculares glomerulares (GMP) con características clínicas y patológicas.

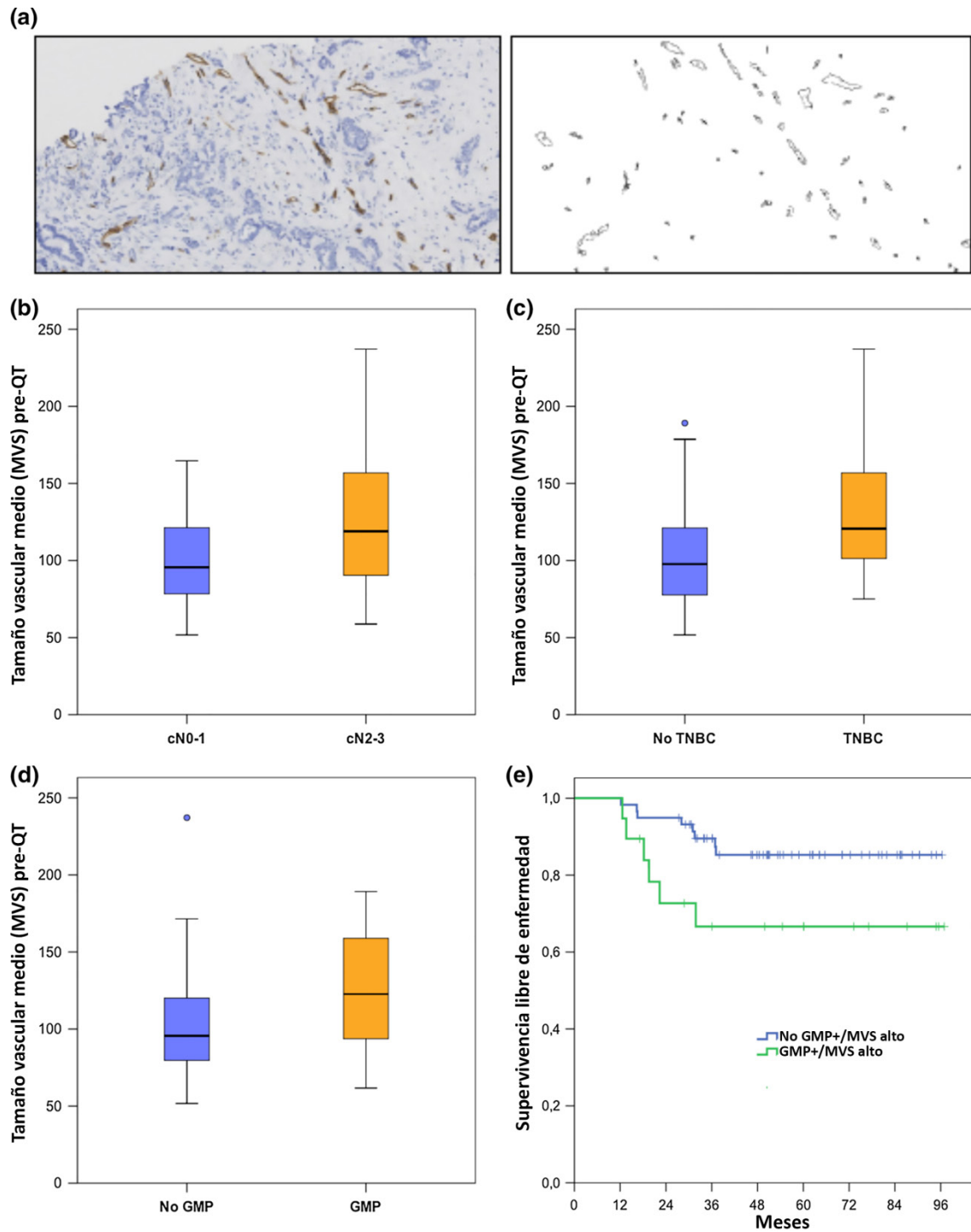
n=80	No GMP n=54	GMP n=26	p^*	
Menopausia	Postmenopausia	28 (68%)	13 (32%)	1,0
	Premenopausia	26 (67%)	13 (33%)	
Afectación ganglionar	cN0-1	40 (73%)	15 (27%)	0,84
	cN2-3	14 (56%)	11 (44%)	
Grado	G1-2	25 (76%)	8 (24%)	0,80
	G3	24 (61%)	15 (39%)	

cT				1,0
	cT1-2	25 (66%)	13 (34%)	
	cT3-4	29 (69%)	13 (31%)	
Subtipo				0,90
	HR+ Her2-	31 (72%)	12 (28%)	
	HR+ Her2+	9 (82%)	2 (18%)	
	HR- Her2+	4 (57%)	3 (43%)	
	TNBC	8 (47%)	9 (53%)	
TNBC				0,36
	Sí	8 (47%)	9 (53%)	
	No	44 (72%)	17 (28%)	
RCp				1,0
	RCp	9 (64%)	5 (36%)	
	No RCp	45 (68%)	21 (32%)	
Respuesta clínica				0,11 [†]
	Sí	48 (72%)	19 (28%)	
	No	2 (25%)	6 (75%)	

* Test Chi² (Holm-Bonferroni ajustado para los valores *p* en comparaciones múltiples)

† Test exacto de Fisher (Holm-Bonferroni ajustado para los valores *p* en comparaciones múltiples)

Figura 11. Perfil angiogénico basal prequimioterapia del cáncer de mama. (A) Figuras representativas de inmunohistoquímica para CD34 en biopsias de cáncer de mama y procesamiento digital para analizar MVD y MVS. (B) Asociación de MVS pretratamiento con estadio clínico linfático ($p=0,025$). (C) Asociación de MVS pretratamiento con el subtipo triple negativo del cáncer de mama ($p=0,049$). (D) Mayor MVS prequimioterapia en tumores con presencia de GMP ($p=0,012$). (E) Kaplan-Meier de SLE de acuerdo al subtipo vascular: grupo de alto riesgo definido como GMP+ con MVS por encima del valor de la mediana ($p=0,048$; test de log-rango).



El tamaño medio vascular fue de 26,5 μm^2 (rango de 5,7 a 97,2) para el grupo completo, no asociándose con estadio del tumor, afectación ganglionar, subtipo de cáncer de mama, grado histológico u otras variables clínicas y patológicas (**Tabla 53**). El mayor tamaño vascular (por encima de la mediana) no se asoció con peor SLE ni con SG. Se analizó también el área vascular, pero los resultados se correlacionaban fuertemente con la densidad microvascular ($r=0,880$; $p<0,001$), y la correlación con las variables clínicas fue similar, de forma que solo se muestran resultados para densidad microvascular. La expresión de factores proangiogénicos (*VEGFA*, *PDGFA*, *HIF1A*) y antiangiogénicos (*THBS1*, *CTGF*) se analizó en las muestras prequimioterapia, observándose una expresión predominante de *THBS1*, *CTGF* y *VEGFA*, mientras que se observaron menores niveles de *HIF1A*, y *PDGFA* (**Tabla 55**). La expresión de *VEGFA* se correlacionó con la de *HIF1A* ($r=0,362$; $p=0,001$), mientras que se observó una fuerte correlación entre *THBS1* y *CTGF* ($r=0,489$; $p=0,00001$).

Tabla 55. Expresión de los biomarcadores angiogénicos pre y post quimioterapia en la subserie clínica.

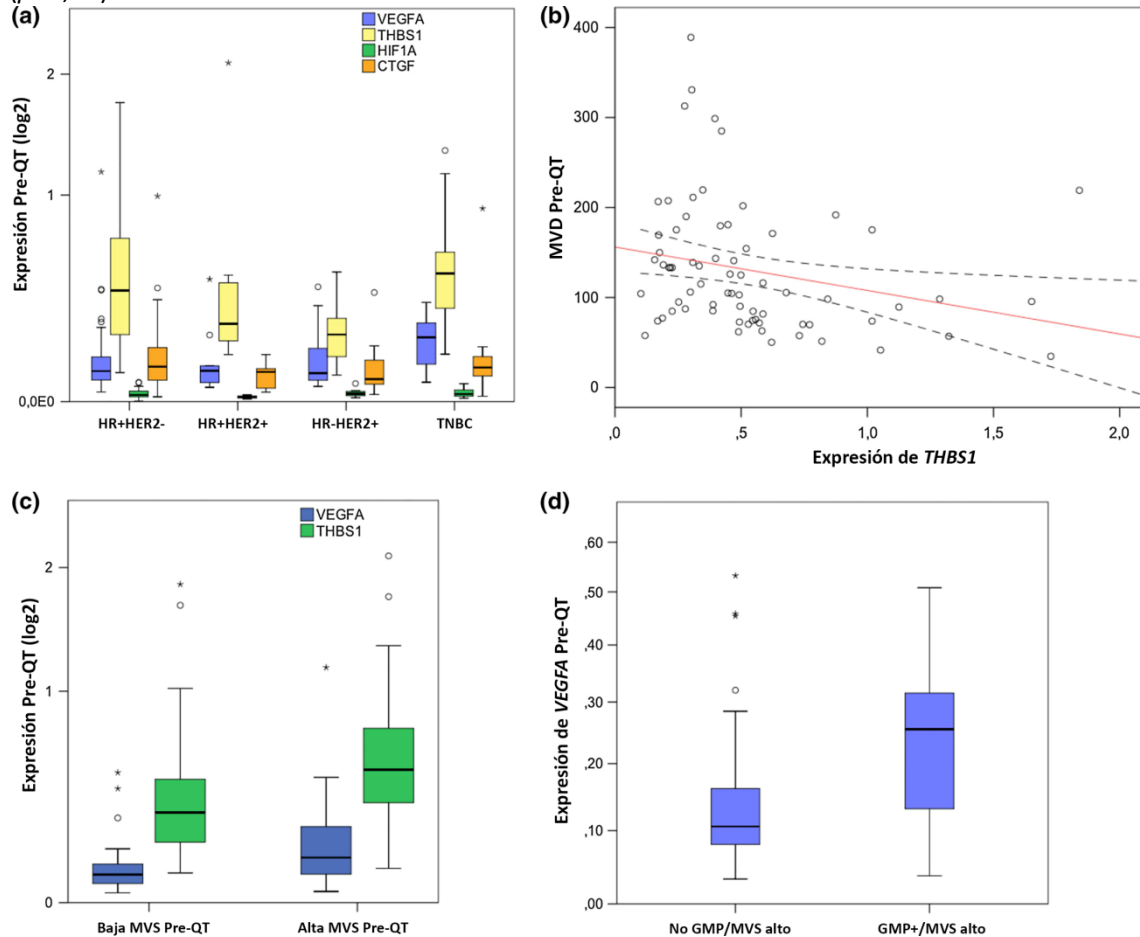
	N=75	Media; SD	Mediana	Min-Max	p*
HIF1A	Pre-QT	0,028765; 0,020617	0,023577	0,001400-0,167000	<0,00001
	Post-QT	0,039672; 0,020511	0,037077	0,008315-0,113178	
PDGFA	Pre-QT	0,00093; 0,00123	0,00051	0,00003-0,00778	0,001
	Post-QT	0,001585; 0,001600	0,001035	0,000003-0,009334	
THBS1	Pre-QT	0,544393; 0,411610	0,450636	0,093428-2,116480	<0,00001
	Post-QT	0,949927; 0,666970	,813868	0,066370-4,189176	
VEGFA	Pre-QT	0,177445; 0,160186	0,115959	0,032918-1,162046	0,14
	Post-QT	0,209239; 0,154481	0,166093	0,030607-1,099362	
CTGF	Pre-QT	0,163969; 0,176307	0,115000	0,000192-0,993000	<0,00001
	Post-QT	0,851420; 0,705635	0,655000	0,000014-3,540000	

*Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

El perfil de biomarcadores fue claramente diferente entre subtipos tumorales: mientras que *VEGFA* mostró tendencia a menor nivel de expresión en tumores con receptores hormonales positivos ($p=0,09$), los tumores triple negativo mostraron mayor nivel de *VEGFA* ($p=0,04$) y menor expresión de *THBS1* ($p=0,009$). Los tumores Her2+ (con o sin expresión de receptores hormonales) se caracterizaron por la baja expresión de ambos, *VEGFA* y *THBS1* ($p=0,003$). No se observaron diferencias en la expresión de *CTGF* ($p=0,480$) y *PDGFA* ($p=0,450$) entre los subtipos tumorales (**Figura 12-A**). La proporción de células tumorales en cada biopsia no se correlacionó con la expresión de ninguno de los biomarcadores angiogénicos.

El patrón vascular se asoció claramente con el perfil angiogénico en el tumor: la expresión de *THBS1* ($r=-0,400$; $p=0,0001$) y *CTGF* ($r=-0,370$; $p=0,001$) se correlacionó inversamente con la densidad microvascular (**Figura 12-B**), mientras que el mayor tamaño medio vascular se correlacionó con un mayor nivel de expresión de *VEGFA* ($r=0,35$; $p=0,003$) y de *THBS1* ($r=0,270$; $p=0,020$) (**Figura 12-C**). No se observaron asociaciones similares para *HIF1A* o *PDGFA*. Los carcinomas GMP+ mostraron a su vez mayor nivel de expresión de *VEGFA* ($p=0,015$). Los tumores con alto tamaño medio vascular y GMP+ mostraron los mayores niveles de expresión de *VEGFA* ($p=0,03$) (**Figura 12-D**).

Figura 12. Expresión de marcadores angiogénicos prequimioterapia y su asociación con el patrón vascular en el contexto del cáncer de mama. (A) Expresión prequimioterapia de los principales biomarcadores angiogénicos de acuerdo con el subtipo. (B) Correlación inversa entre la expresión de *THBS1* con la MDV en el tumor primario de cáncer de mama. (Coeficiente de Spearman: $-0,400$; $p=0,0004$). (C) Asociación de MVS elevado (por encima de la mediana) con mayores niveles de *VEGFA* ($p=0,0004$) y *THBS1* ($0,04$) basales en el tumor primario. (D) Mayores niveles de *VEGFA* en tumores con perfil vascular de alto riesgo (GMP+/MVS alta) ($p=0,03$).



Por otra parte, la sobreexpresión de *VEGFA* en el tejido tumoral fue relevante desde el punto de vista pronóstico, con una menor supervivencia libre de enfermedad ($p=0,009$) que en los casos con baja expresión de *VEGFA*. Este impacto se mantuvo (HR: 3,55; 95%IC:11,07–11,14; $p=0,03$) incluso cuando se incluyó la expresión de *VEGFA* en un modelo de regresión de Cox con las variables cN2-3 y RCp, que fueron las únicas covariables clínicas significativas en ausencia de biomarcadores angiogénicos.

Adicionalmente y para descartar la posible confusión entre sobreexpresión de *VEGFA* y subtipo triple negativo, se incluyeron ambas en un modelo multivariante, junto a cN2-3 y a la RCp como covariables: los niveles elevados de *VEGFA* mantuvieron su relevancia pronóstica para supervivencia libre de enfermedad (HR: 3,42; IC95%: 1,08–10,82; $p=0,04$). Ningún biomarcador angiogénico fue relevante para supervivencia global.

4.3 Cambios inducidos por la quimioterapia sobre los biomarcadores angiogénicos y sobre el patrón vascular

Se realizó un estudio comparativo de la morfología vascular y del perfil de biomarcadores angiogénicos antes y después de la quimioterapia con antraciclinas y taxanos en el grupo de pacientes del que se disponía de muestra pareada evaluable pre- y postquimioterapia (n=54). Para el grupo global, se observó un incremento en la densidad microvascular postquimioterapia ($p=0,0003$) (**Figura 13-A y Tabla 56**). La densidad microvascular post-tratamiento no se asoció con variables patológicas del tumor residual.

Tabla 56. Cambios inducidos por la quimioterapia sobre los parámetros vasculares.

	N=54	Media; SD	Mediana	Rango	p^*
MVD	Pre-CT	27,4; 13,1	24,5	8,6-72,9	0,0003
	Post-CT	40,1; 21,9	32,6	7,7-117,3	
MVS	Pre-CT	113,5; 37,8	103,5	51,7-237,1	0,410
	Post-CT	107,8; 44,9	95,0	51,5-277,7	
Área vascular (%)	Pre-CT	1,5; 0,6	1,4	0,4-3,3	0,0002
	Post-CT	2,2; 1,1	1,9	0-4,9	

* Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon (Holm-Bonferroni ajustado para los valores p en comparaciones múltiples).

Al no existir una definición estándar de respuesta angiogénica (RA) disponible, ésta se definió como cualquier descenso en la densidad microvascular. Se observó respuesta angiogénica inducida por la quimioterapia en un 35,2% de los casos (**Figura 13-B**), sin respuesta o con incrementos en el resto de los casos. La respuesta angiogénica fue más frecuente en aquellos pacientes con mayor densidad microvascular pretratamiento ($p=0,015$) (**Figura 13-C**), pero no se observó asociación alguna con otras variables clínicas o patológicas (**Tabla 57**). Cuando se exploró el sentido biológico y clínico de la respuesta angiogénica, se observó que los descensos del estadio tumoral, definido como cualquier descenso de categoría pT, se asociaban con respuesta angiogénica inducida por quimioterapia (73,7 vs. 35,3 %; $p=0,028$). Sin embargo, no se observó asociación entre respuesta angiogénica ni con respuesta clínica ($p=0,290$) ni con RCp ($p=0,870$) ni con supervivencia (SLE, $p=0,650$; SG, $p=0,490$).

Tabla 57. Asociación de la respuesta clínica con características clínicas y patológicas.

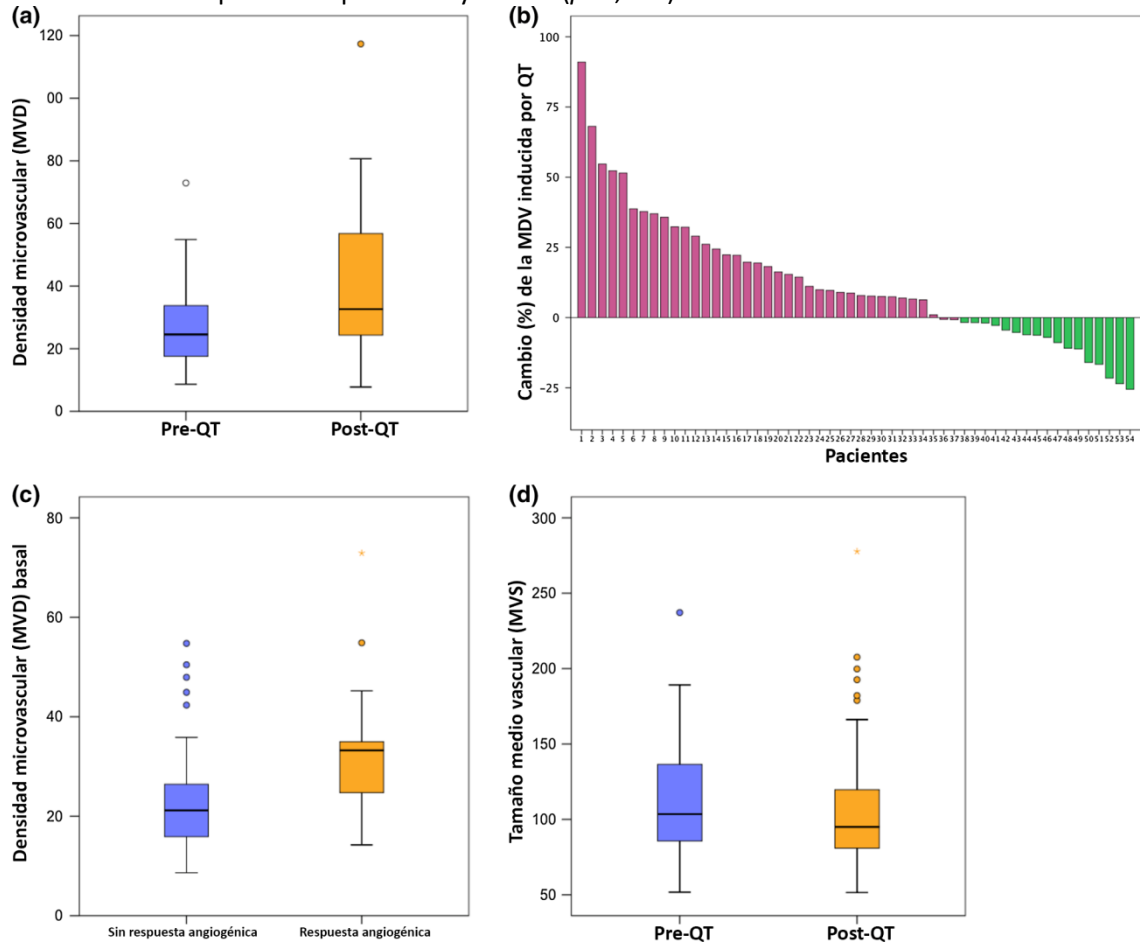
N=54	Sin respuesta angiogénica n=34	Respuesta angiogénica n=19	p^*
Menopausia	Postmenopausia	8 (32%)	0,58
	Premenopausia	17 (61%)	
Estadio ganglionar	cN0-1	15 (41%)	0,28
	cN2-3	12 (75%)	
Grado	G1-2	8 (33%)	0,70

cT	G3	16 (61%)	10 (39%)	0,24
	cT1-2	20 (71%)	8 (29%)	
Subtipo tumoral	cT3-4	14 (56%)	11 (4%)	0,90
	HR+ Her2-	17 (61%)	11 (39%)	
		6 (60%)	4 (40%)	
	HR+ Her2+	2 (67%)	1 (33%)	
	HR- Her2+ TNBC	8 (73%)	3 (27%)	
TNBC	No	25 (61%)	16 (39%)	0,47
	Yes	8 (73%)	3 (27%)	
Respuesta clínica	Yes	29 (69%)	13 (31%)	0,29
	No	4 (50%)	4 (50%)	
RCp	No RCp	29 (63%)	17 (37%)	0,87
	RCp	5 (71%)	2 (29%)	
pN+	ypN0	17 (65%)	9 (35%)	1,0
	ypN1-3	17 (63%)	10 (37%)	

* Prueba Chi².

La quimioterapia neoadyuvante no cambió significativamente el tamaño de los vasos (**Figura 13-D**), con un tamaño medio vascular mantenido en el grupo global ($p=0,410$) (**Tabla 56**). De forma similar a la situación pretratamiento, un mayor tamaño medio vascular postquimioterapia se asoció con características patológicas adversas tales como ausencia de expresión de receptores hormonales (40,7 vs. 7,4 %; $p=0,012$) y mayor enfermedad residual tanto en los ganglios linfáticos axilares (70 % ypN+ vs. 37,8 %; $p=0,018$) como en la mama (36,7 % ypT3-4 vs. 10,8 %; $p=0,03$), incluso cuando el análisis se restringió a solo pacientes sin RCp (ypT3-4, $p=0,08$; ypN+, $p=0,04$; HR-, $p=0,012$).

Figura 13. Cambios inducidos por quimioterapia en las características angiogénicas del cáncer de mama. (A) Mayor densidad microvascular después de tratamiento ($p=0,0003$). (B) Diagrama de flujo de agua mostrando la respuesta angiogénica (definida como cualquier descenso en la MVD) en alrededor del 35% de las pacientes. (C) Asociación de la respuesta angiogénica con la mayor MVD pretratamiento ($p=0,015$; test de χ^2). (D) Ausencia de cambios en MVS tras el tratamiento con quimioterapia neoadyuvante ($p=0,410$).



Los cambios en los biomarcadores angiogénicos mayormente consistieron en un incremento general en la expresión tras tratamiento, a excepción de *VEGFA* cuyos niveles se mantuvieron (**Tabla 55**). Se observó un incremento remarkable de alrededor de diez veces en la expresión de *CTGF* tras quimioterapia. Estos resultados no cambiaron cuando los casos con RCp se excluyeron del análisis. En aquellas pacientes con respuesta angiogénica inducida por quimioterapia, el único cambio significativo fue un incremento de tres veces en la expresión de *THBS1* ($p=0,049$), lo que fue consistente con un equilibrio angiogénico con tendencia a menor densidad microvascular, y diferente de la observada en los pacientes sin respuesta angiogénica (**Tabla 58**).

Tabla 58. Asociación de los cambios inducidos por quimioterapia en los biomarcadores angiogénicos con la respuesta angiogénica (*fold-change*; media, SD)

N=53	Sin respuesta angiogénica n=34	Respuesta angiogénica n=19	p^*
------	-----------------------------------	-------------------------------	-------

VEGFA	1,68; 1,69	2,27; 2,31	1,0
THBS1	2,09; 2,42	2,89; 1,41	0,049
CTGF	10,06; 10,59	9,51; 8,48	0,90
HIF1A	1,48; 0,84	2,60; 2,10	0,20
PDGF	2,15; 2,87	2,75; 3,81	1,0

* U Mann-Whitney (Holm-Bonferroni ajustado para los valores *p* en comparaciones múltiples)

No se observaron diferencias de cambio angiogénico de biomarcadores relacionados con la quimioterapia entre los casos con o sin respuesta clínica, ni entre los casos con o sin respuesta patológica, excepto un mayor incremento de *PDGFA* (**Tabla 59**).

Tabla 59. Asociación de los cambios inducidos por quimioterapia en los biomarcadores angiogénicos con la respuesta patológica.

N=77	No RCp n=63	RCp n=14	<i>p</i>*
VEGFA	1,83; 1,81	1,47; 1,08	0,80
THBS1	2,05; 1,40	4,09; 4,61	0,39
CTGF	8,45; 8,79	19,46; 23,18	0,44
HIF1A	2,18; 3,63	1,69; 1,47	1,0
PDGF	2,88; 4,17	5,56; 3,89	0,01

4.4 Conclusiones del Capítulo IV

Como conclusión del cuarto capítulo de resultados, la subserie obtenida a partir de las muestras analizables para miRNA/mRNA y angiogénesis fue representativa de la serie global. La mediana del MVS fue de 102,5 μm^2 (rango: 51,7-273). Aquellas pacientes con mayor afectación ganglionar y también con fenotipo triple negativo mostraron mayor MVS. No hubo asociación de MVD o de MVS con respuesta no pronóstico. Un 32,5% de los casos mostraron presencia de GMP, si bien estas estructuras no mostraron tener valor pronóstico en nuestra serie. La presencia de MVS alto más GMP se asoció con ausencia de expresión de HR, definiendo un grupo de pacientes con patrón vascular de alto riesgo que tuvo impacto adverso en SLE. La quimioterapia neoadyuvante con AC y taxanos no modificó los niveles de expresión relativos de *VEGFA*. El resto de marcadores angiogénicos aumentaron sus niveles de expresión con el tratamiento (*HIF1A*, *PDGFA*, *THBS1* y *CTGF*). La quimioterapia indujo un aumento de la MVD y del área vascular. No hubo cambios en MVS. El cambio en los niveles de expresión de *PDGFA* se asoció con respuesta patológica.

CAPÍTULO V

CAPÍTULO V: ESTUDIO CLÍNICO E *IN VITRO* DE LA REGULACIÓN ANGIOGÉNICA POR MIRNAS Y DE LOS CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE MIR-17-92 Y EN EL SUBTIPO ANGIOGÉNICO DEL TUMOR INDUCIDOS POR LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE CON TAXANOS

5.1 Características de la serie clínica

Las características globales de las pacientes de estudio en este capítulo se corresponden con las descritas en el **Capítulo I** de esta tesis doctoral.

5.2 Estudio de la correlación de los miembros del clúster 17-92 con MVD, MVS y sus mediadores angiogénicos

Se analizó la correlación de los miembros del clúster 17-92a con la densidad microvascular, con el tamaño medio de los vasos y a su vez se compararon los niveles de expresión entre tumores con presencia o ausencia de proliferaciones microvasculares glomerulares. No se encontró una asociación clara entre miR-17 y angiogénesis, puesto que si bien se correlacionó inversamente con *PDGFA* en las biopsias prequimioterapia y con *CTGF* en las muestras postquimioterapia, no se correlacionó con MVS ni con MVD en ningún caso. Los resultados del análisis de la relación de miR-18a con la angiogénesis se recogen en el **Capítulo VI**. Se observó una correlación inversa de miR-19b con MVD en el tumor primario prequimioterapia ($r=-0,256$; $p=0,025$), observación que no pudo ser confirmada en el tumor residual ($r=-0,065$; $p=0,602$). En las muestras postquimioterapia, miR-19b correlacionó directamente con MVS ($r=0,241$; $p=0,027$). Además, se encontró que miR-19b correlacionaba directamente con *VEGFA* y *THBS1* e inversamente con *PDGFA* en tumor basal, mientras que en tumor residual sólo correlacionó inversamente con *CTGF*. MiR-20a correlacionó de forma directa con el tamaño medio vascular prequimioterapia ($r=0,276$; $p=0,015$), observación que pudo ser confirmada en el tumor residual ($r=-0,404$; $p<0,001$). Además, correlacionó directamente con *VEGFA* y *THBS1* e inversamente con *CTGF* basal, mientras que en tumor residual solo se observó una correlación inversa con *CTGF* (**Tablas 60 y 61**).

Tabla 60. Correlación entre los miembros del clúster 17-92, angiogénesis y biomarcadores en tumor primario previo al tratamiento.

Prequimioterapia		MVD	MVS	VEGFA	THBS1	PDGFA	HIF1A	CTGF
miR-17	Coef. de correlación*	-,043	,135	,102	,049	-,249	,105	-,074
	Sig. (bilateral)	,714	,244	,349	,651	,022	,333	,485
	N	76	76	87	87	85	87	91
miR-18a	Coef. de correlación*	-,093	,075	,241	-,007	-,298	,098	-,263
	Sig. (bilateral)	,421	,516	,027	,953	,006	,375	,015
	N	77	77	84	84	83	84	86
miR-19b	Coef. de correlación*	-,256	,209	,283	,250	-,289	-,008	-,068
	Sig. (bilateral)	,025	,068	,009	,022	,008	,945	,534
	N	77	77	84	84	83	84	86
miR-20a	Coef. de correlación*	-,164	,276	,404	,216	-,288	,045	-,072
	Sig. (bilateral)	,153	,015	<,001	,049	,008	,686	,508
	N	77	77	84	84	83	84	86
miR-92a	Coef. de correlación*	,020	-,062	,018	,022	-,320	,007	-,129
	Sig. (bilateral)	,864	,597	,865	,839	,003	,951	,223
	N	76	76	87	87	85	87	91

* Rho de Spearman

Tabla 61. Correlación entre los miembros del clúster 17-92, angiogénesis y biomarcadores en tumor residual.

Postquimioterapia		MVD	MVS	VEGFA	THBS1	PDGFA	HIF1A	CTGF
miR-17	Coef. de correlación*	-,097	,102	,028	-,097	-,203	-,049	-,345
	Sig. (bilateral)	,443	,349	,808	,400	,077	,675	,002
	N	65	87	78	78	77	77	77
miR-18a	Coef. de correlación*	-,060	,283	-,011	-,118	-,180	-,037	-,436
	Sig. (bilateral)	,631	,009	,926	,301	,115	,746	,000
	N	67	84	79	79	78	78	78
miR-19b	Coef. de correlación*	-,065	,241	-,042	-,026	-,206	-,093	-,246
	Sig. (bilateral)	,602	,027	,716	,820	,071	,416	,030
	N	67	84	79	79	78	78	78
miR-20a	Coef. de correlación*	-,034	,404	-,029	,024	-,202	-,090	-,293
	Sig. (bilateral)	,783	<,001	,799	,834	,077	,432	,009
	N	67	84	79	79	78	78	78
miR-92a	Coef. de correlación*	-,074	,018	,061	-,019	-,203	-,068	-,334
	Sig. (bilateral)	,557	,865	,593	,866	,077	,558	,003
	N	65	87	78	78	77	77	77

* Rho de Spearman

Los niveles de expresión elevados de miR-19b-1 y miR-20a se asociaron con la presencia de GMP en biopsias prequimioterapia (**Tabla 62**). Cuando se comparó la expresión de los miembros del clúster según el patrón vascular (definido en el **Capítulo IV**) (**Tabla 63 y Figura 14**), se observó la asociación de mayores niveles de expresión de los miembros del clúster 17-92 (a excepción de miR-92a) con el perfil vascular de alto riesgo (definido por presencia de GMP y tamaño vascular grande). La asociación de la expresión de miR-20a (pero no de miR-19b-1) con el perfil vascular de alto riesgo, fue independiente de *VEGFA* y del subtipo triple negativo en un modelo multivariante de regresión logística (**Tabla 64-A y -B**).

Tabla 62. Asociación de los niveles de expresión del clúster 17-92 con la presencia o ausencia de proliferaciones microvasculares glomerulares (solo prequimioterapia).

	GMP	N	Rango promedio	Suma de rangos	<i>p</i> *
miR-17	No GMP	47	34,15	1605,00	,290
	GMP	24	39,63	951,00	
	Total	71			
miR-18a	No GMP	48	33,75	1620,00	,185
	GMP	23	40,70	936,00	
	Total	71			
miR-19b	No GMP	48	31,94	1533,00	,017
	GMP	23	44,48	1023,00	
	Total	71			
miR-20a	No GMP	48	30,49	1463,50	,001
	GMP	23	47,50	1092,50	
	Total	71			
miR-92a	No GMP	47	35,34	1661,00	,706
	GMP	24	37,29	895,00	
	Total	71			

*Prueba U de Mann-Whitney

Tabla 63. Asociación de los niveles de expresión del clúster 17-92 con el patrón vascular de alto riesgo (definido en el **Capítulo IV**).

	Patrón vascular	N	Rango promedio	Suma de rangos	p
miR-17	GMP- y/o MVS bajo	51	31,43	1603,00	,013
	GMP+ y MVS alto	18	45,11	812,00	
	Total	69			
miR-18a	GMP- y/o MVS bajo	51	32,08	1636,00	,042
	GMP+ y MVS alto	18	43,28	779,00	
	Total	69			
miR-19b	GMP- y/o MVS bajo	51	30,56	1558,50	,002
	GMP+ y MVS alto	18	47,58	856,50	
	Total	69			
miR-20a	GMP- y/o MVS bajo	51	29,48	1503,50	<,001
	GMP+ y MVS alto	18	50,64	911,50	
	Total	69			
miR-92a	GMP- y/o MVS bajo	51	33,59	1713,00	,325
	GMP+ y MVS alto	18	39,00	702,00	
	Total	69			

Figura 14. Perfil de expresión del clúster 17-92 según el patrón vascular.

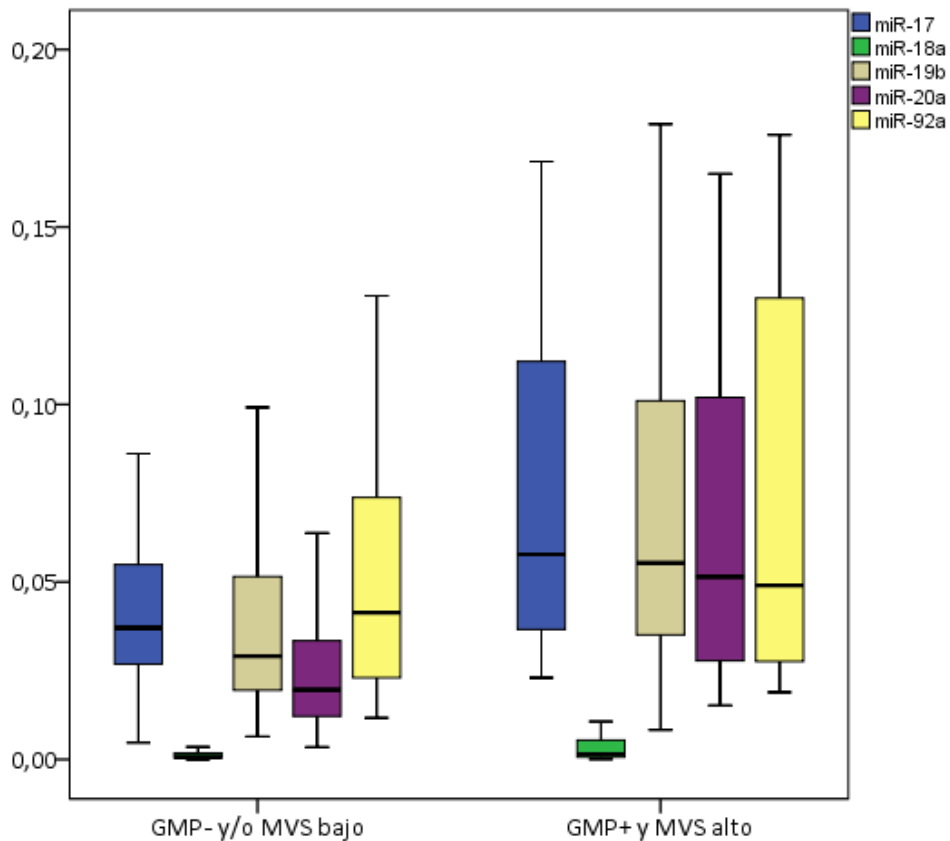


Tabla 64-A y -B. Modelo multivariante de regresión logística binaria para el estudio de asociación entre las variables predictoras del perfil vascular de alto riesgo.

A	OR	IC95%	p	B	OR	IC95%	p
miR-20a-5p	6,153	1,436-26,375	,014	miR-19b-1	3,707	,965-14,234	,056
VEGFA	3,913	,989-15,475	,052	VEGFA	4,000	1,043-15,341	,043
Triple negativo	2,959	,723-12,117	,132	Triple negativo	2,920	,748-11,404	,123

5.3 Estudio detallado del cambio inducido por la quimioterapia sobre la angiogénesis y sobre los biomarcadores angiogénicos

Cuando se compararon los niveles de expresión, la MVS y la MVD entre muestras pareadas pre- y postquimioterapia, se encontró que los niveles de todos los miembros del clúster miR-17-92 aumentaban sistemáticamente (**Tabla 65**). No hubo cambios ni en la expresión de *PDGFA*, ni de *VEGFA*, ni en el tamaño vascular.

Tabla 65. Cambios globales en la expresión de microRNAs y mRNA de genes codificantes con el tratamiento quimioterápico.

miRNA/Gen	N pareado válido§	Rangos	N	Rango promedio	Suma de rangos	Z	Cambio inducido	p*
miR-17	67	Negativos	50	38,04	1902	-4,766	Aumento	<,001
		Positivos	17	22,12	376			
miR-18a	70	Negativos	49	37,31	1828	-3,426	Aumento	<,001
		Positivos	21	31,29	657			
miR-19b	70	Negativos	52	39,00	2028	-4,597	Aumento	<,001
		Positivos	18	25,39	457			
miR-20a	70	Negativos	54	40,09	2165	-5,399	Aumento	<,001
		Positivos	16	20,00	320			
miR-92a	67	Negativos	55	36,24	1993	-5,335	Aumento	<,001
		Positivos	12	23,75	285			
HIF1A	61	Negativos	44	34,32	1510	-4,055	Aumento	<,001
		Positivos	17	22,41	381			
PDGFA	60	Negativos	38	30,50	1159	-1,796	Sin cambio	,072
		Positivos	22	30,50	671			
THBS1	62	Negativos	42	37,24	1564	-4,119	Aumento	<,001
		Positivos	20	19,45	389			
VEGFA	62	Negativos	37	32,30	1195	-1,532	Sin cambio	0,126
		Positivos	25	30,32	758			
CTGF	63	Negativos	55	34,11	1876	-6,306	Aumento	<,001
		Positivos	7	11,00	77			
		Empates	1					
MVS	54	Negativos	23	28,08	645,00	-0,839	Sin cambio	,401
		Positivos	31	27,10	840,0			
MVD	54	Negativos	35	33,03	1156,00	-3,560	Aumento	<,001
		Positivos	19	17,32	329,00			

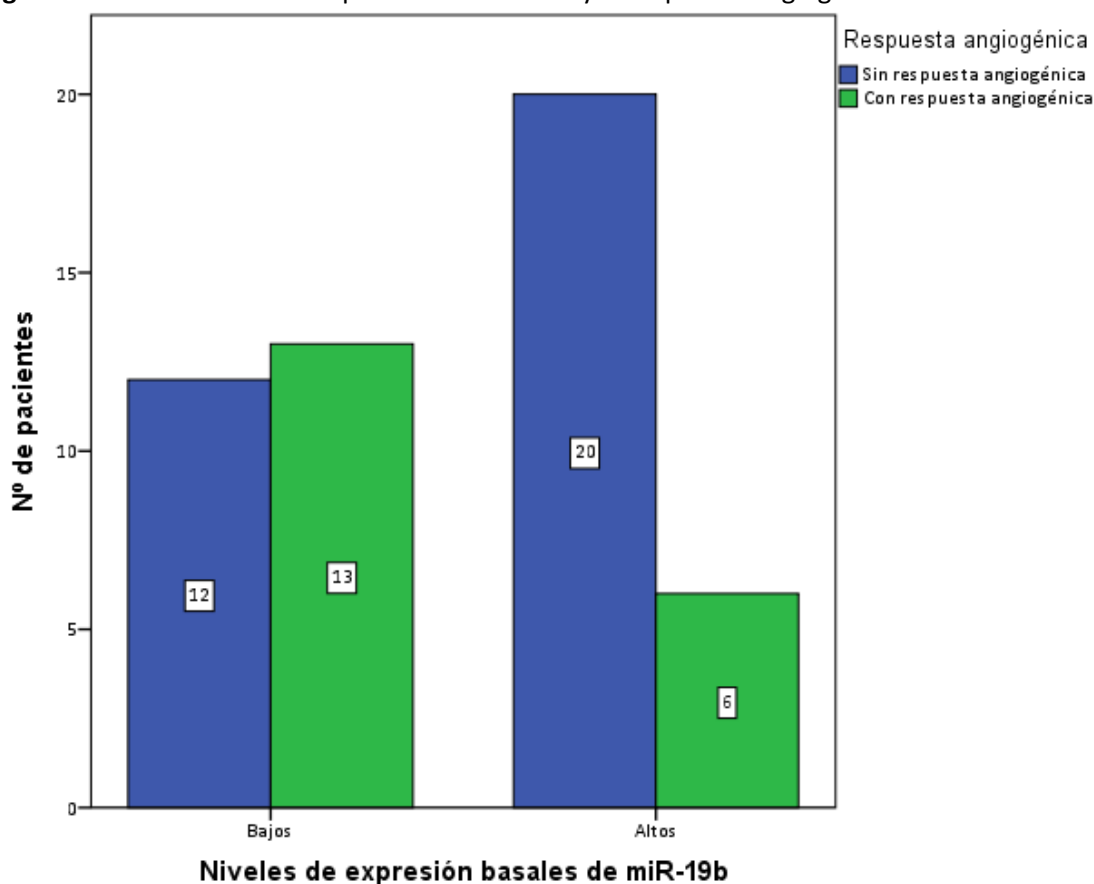
5.4 Análisis de la relación entre la expresión de miR-17-92 y la respuesta angiogénica a la quimioterapia

Se analizó el valor predictivo de la expresión basal de los miembros del clúster miR-17-92 con la respuesta angiogénica al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante. Se observó que miR-19b-1 era el único miembro del clúster con valor predictivo para la respuesta angiogénica, de forma que aquellos tumores con expresión elevada (por encima de la mediana) de miR-19b-1 respondieron menos que aquellos que tuvieron menor expresión (OR: 0,277; IC95% 0,083-0,922; p=0,036) **Tabla 66** y **Figura 15**.

Tabla 66. Análisis de la relación entre la expresión basal del clúster miR-17-92 y la respuesta angiogénica a la quimioterapia.

microRNA	Respuesta angiogénica		
	OR	IC95%	p
miR-17	1,385	,412-4,653	,599
miR-18a	,399	,124-1,285	,124
miR-19b	,277	,083-,922	,036
miR-20a	,399	,124-,1285	,124
miR-92a	1,780	,526-6,020	,354

Figura 15. Relación entre la expresión de miR-19b y la respuesta angiogénica.

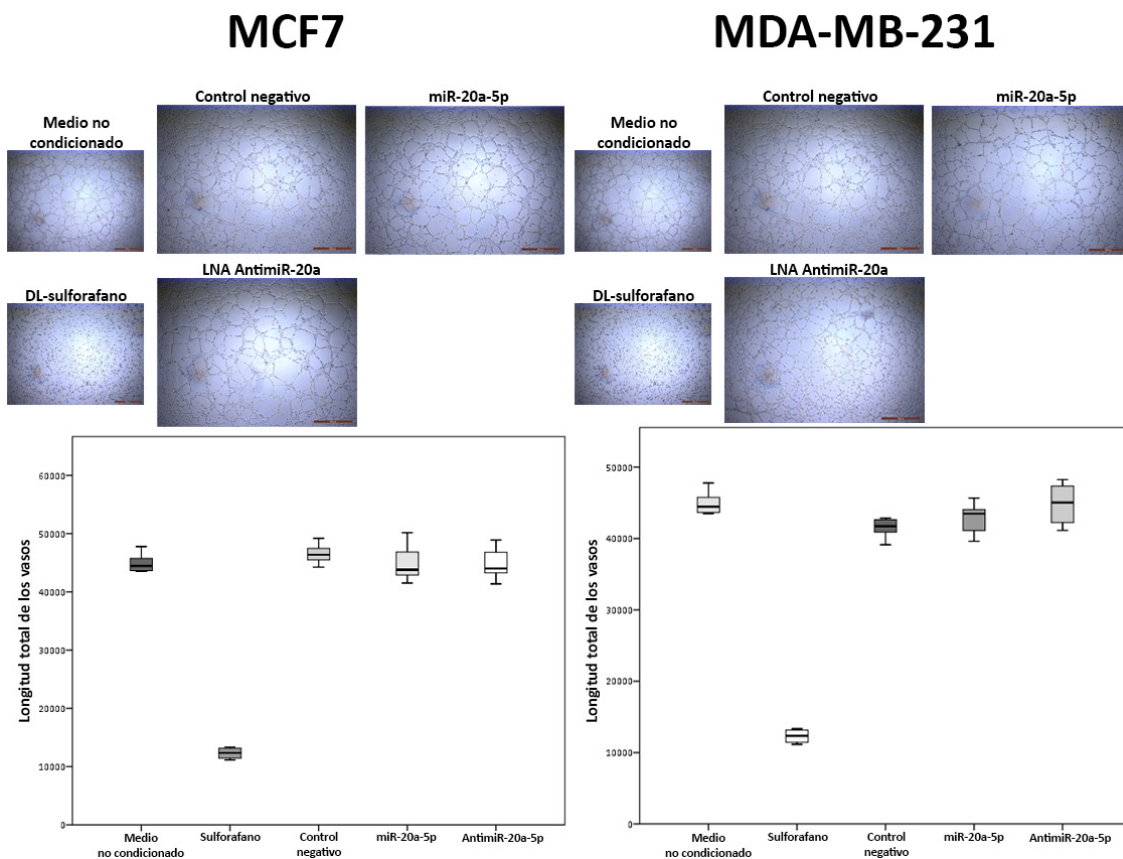


5.5 Estudio *in vitro* del potencial angiogénico de miR-17-92

Se seleccionaron para evaluar el potencial angiogénico los miembros del clúster miR-17-92 en los cuales se obtuvieron previamente mejores datos clínicos: miR-19b-1, miR-18a (ver **Capítulo VI**) y miR-20a. No se observaron diferencias en el potencial angiogénico tras

comparar transfección con un miRNA control negativo y sobre-expresar miR-19b-1 ($p=NS$) y tampoco al sobre-expresar o inhibir miR-20a, ni en MCF7 ($p=NS$) ni en MDA-MB-231 ($p=NS$) (Figura 16).

Figura 16. Análisis del potencial angiogénico de medio condicionado (por líneas celulares tumorales sobre- o infra-expresando miR-20a) sobre células EA.hy926.



Quando se analizó el efecto que inducía la sobreexpresión de miR-20a sobre los marcadores angiogénicos seleccionados previamente por el estudio *in silico*, se observó una disminución efectiva de la expresión de *VEGFA* y de *F3* en MDA-MB-231 (Tabla 67). No se observaron cambios en la línea celular MCF7 (Tabla 68).

Tabla 67. Cambios inducidos en los marcadores angiogénicos tras sobre-expresar miR-20a en MDA-MB-231.

	Transfección	N	Rango promedio	Suma de rangos	p
miR20a	Control	3	2,00	6,00	,049
	miR-20a	3	5,00	15,00	
	Total	6			
TGFBR3	Control	3	3,00	9,00	,513
	miR-20a	3	4,00	12,00	
	Total	6			
CTGF	Control	3	2,17	6,50	,077
	miR-20a	3	4,83	14,50	
	Total	6			

F3	Control	3	5,00	15,00	,046
	miR-20a	3	2,00	6,00	
	Total	6			
VEGFA	Control	3	5,00	15,00	,049
	miR-20a	3	2,00	6,00	
	Total	6			
VIM	Control	3	3,00	9,00	,513
	miR-20a	3	4,00	12,00	
	Total	6			
CXCL12	Control	3	3,50	10,50	1
	miR-20a	3	3,50	10,50	
	Total	6			
PDGFA	Control	3	3,67	11,00	,827
	miR-20a	3	3,33	10,00	
	Total	6			

Tabla 68. Cambios inducidos en los marcadores angiogénicos tras sobre-expresar miR-20a en MCF7.

	Transfección	N	Rango promedio	Suma de rangos	<i>p</i>
miR20a	Control	3	2,00	6,00	,049
	miR-20a	3	5,00	15,00	
	Total	6			
TGFBR3	Control	3	3,00	9,00	,513
	miR-20a	3	4,00	12,00	
	Total	6			
CTGF	Control	3	3,33	10,00	,827
	miR-20a	3	3,67	11,00	
	Total	6			
F3	Control	3	3,00	9,00	,513
	miR-20a	3	4,00	12,00	
	Total	6			
VEGFA	Control	3	2,33	7,00	,127
	miR-20a	3	4,67	14,00	
	Total	6			
VIM	Control	3	3,00	9,00	,513
	miR-20a	3	4,00	12,00	
	Total	6			
CXCL12	Control	3	2,83	8,50	,376
	miR-20a	3	4,17	12,50	
	Total	6			
PDGFA	Control	3	3,67	11,00	,827
	miR-20a	3	3,33	10,00	
	Total	6			

5.6 Conclusiones del Capítulo V

Como conclusión del quinto capítulo de resultados, la expresión de miR-19b-1 se correlacionó inversamente con MVD prequimioterapia, pero no se confirmó en tumor residual. La expresión de miR-19b-1 se correlacionó inversamente con MVS tras el tratamiento. La expresión de miR-20a se correlacionó directamente con la MVS pre- y postquimioterapia. La expresión de miR-20a se correlacionó directamente con *VEGFA* y *THBS1* e inversamente con la expresión de *PDGFA* prequimioterapia. En tumor residual sólo se correlacionó inversamente con *CTGF*. La expresión de miR-19b-1 y de miR-20a se asoció con la presencia de GMP en tumor basal. La expresión de miR-18a, miR-19b-1 y miR-20a, pero no de miR-92a se asoció con el perfil vascular de alto riesgo. Solo la expresión de miR-20a se asoció con este perfil de forma independiente al subtipo triple negativo y a *VEGFA*. La quimioterapia produce un aumento de expresión de miR-19b-1, miR-20a y MVD, sin producirse cambios de expresión en *VEGFA* o en MVS. La expresión de MiR-19b-1 (dicotomizando por mediana de expresión) fue variable predictora de respuesta angiogénica. Aquellas pacientes con mayor expresión de miR-19b-1 tuvieron menor tasa de respuestas angiogénicas que aquellas que tuvieron niveles de expresión inferiores. El estudio *in vitro* de la angiogénesis tumoral no mostró diferencias al sobre-expresar miR-19b-1 ni miR-20a. La sobreexpresión de miR-20a *in vitro* disminuyó los niveles de expresión de *VEGFA* y de *F3* en la línea celular MDA-MB-231, pero no en la línea celular MCF7.

CAPÍTULO VI

CAPÍTULO VI: MIR-18A Y PROGRESIÓN TUMORAL

6.1 Características de la serie clínica

Las características globales de las pacientes en este capítulo se corresponden con las descritas en el **Capítulo I** de esta tesis doctoral.

6.2 Perfil de expresión de miR-18a basal y postquimioterapia

La expresión de hsa-miR-18a-5p pudo ser evaluada en 95 casos prequimioterapia y en 100 casos postquimioterapia (total de casos pareados =86). Se objetivó que la quimioterapia indujo un aumento global de la expresión de miR-18a en 1,25 veces (prueba de los rangos con signo de Wilcoxon; mediana de expresión de 0,0008 (pre-QT) vs. 0,001 (post-QT); $p=0,008$), teniendo un buen grado de correlación entre muestras pre- y postquimioterapia (coeficiente de correlación de Spearman: 0,553; $p<0,0001$).

6.3 Estudio *in silico*

En el análisis *in silico* entre miR-18a y los biomarcadores candidatos, obtuvieron la mejor puntuación *CXCL12*, *TGFBR3*, *CTGF*, *F3*, *HIF1A*, *THBS1* y *VEGFA* (ver **Capítulo II**). De estos, *VEGFA* fue descartado por su correlación directa con miR-18a en nuestra serie clínica y en otras externas.

6.4 Asociación de miR-18a con características clínicas y patológicas

En tumor primario pretratamiento no hubo diferencias en la expresión de miR-18a en función del estatus menopáusico de las pacientes ($p=0,709$). En el estudio fenotípico se observó que la expresión de miR-18a se asociaba fundamentalmente con ausencia de receptores hormonales ($p<0,001$), con tumores triple negativo ($p=0,002$) y grado histológico 3 (tumores indiferenciados) ($p=0,016$). No se encontró asociación con la sobreexpresión de Her2 ($p=0,597$) ni con el tamaño del tumor primario ($p=0,615$) ni con la afectación ganglionar ($p=0,054$) (**Capítulo II**). La asociación de miR-18a con tumores más agresivos concuerda con lo publicado previamente en la bibliografía [385]. En tumor residual se confirmaron todas las observaciones: el subtipo triple negativo ($p=0,037$), ausencia de receptores hormonales ($p=0,009$), tamaño del tumor primario ($p=0,068$), afectación ganglionar ($p=0,054$) (**Capítulo III**) y el grado histológico 3 ($p=0,008$), demostrándose el alto grado de concordancia del tumor residual con el tumor basal.

6.5 Estudios de correlación en la expresión génica y asociativos

MiR-18a correlacionó fuertemente con el resto de microRNAs analizados, tanto en tumor primario pretratamiento como en tumor residual. En relación al resto de biomarcadores, en tumor basal, miR-18a correlacionó directamente (incluyendo validación externa) con *VEGFA*, *CCNB1*, *MKI67* y *MYBL2*, e inversamente con *CXCL12*, *PDGFA* y *CTGF*, mientras que en tumor residual correlacionó directamente con *MKI67* y *MYBL2* e inversamente con *CXCL12*, *F3*, *CTGF* y *TGFBR3* (**Tabla 69**). No se pudo aplicar validación externa en el caso del tumor residual

debido a que no existen series clínicas públicas en las que se haya analizado el tumor residual y que dispongan de datos de miR-18a a la vez que datos de expresión de genes codificantes, por lo que se tomó como valor orientativo de referencia el disponible en el tumor primario previo a tratamiento.

Tabla 69. Análisis de correlaciones entre miR-18a con el resto de biomarcadores estudiados. Se incluye la validación externa en la serie clínica de cáncer de mama del TCGA.

Variable		miR-18a Pre-QT	TCGA	Validación externa	miR-18a Post-QT
CXCL12	r	-,219*	-,268		-,407**
	p	,045	<,0001	Sí	0,000194
	n	84	685		79
F3	r	-,148	-,170		-,492**
	p	,187	<,0001	No	0,000008
	n	81	685		75
HIF1A	r	,098	,141		-,037
	p	,375	<,0001	No	,746
	n	84	685		78
PDGFA	r	-,298**	-,132		-,180
	p	,006	<,0001	Sí	,115
	n	83	685		78
THBS1	r	-,007	-,226		-,118
	p	,953	<,0001	No	,301
	n	84	685		79
VEGFA	r	,241*	,149		-,011
	p	,027	<,0001	Sí	,926
	n	84	685		79
BIRC5	r	,016	,425		-,107
	p	,891	<,0001	No	,419
	n	77	685		59
CCNB1	r	,302**	,363		,094
	p	,008	<,0001	Sí	,467
	n	77	685		62
MKI67*	r	,280*	,354		,341**
	p	,014	<,0001	Sí	,007
	n	77	685		62
MYBL2*	r	,317**	,423		,292*
	p	,005	<,0001	Sí	,021
	n	77	685		62
CTGF	r	-,263*	-,100		-,436**
	p	,015	<,009	Sí	0,000067
	n	86	685		78
VIM	r	-,167	,065		-,346**
	p	,125	,087	Sí	,002
	n	86	685		78
TFPI	r	-,103	-,079		,315*
	p	,370	,038	No	,022
	n	78	685		53
TGFBR3	r	-,131	-,100		-,424**
	p	,231	<,009	No	0,0001
	n	86	685		78

VIM	r	-,167	,065		-,346**
	p	,125	,087	Sí	,002
	n	86	685		78
TFPI	r	-,103	-,079		,315*
	p	,370	,038	No	,022
	n	78	685		53

* Confirmados también en las series de Cartagena (tejido fresco), de Oslo y de Oxford.

A partir de los genes candidatos del análisis de correlación, se realizó un análisis de predicción de funciones por asociación de este grupo de genes con datos públicos disponibles que incluyen interacciones genéticas y proteicas, rutas, co-expresión, co-localización y similitud de dominios proteicos. De los resultados de este análisis se infirió que las funciones de miR-18a podían estar relacionadas de forma directa con proliferación celular y vasculogénesis e inversamente con quimiotaxis celular y desarrollo de vasos sanguíneos en el tumor primario previo a tratamiento. En tumor residual, se infirió que las funciones eran de forma directa proliferación e inversamente quimiotaxis celular y respuesta a TGF beta. (**Tablas 70/71 y Figuras 17/18**).

Tabla 70. Funciones directas de miR-18a inferidas a partir del estudio de asociación.

Funciones directas (pre- y postquimioterapia) <i>Input: VEGFA, CCNB1, MKI67 y MYBL2</i>	FDR	Genes en la red	Genes en el genoma
Transición G2/M del ciclo mitótico celular	0,0000049	7	152
Transición de fase G2/M del ciclo celular	0,0000049	7	152
Regulación negativa de procesos celulares	0,0245174	5	209
Transición G1/S del ciclo mitótico celular	0,0245174	5	201
Vasculogénesis	0,0444591	3	38
Ruta de señalización de VEGF	0,0444591	3	37

Figura 17. Red de interacciones de los principales genes correlacionados directamente con miR-18a (*VEGFA*, *CCNB1*, *MKI67* y *MYBL2*).

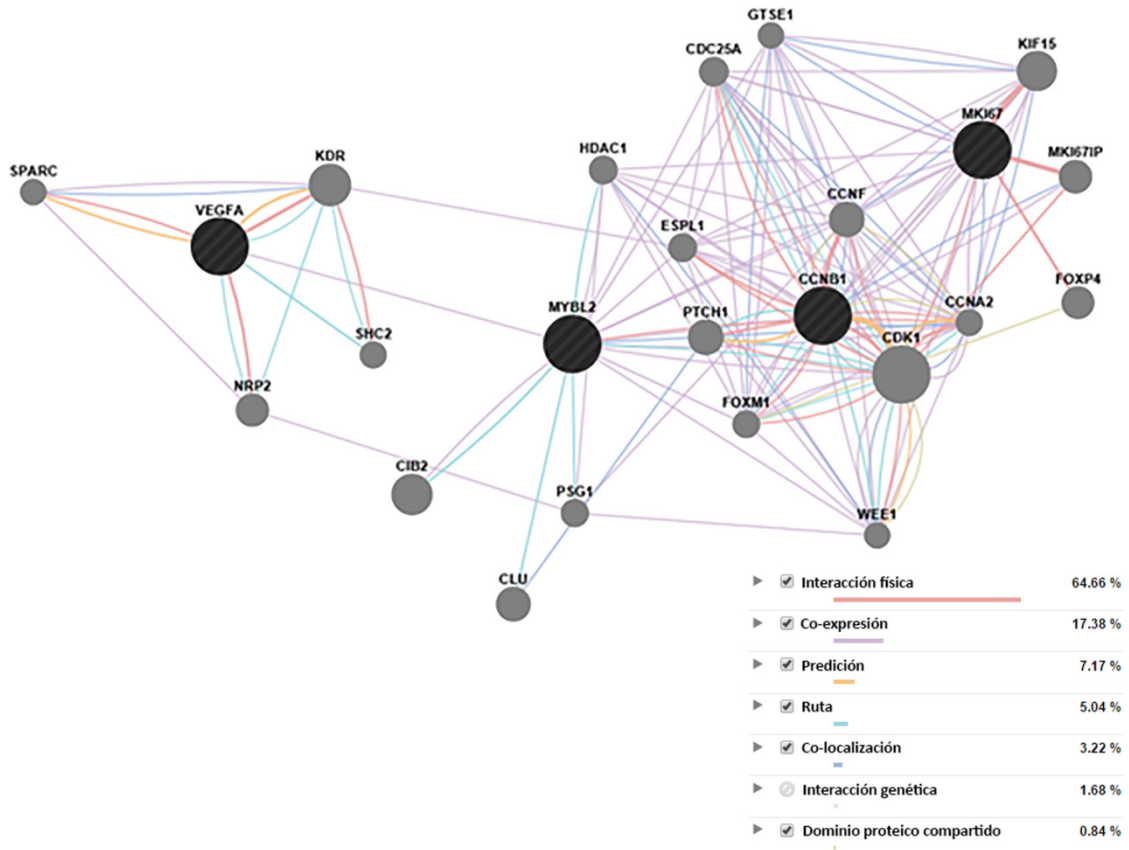
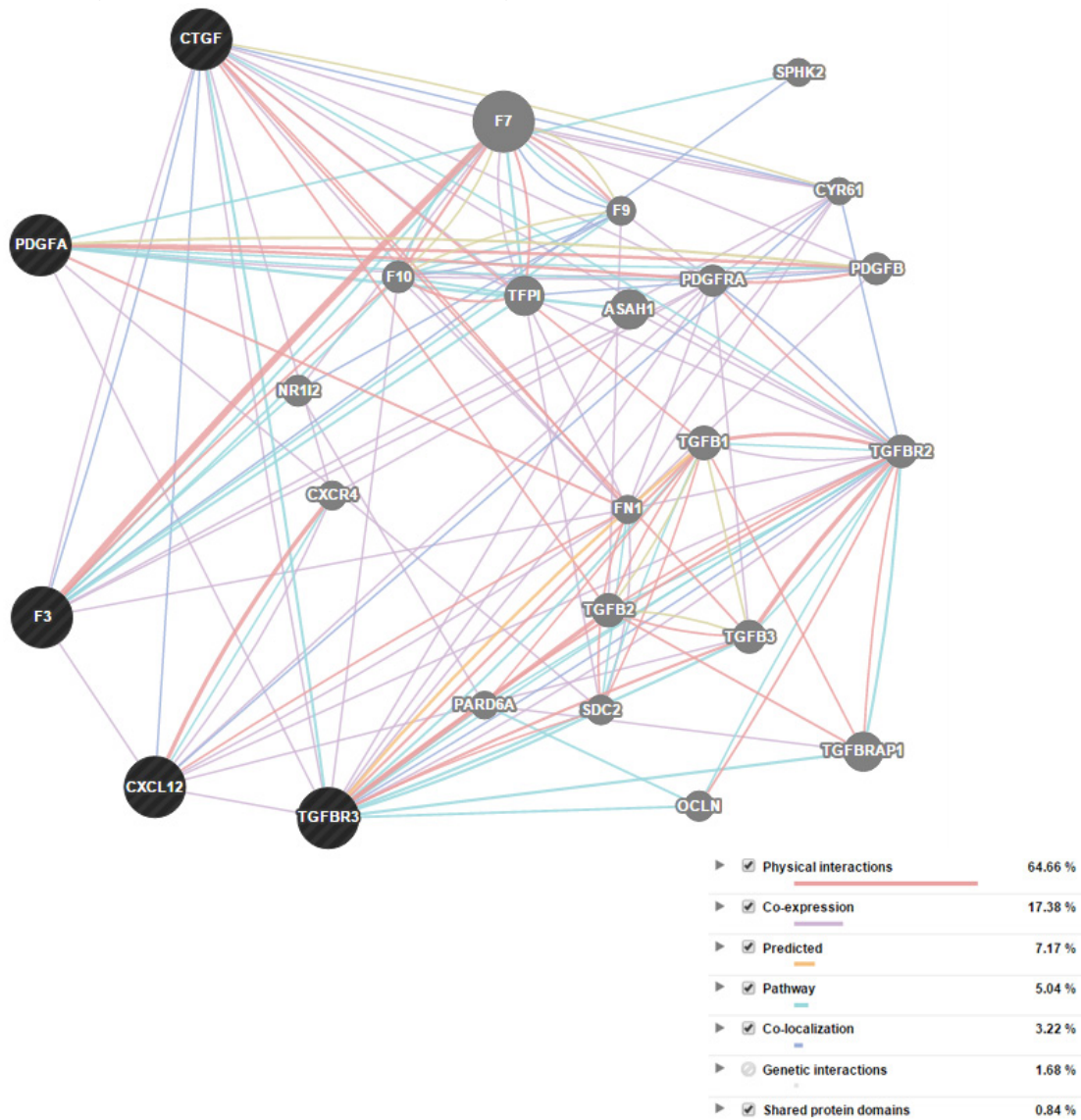


Tabla 71. Funciones inversas de miR-18a inferidas a partir del estudio de asociación.

Funciones inversas (pre- y postquimioterapia) Input: CXCL12, F3, CTGF, TGFBR3, PDGFA	FDR	Genes en la red	Genes en genoma
Unión a receptor del TGF beta	0,0002	6	16
Regulación positiva de la motilidad celular	0,0002	10	203
Regulación positiva de la migración celular	0,0002	10	198
Regulación positiva de la locomoción	0,0002	10	212
Regulación positiva de la locomoción de componentes celulares	0,0002	10	208
Ruta de señalización de receptores serín/treonín quinasa transmembrana	0,0141	9	218
Ruta de señalización celular del TGF beta	0,0292	8	150
Regulación de la quimiotaxis	0,0038	7	89

Figura 18. Red de interacciones de los principales genes correlacionados directamente con miR-18a (CXCL12, F3, CTGF, TGFB3, PDGFA).



6.6 Estudio predictivo y pronóstico

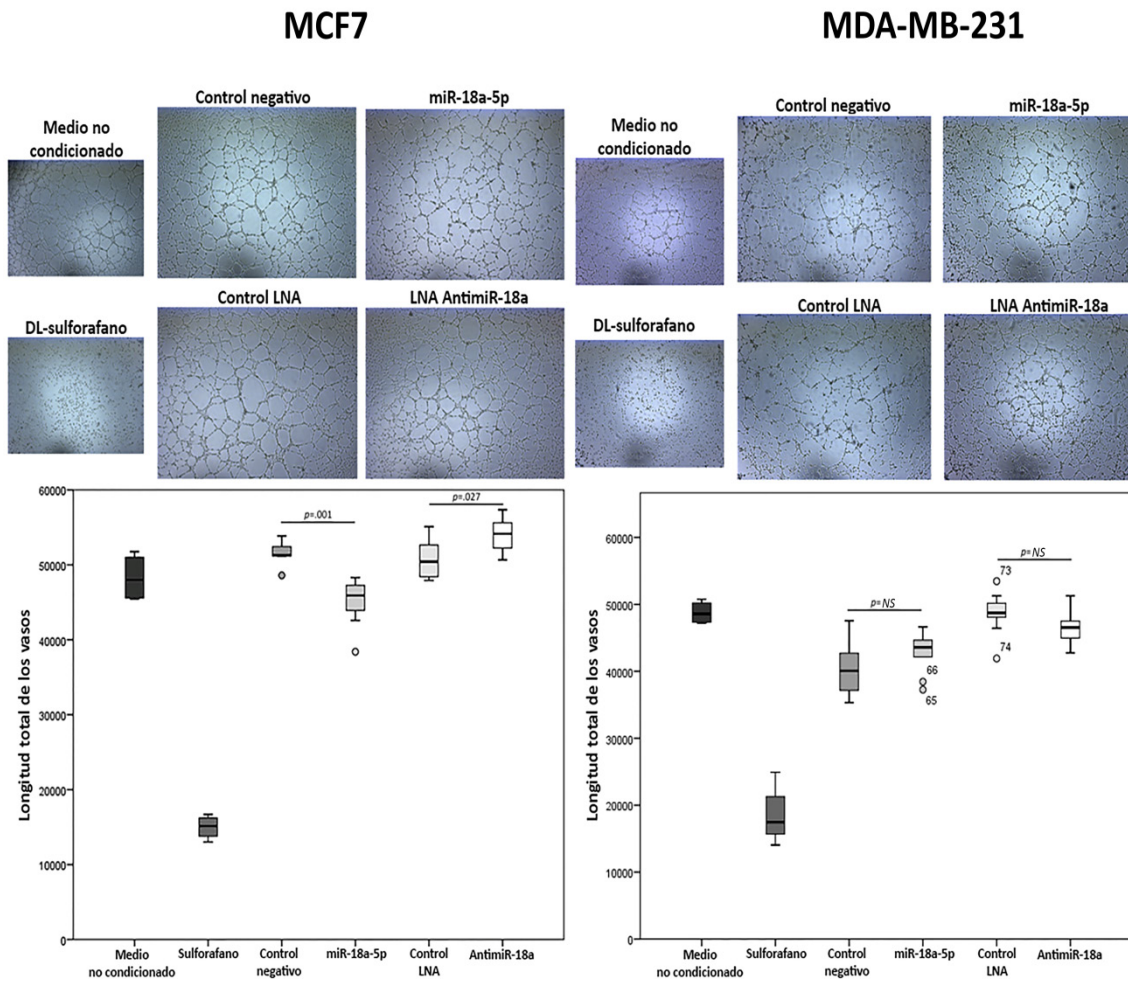
La expresión de miR-18a (tomando como referencia la mediana) no tuvo valor predictivo de respuesta clínica al tratamiento ni impacto pronóstico relevante en el tumor primario basal (con excepción de la supervivencia libre de recaída a distancia, $p=0,037$). Sin embargo, el estudio pronóstico en los tumores que mostraron enfermedad residual tras la quimioterapia, potencialmente correspondiente al tumor resistente al tratamiento, reveló que la expresión elevada de miR-18a se asociaba con menor supervivencia global ($p=0,041$), libre de enfermedad ($p=0,004$) y libre de recaída a distancia ($p=0,003$) en el análisis univariante. Estos resultados se confirmaron en un modelo multivariante que incluía las variables clínicas más relevantes (**Capítulos II y III**) para la supervivencia libre de enfermedad (HR: 3,092; IC95%: 1,015-9,416; $p=0,047$) y para la supervivencia libre de recaída a distancia (HR: 3,879; IC95%: 1,105-13,621; $p=0,034$).

6.7 Perfil de expresión de miR-18a en tumor basal y residual

Dado que miR-18a tenía como diana en el estudio *in silico* a mediadores angiogénicos que además correlacionaban inversamente con éste en nuestra serie clínica (*CTGF* y *PDGFA*), se estudió si miR-18a podía jugar algún papel promoviendo angiogénesis vía inhibición de estas dianas. Para ello se analizó en primer lugar la correlación de miR-18a con la densidad microvascular (MVD) y con el tamaño medio de los vasos (MVS). No se encontró asociación alguna con estas dos variables ni previamente al tratamiento (coeficiente de correlación de Spearman; MVD: $r=-0,093$; $p=0,421$ y MVS: $r=0,075$; $p=0,516$) ni en el tumor residual (coeficiente de correlación de Spearman; MVD: $r=-0,181$; $p=0,194$ y MVS: $r=0,250$; $p=0,071$).

En el estudio *in vitro* utilizando medio condicionado de líneas celulares representativas del subtipo luminal (MCF7) y triple negativo (MDA-MB-231), se observó que cuando miR-18a se sobre-expresaba, el medio condicionado producía un efecto antiangiogénico sobre células modelo endoteliales (EA.hy927) en el caso de MCF7 ($p=0,001$) pero no en el caso de MDA-MB-231 ($p=0,085$) y que cuando se silenciaba con anti-miR-18a mostraba un efecto proangiogénico en el caso de MCF7 ($p=0,027$) pero no en el caso de MDA-MB-231 ($p=0,145$) (**Figura 19**).

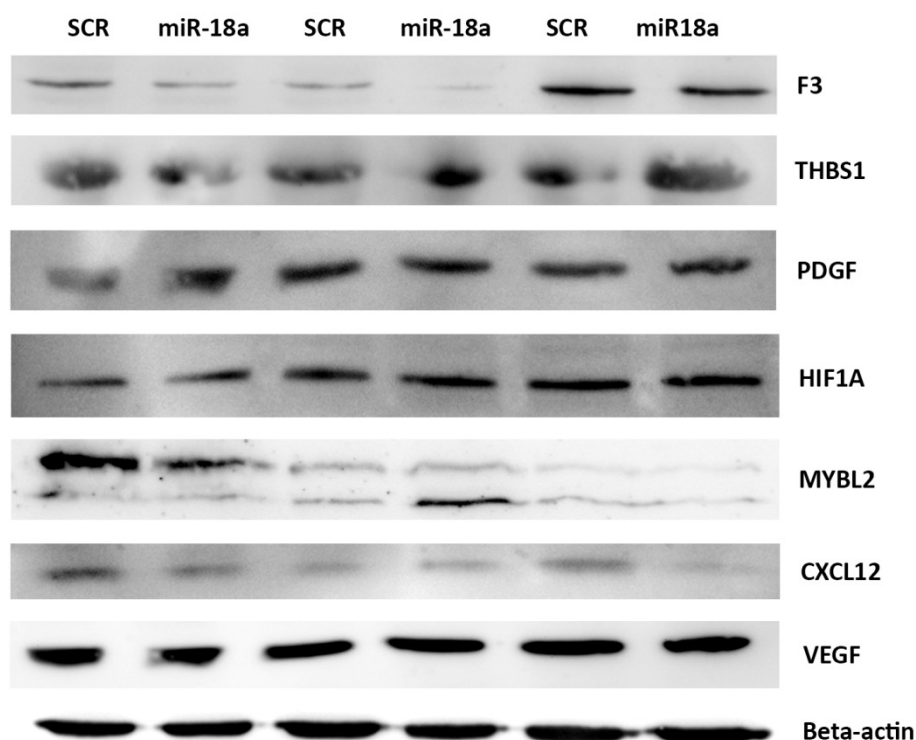
Figura 19. Ensayo de formación de redes vasculares *in vitro* utilizando la línea celular modelo EA.hy927 sobre una matriz de Matrigel y en medio condicionado por MCF7 y MDA-MB-231.



Ante los resultados obtenidos *in vitro* en el modelo luminal, se estudió el grado de correlación entre miR-18a, MVS y MVD en el subgrupo con expresión positiva de receptores de estrógenos, no encontrándose correlación alguna en el tumor basal (coeficiente de correlación de Spearman; MVD: $r=-0,112$; $p=0,430$ y MVS: $r=-0,058$; $p=0,684$). En tumor residual se encontró una correlación directa entre la expresión de miR-18a y la MVD, pero no con la MVS (coeficiente de correlación de Spearman; MVD: $r=0,389$; $p=0,013$ y MVS: $r=-0,081$; $p=0,621$). Finalmente, nuestros resultados tomados globalmente no sustentaron que el impacto pronóstico adverso de la sobreexpresión de miR-18a pueda deberse a una regulación del proceso angiogénico.

No se encontraron diferencias de expresión a nivel proteico en los lisados celulares (western-blot) al analizar F3, THBS1, PDGF, HIF1A, MYBL2, CXCL12 y VEGFA tras sobre-expresar miR-18a ni en MCF7 (**Figura 20**) ni en MDA-MB-231 ($p=NS$ en ningún caso).

Figura 20. Análisis por western-blot en MCF7 del cambio de la expresión en factores angiogénicos tras 48 horas de sobreexpresión de tres controles (SCR) y de tres transfectadas con miR-18a.



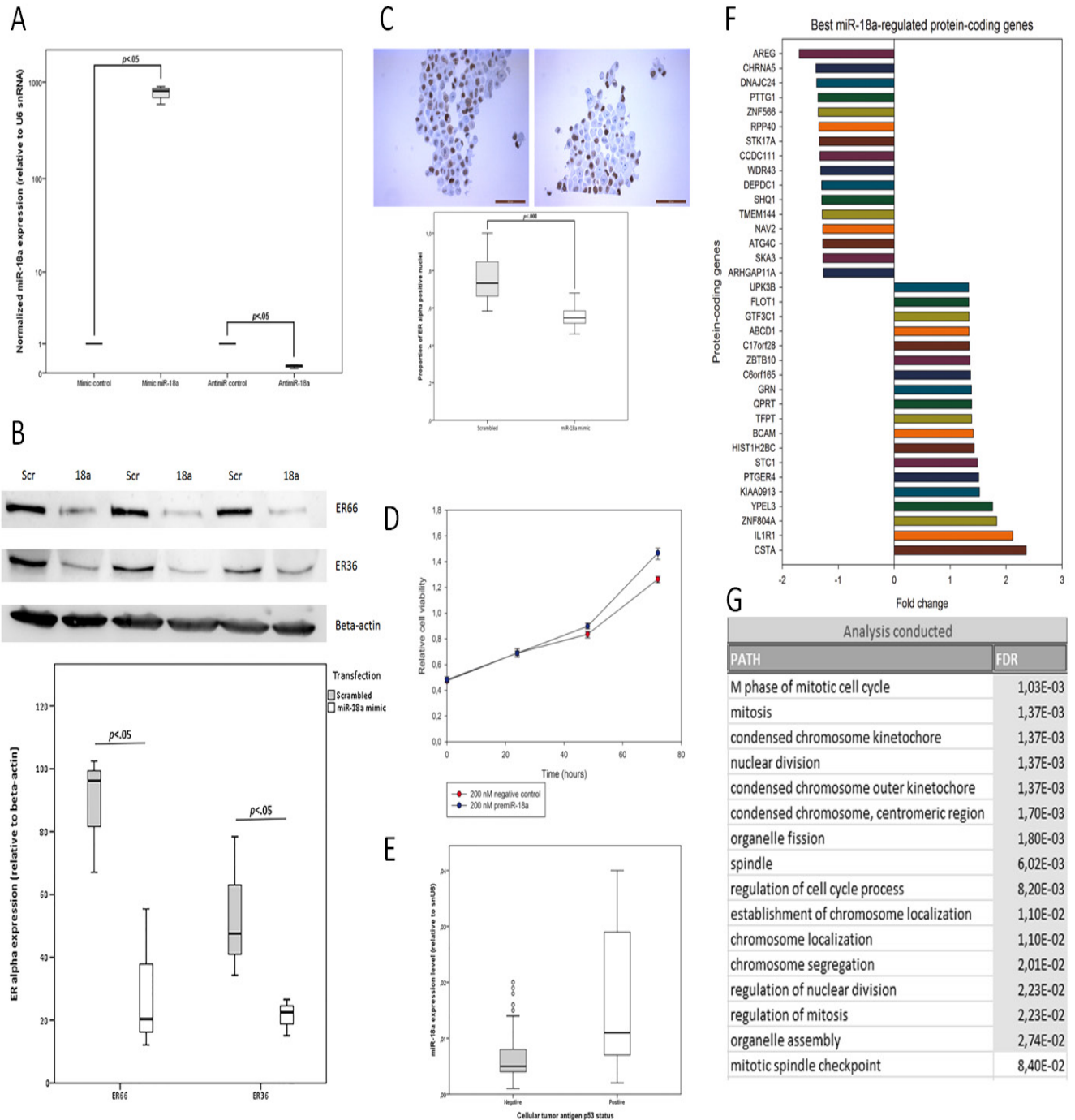
6.8 Papel en la regulación del receptor de estrógenos en la proliferación y en la apoptosis

Se sabe que miR-18a regula de forma directa al receptor de estrógenos alfa, reduciendo de forma efectiva su concentración en la célula [386, 387]. En primer lugar, se quiso confirmar que miR-18a silenciaba de forma efectiva al receptor de estrógenos alfa, realizando transfección transitoria para aumentar o disminuir los niveles de miR-18a en MCF7 (**Figura 21-A**). Se confirmó experimentalmente que miR-18a silenciaba al receptor de estrógenos alfa, tanto a la isoforma ER66 como a la ER36 ($p < 0,05$) (**Figura 21-B**). Estos resultados se confirmaron también por IHQ a partir de células fijadas e incluidas en parafina ($p < 0,001$) (**Figura 21-C**). Sin embargo, no pudimos confirmar que miR-18a produjese un decaimiento del RNA mensajero del receptor de estrógenos (RT-qPCR y chips de expresión; $p = \text{NS}$ a 24 y 48 horas post-transfección), lo cual sugiere que al menos en nuestro modelo experimental, el mecanismo regulatorio dominante es exclusivamente el bloqueo traduccional.

La sobreexpresión de miR-18a producía un estímulo proliferativo sobre células MCF7 *in vitro* 48 horas post-transfección (XTT; $p < 0,05$) (**Figura 21-D**). Este efecto se corroboró por conteo celular ($p < 0,05$). Se comprobó además en nuestra serie de validación de tejido fresco que los tumores con *TP53* mutado tenían a su vez mayores niveles de miR-18a ($p = 0,0001$), y esta observación pudo ser confirmada en la serie clínica del TCGA ($p < 0,0001$) (**Figura 21-E**). Tras transfectar células MCF7 con 100 nM de miR-18a *mimic*, anti-miR-18a y dos controles por triplicado, se realizó un microarray de expresión génica (ver apartado en **Material y Métodos**) y se comprobó cuales eran los genes mayormente afectados por la sobreexpresión de miR-18a

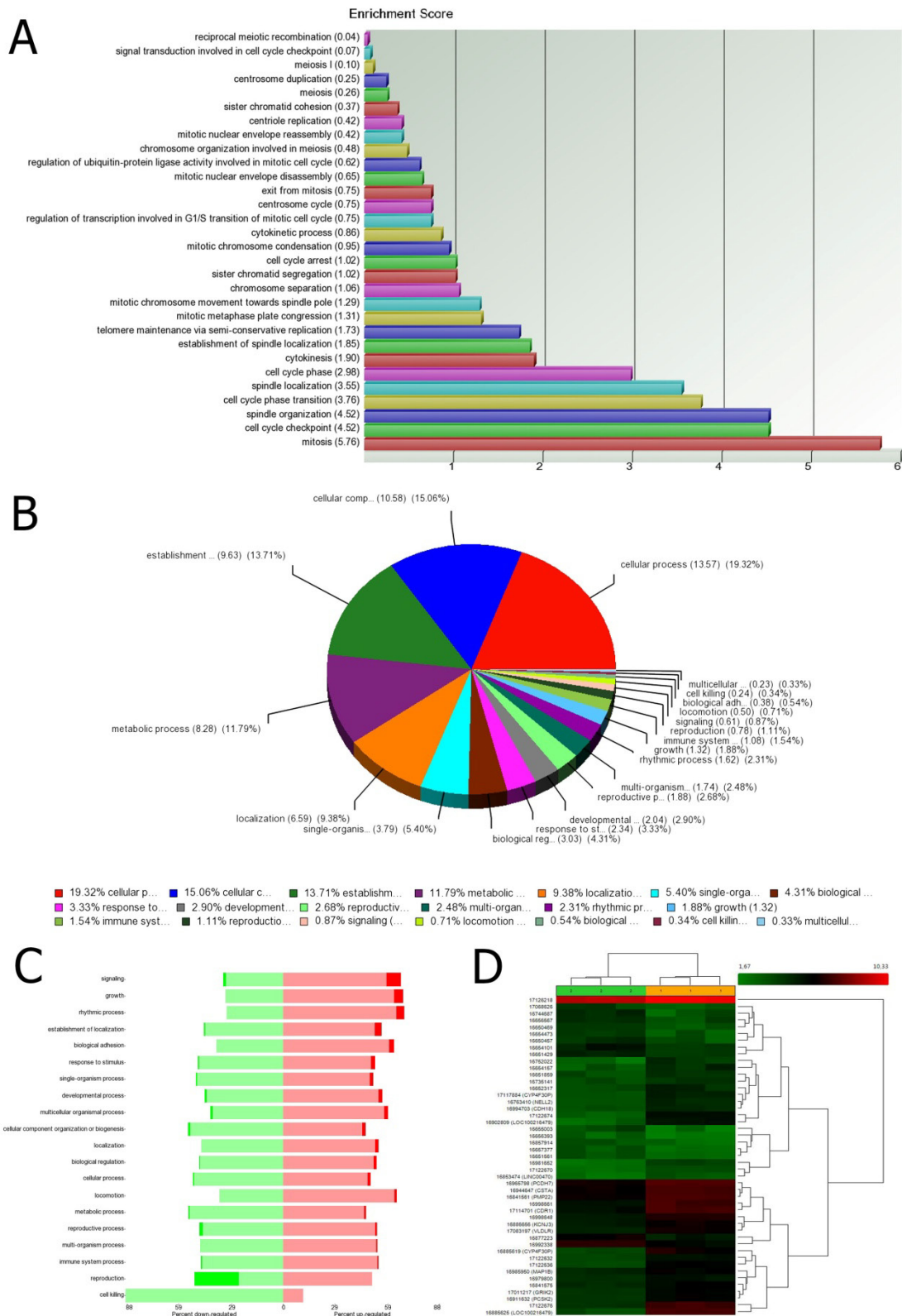
(Figura 21-F). Un nuevo estudio de asociación con GENEmania confirmó los resultados del estudio bioinformático inicial, mostrando que las principales funciones de los genes alterados eran en la proliferación celular (Figura 21-G). No se pudo confirmar que el estímulo proliferativo fuese por inducción indirecta de la expresión de *MKI67* ni de *MYBL2* (western blot; $p=NS$) ni que estos promoviesen la expresión de miR-18a mediante plásmidos de expresión constitutiva de *MKI67* y *MYBL2* (western-blot; $p=NS$).

Figura 21. MiR-18a regula al receptor de estrógenos alfa y estimula la proliferación de células MCF7 *in vitro*.



Cuando se realizó el análisis de expresión génica a nivel exónico, se confirmó nuevamente que miR-18a provocaba una reprogramación compatible con un estado pro-proliferativo de la línea celular MCF7 (**Figura 22**).

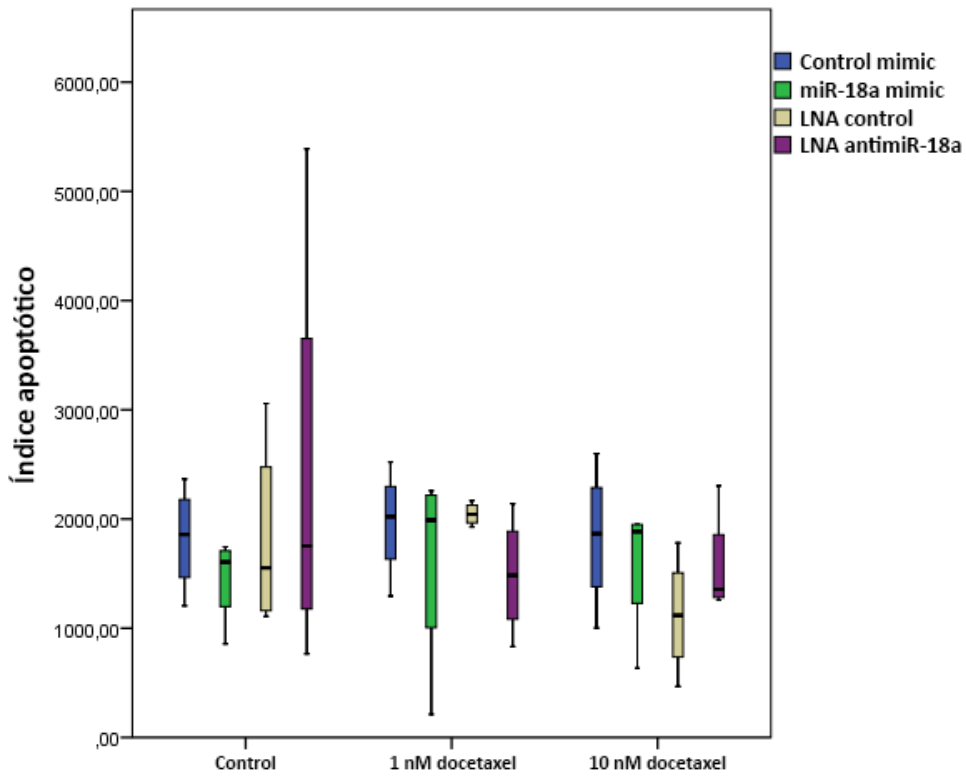
Figura 22. Resultados del microarray a nivel exónico. (A y B) La mayoría de exones que sufrieron cambios fueron de genes relacionados con procesos celulares relativos a mitosis y ciclo celular. (C) La mayor parte de exones sobre-expresados se relacionaban con señalización y proliferación. (D) Lista de genes que sufrieron mayor remodelación exónica.



Por último, se trató de confirmar una diana directa o indirecta de miR-18a, además del receptor de estrógenos alfa, que justificase el impacto adverso. Gracias a los estudios *in silico* y sumados a los datos experimentales disponibles en la bibliografía con microarrays de lisados de proteínas [387], se sospechó que *CXCL12* pudiese ser una diana directa o al menos indirecta, debido a que se conoce que la expresión de *CXCL12* está fuertemente promovida por el receptor de estrógenos alfa. De esta forma, el silenciamiento del *Rα* podría *per se* reducir los niveles de *CXCL12*, independientemente de ser diana directa de miR-18a.

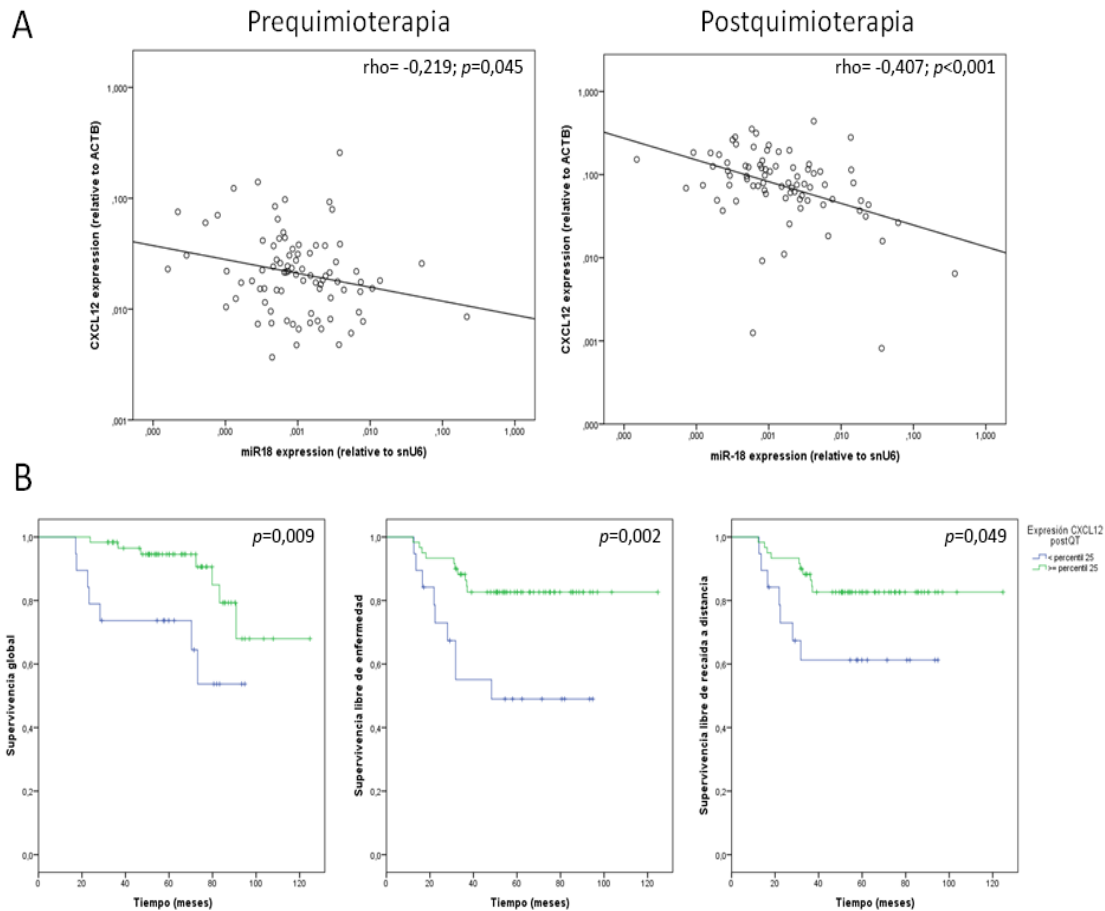
Se realizó un estudio *in silico* con Findtar3 para localizar sitios de unión de miR-18a tanto en el CDS como en el 3'UTR de *CXCL12*, encontrándose cinco sitios de unión en la isoforma alfa y uno en la isoforma beta (**Figura 23-A**). A su vez, se realizaron transfecciones con 100 nM de miR-18a, antimir-18a y controles de transfección. Por RT-qPCR se observó que la sobreexpresión de miR-18a disminuía los niveles de *CXCL12* en la línea celular MCF7 ($p < 0,05$) (**Figura 23-B**), lo que fue confirmado mediante microarrays de expresión ($p < 0,05$). Sin embargo, no se demostró que el silenciamiento de miR-18a aumentase los niveles de *CXCL12*, lo cual podría justificarse en parte debido a que los niveles de este microRNA y de *CXCL12* son muy bajos en esta línea modelo experimental (**Figura 23-C**). A su vez, se realizaron experimentos en células MCF7 en el contexto de estimulación del receptor de estrógenos con 10 nM de estradiol (**Figura 23-D**), confirmándose que la estimulación estrogénica aumenta el nivel de expresión de *CXCL12* hasta en cinco ciclos de qPCR, y que la sobreexpresión de miR-18a mitiga parcialmente este aumento de expresión de *CXCL12*.

Figura 24. Tratamiento con docetaxel en células MCF7 transfectadas con miR-18a o con inhibidor de miR-18a. No se observaron diferencias en apoptosis ni a 1 ni a 10 nM de docetaxel.



Cuando se profundizó en los datos de expresión de miR-18a y de *CXCL12*, se observó que además de estar inversamente correlacionados (**Figura 25-A**), cuando se estudiaba la expresión de *CXCL12* por cuartiles de expresión, la expresión muy baja del mismo se asociaba con un impacto pronóstico adverso en el análisis univariante (**Figura 25-B**), que no se confirmó en el análisis multivariante, pero sí en otras publicaciones previas [388].

Figura 25. (A) Correlación inversa de miR-18a con CXCL12. (B) Impacto pronóstico de CXCL12 dicotimizado por el percentil 25.



6.9 Conclusiones del Capítulo VI

Como conclusión del sexto capítulo de resultados, nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de miR-18a en el tumor residual es un factor de mal pronóstico. MiR-18a provoca un estímulo proliferativo *in vitro* en MCF7 (no observado en MDA-MB-231) que podría justificar en parte el pronóstico adverso. A nivel clínico miR-18a muestra una potente correlación con factores de proliferación, tanto en nuestra serie como en otras externas. Su expresión elevada se asocia a su vez a subtipos más agresivos. Entre los mecanismos que parece desencadenar miR-18a (además de los puramente proliferativos), está la disminución de los niveles proteicos del receptor de estrógenos alfa, así como una disminución efectiva de los niveles de SDF-1 (al menos a nivel de mRNA), lo cual podría promover un mayor estado pro-invasivo en las células, al disminuir la vía autocrina de producción de CXCL12, provocando así que éstas migren a favor de gradiente de concentración de esta quimiocina.

DISCUSIÓN

Serie clínica

La serie propósito de este estudio contiene un número de pacientes limitado (n=121) con cáncer de mama localmente avanzado (Estadios II-III) y con indicación de recibir quimioterapia neoadyuvante. La serie está balanceada en cuanto al estatus menopáusico de las pacientes y subtipos tumorales. La mayoría de los tumores presentaron histología ductal. Fueron homogéneamente tratadas con antraciclinas seguidas de taxanos en más del ochenta por ciento de los casos, lo que minimiza la variabilidad interindividual debida a fármacos.

Se alcanzó una tasa de respuestas completas patológicas (ypT0/ypTis + ypN0) en el 17% de los casos, acorde con otras series descritas en la bibliografía que también utilizan el esquema NSABP-B27 (Adriamicina: 60 mg/m² y Ciclofosfamida: 600 mg/m² x 4ciclos, seguido de Docetaxel 100 mg/m² x4 ciclos). Así mismo, se lograron mayor número de RCp en los subtipos Her2+ y triple negativos. El trastuzumab para los casos Her2+ se aplicó cuando estuvo indicado, y supuso un 14% del total de pacientes la serie. El subtipo tumoral fue el principal factor predictivo de respuesta completa patológica ($p=0,006$). La obtención de respuesta completa patológica se asoció con buen pronóstico para la supervivencia libre de enfermedad ($p=0,02$) mientras que la afectación ganglionar severa se mostró como un factor de mal pronóstico para la misma ($p=0,01$) y para la supervivencia global ($p=0,01$), si bien el seguimiento de la serie no ha permitido alcanzar todavía las medianas de supervivencia.

En conjunto, a pesar del número limitado de casos, nuestra serie muestra una buena concordancia en pronóstico y tasa de respuestas con los datos disponibles en la literatura, lo que avala el valor de la misma para la realización de estudios moleculares. Otra limitación de la misma es la no disponibilidad de tejido congelado, si bien el desarrollo en los últimos años de tecnologías de extracción y análisis de ácidos nucleicos a partir de muestras FFPE ha permitido el abordaje de laboratorio. Los resultados del estudio inmunohistoquímico y molecular se muestran y discuten en los capítulos siguientes.

Expresión de mediadores angiogénicos y de microRNA en cáncer de mama

Los análisis *in silico* realizados en las bases de datos públicas de interacción miRNA/mRNA muestran que los miembros del clúster 17-92a y los demás candidatos seleccionados tienen potencialmente como dianas a varios factores importantes en angiogénesis, proliferación y/o quimiotaxis. Del estudio descriptivo realizado sobre los niveles de expresión basales se puede concluir que miR-200c es el miRNA mayormente expresado en nuestra serie en cáncer de mama entre los candidatos seleccionados, y es acorde con los datos experimentales disponibles en la red que muestran a este microRNA como uno de los que más expresión muestran en cáncer de mama. Por otra parte, miR-519c aparece como uno de los que menos se expresa en tejido mamario. Los miembros del clúster 17-92 poseen expresión alta y similar entre ellos, a excepción de miR-18a que se expresa en menor medida. En cuanto a genes codificantes, los genes con mayor grado de expresión son los asociados con procesos proliferativos (*MKI67*, *MYBL2*), típicos de células neoplásicas en proliferación activa, mientras que *PDGFA* fue el gen que menor grado de expresión mostró en nuestra serie.

Cuando se estudio la correlación entre microRNAs y mRNAs, se observó que los miRNAs en general correlacionaban directamente con genes de proliferación e inversamente con genes asociados con procesos angiogénicos y/o quimiotácticos. Esta asociación con factores de proliferación soporta la evidencia del papel del clúster 17-92 como oncomiR y sustenta la posibilidad de que haya interdependencias entre estos genes y los miRNAs. Sin embargo, no siendo el objetivo de esta tesis doctoral, esta posibilidad deberá ser demostrada en trabajos posteriores. La correlación inversa con factores antiangiogénicos sugiere la posibilidad de que los miRNAs estudiados puedan tener algún papel antiangiogénico en este contexto, si bien los mecanismos moleculares son desconocidos.

En relación a las características clínicas y patológicas, no se observaron diferencias de expresión de ningún marcador en cuanto al estatus menopáusico de las pacientes, lo que sugiere que la expresión de estos marcadores *a priori* no es dependiente de los niveles fisiológicos hormonales. La expresión de miR-17-92, *VEGFA* y *THBS1* se asoció con subtipo tumoral triple negativo, lo cual apoya la idea de que la sobreexpresión de estos factores puede ser de mal pronóstico. Se observó mayor afectación ganglionar en aquellas pacientes cuyos tumores tenían mayores niveles de expresión de miR-200c, miR-19b-1 y miR-20a, *MKI67* y *MYBL2*, de forma que estos genes podrían estar implicados en mecanismos relacionados con la proliferación, la invasividad y la metástasis. Por otra parte, la expresión de miR-18a, miR-20a y miR-17 se asoció con grado histológico indiferenciado, lo que nuevamente sustenta la idea de que estos microRNAs se comportan como oncogenes también en cáncer de mama. Los genes *PDGFA*, *THBS1* y *CTGF* se asociaron sin embargo con tumores mayormente diferenciados, que suelen mostrar un menor índice angiogénico, y concuerda con las funciones generalmente antiangiogénicas o angiostáticas que se atribuyen a estos genes (en especial *THBS1* y *CTGF*) en algunos contextos [136, 137, 157, 158]. Ninguno de los genes analizados se asoció con la respuesta completa patológica. La sobre-expresión de miR-429 mostró tener valor pronóstico adverso para supervivencia libre de enfermedad y supervivencia libre de recaída a distancia, tanto en el análisis univariante como en el modelo multivariante. Este resultado pone de manifiesto una vez más la importancia de uno de los miembros de la familia de miR-200 en cáncer de mama.

Expresión de mediadores angiogénicos y microRNA tras quimioterapia neoadyuvante

Del estudio del tumor residual se puede confirmar que miR-200c es el microRNA con mayor expresión en el tumor primario, de entre los que fueron analizados y de igual forma que se observó en los tumores previo a tratamiento. MiR-107 por otra parte se mostró como el microRNA con menor nivel de expresión en tumor residual y a diferencia de antes del tratamiento, en la que fue miR-519c. Esta variación puede deberse a una respuesta cuantitativamente diferencial de los microRNAs con menor expresión basal en respuesta al tratamiento quimioterápico, o bien debido a la selección que se realiza al erradicar a los tumores sensibles a quimioterapia. De nuevo en el tumor residual los genes con mayor grado de expresión fueron los implicados con procesos de proliferación activa (*MKI67* y *MYBL2*), que pone de manifiesto que esta enfermedad residual sigue activa. El gen que menor expresión mostró fue *PDGFA*. Esto parece estar en concordancia con lo publicado en la bibliografía: PDGF

se asocia al mantenimiento de redes capilares diferenciadas y maduras [104], y lo que se observa en tumor residual (en nuestra serie) es un aumento de la densidad microvascular. Para que dicho incremento ocurra, posiblemente sea necesario el mantenimiento de bajos niveles de PDGF.

Los miRNAs analizados mostraron una potente correlación directa con genes implicados en proliferación activa, mientras que mostraron una correlación inversa con genes importantes en quimiotaxis y en angiogénesis. Esto confirma los resultados observados en tumor primario basal, objetivando un buen grado de correlación entre biopsias pre- y postquimioterapia que avala de nuevo la posibilidad de la utilización de muestras clínicas de archivo incluidas en parafina para realizar estudios de expresión génica. Por otro lado, estos datos sugieren que los microRNAs podrían estar participando en estos procesos proliferativos, bien silenciando genes supresores de tumores, o bien a otros genes perjudiciales para el tumor, cooperando en la progresión tumoral, en especial aquellos microRNAs que se asocian también con fenotipos más agresivos, como son los miembros de miR-17-92, que se asocian a fenotipo triple negativo y con mayor expresión de *THBS1* y de *VEGFA*. *CTGF* y *VIM* se asociaron con subtipo luminal en el tumor residual. Esto podría reflejar un cierto grado de respuesta antiangiogénica a la quimioterapia y/o un cierto grado de TEM o de invasión del nicho tumoral por parte de células mesenquimales en este subtipo de tumores.

MiR-17-92 junto a miR-106b, miR-200c y miR-9 se asociaron con tumores residuales de mayor tamaño. Estas diferencias que no fueron observadas previamente al tratamiento, podrían ser debidas a que los tumores con mayor nivel de expresión de estos marcadores sean intrínsecamente más resistentes a la quimioterapia; sin embargo, la ausencia de asociación con respuesta completa patológica de estos marcadores no sustenta dicha hipótesis. No se observó asociación de ningún marcador postquimioterapia con la afectación ganglionar residual. La quimioterapia indujo un aumento en la expresión de todos los microRNAs analizados, así como también de factores importantes en angiogénesis, así como una disminución en la expresión de factores importantes en proliferación celular. Esto pone de manifiesto por una parte que la quimioterapia funciona disminuyendo la tasa proliferativa del tumor residual, a pesar de no conseguir respuesta completa patológica, y por otra que provoca una respuesta angiogénica a ésta. Por otra parte, la disociación entre el aumento de expresión de los microRNAs y la disminución de la de los factores de proliferación, sugiere al menos que la expresión de los miRNAs no es dependiente directamente de la expresión de *MKI67* y de *MYBL2* y que esa correlación positiva entre ambos podría deberse bien a una co-expresión sin interdependencia, o a mecanismos comunes de regulación indirecta. La expresión de miR-18a en el tumor residual se asoció con mal pronóstico en cuanto a supervivencia libre de enfermedad y supervivencia libre de recaída a distancia, tanto en el análisis univariante, como en el modelo multivariante. Los resultados de miR-18a se discuten con detalle más adelante.

Perfil angiogénico del cáncer de mama pre- y post-quimioterapia neoadyuvante

En este apartado describimos un perfil angiogénico basal en el contexto del cáncer de mama, definido por características de los vasos CD34+ y por la expresión de los principales factores angiogénicos, así como su cambio tras administración secuencial de quimioterapia

neoadyuvante basada en antraciclinas y taxanos. Nuestros resultados muestran que el patrón angiogénico del cáncer de mama, si bien no es relevante para predicción de respuesta clínica o patológica, muestra valor pronóstico cuando la morfología vascular y los niveles de expresión de *VEGFA* son tenidos en consideración.

Los cambios angiogénicos inducidos por quimioterapia se caracterizaron por un incremento de la densidad microvascular, la estabilidad del tamaño medio vascular, y cambios variables en el equilibrio de biomarcadores angiogénicos. La respuesta angiogénica, definida como cualquier descenso en la densidad microvascular, se asoció fundamentalmente con disminución del estadio del tumor primario, pero no se asoció con otros factores pronósticos o patológicos del cáncer de mama (postquimioterapia), notándose la dificultad en la integración de las estrategias antiangiogénicas con quimioterapia convencional en el esquema neoadyuvante.

Mientras que el impacto pronóstico de la densidad microvascular en el cáncer de mama ha sido previamente descrito por varios grupos en cohortes grandes de pacientes en esquemas adyuvantes [203], solo existe un reducido número de trabajos que han abordado la relevancia de la morfología vascular en el cáncer de mama. En nuestra serie, un mayor tamaño medio vascular se asoció consistentemente con características desfavorables del tumor: subtipo triple negativo y con menor supervivencia libre de enfermedad. Se han publicado recientemente resultados similares utilizando parámetros relativos al tamaño vascular y complejidad en una cohorte amplia de cáncer de mama [209].

Hasta donde sabemos, no existen datos clínicos previos que aborden la relación entre la morfología vascular del cáncer de mama y la expresión de biomarcadores angiogénicos. En nuestras pacientes, patrones vasculares diferentes se asociaron con distintos perfiles de expresión de biomarcadores angiogénicos, y esta asociación fue consistente con un modelo en el cual la densidad vascular, determinada por la densidad microvascular, se asoció con la expresión de factores antiangiogénicos como *CTGF* y *THBS1*, mientras que la morfología de los vasos peritumorales (tamaño medio vascular y proliferaciones microvasculares glomerulares), con mayor impacto pronóstico, se asociaron con la expresión de *VEGFA* y *THBS1*. Estos resultados están en concordancia con datos experimentales previos que mostraron un tamaño mayor de vasos en cáncer de mama en el modelo murino *THBS1 knockout* [389] y que la expresión sostenida de *VEGFA* induce una mayor densidad y mayor tamaño de las redes vasculares tumorales [239].

No encontramos impacto pronóstico para densidad microvascular, lo cual está en desacuerdo con lo publicado en el contexto adyuvante; sin embargo, el tamaño muestral y el predominio de afectación ganglionar positiva podría justificar esta discrepancia [203, 390]. Aún así, la expresión de *VEGFA* fue por sí misma un factor determinante de peor supervivencia de las pacientes. Además de los potenciales efectos tumorales independientes de angiogénesis que promueve *VEGFA* [391], la sobreexpresión de *VEGFA* se asoció con la presencia de un patrón vascular anómalo caracterizado por tamaño medio vascular grande y presencia de proliferaciones microvasculares glomerulares, lo que sugiere la implicación de *VEGFA* en este proceso, puesto que es el mayor estímulo proliferativo para las células endoteliales [392].

Nuestros resultados sugieren que este perfil angiogénico podría contribuir a un pronóstico desfavorable, habiéndose publicado datos en el mismo sentido para las proliferaciones microvasculares glomerulares [206] y para la sobreexpresión de *VEGFA* [218, 393, 394] por otros grupos, tanto en cáncer de mama como en otros tumores. De forma similar, se ha observado un mayor grado de expresión de *VEGFA* en cáncer de mama triple negativo, que confiere también a su vez una menor supervivencia [395].

La respuesta angiogénica inducida por quimioterapia, definida arbitrariamente como cualquier descenso en la densidad microvascular, se relacionó con el descenso del estadio del tumor primario en nuestras pacientes. Una correlación similar de la respuesta angiogénica con la respuesta tumoral ha sido observada en otros esquemas de tratamiento midiendo cambios funcionales por imagen como marcador subrogado de modificaciones en densidad microvascular [396]. Sin embargo, el impacto de los cambios angiogénicos en la supervivencia es variable, dependiendo de los fármacos utilizados y del contexto del tumor, y en nuestro caso no encontramos ninguna asociación clara entre el cambio en la densidad microvascular en el tumor primario y el impacto en la supervivencia o en la respuesta patológica, lo cual sugiere un papel limitado de la respuesta angiogénica basada en la densidad microvascular como marcador subrogado en el esquema de quimioterapia neoadyuvante.

La utilización del cambio en la densidad microvascular como criterio subrogado de respuesta en el contexto del tratamiento neoadyuvante, es obstaculizado por el doble y potentemente divergente efecto de la quimioterapia, que causa contracción de la masa tumoral y efectos vasculares: diferentes combinaciones de ellos podrían dar lugar a aumentos aparentes o disminuciones de la densidad microvascular independientemente de la acción angiogénica real de la quimioterapia [396, 397]. Datos experimentales recientes también sugieren que las razones para dicha discordancia podrían deberse a diferencias entre los efectos del tratamiento en las metástasis y en el tumor primario, junto a diferencias en el tipo de respuesta angiogénica, que podría ser diferente cuando es inducida por quimioterapia o por agentes anti-*VEGFA* [398, 399].

Independientemente del valor cuestionable de la densidad microvascular como criterio subrogado de respuesta, tanto el 35% de respuestas angiogénica como el patrón del cambio en los factores angiogénicos observado tras la quimioterapia apoyan la noción de que los regímenes de quimioterapia neoadyuvante ejercen un efecto antiangiogénico. Nuestros resultados muestran que, en el contexto clínico, el incremento de *THBS1* y otros factores antiangiogénicos como *CTGF*, no está restringido a los esquemas metronómicos de quimioterapia [222], sino que también ocurre tras tratamiento convencional con antraciclinas y taxanos. Por el contrario, no encontramos un descenso significativo de los niveles de *VEGFA*; un efecto que es frecuente en la terapia hormonal y tras la quimioterapia metronómica [400], pero no después de la quimioterapia convencional [220]. La falta de impacto de la quimioterapia neoadyuvante en los niveles de *VEGFA* y el tamaño medio vascular, que parecen ser los principales factores pronósticos relacionados con la angiogénesis en nuestra serie, podría explicar la escasa relevancia pronóstica de sus efectos antiangiogénicos. De hecho, solo encontramos una tendencia a tener menor tamaño vascular medio en los tumores primarios de las pacientes en las que se obtuvo RCp tras la quimioterapia. Estos datos podrían ser

relevantes para el diseño de combinaciones de fármacos antiangiogénicos y quimioterapia convencional en el esquema neoadyuvante.

Nuestros resultados por tanto apoyan dos posibilidades:

1- La primera, que la quimioterapia es capaz de generar un microambiente con predominio de factores antiangiogénicos sin cambios relevantes en *VEGFA*, o en otros factores proangiogénicos, como sugiere tanto el aumento absoluto de la trombospondina y los niveles de *CTGF* como el mayor incremento relativo de *THBS1* y *CTGF* cuando se comparan con los niveles de expresión de *HIF1A* y *PDGFA* (ligeramente aumentados o estables). En ese contexto, la incorporación de tratamientos adicionales con agentes anti-VEGF podría ser de limitada utilidad clínica, mientras que quizá la combinación de análogos de trombospondina podría ser una estrategia más potente de agentes cooperativos con la quimioterapia [139].

2- La segunda, la ausencia de descensos en la expresión de *VEGFA* tras la quimioterapia, que también ha sido observada en otras series tratadas con docetaxel neoadyuvante [401], podría apoyar la idea del valor de *VEGFA* como diana oncológica, particularmente en tumores más angiogénicos como son los triple negativo. Se necesita profundizar más en el significado biológico de la pauta de incremento de los factores tanto antiangiogénicos como proangiogénicos tras el tratamiento quimioterápico; sin embargo, la definición de la función precisa y del efecto vascular de cada uno de ellos en particular queda fuera del alcance del objetivo de esta tesis doctoral.

Nuestro trabajo tiene ciertas limitaciones. En primer lugar, el tamaño muestral no permite un análisis más detallado de los patrones angiogénicos entre los diferentes subtipos del cáncer de mama ni del sentido de los cambios del tamaño vascular dentro del grupo de pacientes con RCp. En segundo lugar, la correlación de la densidad microvascular determinada en biopsias con aguja gruesa con la determinada en la pieza quirúrgica ha sido previamente cuestionada, aunque algunos datos previos apuntan a una mejor correlación cuando se evalúan tumores más grandes y se analiza un área mayor [402, 403]. Por ello, a pesar de la no disponibilidad de otros tipos de muestras en el contexto neoadyuvante, la evaluación de un área de entre 2,4 a 4 mm² y el tamaño del tumor alrededor de 2 cm en la mayoría de los casos, puede haber compensado esta limitación metodológica. En tercer lugar, no realizamos un análisis funcional por imagen o inmunohistoquímica de la normalización vascular [404], que podría haber aportado más datos sobre potenciales mecanismos antiangiogénicos o sobre la posible cooperación entre el efecto directo antitumoral y efecto antiangiogénico de la quimioterapia. Nuestros datos de la asociación del descenso del tamaño vascular postquimioterapia con la RCp sugieren que el cambio angiogénico podría estar relacionado con este modelo de normalización vascular, pero esta hipótesis deberá ser confirmada en otros diseños experimentales y estudios con cohortes más amplias.

Finalmente, no evaluamos otros biomarcadores angiogénicos, como *NRP1* o *ANGPT2*, potencialmente implicados en la resistencia por evasión antiangiogénica. Sin embargo, la comparación pareada de secciones completas de biopsias pre- y postquimioterapia y la correlación entre factores angiogénicos fortalecen nuestras conclusiones y proveen nuevos datos clínicamente relevantes acerca del usualmente olvidado efecto antiangiogénico de la quimioterapia neoadyuvante.

Como conclusión, el mayor tamaño vascular en el tumor y los mayores niveles de expresión de *VEGFA* se asociaron con características clínicas y patológicas adversas, así como menor supervivencia libre de enfermedad. A pesar de que el descenso de la densidad microvascular se observó solo en una tercera parte de las pacientes, nuestros datos sugieren que los esquemas de quimioterapia neoadyuvante ejercen efectos antiangiogénicos, con un marcado incremento de los factores antiangiogénicos como *THBS1* y *CTGF*, y un mantenimiento o ligero incremento en los niveles de biomarcadores proangiogénicos, como *VEGFA*. Estos cambios angiogénicos mediados por la quimioterapia se correlacionan con un descenso del estadio del tumor primario, si bien no se asocian con respuesta clínica o patológica ni con pronóstico. Dados los limitados resultados de las terapias antiangiogénicas en el contexto neoadyuvante, con solo ligeras mejoras en la tasa de respuestas [405, 406] y las deficiencias en los modelos experimentales actuales [407], se necesitan urgentemente mejores biomarcadores de respuesta angiogénica en conjunto con una mejor comprensión de la cooperación que existe entre quimioterapia y terapia antiangiogénica, tanto en esquemas clínicos de tratamiento como en modelos experimentales relevantes.

Implicación del clúster miR-17-92 en la angiogénesis del cáncer de mama

Nuestros resultados sugieren que solo los miembros del clúster miR-17-92: miR-18a, miR-19b-1 y miR-20a correlacionan con los parámetros angiogénicos clásicos inmunohistoquímicos con CD34⁺, mientras que miR-17 y miR-92a no parecen asociarse con la angiogénesis en este modelo. Entre los que se asocian con parámetros angiogénicos, y de igual forma que ocurre en otros procesos regulados por el clúster, el comportamiento que siguen difiere de forma consistente entre los distintos miembros.

En los tumores prequimioterapia se observa una relación inversa entre miR-19b-1 y densidad microvascular, mientras que miR-20a se asocia directamente con mayor tamaño de los vasos, y no se observa asociación alguna de miR-18a con los parámetros angiogénicos. En las muestras postquimioterapia, sin embargo, los tres microRNAs se asocian directamente con mayor tamaño vascular, no observándose asociación alguna con densidad microvascular. Con los datos que disponemos de biomarcadores no es posible explicar este tipo de comportamiento, ya que los tres microRNAs correlacionan de forma similar con los mismos, no encontrándose una relación clara diferencial que pueda explicar este patrón.

La quimioterapia con antraciclinas y taxanos provoca un aumento consistente en la expresión de todos los microRNAs, así como ocurre en la densidad microvascular, sin apreciarse cambios en el tamaño vascular y con cambios variables de los biomarcadores angiogénicos estudiados, lo cual tampoco permite elaborar una hipótesis biológica consistente que justifique la interrelación existente entre estos microRNAs y la angiogénesis.

La expresión elevada tanto de miR-19b-1 como de miR-20a se asocia directamente con la aparición de proliferaciones microvasculares glomerulares, mientras que la expresión elevada de todos salvo de miR-92a se asocia con el perfil vascular de alto riesgo definido en el **Capítulo IV**. Este hallazgo refuerza el papel adverso de su sobreexpresión en cáncer de mama, sin que en el presente estudio haya sido posible encontrar un mecanismo claro, aunque tanto

miR-19b-1 como miR-20a muestran una correlación positiva con *VEGFA* y con *THBS1* e inversa con *PDGFA*, lo cual sugiere que podrían estar participando en el proceso angiogénico a través de alguna/s de sus múltiples dianas.

El caso de **miR-19b-1** en el tumor primario basal es muy interesante, por tres motivos fundamentales:

El primero, porque su nivel de expresión muestra una correlación inversa con la densidad microvascular, lo cual indica que podría jugar un papel antiangiogénico en el contexto del microambiente tumoral en el cáncer de mama. A favor de este punto tenemos su correlación directa con *THBS1*, el principal biomarcador antiangiogénico, e inversa con *PDGFA*, un factor proangiogénico importante. Sin embargo, miR-19b-1 también correlaciona directamente con *VEGFA*, el principal factor proangiogénico, lo que sugiere un complejo equilibrio entre factores pro- y antiangiogénicos difícil de elucidar. Varios estudios han señalado previamente funciones antiangiogénicas de algunos de los miembros del clúster, incluyendo a miR-19b-1 y a miR-19a (también miembro del clúster y familia de miR-19b-1, con alta homología de secuencia) [344, 345, 408].

Algunos autores han propuesto que los miembros del clúster tendrían distintas funciones dependiendo de si las condiciones son fisiológicas o patológicas, debido a que por ejemplo, la inhibición simultánea de miR-17 y miR-20a con antagomiR incrementa la vascularización en células endoteliales sobre matrigel, lo cual es consistente con una función antiangiogénica de los mismos en las células endoteliales, y sin embargo, no parecen afectar a la angiogénesis tumoral *in vitro*. Un estudio reciente a su vez demuestra que la expresión del clúster en células endoteliales está promovida por el estímulo de VEGF vía activación de ERK/ELK1 [334], lo cual podría justificar la correlación directa observada con este biomarcador. Sin embargo, no explicaría el aumento de miR-19b-1 inducido por quimioterapia, ya que los niveles de *VEGFA* no cambian con la quimioterapia, lo cual demuestra que no sólo es dependiente de esta vía. Estos autores además muestran que el incremento en el clúster es necesario para la proliferación y diferenciación de las células endoteliales, lo cual sugiere un papel biológico pleiotrópico importante del clúster miR-17-92.

El segundo, porque los niveles elevados de miR-19b-1 se asocian con un subtipo vascular pronósticamente desfavorable, consistente en la presencia de proliferaciones microvasculares glomerulares y un mayor tamaño vascular [208]. La presencia de GMP ha sido asociada con subtipos más agresivos y con un pronóstico desfavorable por múltiples autores en diversas neoplasias sólidas [205, 206, 409]. De igual forma, el tamaño medio de los vasos peritumorales también ha sido relacionado con un pronóstico desfavorable en el cáncer de mama [209]. De esta forma, miR-19b-1 podría servir como un marcador que integre ambas variables, siendo más fácilmente analizable, automatizable y de mayor precisión, ya que su análisis es independiente del observador. El mecanismo biológico por el cual se relacionan estas variables sigue siendo desconocido, aunque parece estar mediado por *VEGFA*.

El tercero, porque miR-19b-1 parece tener valor predictivo de respuesta angiogénica, de manera que aquellos tumores con elevada expresión de miR-19b-1 tienen menos respuestas angiogénicas que aquellos tumores con bajo nivel de expresión de miR-19b-1. Esto parece ocurrir así debido a la correlación inversa entre ambas variables y al hecho de que

aquellas pacientes en las que se obtiene respuesta angiogénica tienen tumores con mayor densidad microvascular. De confirmarse, miR-19b-1 podría servir también como un marcador subrogado de respuesta angiogénica que podría tener utilidad clínica a la hora de evaluar si un fármaco antiangiogénico está funcionando o no.

MiR-20a fue el mejor marcador predictivo de presencia de perfil vascular de alto riesgo, que se asociaba con un pronóstico desfavorable. Esta asociación fue independiente del subtipo triple negativo y de la expresión de *VEGFA*. La sobre-expresión *in vitro* de miR-20a provocó una disminución de los niveles de expresión de *VEGFA* en MDA-MB-231, lo cual apoya la hipótesis de Chamorro-Jorganes [334] y colaboradores de que es *VEGFA* el que promueve la expresión de miR-20a y no al revés, mientras que éste último podría actuar como un mecanismo de retroalimentación negativa sobre *VEGFA*. El mecanismo por el cual miR-20a se relaciona con la aparición de proliferaciones microvasculares glomerulares y con mayor tamaño vascular es por el momento desconocido.

Valor pronóstico y significado biológico de la expresión de miR-18a en cáncer de mama

Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de miR-18a en el tumor residual tras la quimioterapia es un factor de mal pronóstico, lo que podría justificarse al menos en parte por el discreto estímulo proliferativo que provoca este miRNA *in vitro*. MiR-18a muestra una potente correlación directa con marcadores de proliferación activa, como son *MKI67* y *MYBL2*, tanto en nuestra serie clínica como en hasta cinco externas. Además, su expresión elevada se asocia con subtipos más agresivos como es el triple negativo, y con tumores de grado histológico pobremente diferenciados. Nuestros datos de proliferación utilizando XTT y contaje celular *in vitro* avalan esta hipótesis, ya que la sobreexpresión de miR-18a aumenta ligeramente la proliferación en la línea celular MCF7, de forma independiente a la expresión de *MYBL2* o de *MKI67*. A su vez, por microarray de expresión génica, que permite un análisis a dos niveles (expresión y cambio exónico), confirmamos que en la línea celular MCF7 se produce una reprogramación compleja hacia un estado pro-proliferativo, sin existir asociación directa con un gen candidato claro. Estos datos en conjunto concuerdan con lo publicado en la literatura, en la que se reflejan entre otras funciones del clúster, promover la proliferación celular [410, 411].

Sin embargo, sabemos que las respuestas moleculares que se generan como consecuencia de su sobreexpresión son más amplias y más complejas, y por tanto no sólo se puede justificar el impacto pronóstico por el discreto aumento proliferativo. Por ello profundizamos en mecanismos adicionales, y mostramos a su vez que miR-18a es capaz de disminuir los niveles de mRNA de *CXCL12*.

Se trata de un gen que parece ser diana directa en los estudios *in silico*, aunque no se ha confirmado experimentalmente. *CXCL12* codifica para el factor derivado de células estromales 1 (SDF-1). Esta quimiocina es un potente factor quimiotáctico para células epiteliales y también para células de cáncer de mama, y la unión de SDF-1 a su receptor CXCR4 activa a una variedad de rutas de señalización celular y de efectores moleculares que regulan supervivencia celular, proliferación, quimiotaxis, migración, y adhesión [412]. La expresión a

nivel de mRNA de *CXCL12* paradójicamente se correlaciona de forma inversa con la recurrencia metastásica de la enfermedad [388, 413]. Pese su papel como molécula que promueve procesos esenciales en las células tumorales [414], algunos autores sugieren como hipótesis explicativa que bajos o nulos niveles expresión de SDF-1 en el nicho tumoral favorecerían la supresión de la vía autocrina en la célula tumoral, de forma que se favorecerían la migración de las células tumorales, a favor de gradiente de concentración, favoreciendo así la generación de metástasis en tejidos sanos productores de SDF-1 [415].

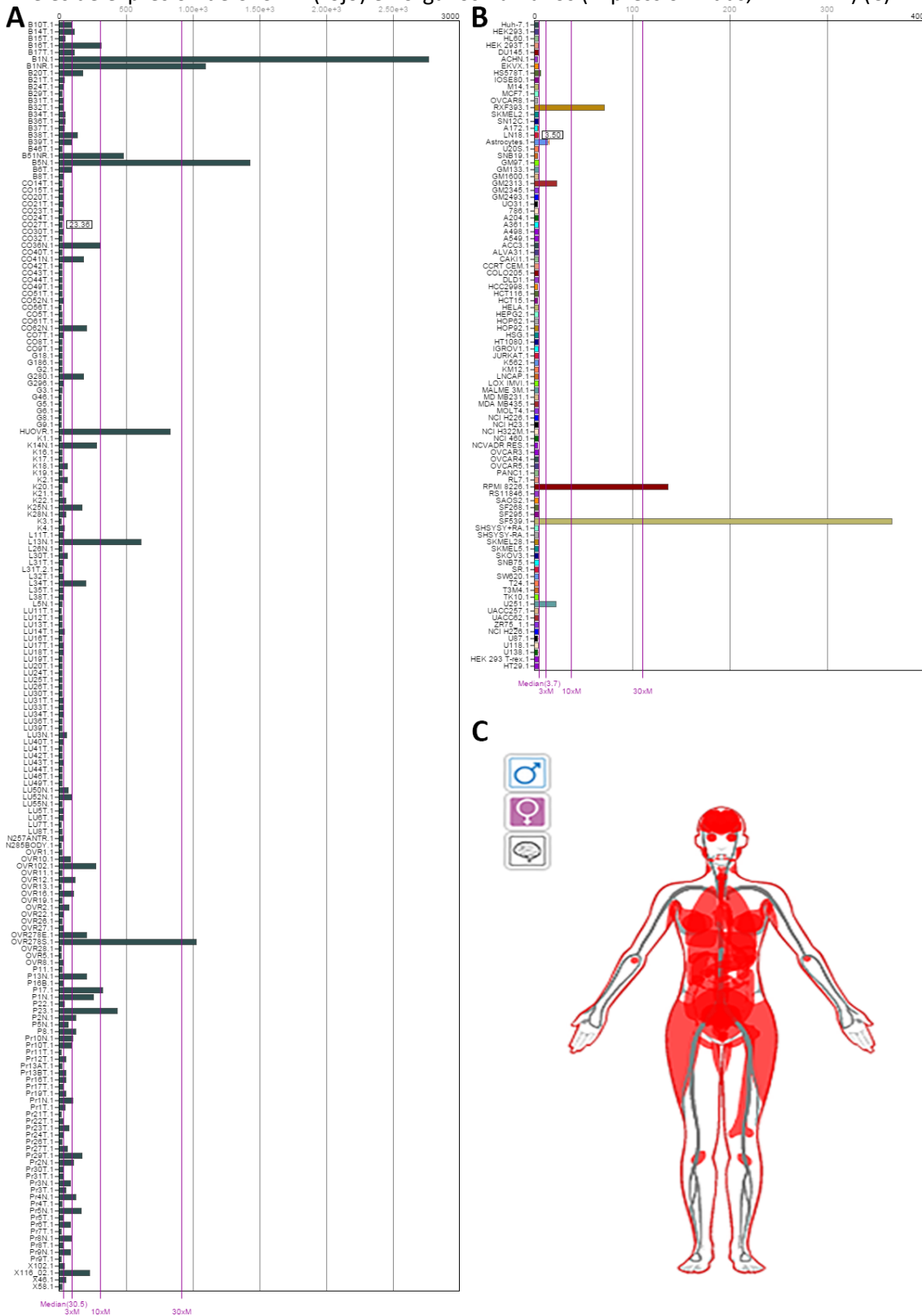
No se conocen los mecanismos que provocan el descenso de la expresión de *CXCL12*; sin embargo, se sabe que está vinculado en parte a la disminución de las señales estrogénicas, ya que *in vitro* la estimulación de células MCF7 con estradiol aumenta considerablemente la expresión del mRNA de *CXCL12*, y hace los niveles de la proteína detectables por western-blot: el estímulo con 10 nM de estradiol aumenta en hasta cinco ciclos la expresión del mRNA de *CXCL12*, lo cual muestra que es dependiente de rutas estrogénicas para su síntesis. Este estímulo se ve parcialmente reducido si miR-18a se sobreexpresa. Este proceso de silenciamiento, quizá incluye un doble bloqueo: directo e indirecto de la expresión de *CXCL12*, y podría contribuir al impacto pronóstico adverso en supervivencia libre de enfermedad y libre de recaída a distancia que producirían altos niveles de miR-18a, al menos en el contexto del cáncer de mama tratado con quimioterapia neoadyuvante.

El receptor de estrógenos alfa es diana directa de miR-18a [387] y aquí confirmamos que es eficazmente silenciado a nivel de proteína en MCF7, lo cual sugiere al menos un bloqueo indirecto de la expresión de *CXCL12*. Si bien esta regulación indirecta podría justificar los resultados observados a nivel transcriptómico, el análisis bioinformático sugiere que miR-18a también silencia a *CXCL12* de forma directa gracias al estudio *in silico* previo, en el que detectamos sitios de unión tanto a nivel de CDS como a nivel de 3'UTR en las isoformas alfa y beta. Nuestros resultados preliminares en ese sentido, utilizando plásmidos de expresión constitutiva sin el 3'UTR, sugieren que esa unión al menos no se produciría en el CDS ($p=NS$). El estudio experimental no se ha podido realizar en líneas modelo de triple negativo (con ausencia de expresión de RE α) debido a que éstas (y la mayoría de líneas celulares en general) presentan sistemáticamente silenciado a nivel epigenético al gen *CXCL12* y a su vez presentan mayor expresión de miR-18a, lo cual parece una evidencia adicional de la importancia de la pérdida de expresión de SDF-1 para la agresividad y la progresión tumoral. Un doble bloqueo de *CXCL12* favorecería eficazmente la disponibilidad de los receptores de esta quimiocina en el tumor primario, en estadios tempranos y localmente avanzados, donde los niveles de expresión de *CXCL12* aún no se han perdido completamente (**Figura 26-A**); este bloqueo promovería la migración de las células tumorales y la invasión tisular a favor de gradiente de concentración de SDF-1.

Con la progresión de la enfermedad en estadios ya metastásicos, SDF-1 parece acabar siendo silenciado sistemáticamente, probablemente epigenéticamente (**Figura 26-B**), lo haría a las células tumorales totalmente dependientes del aporte exógeno de la quimiocina. Una evidencia adicional a este mecanismo de progresión es que los órganos con mayor frecuencia de metástasis por cáncer de mama a su vez son en los que se encuentran mayores niveles de SDF-1 (*Expression Atlas*, EMBL-EBI, **Figura 26-C**). Conocer los niveles de expresión de miR-18a y *CXCL12* podría permitirnos estratificar a las pacientes por riesgo de recurrencia local y a

distancia y a su vez desarrollar estrategias terapéuticas que bloqueasen la expresión del OncomiR-1 (incluyendo a miR-18a) y de los receptores de SDF-1 en estadios tempranos, tratando de disminuir el riesgo de recaída metastásica.

Figura 26. Gráficos de barras generados con BioGPS (<http://biogps.org/>) mostrando los niveles de expresión de *CXCL12* en tumor primario (mediana de expresión de 30,5) (A) en líneas celulares establecidas (mediana de expresión de 3,7) (B) y esquema donde se muestran los niveles de expresión de *CXCL12* (rojo) en órganos humanos (Expression Atlas, EMBL-EBI) (C).



CONCLUSIONES

Como conclusiones parciales,

- Con respecto a los objetivos 1 y 2, en una serie clínica de cáncer de mama con enfermedad locorregional o localmente avanzada, homogénea en cuanto al tratamiento neoadyuvante y comparable a la literatura en la tasa de respuestas completas patológicas, encontramos que la expresión basal elevada de *VEGFA* fue un factor pronóstico desfavorable e independiente para supervivencia libre de enfermedad. Ninguno de los marcadores moleculares se asoció con respuesta clínica o patológica.

- Con respecto al objetivo 3, el tratamiento basado en antraciclinas y taxanos produce un aumento de expresión de los mediadores antiangiogénicos *THBS1* y *CTGF* en el tumor primario, mientras que otros factores proangiogénicos como *VEGFA* y *PDGFA* no modifican sus niveles relativos.

- Con respecto al objetivo 4, identificamos un patrón vascular de alto riesgo, compuesto por la presencia de proliferaciones microvasculares glomerulares y un mayor tamaño vascular, que junto a mayores niveles de expresión de *VEGFA*, se asocia a una menor supervivencia libre de enfermedad. La quimioterapia neoadyuvante produce un aumento de la densidad microvascular, sin afectar al tamaño medio vascular. Se obtuvo respuesta angiogénica (definida como descenso de la MVD) solo en un tercio de las pacientes y su significado pronóstico y biológico es dudoso.

- Con respecto al objetivo 5, miR-18a, miR-19b-1 y miR-20a se asocian con un perfil angiogénico desfavorable (elevado tamaño vascular y presencia de GMP), aunque no pudo confirmarse en un modelo *in vitro* un efecto proangiogénico de ninguno de ellos. MiR-19b-1 además de asociarse con el perfil angiogénico desfavorable, fue una variable predictiva independiente de la respuesta angiogénica.

- Con respecto al objetivo 6, miR-18a se comporta como un marcador con valor pronóstico en el tumor residual, siendo los niveles de expresión altos una variable pronóstica independiente para la supervivencia libre de enfermedad y libre de recaída a distancia. Este mecanismo parece ser independiente del contexto angiogénico, y parece estar relacionado con múltiples factores que incluyen una reprogramación celular hacia un estado pro-proliferativo, y un silenciamiento al menos indirecto de la quimiocina *CXCL12*, vía represión del receptor de estrógenos. El silenciamiento de *CXCL12* suprimiría la vía autocrina, promoviendo la migración de la célula tumoral a favor de gradiente de concentración de *CXCL12*, localmente y a distancia.

Como conclusión general:

MiR-17-92 desempeña un papel relevante en la angiogénesis tumoral, asociándose sus miembros de forma directa con un estado proangiogénico y proproliferativo, a través de biomarcadores tan importantes como el factor de crecimiento endotelio vascular o la trombospondina-1.

Todos los angiomicroRNA analizados en este trabajo de tesis (miR-17, miR-18a, miR-19b-1, miR-20a, miR-92a, miR-200c, miR-106b, miR-429, miR-141, miR-519c, miR-9 y miR-107) sufren un aumento de expresión consistente en el contexto del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas y taxanos.

APÉNDICE I

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA RELACIONADA CON LA TESIS

1) Artículos (por orden cronológico)

- I. **Ginés Luengo Gil**; Enrique González Billalabeitia; Asunción Chaves Benito; Elena García Martínez; Elisa García Garre; **Vicente Vicente García**; **Francisco Ayala de la Peña** (2015). Effects of conventional neoadjuvant chemotherapy for breast cancer on tumor angiogenesis. **Breast cancer research and treatment**.
- II. **Ginés Luengo Gil**; Ana Belén Arroyo Rodríguez; Alberto Carmona Bayonas; **Francisco Ayala De la Peña** (2013). CircRNAs: esponjas moleculares de microRNAs, ¿futuro terapéutico en cáncer? **Eubacteria**, 32.
- III. Alberto Carmona Bayonas; **Ginés Luengo Gil**; Carme Font Puig; Carlos Llorens Candela (2013). Los elementos genéticos móviles en la célula tumoral: el despertar de un gigante. **Eubacteria**, 32.
- IV. Carme Font Puig; Alberto Carmona Bayonas; **Ginés Luengo Gil**; Ana Belén Arroyo Rodríguez (2013). La hemostasia como instrumento para la progresión del cáncer y sus implicaciones clínicas. **Eubacteria**, 32.
- V. **Ginés Luengo Gil** (2012). MicroRNAs: nuevos marcadores de interés en oncología. **Eubacteria**, 28.

En preparación tres artículos para publicación de los resultados relacionados con: (1) miR-19b-1 / miR-20a y su relación con la angiogénesis tumoral; (2) miR-18a y progresión tumoral; (3) familia de miR-200 y su papel como biomarcadores con valor pronóstico.

2) Comunicaciones a Congreso (por orden cronológico)

- I. **Ginés Luengo Gil**; Enrique González-Billalabeitia; Asunción Chaves-Benito; Elisa García Garre; Pilar de la Morena Barrio; Ana Fernández Sánchez; **Vicente Vicente**; **Francisco Ayala de la Peña** (2015). Análisis de la relación entre la expresión de miR-20a y la angiogénesis tumoral en el cáncer de mama. **XV Congreso Nacional SEOM**.
- II. **Ginés Luengo Gil**; Enrique González Billalabeitia; Rocío González-Conejero; Asunción Chaves Benito; Elena García-Martínez; **Vicente Vicente**; **Francisco Ayala de la Peña** (2015). El silenciamiento de CXCL12 dependiente de miR-18a es un mecanismo potencial de progresión tras QT neoadyuvante (QTn) del cáncer de mama. **XV Congreso Nacional SEOM**.
- III. **Ginés Luengo Gil**; Enrique González Billalabeitia; Rocío González-Conejero; Asunción Chaves Benito; Elena García Martínez; Gloria Soler Sánchez; Elisa García Garre; Lorena Velázquez; **Vicente Vicente**; **Francisco Ayala de la Peña**. (2014). Decrease of tumor F3 expression after neoadjuvant chemotherapy associates to lower survival in breast cancer. **CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium**.

- IV. **Ginés Luengo Gil**; Rocío González-Conejero; Asunción Chaves Benito; Gloria Soler Sánchez; Enrique González Billalabeitia; Sergio Pérez Henarejos; Helena García Martínez; Ana Arroyo Rodríguez; **Vicente Vicente**; **Francisco Ayala de la Peña**. (2013) Prognostic impact of miR-18a expression in residual tumor after neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. **CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium**.
- V. **Ginés Luengo Gil**; David Hardisson; Asunción Chaves Benito; Enrique González Billalabeitia; Rocío González-Conejero Hilla; Gloria Soler Sánchez; Sergio Pérez Henarejos; Teresa García García; Cristina Rodríguez Antona; **Francisco Ayala de la Peña**. (2013). Implicaciones pronósticas de la expresión de la familia miR-200 en el cáncer de mama tratado con quimioterapia neoadyuvante. **XIV Congreso Nacional SEOM**.

3) **Financiación obtenida en proyectos nacionales competitivos**

- I. **Francisco Ayala de la Peña**; Enrique González Billalabeitia; María Piedad Fernández Pérez; **Ginés Luengo Gil**; Alberto Carmona-Bayonas; Alberto Martínez Carrasco; Asunción Chaves-Benito; Raúl Teruel-Montoya. (2015). Estudio del valor de los ácidos nucleicos circulantes en pacientes con cáncer de mama y de próstata avanzado en progresión a hormonoterapia (**PI15/01499**).

ANEXO I

Sistema TNM

- Este sistema de estadificación anatómico es el estándar internacionalmente aprobado, estando aceptado por la *Union for International Cancer Control* (UICC) y la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) [39]. Se basa en analizar el tamaño del tumor primario (designado por la letra T), el grado de diseminación linfática proximal (designado por la letra N) y por la presencia de focos metastásicos (designado por la letra M). A estas letras se les incluye un número que permite indicar el tamaño o el grado de diseminación de la enfermedad.

- **TUMOR PRIMARIO (T)**

- i. Tx No evaluable
- ii. T0 Sin evidencia de tumor primario
- iii. Tis Carcinoma *in situ*
- iv. T1 Tumor menor de 2 cm en su diámetro mayor
- v. T2 Tumor > 2 cm pero < 5 cm en su diámetro mayor
- vi. T3 Tumor mayor de 5 cm en su diámetro mayor
- vii. T4 Cualquier tumor primario con extensión directa a la pared torácica, afectación de la piel, combinación de ambas o carcinoma inflamatorio

- **AFECTACIÓN GANGLIONAR REGIONAL (N)**

- i. Nx No evaluables los ganglios linfáticos regionales
- ii. N0 Sin afectación ganglionar
- iii. N1 Metástasis axilares homolaterales móviles palpables
- iv. N2 Metástasis axilares homolaterales fijas o metástasis en mamaria interna homolaterales detectables por análisis de imagen o detectables por examen clínico, en ausencia de afectación metastásica en linfonodos axilares.
- v. N3 Metástasis en linfonodos intraclaviculares homolaterales o metástasis en linfonodos de mamaria interna homolaterales detectables por imagen o examen clínico y evidencia clínica de metástasis en linfonodos axilares, o metástasis en linfonodos supraclaviculares homolaterales con o sin compromiso de los linfonodos axilares o de la mamaria interna.

- **PRESENCIA DE METÁSTASIS (M)**

- i. Mx No evaluable

- ii. M0 Sin metástasis distantes
- iii. M1 Enfermedad metastásica presente

I. Descriptores adicionales

Cuando la estadificación se realiza previamente al tratamiento mediante exámenes físicos, test de laboratorio, análisis de imagen y/o biopsia, recibe el nombre de estadio clínico, denotado por el prefijo "c" minúscula (ejemplo cT, cN, cM). Tras la cirugía, la información obtenida de la resección y por análisis detallados de anatomía patológica permiten determinar el estadio patológico del tumor, denotado por el prefijo "p" minúscula (pTNM). Generalmente el cTNM se utiliza para planificar la estrategia de tratamiento inicial, mientras que el pTNM se utiliza para determinar la necesidad de utilizar quimioterapia adyuvante postquirúrgica y el seguimiento de las pacientes. Otros descriptores utilizados son la letra "R" como prefijo en mayúsculas para describir la extensión del tumor residual tras el tratamiento, generalmente tras resección quirúrgica (Rx, R0, R1, R2). Así mismo, la letra "r" minúscula permite describir la extensión del tumor tras recaída (por ejemplo, rcT0,N1,M0).

Estadaje al diagnóstico

- A todas las pacientes se les debe determinar el estadio clínico antes del comienzo de cualquier tratamiento. Cuando se administra quimioterapia neoadyuvante (o preoperatoria) previa a la resección quirúrgica, el cTNM o el pTNM se identifica con el prefijo "y", de forma que el ycTNM o el ypTNM categorizan el estadio tumoral en el momento del análisis clínico o anatomopatológico en neoadyuvancia. El ypTNM considera la presencia o ausencia de células cancerígenas viables, de forma que este esquema de tratamiento permite la evaluación de la respuesta tumoral a la quimioterapia.

• ESTADIO CLÍNICO EN FUNCIÓN DEL TNM

i. Estadio 0	Tis	N0	M0
ii. Estadio I	T1	N0	M0
iii. Estadio IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
iv. Estadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T3	N1	M0
v. Estadio IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
vi. Estadio IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
vii. Estadio IIIC	Cualquier T, N3, M0		
viii. Estadio IV	Cualquier TN, M1		

ANEXO II

Tabla 72. Clasificación morfológica del cáncer de mama.

Tipo de lesión	Denominación	Frecuencia
Lesiones no invasivas	Carcinoma ductal <i>in situ</i> (DCIS)	Forma no invasiva más frecuente
	Carcinoma lobulillar <i>in situ</i> (LCIS)	Menos frecuente, pero alto riesgo de transformación
Lesiones invasivas	Carcinoma ductal invasivo	El más común de los casos (70-80%)
	Carcinoma lobulillar invasivo	5-10% de los casos
Formas especiales	Carcinoma mucinoso	Aproximadamente 2% de los casos
	Carcinoma medular	De 5-7% de los casos
	Carcinoma tubular	Aproximadamente 2% de los casos
Formas menos frecuentes	Carcinoma papilar	Infrecuente
	Carcinoma apocrino	Infrecuente
	Carcinoma secretor	Infrecuente
	Carcinoma metaplásico	Infrecuente
	Carcinoma cribiforme	Infrecuente
	Carcinoma inflamatorio	Infrecuente

ANEXO III

Macro de ImageJ para el análisis por imagen de las IHQ de CD34

```
run("Canvas Size...", "width=1270 height=590 position=Center");
```

```
run("Colour Deconvolution", "vectors=[H DAB]");
```

```
close();
```

```
run("Make Binary");
```

```
run("Close-");
```

```
run("Fill Holes");
```

```
run("Analyze Particles...", "size=20-1000 circularity=0.00-1.00 show=Outlines display exclude  
summarize record in_situ");
```

Combinada con el *plugin: Colour deconvolution* [416].

<http://www.mecourse.com/landinig/software/cdeconv/cdeconv.html>

ANEXO IV

Características anatomopatológicas disponibles de la Serie de tejido fresco de adyuvancia del Hospital General Universitario Santa Lucía de Cartagena.

Variable	Número	%
N	100	100
Estadio clínico tumor primario		
T1-2	83	83
T3-4	14	14
No disponible	3	3
Estadio clínico ganglionar		
N0-1	63	63
N2-3	31	31
No disponible	6	6
Receptores hormonales		
Negativo	22	22
Positivo	77	77
No disponible	1	1
Sobreexpresión HER2		
Negativo	76	76
Positivo	23	23
No disponible	1	1
Triple negativo		
No	85	85
Sí	14	14
No disponible	1	1
Subtipos IHQ		
HR+	77	77
HR+ HER2 +	15	15
HER2/neu +	8	8
Triple Negativo	14	14
No disponible	1	1
Fenotipo de p53		
Mutado	22	22
Silvestre	74	74
No disponible	4	4

REFERENCIAS

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A: **Cancer statistics, 2014**. *CA: a cancer journal for clinicians* 2014, **64**(1):9-29.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: **Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012**. *International Journal of Cancer* 2015, **136**(5):E359-E386.
3. Visvader JE: **Cells of origin in cancer**. *Nature* 2011, **469**(7330):314-322.
4. Forterre P: **The universal tree of life: an update**. *Frontiers in Microbiology* 2015, **6**.
5. Spang A, Saw JH, Jørgensen SL, Zaremba-Niedzwiedzka K, Martijn J, Lind AE, van Eijk R, Schleper C, Guy L, Ettema TJ: **Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes**. *Nature* 2015, **521**(7551):173-179.
6. Kirk DL: **Volvox: a search for the molecular and genetic origins of multicellularity and cellular differentiation**, vol. 33: Cambridge University Press; 2005.
7. Carlson B: **Embriología humana y biología del desarrollo**. *Embriología Humana y Biología del Desarrollo-84-8174-785-8-76*, 83 2005.
8. Sherwood L: **Human physiology: from cells to systems**: Cengage Learning; 2015.
9. Berg J, Stryer L, Tymoczko J: **Bioquímica (7ma edición)**. Reverté. ISBN 8429176004 [http://books google com/books](http://books.google.com/books) 2005:1051.
10. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM: **Lehninger principles of biochemistry**: Macmillan; 2008.
11. Loeb LA, Harris CC: **AACR Centennial Series Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective**. 2013.
12. Griffiths AJ, Francisco J: **Genética moderna**; 2004.
13. Visscher DW, Nassar A, Degnim AC, Frost MH, Vierkant RA, Frank RD, Tarabishy Y, Radisky DC, Hartmann LC: **Sclerosing adenosis and risk of breast cancer**. *Breast Cancer Research and Treatment* 2014, **144**(1):205-212.
14. IJspeert JE, Vermeulen L, Meijer GA, Dekker E: **Serrated neoplasia - role in colorectal carcinogenesis and clinical implications**. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2015.
15. Agoston AT, Odze RD: **Evidence that gastric pit dysplasia-like atypia is a neoplastic precursor lesion**. *Human Pathology* 2014, **45**(3):446-455.
16. Harris AL: **Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth**. *Nature Reviews Cancer* 2002, **2**(1):38-47.
17. Fearon ER, Vogelstein B: **A genetic model for colorectal tumorigenesis**. *Cell* 1990, **61**(5):759-767.
18. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation**. *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
19. Tabassum DP, Polyak K: **Tumorigenesis: it takes a village**. *Nature Reviews Cancer* 2015, **15**(8):473-483.
20. Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, Alonso DF: **Telomere structure and telomerase in health and disease (review)**. *International Journal of Oncology* 2012, **41**(5):1561-1569.

21. Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J, Moore M: **Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer.** *Clinical Cancer Research* 1997, **3**(11):1931-1941.
22. Shay JW, Reddel RR, Wright WE: **Cancer and telomeres—an ALternative to telomerase.** *Science* 2012, **336**(6087):1388-1390.
23. Nandakumar J, Cech TR: **Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013, **14**(2):69-82.
24. Ruden M, Puri N: **Novel anticancer therapeutics targeting telomerase.** *Cancer Treatment Reviews* 2013, **39**(5):444-456.
25. Gacche RN, Meshram RJ: **Angiogenic factors as potential drug target: efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 2014, **1846**(1):161-179.
26. Folkman J, Klagsbrun M: **Angiogenic factors.** *Science* 1987, **235**(4787):442-447.
27. Semenza GL: **The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2015.
28. McAllister SS, Weinberg RA: **The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis.** *Nature Cell Biology* 2014, **16**(8):717-727.
29. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, Yu M, Pely A, Engstrom A, Zhu H: **Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis.** *Cell* 2014, **158**(5):1110-1122.
30. Chaffer CL, Weinberg RA: **A perspective on cancer cell metastasis.** *Science* 2011, **331**(6024):1559-1564.
31. Lorusso G, Rüegg C: **New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis.** *Seminars in Cancer Biology* 2012: 226-233.
32. Polyak K: **Breast cancer: origins and evolution.** *The Journal of Clinical Investigation* 2007, **117**(117 (11)):3155-3163.
33. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F: **Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012.** *European Journal of Cancer* 2013, **49**(6):1374-1403.
34. Sanchez MJ, Payer T, De Angelis R, Larranaga N, Capocaccia R, Martinez C: **Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012.** *Annals of Oncology* 2010, **21 Suppl 3**:iii30-36.
35. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E: **European cancer mortality predictions for the year 2013.** *Annals of Oncology* 2013, **24**(3):792-800.
36. Howlander N, Noone A, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse S, Kosary C, Ruhl J, Tatalovich Z: **SEER cancer statistics review, 1975–2008.** *Bethesda, MD: National Cancer Institute* 2011, **19**.
37. Chirlaque MD, Salmeron D, Ardanaz E, Galceran J, Martinez R, Marcos-Gragera R, Sanchez MJ, Mateos A, Torrella A, Capocaccia R *et al*: **Cancer survival in Spain: estimate for nine major cancers.** *Annals of Oncology* 2010, **21 Suppl 3**:iii21-29.
38. Perez EA: **Current management of metastatic breast cancer.** *Seminars in Oncology* 1999: 1-10.
39. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C: **TNM classification of malignant tumours:** *John Wiley & Sons* 2011.
40. Carter CL, Allen C, Henson DE: **Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases.** *Cancer* 1989, **63**(1):181-187.
41. Elston CW, Ellis IO, Pinder SE: **Pathological prognostic factors in breast cancer.** *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 1999, **31**(3):209-223.
42. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC, Jr.: **American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations**

- for the use of tumor markers in breast cancer.** *Journal of Clinical Oncology* 2007, **25**(33):5287-5312.
43. Dawson SJ, Rueda OM, Aparicio S, Caldas C: **A new genomeldriven integrated classification of breast cancer and its implications.** *The EMBO journal* 2013, **32**(5):617-628.
 44. Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong H-M, Bauerfeind I, Felber M: **Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer.** *Journal of the National Cancer Institute* 2003, **95**(2):142-153.
 45. Dawson S, Provenzano E, Caldas C: **Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications.** *European Journal of Cancer* 2009, **45**:27-40.
 46. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA: **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2000, **406**(6797):747-752.
 47. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen M, Van de Rijn M, Jeffrey S: **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(19):10869-10874.
 48. Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron J, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S: **Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(14):8418-8423.
 49. Van't Veer LJ, Dai H, Van De Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT: **Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.** *Nature* 2002, **415**(6871):530-536.
 50. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galvan P, Fernandez A, Gaba L, Diez M, Viladot M, Arance A, Munoz M: **Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer.** *Breast* 2015.
 51. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron J, He X, Qaqish BF, Livasy C, Carey LA, Reynolds E, Dressler L: **The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms.** *BMC Genomics* 2006, **7**(1):96.
 52. **Comprehensive molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2012, **490**(7418):61-70.
 53. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y *et al*: **The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups.** *Nature* 2012, **486**(7403):346-352.
 54. Ali HR, Rueda OM, Chin S-F, Curtis C, Dunning MJ, Aparicio S, Caldas C: **Genome-driven integrated classification of breast cancer validated in over 7,500 samples.** *Genome Biology* 2014, **15**(8):431.
 55. Nielsen TO, Parker JS, Leung S, Voduc D, Ebbert M, Vickery T, Davies SR, Snider J, Stijleman IJ, Reed J: **A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer.** *Clinical Cancer Research* 2010, **16**(21):5222-5232.
 56. Group EBCTC: **Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials.** *The Lancet* 2006, **366**(9503):2087-2106.
 57. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, Jeong J-H, Wolmark N: **Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer.** *The New England Journal of Medicine* 2002, **347**(16):1233-1241.

58. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrada S, Galimberti V, Intra M, Veronesi P, Robertson C, Maisonneuve P: **A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer.** *The New England Journal of Medicine* 2003, **349**(6):546-553.
59. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, Leitch AM, Saha S, McCall LM, Morrow M: **Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial.** *Journal of the American Medical Association* 2011, **305**(6):569-575.
60. Poole CJ, Earl HM, Hiller L, Dunn JA, Bathers S, Grieve RJ, Spooner DA, Agrawal RK, Fernando IN, Brunt AM: **Epirubicin and cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil as adjuvant therapy for early breast cancer.** *The New England Journal of Medicine* 2006, **355**(18):1851-1862.
61. Levine MN, Pritchard KI, Bramwell VH, Shepherd LE, Tu D, Paul N: **Randomized trial comparing cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer: update of National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Trial MA5.** *Journal of Clinical Oncology* 2005, **23**(22):5166-5170.
62. Martin M, Pienkowski T, Mackey J, Pawlicki M, Guastalla J-P, Weaver C, Tomiak E, Al-Tweigeri T, Chap L, Juhos E: **Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer.** *The New England Journal of Medicine* 2005, **352**(22):2302-2313.
63. Group EBCTC: **Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials.** *The Lancet* 2012, **379**(9814):432-444.
64. Sparano JA, Wang M, Martino S, Jones V, Perez EA, Saphner T, Wolff AC, Sledge Jr GW, Wood WC, Davidson NE: **Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer.** *The New England Journal of Medicine* 2008, **358**(16):1663-1671.
65. Budd GT, Barlow WE, Moore HC, Hobday TJ, Stewart JA, Isaacs C, Salim M, Cho JK, Rinn KJ, Albain KS: **SWOG S0221: a phase III trial comparing chemotherapy schedules in high-risk early-stage breast cancer.** *Journal of Clinical Oncology* 2014:JCO. 2014.2056. 3296.
66. Aebi S, Davidson T, Gruber G, Cardoso F, Group EGW: **Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.** *Annals of Oncology* 2011, **22**(suppl 6):vi12-vi24.
67. **Breast cancer Clinical Practice Guidelines in Oncology.** *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2003, **1**(2):148-188.
68. Burzykowski T, Buyse M, Piccart-Gebhart MJ, Sledge G, Carmichael J, Lück H-J, Mackey JR, Nabholz J-M, Paridaens R, Biganzoli L: **Evaluation of tumor response, disease control, progression-free survival, and time to progression as potential surrogate end points in metastatic breast cancer.** *Journal of Clinical Oncology* 2008, **26**(12):1987-1992.
69. Cardoso F, Harbeck N, Fallowfield L, Kyriakides S, Senkus E, Group EGW: **Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.** *Annals of Oncology* 2012, **23**(suppl 7):vii11-vii19.
70. Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C, Ferrari L, Moliterni A, Terenziani M, Zambetti M: **Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience at the Milan Cancer Institute.** *Journal of Clinical Oncology* 1998, **16**(1):93-100.
71. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF: **Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer.** *Journal of Clinical Oncology* 2002, **20**(17):3628-3636.
72. Chollet P, Charrier S, Brain E, Cure H, Van Praagh I, Feillel V, De Latour M, Dauplat J, Misset J-L, Ferrière J-P: **Clinical and pathological response to primary chemotherapy in operable breast cancer.** *European Journal of Cancer* 1997, **33**(6):862-866.

73. Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Hortobagyi G: **Inflammatory breast cancer: a review.** *Journal of Clinical Oncology* 1992, **10**(6):1014-1024.
74. Khan A, Sabel MS, Nees A, Diehl KM, Cimmino VM, Kleer CG, Schott AF, Hayes DF, Chang AE, Newman LA: **Comprehensive axillary evaluation in neoadjuvant chemotherapy patients with ultrasonography and sentinel lymph node biopsy.** *Annals of Surgical Oncology* 2005, **12**(9):697-704.
75. Bear HD, Anderson S, Brown A, Smith R, Mamounas EP, Fisher B, Margolese R, Theoret H, Soran A, Wickerham DL: **The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27.** *Journal of Clinical Oncology* 2003, **21**(22):4165-4174.
76. Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, Wickerham DL, Begovic M, DeCillis A, Robidoux A: **Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer.** *Journal of Clinical Oncology* 1998, **16**(8):2672-2685.
77. Valachis A, Mauri D, Polyzos NP, Chlouverakis G, Mavroudis D, Georgoulas V: **Trastuzumab combined to neoadjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis.** *The Breast* 2011, **20**(6):485-490.
78. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, Pusztai L, Green MC, Arun BK, Giordano SH: **Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer.** *Journal of Clinical Oncology* 2005, **23**(16):3676-3685.
79. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Manikhas A, Lluch A, Tjulandin S, Zambetti M, Vazquez F, Byakhov M, Lichinitser M: **Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort.** *The Lancet* 2010, **375**(9712):377-384.
80. Untch M, Rezai M, Loibl S, Fasching PA, Huober J, Tesch H, Bauerfeind I, Hilfrich J, Eidtmann H, Gerber B: **Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: results from the GeparQuattro study.** *Journal of Clinical Oncology* 2010, **28**(12):2024-2031.
81. Untch M, Loibl S, Bischoff J, Eidtmann H, Kaufmann M, Blohmer J-U, Hilfrich J, Strumberg D, Fasching PA, Kreienberg R: **Lapatinib versus trastuzumab in combination with neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy (GeparQuinto, GBG 44): a randomised phase 3 trial.** *The Lancet Oncology* 2012, **13**(2):135-144.
82. De Azambuja E, Holmes AP, Piccart-Gebhart M, Holmes E, Di Cosimo S, Swaby RF, Untch M, Jackisch C, Lang I, Smith I: **Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): survival outcomes of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial and their association with pathological complete response.** *The Lancet Oncology* 2014, **15**(10):1137-1146.
83. Gianni L, Pienkowski T, Im Y-H, Roman L, Tseng L-M, Liu M-C, Lluch A, Staroslawska E, de la Haba-Rodriguez J, Im S-A: **Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial.** *The Lancet Oncology* 2012, **13**(1):25-32.
84. Chang J, Powles T, Allred D, Ashley S, Clark G, Makris A, Assersohn L, Gregory R, Osborne C, Dowsett M: **Biologic markers as predictors of clinical outcome from**

- systemic therapy for primary operable breast cancer.** *Journal of Clinical Oncology* 1999, **17**(10):3058-3063.
85. Ellis P, Smith I, Ashley S, Walsh G, Ebbs S, Baum M, Sacks N, McKinna J: **Clinical prognostic and predictive factors for primary chemotherapy in operable breast cancer.** *Journal of Clinical Oncology* 1998, **16**(1):107-114.
 86. Rouzier R, Mathieu MC, Sideris L, Youmsi E, Rajan R, Garbay JR, André F, Marsiglia H, Spielmann M, Delalogue S: **Breast-conserving surgery after neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy for large breast tumors.** *Cancer* 2004, **101**(5):918-925.
 87. Cristofanilli M, Gonzalez-Angulo A, Sneige N, Kau S-W, Broglio K, Theriault RL, Valero V, Buzdar AU, Kuerer H, Buccholz TA: **Invasive lobular carcinoma classic type: response to primary chemotherapy and survival outcomes.** *Journal of Clinical Oncology* 2005, **23**(1):41-48.
 88. Mathieu M-C, Rouzier R, Llombart-Cussac A, Sideris L, Koscielny S, Travagli J, Contesso G, Delalogue S, Spielmann M: **The poor responsiveness of infiltrating lobular breast carcinomas to neoadjuvant chemotherapy can be explained by their biological profile.** *European Journal of Cancer* 2004, **40**(3):342-351.
 89. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK, Dhingra K, Theriault RL, Singh G, Binkley SM, Sneige N *et al*: **Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy.** *Journal of Clinical Oncology* 1999, **17**(2):460-469.
 90. Scholl SM, Pierga JY, Asselain B, Beuzeboc P, Dorval T, Garcia-Giralt E, Jouve M, Palangie T, Remvikos Y, Durand JC *et al*: **Breast tumour response to primary chemotherapy predicts local and distant control as well as survival.** *European Journal of Cancer* 1995, **31A**(12):1969-1975.
 91. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, Margolese RG, Hoehn JL, Vogel VG, Dakhil SR *et al*: **Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27.** *Journal of Clinical Oncology* 2008, **26**(5):778-785.
 92. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, Gerber B, Eiermann W, Hilfrich J, Huober J *et al*: **Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes.** *Journal of Clinical Oncology* 2012, **30**(15):1796-1804.
 93. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, Assad L, Poniecka A, Hennessy B, Green M *et al*: **Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy.** *Journal of Clinical Oncology* 2007, **25**(28):4414-4422.
 94. Buzdar AU, Singletary SE, Booser DJ, Frye DK, Wasaff B, Hortobagyi GN: **Combined modality treatment of stage III and inflammatory breast cancer. M.D. Anderson Cancer Center experience.** *Surgical Oncology Clinics of North America* 1995, **4**(4):715-734.
 95. Jeruss JS, Mittendorf EA, Tucker SL, Gonzalez-Angulo AM, Buchholz TA, Sahin AA, Cormier JN, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Hunt KK: **Combined use of clinical and pathologic staging variables to define outcomes for breast cancer patients treated with neoadjuvant therapy.** *Journal of Clinical Oncology* 2008, **26**(2):246-252.
 96. Mittendorf EA, Jeruss JS, Tucker SL, Kolli A, Newman LA, Gonzalez-Angulo AM, Buchholz TA, Sahin AA, Cormier JN, Buzdar AU *et al*: **Validation of a novel staging system for disease-specific survival in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy.** *Journal of Clinical Oncology* 2011, **29**(15):1956-1962.
 97. Rouzier R, Pusztai L, Delalogue S, Gonzalez-Angulo AM, Andre F, Hess KR, Buzdar AU, Garbay JR, Spielmann M, Mathieu MC *et al*: **Nomograms to predict pathologic**

- complete response and metastasis-free survival after preoperative chemotherapy for breast cancer.** *Journal of Clinical Oncology* 2005, **23**(33):8331-8339.
98. Esserman LJ, Berry DA, Cheang MC, Yau C, Perou CM, Carey L, DeMichele A, Gray JW, Conway-Dorsey K, Lenburg ME *et al*: **Chemotherapy response and recurrence-free survival in neoadjuvant breast cancer depends on biomarker profiles: results from the I-SPY 1 TRIAL (CALGB 150007/150012; ACRIN 6657).** *Breast Cancer Research and Treatment* 2012, **132**(3):1049-1062.
 99. Goldstein NS, Decker D, Severson D, Schell S, Vicini F, Margolis J, Dekhne NS: **Molecular classification system identifies invasive breast carcinoma patients who are most likely and those who are least likely to achieve a complete pathologic response after neoadjuvant chemotherapy.** *Cancer* 2007, **110**(8):1687-1696.
 100. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, Hess KR, Stec J, Ayers M, Wagner P *et al*: **Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy.** *Clinical Cancer Research* 2005, **11**(16):5678-5685.
 101. Kaufmann M, von Minckwitz G, Mamounas EP, Cameron D, Carey LA, Cristofanilli M, Denkert C, Eiermann W, Gnant M, Harris JR *et al*: **Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer.** *Annals of Surgical Oncology* 2012, **19**(5):1508-1516.
 102. Folkman J, Kalluri R: **Cancer without disease.** *Nature* 2004, **427**(6977):787-787.
 103. Harris AL: **Antiangiogenesis for cancer therapy.** *The Lancet* 1997, **349**, Supplement 2:S13-S15.
 104. Carmeliet P, Jain RK: **Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis.** *Nature* 2011, **473**(7347):298-307.
 105. Swift MR, Weinstein BM: **Arterial-venous specification during development.** *Circulation Research* 2009, **104**(5):576-588.
 106. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, Fligelman B, Leversha M, Brennan C, Tabar V: **Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium.** *Nature* 2010, **468**(7325):829-833.
 107. Ferrara N: **VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth.** *European Cytokine Network* 2009, **20**(4):158-163.
 108. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF: **VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis.** *Annual Review of Pathology* 2007, **2**:251-275.
 109. Neufeld G, Kessler O: **The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis.** *Nature Reviews Cancer* 2008, **8**(8):632-645.
 110. Carmeliet P: **Angiogenesis in health and disease.** *Nature Medicine* 2003, **9**(6):653-660.
 111. Stockmann C, Doedens A, Weidemann A, Zhang N, Takeda N, Greenberg JI, Cheresch DA, Johnson RS: **Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis.** *Nature* 2008, **456**(7223):814-818.
 112. Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, Ferrara N, Nagy A, Roos KP, Iruela-Arispe ML: **Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis.** *Cell* 2007, **130**(4):691-703.
 113. Jain RK, Duda DG, Willett CG, Sahani DV, Zhu AX, Loeffler JS, Batchelor TT, Sorensen AG: **Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy.** *Nature Reviews Clinical Oncology* 2009, **6**(6):327-338.
 114. Buysschaert I, Schmidt T, Roncal C, Carmeliet P, Lambrechts D: **Genetics, epigenetics and pharmaco-(epi)genomics in angiogenesis.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2008, **12**(6B):2533-2551.
 115. Tvorogov D, Anisimov A, Zheng W, Leppanen VM, Tammela T, Laurinavicius S, Holnthoner W, Helotera H, Holopainen T, Jeltsch M *et al*: **Effective suppression of vascular network formation by combination of antibodies blocking VEGFR ligand binding and receptor dimerization.** *Cancer Cell* 2010, **18**(6):630-640.

116. Tammela T, Alitalo K: **Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise.** *Cell* 2010, **140**(4):460-476.
117. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P: **FLT1 and its ligands VEGFB and PIGF: drug targets for anti-angiogenic therapy?** *Nature Reviews Cancer* 2008, **8**(12):942-956.
118. Carmeliet P, Moons L, Lutun A, Vincenti V, Compennolle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H *et al*: **Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions.** *Nature Medicine* 2001, **7**(5):575-583.
119. Bry M, Kivela R, Holopainen T, Anisimov A, Tammela T, Soronen J, Silvola J, Saraste A, Jeltsch M, Korpisalo P *et al*: **Vascular endothelial growth factor-B acts as a coronary growth factor in transgenic rats without inducing angiogenesis, vascular leak, or inflammation.** *Circulation* 2010, **122**(17):1725-1733.
120. Schwartz JD, Rowinsky EK, Youssoufian H, Pytowski B, Wu Y: **Vascular endothelial growth factor receptor-1 in human cancer: concise review and rationale for development of IMC-18F1 (Human antibody targeting vascular endothelial growth factor receptor-1).** *Cancer* 2010, **116**(4 Suppl):1027-1032.
121. Lichtenberger BM, Tan PK, Niederleithner H, Ferrara N, Petzelbauer P, Sibilica M: **Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development.** *Cell* 2010, **140**(2):268-279.
122. Jain RK: **Molecular regulation of vessel maturation.** *Nature Medicine* 2003, **9**(6):685-693.
123. Hellberg C, Ostman A, Heldin CH: **PDGF and vessel maturation.** *Recent Results in Cancer Research* 2010, **180**:103-114.
124. Gaengel K, Genove G, Armulik A, Betsholtz C: **Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis.** *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2009, **29**(5):630-638.
125. Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C: **Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice.** *Science* 1997, **277**(5323):242-245.
126. Song S, Ewald AJ, Stallcup W, Werb Z, Bergers G: **PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival.** *Nature Cell Biology* 2005, **7**(9):870-879.
127. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D: **Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors.** *The Journal of Clinical Investigation* 2003, **111**(9):1287-1295.
128. McCarty MF, Somcio RJ, Stoeltzing O, Wey J, Fan F, Liu W, Bucana C, Ellis LM: **Overexpression of PDGF-BB decreases colorectal and pancreatic cancer growth by increasing tumor pericyte content.** *The Journal of Clinical Investigation* 2007, **117**(8):2114-2122.
129. Sennino B, Kuhnert F, Tabruyn SP, Mancuso MR, Hu-Lowe DD, Kuo CJ, McDonald DM: **Cellular source and amount of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in tumors determine response to angiogenesis inhibitors.** *Cancer Research* 2009, **69**(10):4527-4536.
130. Crawford Y, Kasman I, Yu L, Zhong C, Wu X, Modrusan Z, Kaminker J, Ferrara N: **PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment.** *Cancer Cell* 2009, **15**(1):21-34.
131. di Tomaso E, London N, Fuja D, Logie J, Tyrrell JA, Kamoun W, Munn LL, Jain RK: **PDGF-C induces maturation of blood vessels in a model of glioblastoma and attenuates the response to anti-VEGF treatment.** *PLoS ONE* 2009, **4**(4):e5123.
132. Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P: **Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease.** *Trends in Cell Biology* 2010, **20**(9):556-567.

133. Kamaid A, Molina-Villa T, Mendoza V, Pujades C, Maldonado E, Ispizua Belmonte JC, Lopez-Casillas F: **Betaglycan knock-down causes embryonic angiogenesis defects in zebrafish.** *Genesis* 2015.
134. Gatza CE, Oh SY, Blobel GC: **Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer.** *Cellular Signalling* 2010, **22**(8):1163-1174.
135. Dong M, How T, Kirkbride KC, Gordon KJ, Lee JD, Hempel N, Kelly P, Moeller BJ, Marks JR, Blobel GC: **The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression.** *The Journal of Clinical Investigation* 2007, **117**(1):206-217.
136. Isenberg JS, Frazier WA, Roberts DD: **Thrombospondin-1: a physiological regulator of nitric oxide signaling.** *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 2008, **65**(5):728-742.
137. Isenberg JS, Martin-Manso G, Maxhimer JB, Roberts DD: **Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies.** *Nature Reviews Cancer* 2009, **9**(3):182-194.
138. Zhang X, Kazerounian S, Duquette M, Perruzzi C, Nagy JA, Dvorak HF, Parangi S, Lawler J: **Thrombospondin-1 modulates vascular endothelial growth factor activity at the receptor level.** *FASEB Journal* 2009, **23**(10):3368-3376.
139. Lawler PR, Lawler J: **Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2012, **2**(5):a006627.
140. Qian X, Tuszynski GP: **Expression of thrombospondin-1 in cancer: a role in tumor progression.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1996, **212**(3):199-207.
141. Bertin N, Clezardin P, Kubiak R, Frappart L: **Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in normal, benign, and neoplastic human breast tissues: correlation with prognostic factors, tumor angiogenesis, and fibroblastic desmoplasia.** *Cancer Research* 1997, **57**(3):396-399.
142. Li SS, Liu Z, Uzunel M, Sundqvist KG: **Endogenous thrombospondin-1 is a cell-surface ligand for regulation of integrin-dependent T-lymphocyte adhesion.** *Blood* 2006, **108**(9):3112-3120.
143. Sick E, Boukhari A, Deramaudt T, Ronde P, Bucher B, Andre P, Gies JP, Takeda K: **Activation of CD47 receptors causes proliferation of human astrocytoma but not normal astrocytes via an Akt-dependent pathway.** *Glia* 2011, **59**(2):308-319.
144. Rath GM, Schneider C, Dedieu S, Rothhut B, Soula-Rothhut M, Ghoneim C, Sid B, Morjani H, El Btaouri H, Martiny L: **The C-terminal CD47/IAP-binding domain of thrombospondin-1 prevents camptothecin- and doxorubicin-induced apoptosis in human thyroid carcinoma cells.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2006, **1763**(10):1125-1134.
145. Rath GM, Schneider C, Dedieu S, Sartelet H, Morjani H, Martiny L, El Btaouri H: **Thrombospondin-1 C-terminal-derived peptide protects thyroid cells from ceramide-induced apoptosis through the adenylyl cyclase pathway.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2006, **38**(12):2219-2228.
146. Saumet A, Slimane MB, Lanotte M, Lawler J, Dubernard V: **Type 3 repeat/C-terminal domain of thrombospondin-1 triggers caspase-independent cell death through CD47/alphavbeta3 in promyelocytic leukemia NB4 cells.** *Blood* 2005, **106**(2):658-667.
147. Jayachandran A, Anaka M, Prithviraj P, Hudson C, McKeown SJ, Lo PH, Vella LJ, Goding CR, Cebon J, Behren A: **Thrombospondin 1 promotes an aggressive phenotype through epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma.** *Oncotarget* 2014, **5**(14):5782-5797.
148. Borsotti P, Ghilardi C, Ostano P, Silini A, Dossi R, Pinessi D, Foglieni C, Scatolini M, Lacial PM, Ferrari R *et al*: **Thrombospondin-1 is part of a Slug-independent motility and metastatic program in cutaneous melanoma, in association with VEGFR-1 and FGF-2.** *Pigment Cell & Melanoma Research* 2015, **28**(1):73-81.

149. Grimbert P, Bouguermouh S, Baba N, Nakajima T, Allakhverdi Z, Braun D, Saito H, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M: **Thrombospondin/CD47 interaction: a pathway to generate regulatory T cells from human CD4+ CD25- T cells in response to inflammation.** *The Journal of Immunology* 2006, **177**(6):3534-3541.
150. Bi J, Bai Z, Ma X, Song J, Guo Y, Zhao J, Yi X, Han S, Zhang Z: **Txr1: an important factor in oxaliplatin resistance in gastric cancer.** *Medical Oncology* 2014, **31**(2):807.
151. Lih CJ, Wei W, Cohen SN: **Txr1: a transcriptional regulator of thrombospondin-1 that modulates cellular sensitivity to taxanes.** *Genes & Development* 2006, **20**(15):2082-2095.
152. Manna PP, Frazier WA: **CD47 mediates killing of breast tumor cells via Gi-dependent inhibition of protein kinase A.** *Cancer Research* 2004, **64**(3):1026-1036.
153. Ioachim E, Damala K, Tsanou E, Briasoulis E, Papadiotis E, Mitselou A, Charhanti A, Doukas M, Lampri L, Arvanitis DL: **Thrombospondin-1 expression in breast cancer: prognostic significance and association with p53 alterations, tumour angiogenesis and extracellular matrix components.** *Histology and Histopathology* 2012, **27**(2):209-216.
154. Zhu X, Zhong J, Zhao Z, Sheng J, Wang J, Liu J, Cui K, Chang J, Zhao H, Wong S: **Epithelial derived CTGF promotes breast tumor progression via inducing EMT and collagen I fibers deposition.** *Oncotarget* 2015, **6**(28):25320-25338.
155. Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, Daluiski A, Lyons KM: **Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development.** *Development* 2003, **130**(12):2779-2791.
156. Hall-Glenn F, De Young RA, Huang BL, van Handel B, Hofmann JJ, Chen TT, Choi A, Ong JR, Benya PD, Mikkola H *et al*: **CCN2/connective tissue growth factor is essential for pericyte adhesion and endothelial basement membrane formation during angiogenesis.** *PLoS ONE* 2012, **7**(2):e30562.
157. Brigstock DR: **Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61).** *Angiogenesis* 2002, **5**(3):153-165.
158. Inoki I, Shiomi T, Hashimoto G, Enomoto H, Nakamura H, Makino K, Ikeda E, Takata S, Kobayashi K, Okada Y: **Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis.** *FASEB Journal* 2002, **16**(2):219-221.
159. Folkman J, Haudenschild C: **Angiogenesis in vitro.** *Nature* 1980, **288**(5791):551-556.
160. Vailhe B, Vittet D, Feige JJ: **In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis.** *Laboratory investigation* 2001, **81**(4):439-452.
161. Staton CA, Reed MW, Brown NJ: **A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays.** *International Journal of Experimental Pathology* 2009, **90**(3):195-221.
162. Vogel HB, Berry RG: **Chorioallantoic membrane heterotransplantation of human brain tumors.** *International Journal of Cancer* 1975, **15**(3):401-408.
163. Auerbach R, Arensman R, Kubai L, Folkman J: **Tumor-induced angiogenesis: lack of inhibition by irradiation.** *International Journal of Cancer* 1975, **15**(2):241-245.
164. Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J: **Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Role of host and preexisting graft blood vessels.** *The American Journal of Pathology* 1975, **79**(3):597-618.
165. Zijlstra A, Seandel M, Kupriyanova TA, Partridge JJ, Madsen MA, Hahn-Dantona EA, Quigley JP, Deryugina EI: **Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells.** *Blood* 2006, **107**(1):317-327.
166. Rubinstein AL: **Zebrafish: from disease modeling to drug discovery.** *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 2003, **6**(2):218-223.

167. Isogai S, Horiguchi M, Weinstein BM: **The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development.** *Developmental Biology* 2001, **230**(2):278-301.
168. Currie PD, Ingham PW: **Induction of a specific muscle cell type by a hedgehog-like protein in zebrafish.** *Nature* 1996, **382**(6590):452-455.
169. Lawson ND, Weinstein BM: **Arteries and veins: making a difference with zebrafish.** *Nature Reviews Genetics* 2002, **3**(9):674-682.
170. Motoike T, Loughna S, Perens E, Roman BL, Liao W, Chau TC, Richardson CD, Kawate T, Kuno J, Weinstein BM *et al*: **Universal GFP reporter for the study of vascular development.** *Genesis* 2000, **28**(2):75-81.
171. Cross LM, Cook MA, Lin S, Chen JN, Rubinstein AL: **Rapid analysis of angiogenesis drugs in a live fluorescent zebrafish assay.** *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2003, **23**(5):911-912.
172. Haldi M, Ton C, Seng WL, McGrath P: **Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish.** *Angiogenesis* 2006, **9**(3):139-151.
173. Stoletov K, Montel V, Lester RD, Gonias SL, Klemke R: **High-resolution imaging of the dynamic tumor cell vascular interface in transparent zebrafish.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(44):17406-17411.
174. Kragh M, Hjarnaa PJ, Bramm E, Kristjansen PE, Rygaard J, Binderup L: **In vivo chamber angiogenesis assay: an optimized Matrigel plug assay for fast assessment of anti-angiogenic activity.** *International Journal of Oncology* 2003, **22**(2):305-311.
175. Ley CD, Olsen MW, Lund EL, Kristjansen PE: **Angiogenic synergy of bFGF and VEGF is antagonized by Angiopoietin-2 in a modified in vivo Matrigel assay.** *Microvascular Research* 2004, **68**(3):161-168.
176. Baker JH, Huxham LA, Kyle AH, Lam KK, Minchinton AI: **Vascular-specific quantification in an in vivo Matrigel chamber angiogenesis assay.** *Microvascular Research* 2006, **71**(2):69-75.
177. Gimbrone MA, Jr., Cotran RS, Leapman SB, Folkman J: **Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea.** *Journal of the National Cancer Institute* 1974, **52**(2):413-427.
178. Muthukkaruppan V, Auerbach R: **Angiogenesis in the mouse cornea.** *Science* 1979, **205**(4413):1416-1418.
179. Shan S, Lockhart AC, Saito WY, Knapp AM, Laderoute KR, Dewhirst MW: **The novel tubulin-binding drug BTO-956 inhibits R3230AC mammary carcinoma growth and angiogenesis in Fischer 344 rats.** *Clinical Cancer Research* 2001, **7**(8):2590-2596.
180. Sarayba MA, Li L, Tungsiripat T, Liu NH, Sweet PM, Patel AJ, Osann KE, Chittiboyina A, Benson SC, Pershadsingh HA *et al*: **Inhibition of corneal neovascularization by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand.** *Experimental Eye Research* 2005, **80**(3):435-442.
181. Oikawa T, Sasaki M, Inose M, Shimamura M, Kuboki H, Hirano S, Kumagai H, Ishizuka M, Takeuchi T: **Effects of cytogenin, a novel microbial product, on embryonic and tumor cell-induced angiogenic responses in vivo.** *Anticancer Research* 1997, **17**(3C):1881-1886.
182. Funahashi Y, Wakabayashi T, Semba T, Sonoda J, Kitoh K, Yoshimatsu K: **Establishment of a quantitative mouse dorsal air sac model and its application to evaluate a new angiogenesis inhibitor.** *Oncology Research* 1999, **11**(7):319-329.
183. Hamada Y, Yuki K, Okazaki M, Fujitani W, Matsumoto T, Hashida MK, Harutsugu K, Nokihara K, Daito M, Matsuura N *et al*: **Osteopontin-derived peptide SVVYGLR induces angiogenesis in vivo.** *Dental Materials Journal* 2004, **23**(4):650-655.

184. Vajkoczy P, Menger MD, Vollmar B, Schilling L, Schmiedek P, Hirth KP, Ullrich A, Fong TA: **Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor SU5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy.** *Neoplasia* 1999, **1**(1):31-41.
185. Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA: **A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold.** *Microvascular Research* 1979, **18**(3):311-318.
186. Endrich B, Asaishi K, Gotz A, Messmer K: **Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters.** *Research in Experimental Medicine* 1980, **177**(2):125-134.
187. Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K: **Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice.** *The American Journal of Pathology* 1993, **143**(4):1055-1062.
188. Stribbling SM, Friedlos F, Martin J, Davies L, Spooner RA, Marais R, Springer CJ: **Regressions of established breast carcinoma xenografts by carboxypeptidase G2 suicide gene therapy and the prodrug CMDA are due to a bystander effect.** *Human Gene Therapy* 2000, **11**(2):285-292.
189. Brown NJ, Staton CA, Rodgers GR, Corke KP, Underwood JC, Lewis CE: **Fibrinogen E fragment selectively disrupts the vasculature and inhibits the growth of tumours in a syngeneic murine model.** *British Journal of Cancer* 2002, **86**(11):1813-1816.
190. Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE: **Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo.** *International Journal of Experimental Pathology* 2004, **85**(5):233-248.
191. Cross NA, Fowles A, Reeves K, Jokonya N, Linton K, Holen I, Hamdy FC, Eaton CL: **Imaging the effects of castration on bone turnover and hormone-independent prostate cancer colonization of bone.** *The Prostate* 2008, **68**(15):1707-1714.
192. Hoffman RM: **Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic.** *Investigational New Drugs* 1999, **17**(4):343-359.
193. Yang M, Reynoso J, Jiang P, Li L, Moossa AR, Hoffman RM: **Transgenic nude mouse with ubiquitous green fluorescent protein expression as a host for human tumors.** *Cancer Research* 2004, **64**(23):8651-8656.
194. Amoh Y, Li L, Yang M, Moossa AR, Katsuoaka K, Penman S, Hoffman RM: **Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(36):13291-13295.
195. Hillen F, Kaijzel EL, Castermans K, oude Egbrink MG, Lowik CW, Griffioen AW: **A transgenic Tie2-GFP athymic mouse model; a tool for vascular biology in xenograft tumors.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008, **368**(2):364-367.
196. Rak JW, St Croix BD, Kerbel RS: **Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy.** *Anti-cancer Drugs* 1995, **6**(1):3-18.
197. Folkman J: **Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.** *Nature Medicine* 1995, **1**(1):27-31.
198. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J: **Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression.** *Nature Medicine* 1995, **1**(2):149-153.
199. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J: **Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma.** *Cell* 1994, **79**(2):315-328.
200. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G: **Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma.** *Journal of the National Cancer Institute* 1992, **84**(24):1875-1887.

201. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Theodossiou D, Barbatis K, O'Byrne K, Harris AL, Gatter KC: **Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer.** *Clinical Cancer Research* 1997, **3**(12 Pt 1):2485-2492.
202. Dhakal HP, Bassarova A, Naume B, Synnestvedt M, Borgen E, Kaaresen R, Schlichting E, Wiedswang G, Giercksky KE, Nesland JM: **Breast carcinoma vascularity: a comparison of manual microvessel count and Chalkley count.** *Histology and Histopathology* 2009, **24**(8):1049-1059.
203. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret G-Y: **Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer a systematic review of the literature and meta-analysis.** *Cancer Research* 2004, **64**(9):2941-2955.
204. Hansen S, Grabau DA, Sorensen FB, Bak M, Vach W, Rose C: **The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients.** *Clinical Cancer Research* 2000, **6**(1):139-146.
205. Straume O, Chappuis PO, Salvesen HB, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Goffin JR, Begin LR, Foulkes WD, Akslen LA: **Prognostic importance of glomeruloid microvascular proliferation indicates an aggressive angiogenic phenotype in human cancers.** *Cancer Research* 2002, **62**(23):6808-6811.
206. Akslen L, Straume O, Geisler S, Sørli T, Chi J, Aas T, Børresen-Dale A, Lønning P: **Glomeruloid microvascular proliferation is associated with lack of response to chemotherapy in breast cancer.** *British Journal of Cancer* 2011, **105**(1):9-12.
207. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: **Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma.** *The New England Journal of Medicine* 1991, **324**(1):1-8.
208. Luengo-Gil G, González-Billalabeitia E, Chaves-Benito A, Martínez EG, Garre EG, Vicente V, de la Peña FA: **Effects of conventional neoadjuvant chemotherapy for breast cancer on tumor angiogenesis.** *Breast Cancer Research and Treatment* 2015:1-11.
209. Mikalsen LT, Dhakal HP, Bruland OS, Naume B, Borgen E, Nesland JM, Olsen DR: **The clinical impact of mean vessel size and solidity in breast carcinoma patients.** *PLoS ONE* 2013, **8**(10):e75954.
210. Zhang Y, Kapur P, Yuan Q, Xi Y, Carvo I, Signoretti S, Dimitrov I, Cadeddu JA, Margulis V, Muradyan N *et al*: **Tumor Vascularity in Renal Masses: Correlation of Arterial Spin-Labeled and Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging Assessments.** *Clinical Genitourinary Cancer* 2015.
211. Rosen MA, Schnall MD: **Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging for assessing tumor vascularity and vascular effects of targeted therapies in renal cell carcinoma.** *Clinical Cancer Research* 2007, **13**(2 Pt 2):770s-776s.
212. Chen J, Qian T, Zhang H, Wei C, Meng F, Yin H: **Combining dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging and microvessel density to assess the angiogenesis after PEI in a rabbit VX2 liver tumor model.** *Magnetic Resonance Imaging* 2015.
213. Sa-Nguanraksa D, Chuangsuwanich T, Pongpruttipan T, P OC: **High vascular endothelial growth factor gene expression predicts poor outcome in patients with non-luminal A breast cancer.** *Molecular and Clinical Oncology* 2015, **3**(5):1103-1108.
214. Linardou H, Kalogeras KT, Kronenwett R, Alexopoulou Z, Wirtz RM, Zagouri F, Scopa CD, Gogas H, Petraki K, Christodoulou C *et al*: **Prognostic Significance of VEGFC and VEGFR1 mRNA Expression According to HER2 Status in Breast Cancer: A Study of Primary Tumors from Patients with High-risk Early Breast Cancer Participating in a Randomized Hellenic Cooperative Oncology Group Trial.** *Anticancer Research* 2015, **35**(7):4023-4036.

215. Gomez-Esquer F, Agudo D, Martinez-Arribas F, Nunez-Villar MJ, Schneider J: **mRNA expression of the angiogenesis markers VEGF and CD105 (endoglin) in human breast cancer.** *Anticancer Research* 2004, **24**(3a):1581-1585.
216. Van der Auwera I, Van Laere SJ, Van den Eynden GG, Benoy I, van Dam P, Colpaert CG, Fox SB, Turley H, Harris AL, Van Marck EA *et al*: **Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene expression quantification.** *Clinical Cancer Research* 2004, **10**(23):7965-7971.
217. Secord AA, Nixon AB, Hurwitz HI: **The search for biomarkers to direct antiangiogenic treatment in epithelial ovarian cancer.** *Gynecologic Oncology* 2014, **135**(2):349-358.
218. Schneider BP, Gray RJ, Radovich M, Shen F, Vance G, Li L, Jiang G, Miller KD, Gralow JR, Dickler MN *et al*: **Prognostic and predictive value of tumor vascular endothelial growth factor gene amplification in metastatic breast cancer treated with paclitaxel with and without bevacizumab; results from ECOG 2100 trial.** *Clinical Cancer Research* 2013, **19**(5):1281-1289.
219. Chi Y, Huang S, Peng H, Liu M, Zhao J, Shao Z, Wu J: **Critical role of CDK11(p58) in human breast cancer growth and angiogenesis.** *BMC Cancer* 2015, **15**:701.
220. Mele T, Generali D, Fox S, Brizzi MP, Bersiga A, Milani M, Allevi G, Bonardi S, Aguggini S, Volante M *et al*: **Anti-angiogenic effect of tamoxifen combined with epirubicin in breast cancer patients.** *Breast Cancer Research and Treatment* 2010, **123**(3):795-804.
221. Grant DS, Williams TL, Zahaczewsky M, Dicker AP: **Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere).** *International Journal of Cancer* 2003, **104**(1):121-129.
222. Tonini G, Schiavon G, Silletta M, Vincenzi B, Santini D: **Antiangiogenic properties of metronomic chemotherapy in breast cancer.** *Future Oncology* 2007, **3**(2):183-190.
223. Tas F, Duranyildiz D, Soydinc HO, Cicin I, Selam M, Uygun K, Disci R, Yasasever V, Topuz E: **Effect of maximum-tolerated doses and low-dose metronomic chemotherapy on serum vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 levels in patients with advanced nonsmall cell lung cancer.** *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2008, **61**(5):721-725.
224. Makris A, Powles TJ, Kakolyris S, Dowsett M, Ashley SE, Harris AL: **Reduction in angiogenesis after neoadjuvant chemoendocrine therapy in patients with operable breast carcinoma.** *Cancer* 1999, **85**(9):1996-2000.
225. Baena-Canada JM, Palomo Gonzalez MJ, Arriola Arellano E, Anon Requena MJ, Benitez Rodriguez E: **Evolution of angiogenesis following anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.** *Medicina Clínica* 2008, **130**(19):721-725.
226. Honkoop AH, van Diest PJ, de Jong JS, Linn SC, Giaccone G, Hoekman K, Wagstaff J, Pinedo HM: **Prognostic role of clinical, pathological and biological characteristics in patients with locally advanced breast cancer.** *British Journal of Cancer* 1998, **77**(4):621-626.
227. Honkoop AH, Pinedo HM, De Jong JS, Verheul HM, Linn SC, Hoekman K, Wagstaff J, van Diest PJ: **Effects of chemotherapy on pathologic and biologic characteristics of locally advanced breast cancer.** *American Journal of Clinical Pathology* 1997, **107**(2):211-218.
228. Wedam SB, Low JA, Yang SX, Chow CK, Choyke P, Danforth D, Hewitt SM, Berman A, Steinberg SM, Liewehr DJ *et al*: **Antiangiogenic and antitumor effects of bevacizumab in patients with inflammatory and locally advanced breast cancer.** *Journal of Clinical Oncology* 2006, **24**(5):769-777.
229. Yang SX, Steinberg SM, Nguyen D, Wu TD, Modrusan Z, Swain SM: **Gene expression profile and angiogenic marker correlates with response to neoadjuvant bevacizumab followed by bevacizumab plus chemotherapy in breast cancer.** *Clinical Cancer Research* 2008, **14**(18):5893-5899.

230. Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Allevi G, Bolsi G, Aguggini S, Brunelli A, Betri E, Generali D *et al*: **Changes in microvessel density as assessed by CD34 antibodies after primary chemotherapy in human breast cancer.** *Clinical Cancer Research* 2002, **8**(6):1816-1821.
231. Beresford MJ, Harris AL, Ah-See M, Daley F, Padhani AR, Makris A: **The relationship of the neo-angiogenic marker, endoglin, with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.** *British Journal of Cancer* 2006, **95**(12):1683-1688.
232. Miller KD, Soule SE, Calley C, Emerson RE, Hutchins GD, Kopecky K, Badve S, Storniolo A, Goulet R, Sledge GW, Jr.: **Randomized phase II trial of the anti-angiogenic potential of doxorubicin and docetaxel; primary chemotherapy as Biomarker Discovery Laboratory.** *Breast Cancer Research and Treatment* 2005, **89**(2):187-197.
233. Bergers G, Hanahan D: **Modes of resistance to anti-angiogenic therapy.** *Nature Reviews Cancer* 2008, **8**(8):592-603.
234. Zangari M, Fink LM, Elice F, Zhan F, Adcock DM, Tricot GJ: **Thrombotic events in patients with cancer receiving antiangiogenesis agents.** *Journal of Clinical Oncology* 2009, **27**(29):4865-4873.
235. Bluff J, Menakuru S, Cross S, Higham S, Balasubramanian S, Brown N, Reed M, Staton C: **Angiogenesis is associated with the onset of hyperplasia in human ductal breast disease.** *British Journal of Cancer* 2009, **101**(4):666-672.
236. Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passequé E, Song H, VandenBerg S, Johnson RS, Werb Z: **HIF1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion.** *Cancer Cell* 2008, **13**(3):206-220.
237. Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O: **Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis.** *Cancer Cell* 2009, **15**(3):220-231.
238. Eikesdal HP, Kalluri R: **Drug resistance associated with antiangiogenesis therapy.** *Seminars in Cancer Biology* 2009: 310-317.
239. Nagy JA, Chang SH, Dvorak AM, Dvorak HF: **Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know?** *British Journal of Cancer* 2009, **100**(6):865-869.
240. Iorio MV, Croce CM: **MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact.** *Journal of Clinical Oncology* 2009, **27**(34):5848-5856.
241. Ha M, Kim VN: **Regulation of microRNA biogenesis.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014, **15**(8):509-524.
242. Lin S, Gregory RI: **MicroRNA biogenesis pathways in cancer.** *Nature Reviews Cancer* 2015, **15**(6):321-333.
243. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: **The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.** *Cell* 1993, **75**(5):843-854.
244. Lee R, Feinbaum R, Ambros V: **A short history of a short RNA.** *Cell* 2004, **116**:S89-S92.
245. Ghildiyal M, Zamore PD: **Small silencing RNAs: an expanding universe.** *Nature Reviews Genetics* 2009, **10**(2):94-108.
246. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN: **MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization.** *The EMBO journal* 2002, **21**(17):4663-4670.
247. Kozomara A, Griffiths-Jones S: **miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data.** *Nucleic Acids Research* 2013:gkt1181.
248. Kozomara A, Griffiths-Jones S: **miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data.** *Nucleic Acids Research* 2010:gkq1027.
249. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ: **miRBase: tools for microRNA genomics.** *Nucleic Acids Research* 2008, **36**(suppl 1):D154-D158.
250. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, Van Dongen S, Bateman A, Enright AJ: **miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature.** *Nucleic Acids Research* 2006, **34**(suppl 1):D140-D144.

251. Griffiths-Jones S: **The microRNA registry.** *Nucleic Acids Research* 2004, **32**(suppl 1):D109-D111.
252. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M: **A uniform system for microRNA annotation.** *RNA* 2003, **9**(3):277-279.
253. Meyers BC, Axtell MJ, Bartel B, Bartel DP, Baulcombe D, Bowman JL, Cao X, Carrington JC, Chen X, Green PJ: **Criteria for annotation of plant MicroRNAs.** *The Plant Cell* 2008, **20**(12):3186-3190.
254. Stefani G, Slack FJ: **Small non-coding RNAs in animal development.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008, **9**(3):219-230.
255. Kasinski AL, Slack FJ: **MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy.** *Nature Reviews Cancer* 2011, **11**(12):849-864.
256. Luengo-Gil G: **MicroRNAs: nuevos marcadores de interés en oncología.** *Revista Eubacteria* 2012, **28**(1):1-4.
257. Luengo Gil G, Arroyo Rodríguez AB, Carmona Bayonas A, Ayala de la Peña F: **CircRNAs: esponjas moleculares de microRNAs, ¿futuro terapéutico en cáncer?** *Revista Eubacteria* 2013, **32**(1):46-57.
258. Taulli R, Loretelli C, Pandolfi PP: **From pseudo-ceRNAs to circ-ceRNAs: a tale of cross-talk and competition.** *Nature Structural & Molecular Biology* 2013, **20**(5):541-543.
259. Du Toit A: **RNA: circular RNAs as miRNA sponges.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013, **14**(4):195-195.
260. Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J: **Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges.** *Nature* 2013, **495**(7441):384-388.
261. Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M: **Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency.** *Nature* 2013, **495**(7441):333-338.
262. Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP: **A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?** *Cell* 2011, **146**(3):353-358.
263. Clark JL, Kandil D, Cosar EF, Khan A: **Role of MicroRNAs in Breast Cancer.** In: *Precision Molecular Pathology of Breast Cancer.* edn.: Springer; 2015: 197-218.
264. Li X-Y, Luo Q-F, Wei C-K, Li D-F, Li J, Fang L: **MiRNA-107 inhibits proliferation and migration by targeting CDK8 in breast cancer.** *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2014, **7**(1):32.
265. Hwang H, Mendell J: **MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis.** *British Journal of Cancer* 2006, **94**(6):776-780.
266. Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ: **MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition.** *Cell Cycle* 2008, **7**(20):3112-3117.
267. Zheng H, Kang Y: **Multilayer control of the EMT master regulators.** *Oncogene* 2014, **33**(14):1755-1763.
268. Lima RT, Busacca S, Almeida GM, Gaudino G, Fennell DA, Vasconcelos MH: **MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer.** *European Journal of Cancer* 2011, **47**(2):163-174.
269. Ma J, Dong C, Ji C: **MicroRNA and drug resistance.** *Cancer Gene Therapy* 2010, **17**(8):523-531.
270. Robertson NM, Yigit MV: **The role of microRNA in resistance to breast cancer therapy.** *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 2014, **5**(6):823-833.
271. Nana-Sinkam SP, Croce CM: **MicroRNA regulation of tumorigenesis, cancer progression and interpatient heterogeneity: towards clinical use.** *Genome Biology* 2014, **15**:445.

272. McGuire A, Brown JA, Kerin MJ: **Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring.** *Cancer and Metastasis Reviews* 2015, **34**(1):145-155.
273. Nair VS, Giraldez M, Luttmann M, Keu KV, Vasanaawala M, Horng G, Jamali M, Kolatkar A, Kuschner W, Kuhn P: **MicroRNA footprints of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer.** *Cancer Research* 2014, **74**(19 Supplement):4006-4006.
274. Takahashi RU, Miyazaki H, Ochiya T: **The role of microRNAs in the regulation of cancer stem cells.** *Frontiers in Genetics* 2014, **4**:295.
275. Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli AJ, Wiggins PA, Rodrigues LO, Brooks M, Reinhardt F, Su Y, Polyak K *et al*: **Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, **108**(19):7950-7955.
276. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(7):3983-3988.
277. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J *et al*: **let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells.** *Cell* 2007, **131**(6):1109-1123.
278. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhardt F, Zhang CC, Shipitsin M *et al*: **The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells.** *Cell* 2008, **133**(4):704-715.
279. Martello G, Rosato A, Ferrari F, Manfrin A, Cordenonsi M, Dupont S, Enzo E, Guzzardo V, Rondina M, Spruce T *et al*: **A MicroRNA targeting dicer for metastasis control.** *Cell* 2010, **141**(7):1195-1207.
280. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ: **The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1.** *Nature Cell Biology* 2008, **10**(5):593-601.
281. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, Brabletz T: **A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells.** *EMBO Reports* 2008, **9**(6):582-589.
282. Song SJ, Poliseno L, Song MS, Ala U, Webster K, Ng C, Beringer G, Brikbak NJ, Yuan X, Cantley LC *et al*: **MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling.** *Cell* 2013, **154**(2):311-324.
283. Takahashi RU, Miyazaki H, Ochiya T: **The Roles of MicroRNAs in Breast Cancer.** *Cancers* 2015, **7**(2):598-616.
284. Shimono Y, Zabala M, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian D, Diehn M, Liu H, Panula SP, Chiao E *et al*: **Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells.** *Cell* 2009, **138**(3):592-603.
285. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG: **Cancer drug resistance: an evolving paradigm.** *Nature Reviews Cancer* 2013, **13**(10):714-726.
286. Kartner N, Riordan JR, Ling V: **Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines.** *Science* 1983, **221**(4617):1285-1288.
287. Kartner N, Shales M, Riordan JR, Ling V: **Daunorubicin-resistant Chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface P-glycoprotein.** *Cancer Research* 1983, **43**(9):4413-4419.
288. Korner C, Keklikoglou I, Bender C, Worner A, Munstermann E, Wiemann S: **MicroRNA-31 sensitizes human breast cells to apoptosis by direct targeting of protein kinase C epsilon (PKCepsilon).** *The Journal of Biological Chemistry* 2013, **288**(12):8750-8761.

289. Bockhorn J, Dalton R, Nwachukwu C, Huang S, Prat A, Yee K, Chang YF, Huo D, Wen Y, Swanson KE *et al*: **MicroRNA-30c inhibits human breast tumour chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11**. *Nature Communications* 2013, **4**:1393.
290. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD: **A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(26):15665-15670.
291. Miller TE, Ghoshal K, Ramaswamy B, Roy S, Datta J, Shapiro CL, Jacob S, Majumder S: **MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1**. *The Journal of Biological Chemistry* 2008, **283**(44):29897-29903.
292. Liang Z, Wu H, Xia J, Li Y, Zhang Y, Huang K, Wagar N, Yoon Y, Cho HT, Scala S *et al*: **Involvement of miR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1**. *Biochemical Pharmacology* 2010, **79**(6):817-824.
293. Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, Illynskyy Y, Tryndyak VP, Chekhun VF, Pogribny IP: **Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin**. *Molecular Cancer Therapeutics* 2008, **7**(7):2152-2159.
294. Ma MT, He M, Wang Y, Jiao XY, Zhao L, Bai XF, Yu ZJ, Wu HZ, Sun ML, Song ZG *et al*: **MiR-487a resensitizes mitoxantrone (MX)-resistant breast cancer cells (MCF-7/MX) to MX by targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)**. *Cancer Letters* 2013, **339**(1):107-115.
295. Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris MD: **ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps**. *Nature Reviews Cancer* 2010, **10**(2):147-156.
296. Juliano RL, Ling V: **A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants**. *Biochimica et Biophysica Acta* 1976, **455**(1):152-162.
297. Pirker R, Wallner J, Gsur A, Gotzl M, Zochbauer S, Scheithauer W, Depisch D: **MDR1 gene expression in primary colorectal carcinomas**. *British Journal of Cancer* 1993, **68**(4):691-694.
298. Reeve JG, Rabbitts PH, Twentyman PR: **Amplification and expression of mdr1 gene in a multidrug resistant variant of small cell lung cancer cell line NCI-H69**. *British Journal of Cancer* 1989, **60**(3):339-342.
299. Honma K, Iwao-Koizumi K, Takeshita F, Yamamoto Y, Yoshida T, Nishio K, Nagahara S, Kato K, Ochiya T: **RPN2 gene confers docetaxel resistance in breast cancer**. *Nature Medicine* 2008, **14**(9):939-948.
300. Sullivan GF, Yang JM, Vassil A, Yang J, Bash-Babula J, Hait WN: **Regulation of expression of the multidrug resistance protein MRP1 by p53 in human prostate cancer cells**. *The Journal of Clinical Investigation* 2000, **105**(9):1261-1267.
301. Kim R, Nishimoto N, Osaki A, Kojima J, Fujii S, Inai K, Toge T: **An analysis of relapsed breast cancer in patients previously treated with breast conserving surgery**. *Breast Cancer* 2001, **8**(2):146-152.
302. Scheffer GL, Pijnenborg AC, Smit EF, Muller M, Postma DS, Timens W, van der Valk P, de Vries EG, Scheper RJ: **Multidrug resistance related molecules in human and murine lung**. *Journal of Clinical Pathology* 2002, **55**(5):332-339.
303. Ross DD: **Novel mechanisms of drug resistance in leukemia**. *Leukemia* 2000, **14**(3):467-473.
304. Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Ohkuma M, Kim HM, Akita H, Takiuchi D, Hatano H, Nagano H *et al*: **CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells**. *The Journal of Clinical Investigation* 2010, **120**(9):3326-3339.
305. le Sage C, Nagel R, Egan DA, Schrier M, Mesman E, Mangiola A, Anile C, Maira G, Mercatelli N, Ciafre SA *et al*: **Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-**

- 221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation.** *EMBO Journal* 2007, **26**(15):3699-3708.
306. Gupta GP, Massague J: **Cancer metastasis: building a framework.** *Cell* 2006, **127**(4):679-695.
307. Fidler IJ: **The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited.** *Nature Reviews Cancer* 2003, **3**(6):453-458.
308. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA: **Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer.** *Nature* 2007, **449**(7163):682-688.
309. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massague J: **Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis.** *Nature* 2008, **451**(7175):147-152.
310. Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Calogrias D, Szasz AM, Wang ZC, Brock JE, Richardson AL, Weinberg RA: **A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis.** *Cell* 2009, **137**(6):1032-1046.
311. Chou J, Lin JH, Brenot A, Kim JW, Provot S, Werb Z: **GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression.** *Nature Cell Biology* 2013, **15**(2):201-213.
312. Kim NH, Kim HS, Li XY, Lee I, Choi HS, Kang SE, Cha SY, Ryu JK, Yoon D, Fearon ER *et al*: **A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition.** *The Journal of Cell Biology* 2011, **195**(3):417-433.
313. Ryu S, McDonnell K, Choi H, Gao D, Hahn M, Joshi N, Park SM, Catena R, Do Y, Brazin J *et al*: **Suppression of miRNA-708 by polycomb group promotes metastases by calcium-induced cell migration.** *Cancer Cell* 2013, **23**(1):63-76.
314. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D *et al*: **A microRNA component of the p53 tumour suppressor network.** *Nature* 2007, **447**(7148):1130-1134.
315. Chou J, Provot S, Werb Z: **GATA3 in development and cancer differentiation: cells GATA have it!** *Journal of Cell Physiology* 2010, **222**(1):42-49.
316. Asselin-Labat ML, Sutherland KD, Barker H, Thomas R, Shackleton M, Forrest NC, Hartley L, Robb L, Grosveld FG, van der Wees J *et al*: **Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation.** *Nature Cell Biology* 2007, **9**(2):201-209.
317. Kouros-Mehr H, Bechis SK, Slorach EM, Littlepage LE, Egeblad M, Ewald AJ, Pai SY, Ho IC, Werb Z: **GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model.** *Cancer Cell* 2008, **13**(2):141-152.
318. Canel M, Serrels A, Frame MC, Brunton VG: **E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis.** *Journal of Cell Science* 2013, **126**(Pt 2):393-401.
319. Shen J, Xia W, Khotskaya YB, Huo L, Nakanishi K, Lim SO, Du Y, Wang Y, Chang WC, Chen CH *et al*: **EGFR modulates microRNA maturation in response to hypoxia through phosphorylation of AGO2.** *Nature* 2013, **497**(7449):383-387.
320. Taylor DD, Doellgast GJ: **Quantitation of peroxidase-antibody binding to membrane fragments using column chromatography.** *Analytical Biochemistry* 1979, **98**(1):53-59.
321. Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, Gonzalez S, Sanchez-Cabo F, Gonzalez MA, Bernad A, Sanchez-Madrid F: **Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells.** *Nature Communications* 2011, **2**:282.
322. McDonald MK, Tian Y, Qureshi RA, Gormley M, Ertel A, Gao R, Aradillas Lopez E, Alexander GM, Sacan A, Fortina P *et al*: **Functional significance of macrophage-derived exosomes in inflammation and pain.** *Pain* 2014, **155**(8):1527-1539.
323. Putz U, Howitt J, Doan A, Goh CP, Low LH, Silke J, Tan SS: **The tumor suppressor PTEN is exported in exosomes and has phosphatase activity in recipient cells.** *Science Signaling* 2012, **5**(243):ra70.

324. Taylor DD, Gercel-Taylor C: **The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids.** *Frontiers in Genetics* 2013, **4**:142.
325. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO: **Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.** *Nature Cell Biology* 2007, **9**(6):654-659.
326. Zhou W, Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, Palomares MR, Yu Y, Chow A, O'Connor ST, Chin AR *et al*: **Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis.** *Cancer Cell* 2014, **25**(4):501-515.
327. Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar C *et al*: **Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET.** *Nature Medicine* 2012, **18**(6):883-891.
328. Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, Chiu E, Buchanan M, Hosein AN, Basik M, Wrana JL: **Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration.** *Cell* 2012, **151**(7):1542-1556.
329. Marleau AM, Chen CS, Joyce JA, Tullis RH: **Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer.** *Journal of Translational Medicine* 2012, **10**:134.
330. Lim PK, Bliss SA, Patel SA, Torgora M, Dave MA, Gregory LA, Greco SJ, Bryan M, Patel PS, Rameshwar P: **Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells.** *Cancer Research* 2011, **71**(5):1550-1560.
331. Yang M, Chen J, Su F, Yu B, Lin L, Liu Y, Huang JD, Song E: **Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells.** *Molecular Cancer* 2011, **10**:117.
332. Chen WX, Liu XM, Lv MM, Chen L, Zhao JH, Zhong SL, Ji MH, Hu Q, Luo Z, Wu JZ *et al*: **Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs.** *PLoS ONE* 2014, **9**(4):e95240.
333. Zhong S, Li W, Chen Z, Xu J, Zhao J: **MiR-222 and miR-29a contribute to the drug-resistance of breast cancer cells.** *Gene* 2013, **531**(1):8-14.
334. Chamorro-Jorganes A, Lee MY, Araldi E, Landskroner-Eiger S, Fernandez-Fuertes M, Sahraei M, Quiles Del Rey M, van Solingen C, Yu J, Fernandez-Hernando C *et al*: **VEGF-Induced Expression of miR-17~92 Cluster in Endothelial Cells is Mediated by ERK/ELK1 Activation and Regulates Angiogenesis.** *Circulation Research* 2015.
335. Yin KJ, Olsen K, Hamblin M, Zhang J, Schwendeman SP, Chen YE: **Vascular endothelial cell-specific microRNA-15a inhibits angiogenesis in hindlimb ischemia.** *The Journal of Biological Chemistry* 2012, **287**(32):27055-27064.
336. Tang Y, Zhang Y, Chen Y, Xiang Y, Xie Y: **Role of the microRNA, miR-206, and its target PIK3C2alpha in endothelial progenitor cell function - potential link with coronary artery disease.** *The FEBS journal* 2015, **282**(19):3758-3772.
337. Yamakuchi M, Lotterman CD, Bao C, Hruban RH, Karim B, Mendell JT, Huso D, Lowenstein CJ: **P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(14):6334-6339.
338. Zhuang G, Wu X, Jiang Z, Kasman I, Yao J, Guan Y, Oeh J, Modrusan Z, Bais C, Sampath D: **Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway.** *The EMBO journal* 2012, **31**(17):3513-3523.
339. Cha ST, Chen PS, Johansson G, Chu CY, Wang MY, Jeng YM, Yu SL, Chen JS, Chang KJ, Jee SH *et al*: **MicroRNA-519c suppresses hypoxia-inducible factor-1alpha expression and tumor angiogenesis.** *Cancer Research* 2010, **70**(7):2675-2685.
340. Zhao H-Y, Ooyama A, Yamamoto M, Ikeda R, Haraguchi M, Tabata S, Furukawa T, Che X-F, Iwashita K-i, Oka T: **Down regulation of c-Myc and induction of an angiogenesis**

- inhibitor, thrombospondin-1, by 5-FU in human colon cancer KM12C cells. *Cancer Letters* 2008, **270**(1):156-163.**
341. Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Sevigani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT: **Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster.** *Nature Genetics* 2006, **38**(9):1060-1065.
342. Dews M, Fox JL, Hultine S, Sundaram P, Wang W, Liu YY, Furth E, Enders GH, El-Deiry W, Schelter JM: **The myc-mir-17~ 92 axis blunts TGF β signaling and production of multiple TGF β -dependent antiangiogenic factors.** *Cancer Research* 2010, **70**(20):8233-8246.
343. de la Peña FA, Kanasaki K, Kanasaki M, Tangirala N, Maeda G, Kalluri R: **Loss of p53 and acquisition of angiogenic microRNA profile are insufficient to facilitate progression of bladder urothelial carcinoma in situ to invasive carcinoma.** *Journal of Biological Chemistry* 2011, **286**(23):20778-20787.
344. Doebele C, Bonauer A, Fischer A, Scholz A, Reiss Y, Urbich C, Hofmann W-K, Zeiher AM, Dimmeler S: **Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells.** *Blood* 2010, **115**(23):4944-4950.
345. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K *et al*: **MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice.** *Science* 2009, **324**(5935):1710-1713.
346. Zhang X, Yu H, Lou JR, Zheng J, Zhu H, Popescu N-I, Lupu F, Lind SE, Ding W-Q: **MicroRNA-19 (miR-19) regulates tissue factor expression in breast cancer cells.** *Journal of Biological Chemistry* 2011, **286**(2):1429-1435.
347. Sundaram P, Hultine S, Smith LM, Dews M, Fox JL, Biyashev D, Schelter JM, Huang Q, Cleary MA, Volpert OV *et al*: **p53-responsive miR-194 inhibits thrombospondin-1 and promotes angiogenesis in colon cancers.** *Cancer Res* 2011, **71**(24):7490-7501.
348. Lu Z, Zhang W, Gao S, Jiang Q, Xiao Z, Ye L, Zhang X: **MiR-506 suppresses liver cancer angiogenesis through targeting sphingosine kinase 1 (SPHK1) mRNA.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015, **468**(1-2):8-13.
349. Liu HT, Xing AY, Chen X, Ma RR, Wang YW, Shi DB, Zhang H, Li P, Chen HF, Li YH *et al*: **MicroRNA-27b, microRNA-101 and microRNA-128 inhibit angiogenesis by down-regulating vascular endothelial growth factor C expression in gastric cancers.** *Oncotarget* 2015.
350. Dai J, Wang J, Yang L, Xiao Y, Ruan Q: **miR-125a regulates angiogenesis of gastric cancer by targeting vascular endothelial growth factor A.** *International Journal of Oncology* 2015, **47**(5):1801-1810.
351. Yan JJ, Zhang YN, Liao JZ, Ke KP, Chang Y, Li PY, Wang M, Lin JS, He XX: **MiR-497 suppresses angiogenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting VEGFA and AEG-1.** *Oncotarget* 2015, **6**(30):29527-29542.
352. Mendell JT: **miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease.** *Cell* 2008, **133**(2):217-222.
353. Volinia S, Galasso M, Sana ME, Wise TF, Palatini J, Huebner K, Croce CM: **Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**(8):3024-3029.
354. Loscalzo J: **The cellular response to hypoxia: tuning the system with microRNAs.** *The Journal of Clinical Investigation* 2010, **120**(11):3815.
355. Yu Z, Willmarth NE, Zhou J, Katiyar S, Wang M, Liu Y, McCue PA, Quong AA, Lisanti MP, Pestell RG: **microRNA 17/20 inhibits cellular invasion and tumor metastasis in breast cancer by heterotypic signaling.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(18):8231-8236.
356. Castellano L, Giamas G, Jacob J, Coombes RC, Lucchesi W, Thiruchelvam P, Barton G, Jiao LR, Wait R, Waxman J: **The estrogen receptor- α -induced microRNA signature**

- regulates itself and its transcriptional response.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(37):15732-15737.
357. Cascio S, D'Andrea A, Ferla R, Surmacz E, Gulotta E, Amodeo V, Bazan V, Gebbia N, Russo A: **miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1 α and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells.** *Journal of Cellular Physiology* 2010, **224**(1):242-249.
358. Teruel R, Pérez-Sánchez C, Corral J, Herranz M, Pérez-Andréu V, Saiz E, García-Barberá N, Martínez-Martínez I, Roldan V, Vicente V *et al*: **Identification of miRNAs as potential modulators of tissue factor expression in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2011, **9**(10):1985-1992.
359. Al-Nakhle H, Burns PA, Cummings M, Hanby AM, Hughes TA, Satheesha S, Shaaban AM, Smith L, Speirs V: **Estrogen receptor β 1 expression is regulated by miR-92 in breast cancer.** *Cancer Research* 2010, **70**(11):4778-4784.
360. Farazi TA, Horlings HM, Jelle J, Mihailovic A, Halfwerk H, Morozov P, Brown M, Hafner M, Reyat F, van Kouwenhove M: **MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing.** *Cancer Research* 2011, **71**(13):4443-4453.
361. Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C: **The microRNA. org resource: targets and expression.** *Nucleic Acids Research* 2008, **36**(suppl 1):D149-D153.
362. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N: **miRWalk–database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes.** *Journal of Biomedical Informatics* 2011, **44**(5):839-847.
363. Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP: **Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs.** *Elife* 2015, **4**:e05005.
364. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP: **Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs.** *Genome Research* 2009, **19**(1):92-105.
365. Garcia DM, Baek D, Shin C, Bell GW, Grimson A, Bartel DP: **Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsy-6 and other microRNAs.** *Nature Structural & Molecular Biology* 2011, **18**(10):1139-1146.
366. Grimson A, Farh KK-H, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP: **MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing.** *Molecular Cell* 2007, **27**(1):91-105.
367. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP: **Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.** *Cell* 2005, **120**(1):15-20.
368. Nam J-W, Rissland OS, Koppstein D, Abreu-Goodger C, Jan CH, Agarwal V, Yildirim MA, Rodriguez A, Bartel DP: **Global analyses of the effect of different cellular contexts on microRNA targeting.** *Molecular Cell* 2014, **53**(6):1031-1043.
369. Shin C, Nam J-W, Farh KK-H, Chiang HR, Shkumatava A, Bartel DP: **Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing.** *Molecular Cell* 2010, **38**(6):789-802.
370. Ye W, Lv Q, Wong C, Hu S, Fu C, Hua Z, Cai G, Li G, Yang BB, Zhang Y: **The effect of central loops in miRNA: MRE duplexes on the efficiency of miRNA-mediated gene regulation.** *PloS ONE* 2008, **3**(3):e1719.
371. Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Vlachos IS, Vergoulis T, Reczko M, Filippidis C, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG: **DIANA-microT web server v5. 0: service integration into miRNA functional analysis workflows.** *Nucleic Acids Research* 2013, **41**(W1):W169-W173.
372. Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, Alexiou P, Papadopoulos GL, Dalamagas T, Giannopoulos G, Goumas G, Koukis E, Kourtis K: **DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction.** *Nucleic Acids Research* 2009:gkp292.

373. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, Franz M, Grouios C, Kazi F, Lopes CT *et al*: **The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function.** *Nucleic Acids Research* 2010, **38**(Web Server issue):W214-220.
374. Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K: **Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples.** *Nucleic Acids Research* 1999, **27**(22):4436-4443.
375. Farragher SM, Tanney A, Kennedy RD, Paul Harkin D: **RNA expression analysis from formalin fixed paraffin embedded tissues.** *Histochemistry and Cell Biology* 2008, **130**(3):435-445.
376. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
377. Carpentier G, Martinelli M, Courty J, Cascone I: **Angiogenesis analyzer for ImageJ.** In: *4th ImageJ User and Developer Conference Proceedings: 2012*; 2012: 198-201.
378. Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ: **Image processing with ImageJ.** *Biophotonics International* 2004, **11**(7):36-42.
379. Barrett T, Troup DB, Wilhite SE, Ledoux P, Rudnev D, Evangelista C, Kim IF, Soboleva A, Tomashevsky M, Edgar R: **NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles—database and tools update.** *Nucleic Acids Research* 2007, **35**(suppl 1):D760-D765.
380. Enerly E, Steinfeld I, Kleivi K, Leivonen S-K, Aure MR, Russnes HG, Ronneberg JA, Johnsen H, Navon R, Rodland E: **miRNA-mRNA integrated analysis reveals roles for miRNAs in primary breast tumors.** *PLoS ONE* 2011, **6**(2):e16915.
381. Buffa FM, Camps C, Winchester L, Snell CE, Gee HE, Sheldon H, Taylor M, Harris AL, Ragoussis J: **microRNA-associated progression pathways and potential therapeutic targets identified by integrated mRNA and microRNA expression profiling in breast cancer.** *Cancer Research* 2011, **71**(17):5635-5645.
382. Hatzis C, Pusztai L, Valero V, Booser DJ, Esserman L, Lluch A, Vidaurre T, Holmes F, Souchon E, Wang H: **A genomic predictor of response and survival following taxane-anthracycline chemotherapy for invasive breast cancer.** *Journal of the American Medical Association* 2011, **305**(18):1873-1881.
383. Itoh M, Iwamoto T, Matsuoka J, Nogami T, Motoki T, Shien T, Taira N, Niikura N, Hayashi N, Ohtani S: **Estrogen receptor (ER) mRNA expression and molecular subtype distribution in ER-negative/progesterone receptor-positive breast cancers.** *Breast Cancer Research and Treatment* 2014, **143**(2):403-409.
384. Holm S: **A simple sequentially rejective multiple test procedure.** *Scandinavian Journal of Statistics* 1979:65-70.
385. Blenkinson C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Teschendorff AE, Green AR, Ellis IO *et al*: **MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype.** *Genome Biology* 2007, **8**(10):R214.
386. Liu WH, Yeh SH, Lu CC, Yu SL, Chen HY, Lin CY, Chen DS, Chen PJ: **MicroRNA-18a prevents estrogen receptor-alpha expression, promoting proliferation of hepatocellular carcinoma cells.** *Gastroenterology* 2009, **136**(2):683-693.
387. Leivonen SK, Makela R, Ostling P, Kohonen P, Haapa-Paananen S, Kleivi K, Enerly E, Aakula A, Hellstrom K, Sahlberg N *et al*: **Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines.** *Oncogene* 2009, **28**(44):3926-3936.
388. Mirisola V, Zuccarino A, Bachmeier BE, Sormani MP, Falter J, Nerlich A, Pfeffer U: **CXCL12/SDF1 expression by breast cancers is an independent prognostic marker of disease-free and overall survival.** *European Journal of Cancer* 2009, **45**(14):2579-2587.

389. Yee KO, Connolly CM, Duquette M, Kazerounian S, Washington R, Lawler J: **The effect of thrombospondin-1 on breast cancer metastasis.** *Breast Cancer Research and Treatment* 2009, **114**(1):85-96.
390. Guidi AJ, Berry DA, Broadwater G, Helmchen B, Bleiweiss IJ, Budman DR, Henderson IC, Norton L, Hayes DF: **Association of angiogenesis and disease outcome in node-positive breast cancer patients treated with adjuvant cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil: a Cancer and Leukemia Group B correlative science study from protocols 8541/8869.** *Journal of Clinical Oncology* 2002, **20**(3):732-742.
391. Goel HL, Mercurio AM: **VEGF targets the tumour cell.** *Nature Reviews Cancer* 2013, **13**(12):871-882.
392. Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere SJ, Trinh XB, Colpaert CG, van Dam P, Dirix LY, Vermeulen PB, Van Marck EA: **Comparison of molecular determinants of angiogenesis and lymphangiogenesis in lymph node metastases and in primary tumours of patients with breast cancer.** *Journal of Pathology* 2007, **213**(1):56-64.
393. Maae E, Olsen DA, Steffensen KD, Jakobsen EH, Brandslund I, Sorensen FB, Jakobsen A: **Prognostic impact of placenta growth factor and vascular endothelial growth factor A in patients with breast cancer.** *Breast Cancer Research and Treatment* 2012, **133**(1):257-265.
394. Linderholm B, Grankvist K, Wilking N, Johansson M, Tavelin B, Henriksson R: **Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment.** *Journal of Clinical Oncology* 2000, **18**(7):1423-1431.
395. Bender RJ, Mac Gabhann F: **Expression of VEGF and semaphorin genes define subgroups of triple negative breast cancer.** *PLoS ONE* 2013, **8**(5):e61788.
396. Vasudev NS, Goh V, Juttla JK, Thompson VL, Larkin JM, Gore M, Nathan PD, Reynolds AR: **Changes in tumour vessel density upon treatment with anti-angiogenic agents: relationship with response and resistance to therapy.** *British Journal of Cancer* 2013, **109**(5):1230-1242.
397. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J: **Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us.** *Journal of the National Cancer Institute* 2002, **94**(12):883-893.
398. Ebos JM, Mastri M, Lee CR, Tracz A, Hudson JM, Attwood K, Cruz-Munoz WR, Jedeszko C, Burns P, Kerbel RS: **Neoadjuvant antiangiogenic therapy reveals contrasts in primary and metastatic tumor efficacy.** *EMBO Molecular Medicine* 2014, **6**(12):1561-1576.
399. Chung AS, Kowanetz M, Wu X, Zhuang G, Ngu H, Finkle D, Komuves L, Peale F, Ferrara N: **Differential drug class-specific metastatic effects following treatment with a panel of angiogenesis inhibitors.** *Journal of Pathology* 2012, **227**(4):404-416.
400. Colleoni M, Orlando L, Sanna G, Rocca A, Maisonneuve P, Peruzzotti G, Ghisini R, Sandri MT, Zorzino L, Nole F *et al*: **Metronomic low-dose oral cyclophosphamide and methotrexate plus or minus thalidomide in metastatic breast cancer: antitumor activity and biological effects.** *Annals of Oncology* 2006, **17**(2):232-238.
401. Baar J, Silverman P, Lyons J, Fu P, Abdul-Karim F, Ziats N, Wasman J, Hartman P, Jesberger J, Dumadag L *et al*: **A vasculature-targeting regimen of preoperative docetaxel with or without bevacizumab for locally advanced breast cancer: impact on angiogenic biomarkers.** *Clinical Cancer Research* 2009, **15**(10):3583-3590.
402. Jacobs TW, Siziopikou KP, Prioleau JE, Raza S, Baum JK, Hayes DF, Schnitt SJ: **Do prognostic marker studies on core needle biopsy specimens of breast carcinoma accurately reflect the marker status of the tumor?** *Modern Pathology* 1998, **11**(3):259-264.
403. Ryden L, Boiesen P, Jonsson PE: **Assessment of microvessel density in core needle biopsy specimen in breast cancer.** *Anticancer Research* 2004, **24**(1):371-375.

404. Jain RK: **Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia.** *Cancer Cell* 2014, **26**(5):605-622.
405. Bear HD, Tang G, Rastogi P, Geyer CE, Jr., Robidoux A, Atkins JN, Baez-Diaz L, Brufsky AM, Mehta RS, Fehrenbacher L *et al*: **Bevacizumab added to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer.** *The New England Journal of Medicine* 2012, **366**(4):310-320.
406. von Minckwitz G, Eidtmann H, Rezai M, Fasching PA, Tesch H, Eggemann H, Schrader I, Kittel K, Hanusch C, Kreienberg R *et al*: **Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer.** *The New England Journal of Medicine* 2012, **366**(4):299-309.
407. Vasudev NS, Reynolds AR: **Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions.** *Angiogenesis* 2014, **17**(3):471-494.
408. Yin R, Bao W, Xing Y, Xi T, Gou S: **MiR-19b-1 inhibits angiogenesis by blocking cell cycle progression of endothelial cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012, **417**(2):771-776.
409. Peddinti R, Zeine R, Luca D, Seshadri R, Chlenski A, Cole K, Pawel B, Salwen HR, Maris JM, Cohn SL: **Prominent microvascular proliferation in clinically aggressive neuroblastoma.** *Clinical Cancer Research* 2007, **13**(12):3499-3506.
410. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T: **A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation.** *Cancer Research* 2005, **65**(21):9628-9632.
411. Lu Y, Thomson JM, Wong HY, Hammond SM, Hogan BL: **Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells.** *Developmental Biology* 2007, **310**(2):442-453.
412. Luker KE, Luker GD: **Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer.** *Cancer Letters* 2006, **238**(1):30-41.
413. Zhao S, Chang SL, Linderman JJ, Feng FY, Luker GD: **A Comprehensive Analysis of CXCL12 Isoforms in Breast Cancer.** *Translational Oncology* 2014.
414. Teicher BA, Fricker SP: **CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer.** *Clinical Cancer Research* 2010, **16**(11):2927-2931.
415. Wendt MK, Cooper AN, Dwinell MB: **Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells.** *Oncogene* 2008, **27**(10):1461-1471.
416. Ruifrok AC, Johnston DA: **Quantification of histochemical staining by color deconvolution.** *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 2001, **23**(4):291-299.

ABREVIATURAS

AC:	Antraciclinas
ACA45:	RNA específico de cuerpos de Cajal 15 (snoRNA)
AGO/AGO2:	Proteína argonauta 2
ALK1:	Quinasa similar al receptor de activina 1
ANG-1:	ANGPT2
ARNT:	Receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos
AURKA:	Gen de la Aurora quinasa A
ATM:	Gen de la serina proteína quinasa ATM
ATP:	Trifosfato de adenosina
ATR:	Gen de la serina/treonina proteína quinasa ATR
BRCA1/2:	Gen de la proteína de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 1/2
CD31:	PECAM-1
CD36:	Receptor de trombospondina
CD47:	Proteína asociada a integrina
CDKN1B:	Inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina
CGH:	Hibridación genómica comparada
CMM:	Cáncer de mama metastásico
CTCs:	Células tumorales circulantes
CTGF:	Gen del factor de crecimiento del tejido conectivo
CXCL12:	Gen del factor derivado de célula estromal 1
CXCR4:	Receptor de SDF-1 (CXCL12)
DGCR8:	Gen de la proteína del complejo microprocesador DGCR8
ddH2O	Agua bidestilada
DLL4:	Proteína 4 similar a Delta
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DOC:	Docetaxel
DTT:	Ditiotreitol
EA.hy926	Línea celular (hibridoma); modelo de célula endotelial
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico
EGFL7:	Proteína del dominio 7 similar al factor de crecimiento epidérmico
ENG:	Endoglina
ESR1:	Gen del receptor de estrógenos alfa
F3:	Gen del factor tisular
FFPE:	Fijado en formalina e incluido en parafina
FGF:	Factor de crecimiento de fibroblastos
FISH:	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
FOXA1:	Gen del factor de transcripción de la familia <i>forkheadbox</i> A1
FOXC1:	Gen del factor de transcripción de la familia <i>forkheadbox</i> C1
FOXM1:	Gen del factor de transcripción de la familia <i>forkheadbox</i> M1
GMP:	Proliferaciones microvasculares glomerulares
GRB7:	Gen de la Proteína unida a receptor de factor de crecimiento 7
GTP:	Trifosfato de guanosina
HIF1A:	Gen del factor inducible por hipoxia 1 alfa

HMGA2:	Proteína del grupo de alta movilidad HMGI-C
HOXD10:	Proteína homeobox Hox-D10
HR:	Receptores hormonales
HRAS:	GTPasa Hras o proteína transformante p21
IHQ:	Inmunohistoquímica
<i>INPP4B</i> :	Gen de la Fosfatasa-4 de IP ₂ tipo II
IP ₂ :	Inositol 3,4-bisfosfato
ITGA5:	Integrina alfa 5
JAGGED1:	Proteína de superficie de la vía de señalización Notch
KRAS:	GTPasa Kras
MCF7:	Línea celular de cáncer de mama; modelo de subtipo luminal
MDA-MB-231:	Línea celular de cáncer de mama; modelo de subtipo triple negativo
MEF2C:	Factor potenciador específico de miocito 2C
miRNA:	microRNA
miR-18a:	hsa-miR-18a-5p; microRNA 18a humano
miR-19b-1:	hsa-miR-19b-3p
<i>MKI67</i> :	Gen del antígeno Ki-67
MMP-2:	Metaloproteinasa-2
MMP-9:	Metaloproteinasa-9
MVD:	Densidad microvascular
MVS:	Tamaño medio vascular
<i>MYBL2</i> :	Gen de la proteína B emparentada con Myb
MYC:	Factor de transcripción c-Myc
NGS:	<i>Next Generation sequencing</i>
NNAT:	Neuronatina
NOTCH:	Notch1, proteína transmembrana con múltiples dominios EGF
NRARP:	Proteína con repeticiones ankirina regulada por Notch
NRP1:	Neurofilina 1
PAI-1:	Inhibidor del factor del plasminógeno-1
PAM50:	Análisis genómico; calcula riesgo de recurrencia en cáncer de mama
PARN:	Ribonucleasa específica de Poli-A
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>PDGFA</i> :	Gen del factor de crecimiento derivado de las plaquetas A
<i>PGR</i> :	Gen del receptor de progesterona
<i>PIK3CA</i> :	Subunidad catalítica de la PIP ₂ -3-quinasa
piRNA:	RNA asociados a <i>piwi</i>
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
<i>PDGFR</i> :	Gen del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PIGF:	Factor de crecimiento placentario
PIP ₂ :	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP ₃ :	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
<i>PTEN</i> :	Gen de la fosfatasa de especificidad dual y PIP ₃ fosfatasa
qPCR:	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
QT:	Quimioterapia
<i>RB1</i> :	Gen de la proteína asociada a retinoblastoma
RCp:	Respuesta completa patológica
RE α :	Receptor de estrógenos alfa
<i>RHOA</i> :	Gen de la familia de genes homólogos de Ras, miembro A
<i>RHOC</i> :	Gen de la familia de genes homólogos de Ras, miembro C
RISC:	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RNA:	Ácido ribonucleico
RP:	Receptor de progesterona

RT:	Retrotranscripción o transcripción reversa
SG:	Supervivencia global
siRNA	RNA de interferencia pequeño
SLE:	Supervivencia libre de enfermedad
SLP:	Supervivencia libre de progresión
SLRD:	Supervivencia libre de recaída a distancia
SNAI1:	Proteína con dedo de Zinc SNAI1
snoRNA:	RNA pequeño nucleolar
snRNA:	RNA pequeño nuclear
SOX4:	Factor de transcripción SOX4
TAC:	Consola de análisis transcriptómico
TCGA:	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
<i>THBS1</i> :	Gen de la trombospondina-1
TIMP:	Inhibidor tisular de metaloproteinasas
TMA:	Micromatriz (o microarray) tisular
TNBC:	Cáncer de mama subtipo triple negativo
TNM:	Sistema de estadificación clínico y patológico del cáncer de mama
<i>TP53</i> :	Gen del antígeno celular tumoral p53
tRNA:	RNA de transferencia
VCAM-1:	Molécula de adhesión vascular-1 (o CD106)
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular A (proteína)
<i>VEGFA</i> :	Gen del factor de crecimiento endotelial vascular A
<i>VEGFR</i> :	Gen del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular A
VEGFR1:	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 1
VEGFR2:	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (o FLK1)
VEGFR3:	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 3
WNT:	Proteína WNT (del inglés, <i>Wingless e Int</i>)
ZO-1:	Proteína de uniones estrechas 1