

**Influencia de las células
endoteliales en la
recurrencia del cáncer de
mama metastásico óseo**



AGRADECIMIENTOS

La posibilidad de poder desarrollar este trabajo fue dada por el proyecto *Bojos per la Ciència* de la *Fundació Catalunya La Pedrera*. Gracias a su interés por la divulgación a la comunidad estudiantil, por primera vez pude entrar en contacto con algunos científicos magníficos que, en muchas sesiones, nos compartían sus experiencias sobre la investigación e intentaban relajarnos en el ambiente ansioso de Bachillerato.

Doy gracias a mi tutor del Trabajo de Investigación. Gracias a él pude realizar mi trabajo sin preocupaciones, teniendo un apoyo constante en el colegio. Él siempre me apoyaba en las ideas que tenía y me sugería cosas en las que podía mejorar. Gracias a su seguimiento anual, he podido completar todo el trabajo con la mayor tranquilidad y seguridad.

Doy gracias a mis profesores de Biología, quienes me presentaron el proyecto de *Bojos per la ciencia*. Si no fuera por ellos, no hubiera llegado de igual manera hasta las conclusiones finales.

Doy agradecimientos especiales a mi tutora de prácticas, una estudiante PhD que trabaja en IRB y Fundación Josep Carreras. Ella fue la persona quien se ofreció a guiarme en las prácticas y a darme la oportunidad de llevar a cabo la parte experimental de este trabajo. En todas las charlas que hacíamos me explicaba su recorrido profesional y me motivaba a hacer investigación en un futuro no lejano. Me dio a entender las dificultades que podríamos tener a la hora de poner en práctica las teorías, pero que nunca nos tenemos que parar por ellas. De hecho, tuvimos un problema con las células endoteliales y no pudimos acabar la práctica después de haberlo empezado dos semanas antes. No obstante, el esfuerzo de ese tiempo no fue inútil ni mucho menos, ya que, gracias a este error, pude ver más claro que no todas las veces ocurren cosas que nosotros esperamos, lo cual nos hace reflexionar sobre nuestro fallo y ser más precisos en los siguientes experimentos.

La experiencia que he tenido con ella es la más inolvidable de todo este trabajo, y le doy de nuevo muchísimas gracias.

Doy gracias a las coordinadoras del proyecto *Bojos per la Biomedicina*. Gracias a sus

esfuerzos de organizar este gran proyecto de forma coordinada, pude entrar en contacto con mi tutora de prácticas y realizar todas las sesiones del proyecto.

Finalmente, doy gracias a mis padres que siempre me han apoyado en todas las ideas que tenía. Si no fuera por ellos, no hubiera tenido la oportunidad de hacer esta pequeña investigación, no solamente por motivos económicos sino también psicológicos. Cuando tenía dificultades siempre me daban ayuda y consuelo para relajar mi estrés. Mi padre era la persona que siempre me llevaba en coche al centro de IRB las mañanas de los sábados que teníamos prácticas y ambos aprecian mucho mi esfuerzo académico.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	6
1. MOTIVACIÓN	6
2. OBJETIVOS	6
3. HIPÓTESIS E INTRODUCCIÓN AL TRABAJO	6
<i>MARCO TEÓRICO.....</i>	9
I. CÁNCER	9
1. ¿QUÉ ES EL CÁNCER?	9
1.1 CARÁCTERÍSTICAS DE CÉLULAS CANCEROSAS.....	11
1.2 TIPOS DE TUMORES	12
2. CAUSAS DEL CÁNCER	13
2.1 MUTACIONES Y CÁNCER	13
2.2 GENES VINCULADOS EN EL DESARROLLO DE UN CÁNCER	14
2.3 FACTORES DE RIESGO.....	16
3. TIPOS DE CÁNCER	17
4. LAS CIFRAS DEL CÁNCER	19
II. CÁNCER DE MAMA	22
1. INTRODUCCIÓN	22
2. LAS CIFRAS DEL CÁNCER DE MAMA	23
3. ESTRUCTURA DE LA MAMA	25
4. TIPOS DEL CÁNCER DE MAMA	29
4.1 CÁNCER DE MAMA IN SITU O NO INVASIVO.....	29
4.2 CÁNCER DE MAMA INVASIVO O INFILTRANTE.....	29
4.3 SUBTIPOS MOLECULARES	31
4.4 ESTADIFICACIÓN.....	36
III. METÁSTASIS.....	39
1. INTRODUCCIÓN	39
2. FORMACIÓN DE LA METÁSTASIS	40
2.1 ANGIOGÉNESIS.....	40
2.2 PROCESO I: INVASIÓN LOCAL DE LA MATRIZ EXTRACELULAR	41
2.3 PROCESO METASTÁSICO II: INTRAVASACIÓN	42
2.4 PROCESO III: DISEMINACIÓN POR EL TORRENTE CIRCULATORIO.....	44
2.5 PROCESO IV: EXTRAVASACIÓN	44
2.6 PROCESO V: DESARROLLO DEL TUMOR SECUNDARIO	45
3. CÁNCER DE MAMA METASTÁSICO	46
4. TRATAMIENTOS.....	47
IV. LATENCIA DEL CÁNCER DE MAMA	48
V. RECURRENCIA DEL CÁNCER	49

VI. INTERACCIONES ENTRE CÉLULAS.....	50
VII. MICROAMBIENTE TUMORAL (MAT)	52
1. MICROAMBIENTE ÓSEO CON LA METÁSTASIS DE LAS CÉLULAS DEL CÁNCER DE MAMA	54
1.1 TEJIDO ÓSEO.....	55
1.2 TIPOS DE TEJIDO ÓSEO	56
2. VASOS SANGUÍNEOS	57
2.1. ESTUCTURA DE LOS VASOS SANGUÍNEOS.....	58
2.2 CÉLULA ENDOTELIAL (CE).....	59
<i>PARTE EXPERIMENTAL.....</i>	<i>63</i>
I. INTRODUCCIÓN AL TRABAJO	63
II. MATERIAL	64
III. HIPÓTESIS	64
IV. MÉTODO EXPERIMENTAL.....	64
1. CONCEPTOS A ENTENDER	66
1.1 GEN MAF.....	66
1.2 MUTACIÓN CÉLULAS ENDOTELIALES.....	67
1.3 TINCIONES.....	67
V. PROTOCOLOS DE LA PRÁCTICA	68
1. IMÁGENES	77
VI. RESULTADOS	85
VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	93
<i>CONCLUSIÓN.....</i>	<i>95</i>
I. CONCLUSIONES.....	95
II. FUTURAS POSIBILIDADES.....	96
<i>REFERENCIAS</i>	<i>97</i>
I. INFORMACIÓN ESCRITA	97
II. FIGURAS	112
III. GRÁFICAS	117
IV. TABLAS	119

I. INTRODUCCIÓN

1. MOTIVACIÓN

El Trabajo de investigación es el trabajo más completo y laborioso que he hecho durante todo mi recorrido académico.

Al principio, me decanté por las influencias que podría tener la dieta sobre una persona, pero al final decidí tratarlo sobre el cáncer, no solamente porque es uno de los temas más investigados, sino porque después de una investigación rápida tuve motivación por descubrir cuál podría ser causa de este gran problema social.

Dentro de todos los temas del cáncer escogí la influencia que podrían tener las células endoteliales sobre las células cancerosas de mama, porque era un tema dado por el proyecto *Bojos per la Biomedicina de La Fundació Catalunya La Pedrera* y en concreto, por mi tutora de prácticas.

2. OBJETIVOS

Los objetivos generales de este trabajo son:

- Conocer cómo es el auténtico modo de trabajo de un investigador.
- Profundizar conocimientos sobre la Biomedicina, en concreto, la Oncología.
- Llevar a cabo un trabajo de gran importancia de forma autónoma.
- Contrastar la certeza de la hipótesis.

3. HIPÓTESIS E INTRODUCCIÓN AL TRABAJO

El siguiente trabajo se extiende a partir de la hipótesis de que las células endoteliales pueden influir en el crecimiento de los tumores, así como, facilitarles la recurrencia metastásica después de haber entrado en fase de latencia.

Hoy día, el cáncer es un tema de preocupación que todos podríamos sufrir de manera directa o indirecta.

El cáncer de mama es uno de los cánceres más frecuentes en todo el mundo. Se estima que solamente en España, una de cada ocho mujeres lo desarrollan una vez en su vida

(11). Además, un 30% de las mujeres diagnosticadas en estadios tempranos experimentan una recurrencia del tumor a distancia incluso de años después de haber finalizado el primer tratamiento (13).

Por este motivo, conocer las causas de esta enfermedad resulta esencial para seguir avanzando en el desarrollo de los tratamientos.

Este trabajo tiene como objetivo comprobar una de las posibles causas para que una célula tumoral latente empiece a proliferarse de nuevo.

Debido a que el hueso es el lugar donde las células cancerosas de mama tienden a metastatizar con más abundancia, en este trabajo se comprueba la posibilidad de interacción entre el endotelio de los capilares del tejido óseo con las células de cáncer de mama, con el objetivo de entender si las células de los capilares contribuyen en la gran incidencia de metástasis óseas en este tipo de cáncer.

Se escogió las células endoteliales y no otras del microambiente óseo porque es un tipo de células que presenta una gran variedad de contenido en su secreción, y por lo tanto son más fáciles de ser influenciadas por mutaciones y así estimular a las células cancerosas latentes de su alrededor.

Para poder corroborar la afirmación, se hizo una investigación previa de los conceptos integrados con el fin de conocer más a fondo qué es el cáncer, sus mecanismos de desarrollo, incidencia mundial, distintos tipos y sus posibles causas y mutaciones.

Seguidamente, se introduce el cáncer de mama desde el lugar donde se origina hasta los procesos que se necesita para llegar hasta los huesos. Dentro de los pasos, se destaca la metástasis en los huesos.

Por último, se presenta diferentes conceptos relacionados con el tema como la recurrencia, el microambiente y los vasos sanguíneos y la influencia que pueden tener en cuanto al cáncer.

Tras la parte teórica, se presenta las prácticas que se hizo en el centro de IRB Barcelona guiadas por una estudiante de doctorado visitante. Gracias a ella se pudo realizar dos veces el trabajo, ya que la primera vez se finalizó sin conclusiones por contaminación de las células endoteliales.

En estas prácticas realizadas experimentalmente, usamos células endoteliales

extraídas de pulmones de ratones para incidir en el crecimiento de células de cáncer de mama, también aisladas de este roedor.

MARCO TEÓRICO

I. CÁNCER

1. ¿QUÉ ES EL CÁNCER?

Llamamos cáncer a un conjunto de más de 200 enfermedades (5) que se caracterizan por una proliferación celular descontrolada y con capacidad de diseminarse a otras partes del cuerpo formando la metástasis.

El cáncer, clínicamente denominado neoplasia maligna, es caracterizado por tener una proliferación celular alterada causada por mutaciones en el ADN nuclear, exactamente mutaciones que activan a los oncogenes y desactivan a los genes supresores de tumores (43,72) (ver apartado 2.1).

Estas mutaciones provocan que las células crezcan rápidamente y no se mueran cuando sea necesario. Como consecuencia, las células se acumulan formando una masa anormal de tejido corporal llamada tumor (68) o neoplasia, que en su expansión puede destruir y sustituir a los tejidos normales (Figura 1).

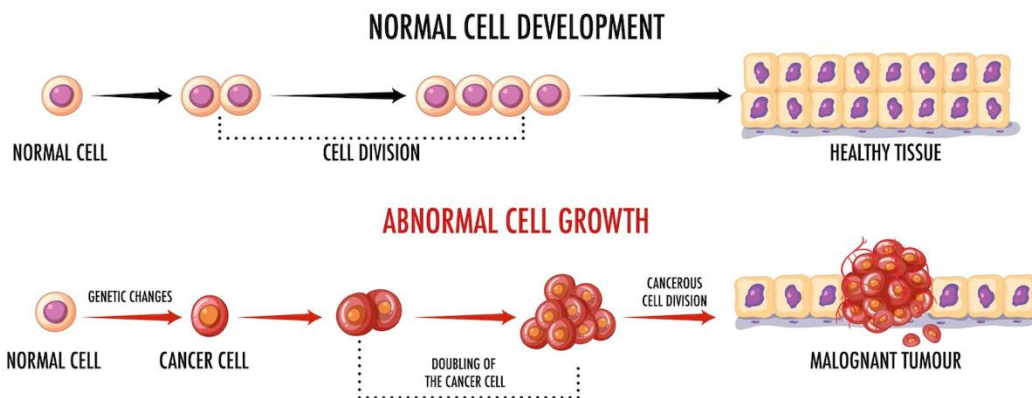


Figura 1. Comparación del desarrollo de células normales y cancerosas. Las células sanas, tras sufrir mutaciones genéticas, pueden transformarse en células cancerosas. Estas se multiplican sin límites y sobresalen del tejido normal formando bultos malignos capaces de metastatizar.

Cada tipo de cáncer tiene sus propias características, diagnósticos, factores de riesgos y tratamientos, y recibe nombre por el lugar primario donde se originó, aunque haya diseminado a otras partes. Así, el cáncer de mama metastatizado en los huesos se sigue llamando cáncer de mama.

Actualmente, el cáncer es un tema de investigación con mucha relevancia, ya que es una de las principales causas de muerte en todo el mundo.

En los últimos años, el número de tumores diagnosticados en España ha ido creciendo constantemente debido al aumento demográfico, las técnicas de detección precoz y el aumento de la esperanza de vida (11).

Sin embargo, el riesgo de la mortalidad ha disminuido de forma considerable gracias a las investigaciones sanitarias, como la investigación sobre las causas y tratamientos.

El cáncer nunca fue una enfermedad moderna. El primer caso prehistórico de cáncer generalmente aceptado es el de un pez de la especie *Phanerosteon mirabile* que vivió hace 300 millones de años, cuyo esqueleto mostraba evidencias claras de un osteoma (cáncer de huesos) (62).

La etimología del cáncer se remonta a la época de los griegos. El origen de la palabra cáncer se atribuye a Hipócrates (460-360 a.C.), el conocido padre de la medicina. Fue el primero en describir los tumores usando los términos *karkinos*, que en griego hacen referencia a “cangrejo” y de ahí nació la palabra “cancer” (en latín) para referirse a

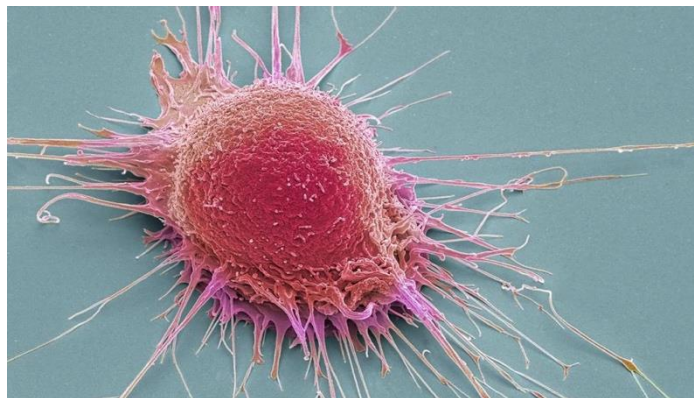


Figura 2. Célula de cáncer de próstata en una imagen de escáner coloreada

tumores y otras lesiones ulcerosas (27).

El motivo por el cual los griegos llamaron así a los tumores, según algunos autores, es que algunos son tan duros como el caparazón de un cangrejo y otros recuerdan a las pinzas del propio cangrejo (Figura 2).

1.1 CARÁCTERÍSTICAS DE CÉLULAS CANCEROSAS

Aunque cada tipo de célula tumoral presenta características distintas con sus propias manifestaciones clínicas, pronósticos, tratamientos y desarrollo, todas ellas comparten una serie de propiedades. A esto le llamamos sellos distintivos del cáncer (en inglés *hallmarks of cancer*). Algunas de esas propiedades son (17,26):

1. **Alteración de los genes implicados en la proliferación celular:** las células cancerosas pueden activar su división celular sin que haya señales de crecimiento. Además, entran en un proceso inmortal que les permite dividirse de forma ilimitada, formando así un tumor (excepto cánceres hematológicos) que va aumentando de tamaño.
2. **Pérdida de sensibilidad respecto a señales externas:** tienen la capacidad de ignorar o ser insensibles a los estímulos que pueden bloquear el proceso de la división celular. Las células normales obedecen a señales que les indican cuándo han llegado a su límite y causarán daño si crecen más.
3. **Inhibición interna** de los mecanismos que inducen la muerte programada (apoptosis).
4. **Capacidad de perder proteínas** que las fijan a la zona donde originalmente se encontraba, de esta forma se separan de las células vecinas y forman la metástasis.
5. **Capacidad de estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos** por el proceso de angiogénesis, lo cual les facilita nutrientes y oxígeno para ayudar al crecimiento y desarrollo.
6. **Camuflaje ante el sistema inmunitario:** pueden escapar de la destrucción por los linfocitos pasando desapercibidas como si fueran fibroblastos.
7. En comparación con las células sanas, las células cancerosas son más **blandas**, lo cual podría estar relacionado con la facilidad que tienen de deformarse para penetrar tejidos y entrar en el torrente sanguíneo (39).

1.2 TIPOS DE TUMORES

Según la definición del *Oxford Languages*, un tumor es una masa de tejido corporal cuyas células sufren un crecimiento anormal sin ninguna función fisiológica, pero con tendencia a invadir otras partes del cuerpo (118).

A diferencia del cáncer, cuando hablamos de tumores, incluimos dos tipos; los benignos y malignos (Figura 3) (93):

-**Benignos**: Son conocidos como verrugas cuya masa celular crece sin límites, pero no son cancerosas, ya que ni se diseminan a otras partes del cuerpo ni invaden otros tejidos vecinos.

-**Malignos**: También llamados cancerosos, sus células tumorales tienen tendencia a diseminarse a otros lugares, invadir las células vecinas y formar nuevos tumores mediante la metástasis a partir de la sangre o el sistema linfático. En fases más avanzadas, pueden provocar hasta la muerte.

Benign & Maligant Tumor

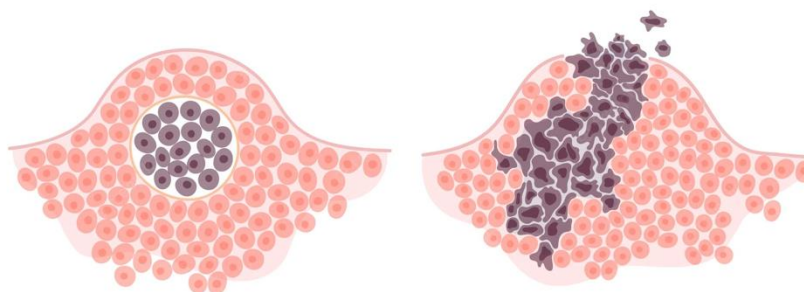


Figura 3. La imagen de la derecha muestra un tumor benigno donde las células se mantienen en un lugar determinado. La imagen de la izquierda simula a un tumor maligno capaz de diseminarse a otras partes.

Esta diferencia de tumores no es una invención de nuestra época. Según ha quedado registrado en papiros del 1500 a.C. (62), los egipcios ya diferenciaban los tumores malignos de los benignos.

2. CAUSAS DEL CÁNCER

2.1 MUTACIONES Y CÁNCER

Los cánceres o tumores malignos son causados por mutaciones en los genes que se encuentran en el ADN de cada una de los 37,2 billones de células de nuestro cuerpo. Los genes son las distintas secuencias lineales de nucleótidos en un ADN. Son considerados como la unidad de herencia y la unidad básica del almacenamiento de informaciones necesarias para especificar los rasgos biológicos y fisiológicos. Según el Proyecto Genoma Humano, contamos aproximadamente con unos 30.000 genes distintos que se encuentran en los cromosomas. Mientras que 20.000 de ellos pueden codificar a proteínas, otros dan lugar a moléculas de ARN que tienen algún papel funcional (58,115).

Cada uno de los genes codifican a proteínas que desempeñan una función específica en nuestro cuerpo, gracias a su exclusiva estructura tridimensional relacionada con el orden de los nucleótidos.

Cuando los genes sufren mutaciones, modifican los nucleótidos y generan proteínas que adoptan formas anormales y, por lo tanto, pierden su funcionalidad.

Una mutación aislada no causa cáncer porque el cáncer se produce a partir de mutaciones múltiples que se van produciendo a lo largo de la vida. Es por este motivo que las personas de edad más avanzada tienen más posibilidad de padecer algún cáncer, debido a que han tenido más oportunidades para que se acumulen diferentes mutaciones.

Existen dos tipos básicos de mutaciones genéticas:

- **Mutaciones adquiridas:** son la causa principal del cáncer. Son mutaciones que afectan a una o varias células en particular durante la vida de una persona. Los cánceres causados por mutaciones adquiridas se denominan cánceres esporádicos y no son hereditarios, ya que la alteración genética no afecta a todas las células. Pueden estar causadas por factores de riesgos explicados en el punto 2.3.
- **Mutaciones de la línea germinal:** son mutaciones que afectan a las células

reproductivas y se transmiten directamente de padres a hijos en el momento de la concepción. A medida que el embrión crece y se divide en millones de células, todas ellas presentarán aquella mutación. Estas personas tienen más probabilidad de desarrollar cáncer por la acumulación de nuevas mutaciones, además de la heredada, dando lugar a un cáncer hereditario. Aunque es menos frecuente, todos los cánceres pueden ser hereditarios.

2.2 GENES VINCULADOS EN EL DESARROLLO DE UN CÁNCER

- **Genes supresores de tumores:** llamados también antioncogenes. Como su nombre indica, son secuencias del ADN que codifican proteínas que ayudan a las células a reducir la probabilidad de transformarse en cancerosas, inhibiendo las proliferaciones celulares excesivas (59). Se encuentran en todas las células y juegan un papel fundamental en la división celular.

Si un gen supresor de tumor se muta y la proteína pierde su actividad funcional, la célula puede, entonces, comenzar a dividirse sin control y contribuir a la génesis del tumor (Figura 4) (60).

Algunos ejemplos de genes supresores de tumores son BRCA1, BRCA2, y p53 o TP53.

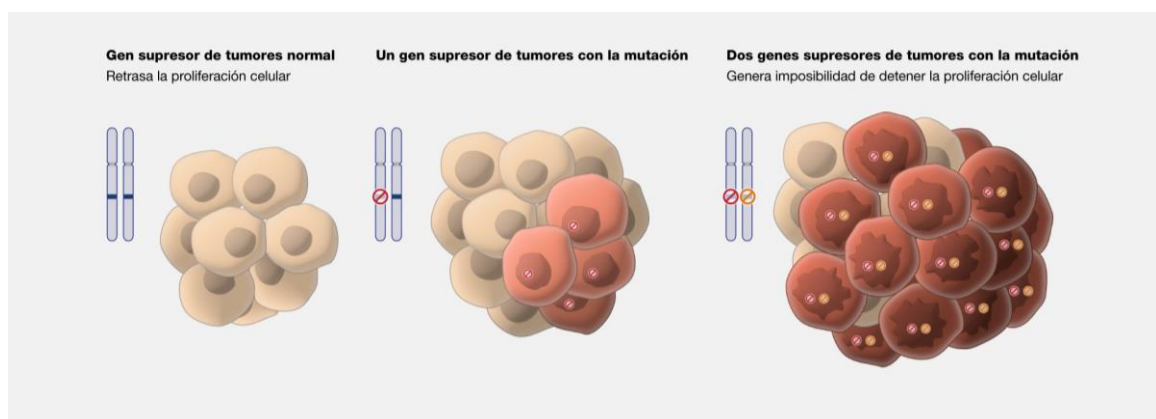


Figura 4. Si el gen supresor de tumores se muta, las células mutadas proliferan sin control.

- **Oncogenes:** son genes mutados que provienen de un gen normal conocido como protooncogén que se encarga de promover el crecimiento y la división celular

(como HER-2) (80). Cuando los protooncogenes funcionan correctamente, ayudan a las células a dividirse y a repararse de forma equilibrada. Sin embargo, cuando sufren una mutación y se convierten en oncogenes (86), comienzan a hacer copias sin control (sobreexpresión), por lo cual, la célula puede empezar a dividirse de forma descontrolada.

Como consecuencia, pueden llegar a fallar los mecanismos de reparación, favoreciendo el crecimiento y la supervivencia de un tumor (**Error! Reference source not found.**).

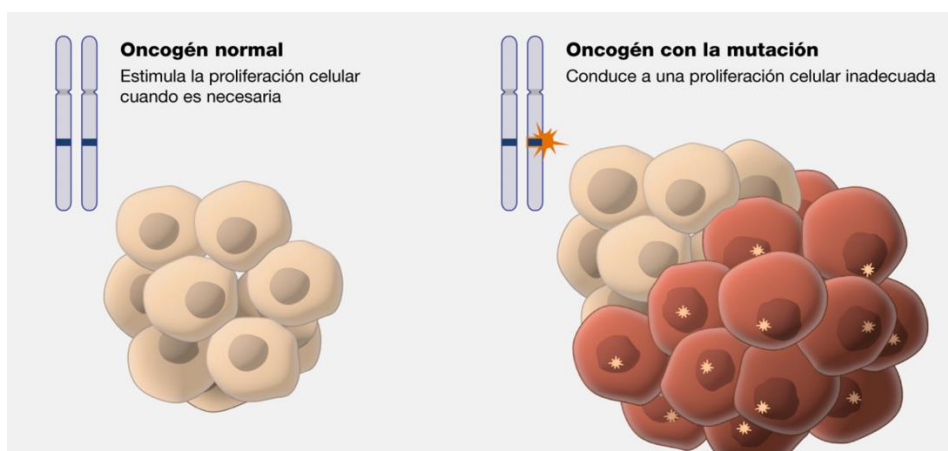


Figura 5. Los oncogenes con mutación pueden conducir a una proliferación celular inadecuada.

Además de estos dos genes también existen los genes de reparación que ayudan a reestablecer las alteraciones del material genético:

- **Genes de reparación del ADN:** son genes que ayudan a la reparación de los errores durante la transcripción del ADN. Algunos de los genes supresores de tumores también funcionan como genes de reparación del ADN, como son BRCA1, BRCA2, y p53 o TP53.

Si hubiera una mutación en genes de reparación, los errores que se producen a lo largo de la transcripción permanecerán sin corregir. Como resultado, activará una serie de consecuencias en cadena dando lugar a un tumor.

Finalmente, ciertas investigaciones han demostrado que muchos tipos de cáncer no están vinculados con un gen específico, ya que probablemente el cáncer

involucra múltiples mutaciones genéticas.

2.3 FACTORES DE RIESGO

Como he mencionado a priori, todos los cánceres son causados por mutaciones en el material genético de una célula o un grupo de células.

Actualmente no se ha identificado el factor en concreto que provoca estas mutaciones, pero sabemos que hay una serie de factores que pueden aumentar el riesgo de desarrollar mutaciones, a los cuales llamamos factores de riesgo.

Existen factores de riesgo que pueden ser modificables, como el tabaquismo, pero hay otros que no, como la edad y la genética (Figura 6) (23,53). Podemos clasificarlos en los siguientes tipos (117):

-Factores biológicos: son las características físicas como el sexo, la raza o el grupo étnico, la edad y el color de la piel.

-Factores genéticos: están relacionados con mutaciones específicas heredadas de miembros familiares.

-Factores relacionados con la conducta: son los hábitos personales como fumar, beber alcohol, la dieta, etc.

-Factores ambientales: son una serie de factores que nos rodea como es la radiación UV, la contaminación, la exposición pasiva al humo del tabaco, etc.

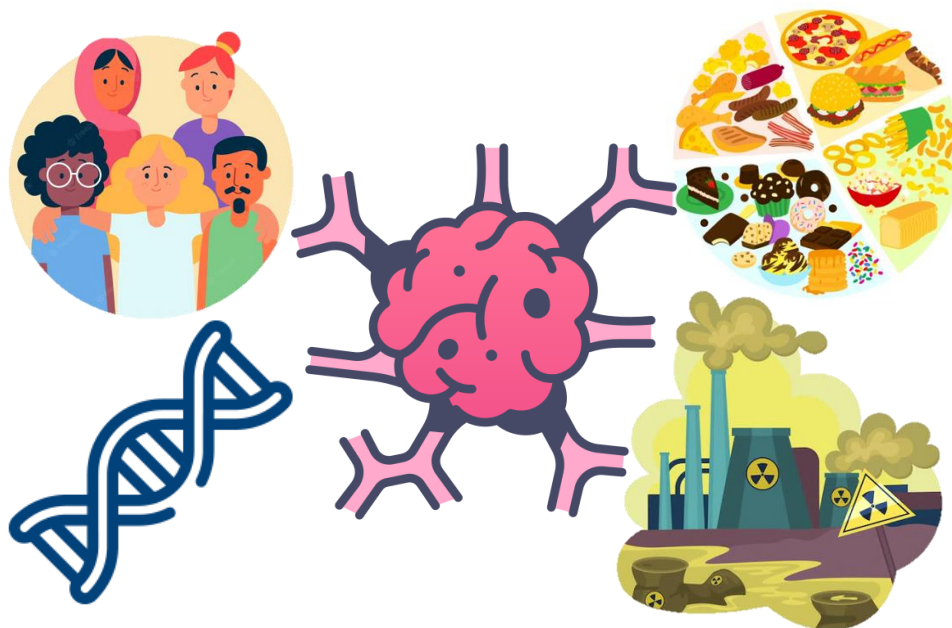


Figura 6. Distintos factores de riesgo pueden causar mutaciones en las células favoreciendo así la aparición del cáncer

Los orígenes o causas del cáncer son distintos según el tipo de cáncer. No obstante, tener uno o varios factores de riesgo no significa tener esta enfermedad. De hecho, muchas personas tienen cáncer sin haber tenido ni haber estado expuestas a ningún factor de riesgo conocido.

Por un lado, tenemos factores de riesgo que aumentan la posibilidad de tener cáncer, pero por otro, también nos encontramos con ciertos factores que están relacionados con un riesgo menor de cáncer; son los llamados factores protectores o factores de protección.

Por ejemplo, al contrario de tener antecedentes con alcoholismo, sería factor de protección crecer en una familia sin esos antecedentes (85).

3. TIPOS DE CÁNCER

En el día de hoy, hemos distinguido más de 200 enfermedades que las englobamos bajo el nombre de cáncer. Algunas comparten características, pero otras son completamente distintas.

Se distinguen los cánceres en dos categorías diferentes (Figura 7) (49):

-Cánceres hematológicos: también conocidos como cánceres de la sangre. Afectan a los glóbulos sanguíneos y no forman tumores sólidos. Algunos ejemplos son la leucemia, el linfoma y el mieloma múltiple (12).

-Cánceres de tumor sólido: son masas anormales de células que se desarrollan en un órgano, tejido o parte del cuerpo. Pueden ser benignos o malignos (119).

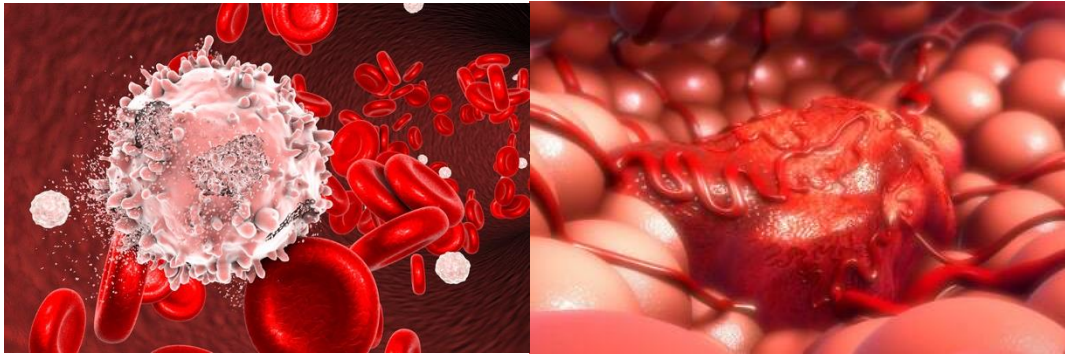


Figura 7. Célula cancerosa hematológica que viaja por el sistema circulatorio y células de un tumor sólido que se establece en un tejido

Además, según la Clasificación Internacional de Enfermedades para Oncología existen 6 tipos diferentes de cánceres según el tejido (38):

1. **Carcinoma:** Es el tipo de cáncer más habitual, representando el 80% de la totalidad de los cánceres. Se origina en las células epiteliales que cubren la superficie entera del cuerpo, así como estructuras internas y las cavidades.
 - 1.1 **Adenocarcinoma:** Es el tipo de cáncer que se origina en los tejidos glandulares formados por células con capacidad secretora (7).
Ej. Adenocarcinoma de mama, de pulmón, de próstata, de útero y de páncreas.
 - 1.2 **Carcinoma de células escamosas o carcinoma epidermoide:** Es el conjunto de cánceres que empiezan en las células escamosas (células epiteliales planas) que no tienen capacidad secretora (19).
Ej. Cáncer de pulmón o de piel.
2. **Sarcoma:** es el tipo de cáncer que tiene como lugar primario los huesos y los tejidos blandos, incluyendo los músculos, el tejido adiposo, los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos y los tejidos fibrosos.
3. **Leucemia:** se empieza a formar cáncer en la médula ósea, tejido formador de la sangre. Este tipo de cánceres son cánceres hematológicos y no sólidos
4. **Linfoma:** cáncer que se origina en las células del sistema inmunitario, en concreto, en los linfocitos (células T o células B). Es un tipo de cáncer hematológico que se

produce cuando los glóbulos blancos empiezan a crecer sin control y se acumulan en los ganglios linfáticos (92).

5. **Mieloma múltiple:** es un tipo de cáncer de sangre que afecta a la médula ósea que representan un 10-15% de todos los cánceres hematológicos. Se inicia en las células plasmáticas, un tipo de células inmunitarias.
6. **Tumor cerebral y de la médula espinal:** se originan cuando hay un crecimiento anormal de células cerebrales o de la médula espinal y reciben nombres distintos en función del tipo de célula y del primer lugar donde se localiza el tumor en el sistema nervioso central.

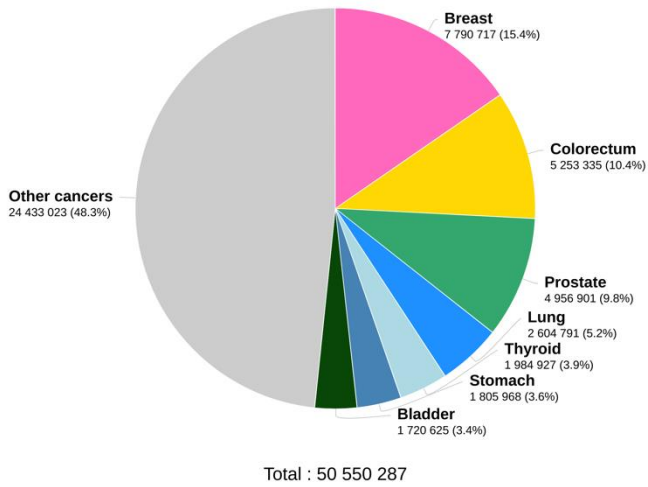
4. LAS CIFRAS DEL CÁNCER

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo.

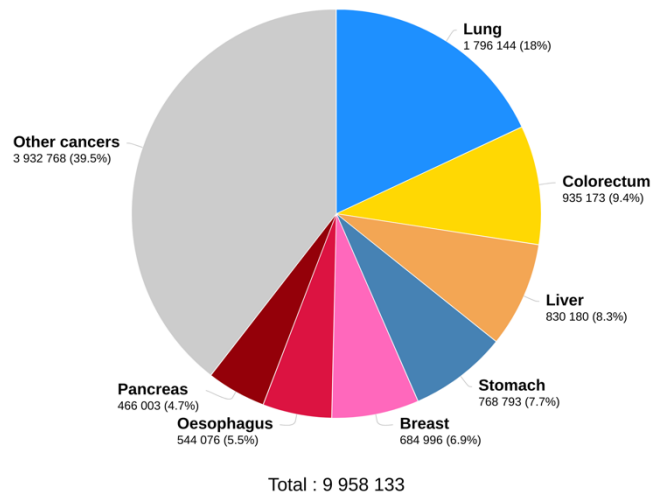
En el año 2020, la prevalencia¹ a 5 años a nivel mundial era más de 50 millones y se registraron casi 10 millones de defunciones debidos a esta enfermedad, es decir, aproximadamente 1 de cada 5 pacientes fallecieron por cáncer (Gráfica 1 y Gráfica 2)(15).

¹ Número de individuos que padecen una característica determinada en un tiempo determinado.

Estimated number of prevalent cases (5-year) in 2020, worldwide, both sexes, all ages



Estimated number of deaths in 2020, worldwide, both sexes, all ages



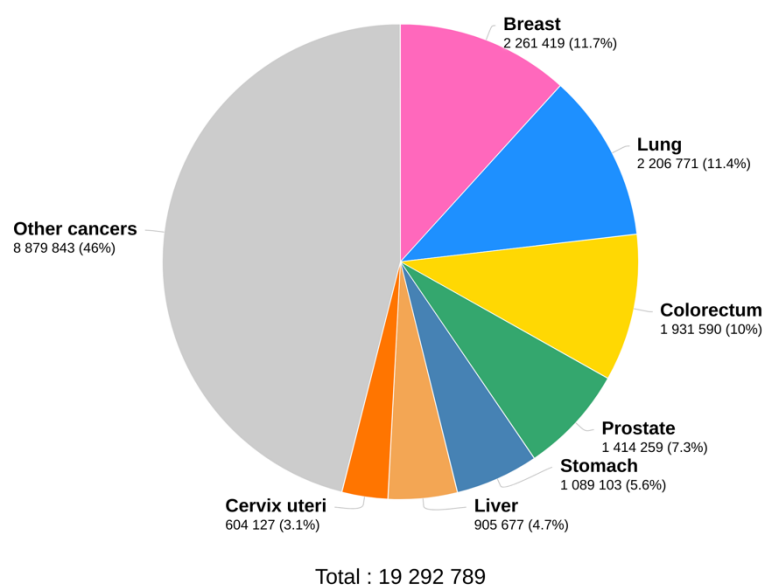
Gráfica 1. El número estimado de casos prevalentes (5 años) en 2020 fue 50.550.287. El cáncer de mama representa el mayor porcentaje seguido de cáncer colorrectal, de próstata, de pulmón, de tiroides, de estómago, de vejiga y otros tipos ordenados de más a menos prevalencia.

Gráfica 2. El número estimado de fallecimientos en 2020 fue 9.958.133. El cáncer con mayor mortalidad fue el cáncer de pulmón ocupando el 18% del total. Seguidamente, está el cáncer colorrectal, el cáncer de hígado, de estómago, de mama, de esófago, de páncreas y otros tipos ordenados de mayor a menor mortalidad.

En ese mismo año, la incidencia² del cáncer fue de unos 19 millones (Gráfica 3) (15). Sin embargo, se estima que, en 20 años, la cifra aumentará hasta 27 millones debidos a tabaquismo, obesidad, alcoholismo, dieta desequilibrada y falta de actividad física.

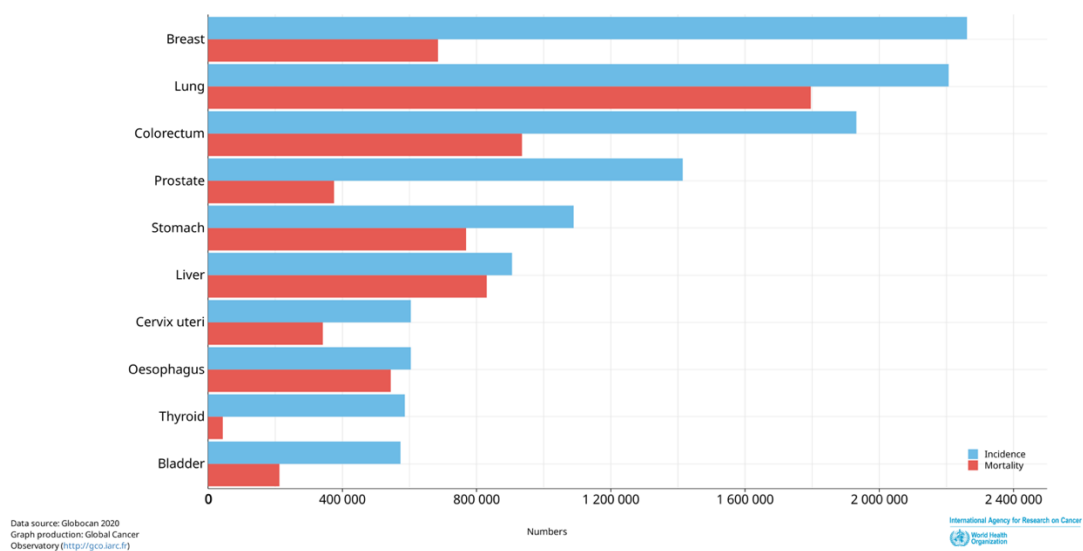
² Número de nuevos casos en un determinado tiempo.

Estimated number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages



Gráfica 3. Se muestra el número estimado de nuevos casos en 2020, 19.292.789. El cáncer de mama fue el que tuvo más casos diagnosticados, seguido de cáncer de pulmón, colorrectal, de próstata, de estómago, de hígado, de cuello uterino y otros tipos ordenados de mayor a menor incidencia.

Estimated number of incident cases and deaths worldwide, both sexes, all ages



Gráfica 4. En esta gráfica de barras se muestra una comparación entre el número de casos incidentes y el número de la mortalidad en todo el mundo en el año 2020.

II. CÁNCER DE MAMA

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama, conocido por los especialistas como carcinoma de mama, es un tipo de cáncer sólido que consiste en la proliferación acelerada y descontrolada de células situadas en la mama con capacidad de diseminarse a otras partes del cuerpo (44).

Puede originarse a partir de cualquier tipo celular que compone el tejido mamario. Sin embargo, los tumores más frecuentes son los que se originan en el epitelio que reviste los conductos mamarios, ya que el 80% de todos los tumores malignos corresponde a carcinomas ductales infiltrantes (104) (Figura 8).

A pesar de su alta incidencia, es uno de los cánceres que cuenta con grandes probabilidades de curación si se detecta a tiempo, ya que la cirugía actual es capaz de extirpar casi por completo el tumor original y con tratamientos quimioterapéuticos complementarios se puede anular totalmente el crecimiento del tumor.

De este modo, es importante que se organicen campañas de divulgación, detección precoz y activar la alerta dentro en la población para evitar los factores de riesgos escondidos (121).

El cáncer de mama no es una enfermedad reciente, sino que en los primeros escritos sobre el cáncer ya encontramos ocho casos registrados. Un documento escrito en el siglo XVII a.C. por Imhotep, un físico y arquitecto egipcio, describe ocho casos incurables de cáncer de mama en Egipto extraídos por cauterización (62).

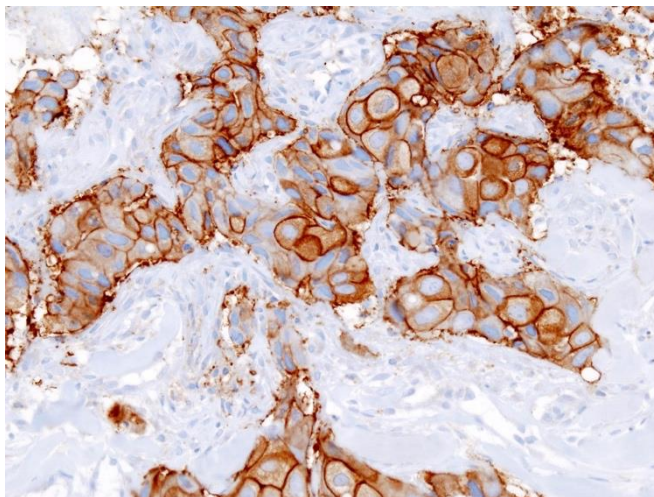
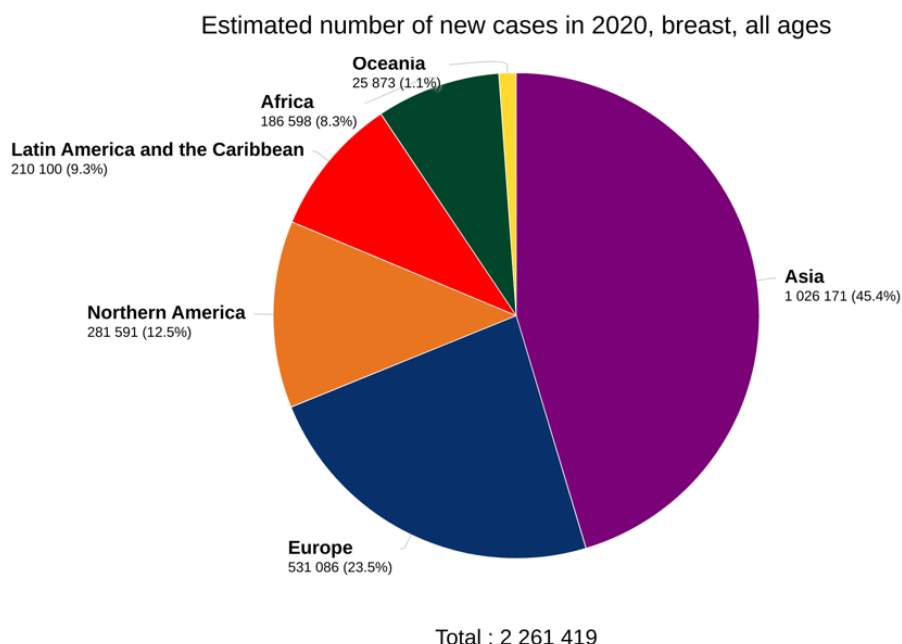


Figura 8. Imagen histopatológica de un carcinoma ductal infiltrante de mama

2. LAS CIFRAS DEL CÁNCER DE MAMA

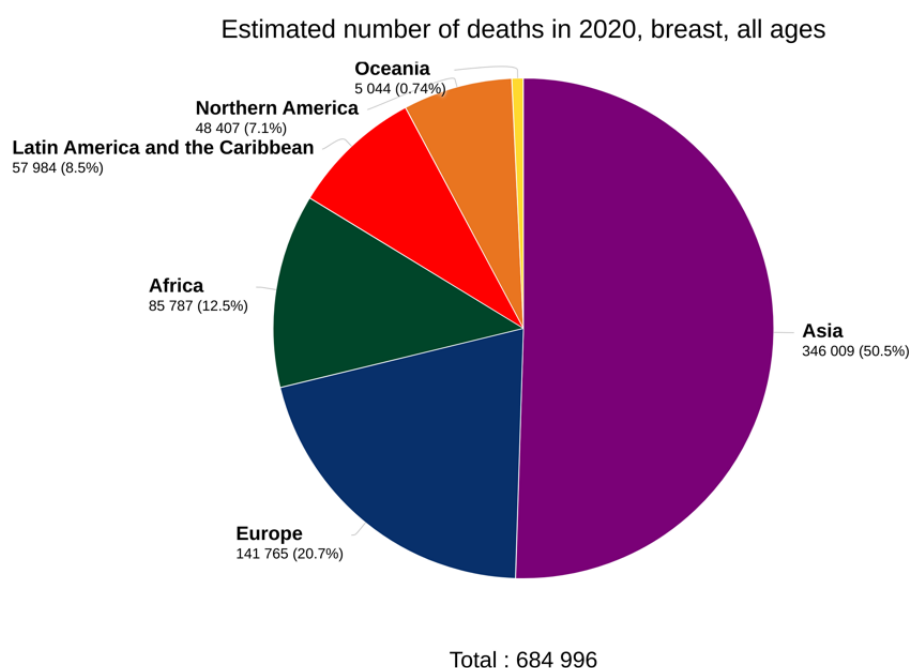
Según la Organización Mundial de la Salud, en el año 2020 la incidencia mundial del cáncer de mama fue de unos 2.2 millones, siendo el cáncer más común (Gráfica 3). Se estima que el cáncer de mama puede afectar a 1 de cada 12 mujeres en algún momento de su vida.

En la siguiente gráfica (Gráfica 5) se muestra el número estimado de casos nuevos registrados en 2020 en mujeres de todas las edades.



Gráfica 5. El número estimado de casos nuevos en 2020 en mujeres de todas las edades fue de 2.261.419. Asia es el continente que presenta la mayor incidencia, ocupando casi la mitad del total. Seguidamente están Europa, América del norte, Latinoamérica, África y Oceanía, en orden de mayor a menor incidencia.

En 2020, alrededor de 685.000 mujeres fallecieron como consecuencia de esta enfermedad (Gráfica 6). Sin embargo, la mayoría de las muertes se encuentran en países de ingresos bajos y medianos como la India y países de Sudáfrica, donde la supervivencia al cáncer de mama a cinco años es del 66% y el 40%, mientras que en los países más desarrollados es más del 90%, sin tener en cuenta los casos con metástasis (9).

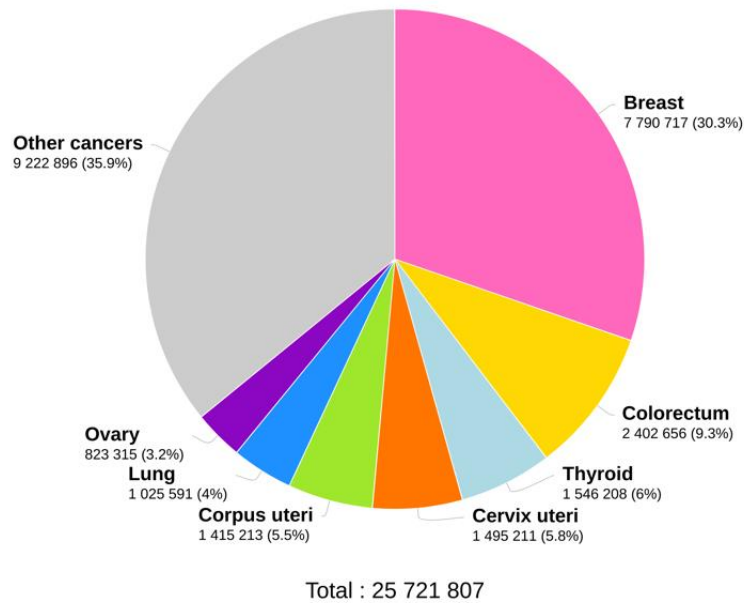


Gráfica 6. Se muestra el número estimado de fallecimientos por cáncer de mama en el año 2020 en mujeres de todas las edades. Asia, siendo el continente con mayor incidencia, cuenta con la mayor mortalidad seguido de Europa. Sin embargo, África que contaba con menos casos nuevos que América, presenta mayor mortalidad que allí. Por último, Oceanía es el que presenta la menor tasa de mortalidad.

Finalmente, el cáncer de mama es el cáncer con mayor prevalencia en el mundo debido a su alto porcentaje de supervivencia.

Gracias a los programas de detección precoz combinados con diferentes tipos de terapias, a finales del 2020, 7,8 millones de mujeres que fueron diagnosticadas con cáncer de mama hacía cinco años permanecían con vida, lo que hace que la prevalencia de este cáncer ocupe el 30.3% de todos los casos (Gráfica 7) (9).

Estimated number of prevalent cases (5-year) in 2020, worldwide, females, all ages



Gráfica 7. La gráfica muestra el número estimado de casos prevalentes (5 años) en 2020 que fue de 25.721.807 casos. Se observa que el cáncer de mama es el cáncer más prevalente, seguido de cáncer colorrectal, de tiroides, de cuello útero, de cuerpo útero, de pulmón y de ovarios.

En España se diagnosticaron 33.307 casos nuevos de cáncer de mama en el año 2019 y con más de 90% de posibilidad de estar libre de recaída a los cinco años tras el diagnóstico (105).

3. ESTRUCTURA DE LA MAMA

El seno, llamado vulgarmente mama, es cualquiera de las dos glándulas mamarias que se encuentra en la parte anterosuperior del pecho, tanto en hombres como mujeres. Estas estructuras solo maduran en los cuerpos femeninos, y tras la maduración adquieren una forma circular que se extiende transversalmente desde los bordes del esternón hasta la línea axilar media, y verticalmente desde la 2ª hasta la 6ª costilla (100).

Las mamas están situadas en el tejido subcutáneo que recubre los músculos pectorales mayor y menor. Además, tienen una función exclusivamente femenina de sintetizar, secretar y proporcionar leche a los recién nacidos, ya que en los hombres consisten

solo en unos conductos pequeños o cordones epiteliales (Figura 9 y Figura 10) (3,36).

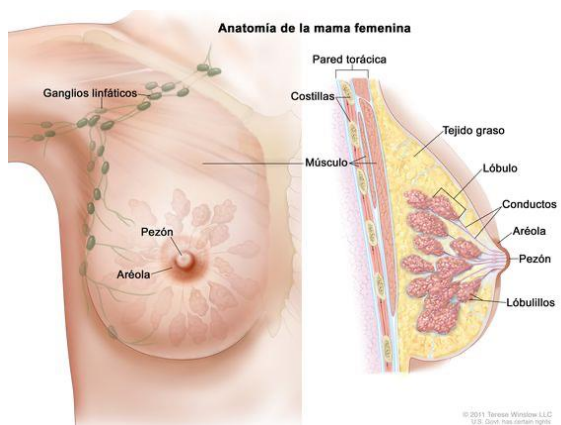


Figura 9. Anatomía de la mama femenina

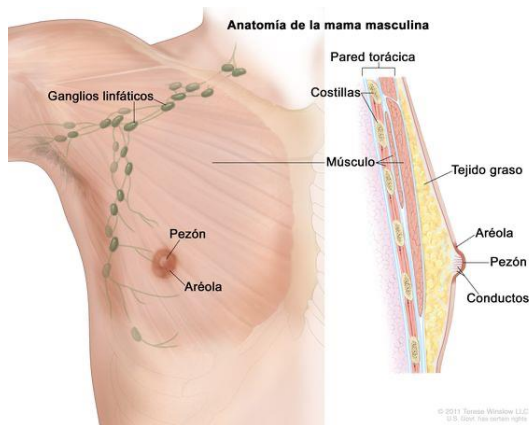


Figura 10. Anatomía de la mama masculina

Cada una de las mamas femeninas maduras está compuesta principalmente por las siguientes estructuras (Figura 11):

-Lóbulos: son las glándulas que producen la leche materna. Cada mama tiene entre 15-20 lóbulos distribuidos en forma de pétalos (4). Están separados por ligamentos de Cooper (tejido conectivo fibroso) y están formados por estructuras más pequeñas llamadas lobulillos. Los conductos secretores de los lóbulos se llaman conductos galactóforos que confluyen en el seno galactóforo que comunica el interior con el exterior a partir del pezón. Los cánceres que comienzan en los lóbulos o lobulillos se denominan cánceres lobulillares.

-Conductos galactóforos: son pequeños canales que conducen la leche desde los lóbulos hasta el pezón. Los cánceres que tienen su origen en los conductos reciben el nombre de cánceres ductales y es el lugar más común para el cáncer de mama (50).

-Pezón: es un área pequeña situado en el centro de la mama en el cual se encuentra una abertura donde los conductos se unen y se convierten en conductos más grandes para la salida de la leche. El pezón está rodeado por una piel más gruesa y más oscura llamada areola. La unión de ambas estructuras recibe el nombre de complejo areola-

pezón. La areola contiene glándulas sebáceas³, sudoríparas y mamarias modificadas (glándulas de Montgomery⁴). La enfermedad de Paget del seno es un tipo menos común de cáncer de mama que puede comenzar en el pezón.

-Tejido adiposo y conjuntivo (estroma): rodean los ductos y los lóbulos y los mantienen en su lugar. El tumor de filoides es un tipo de cáncer de mama que puede iniciarse en el estroma. Tras la menopausia, la glándula mamaria se atrofia y el volumen de la mama depende básicamente del tejido adiposo.

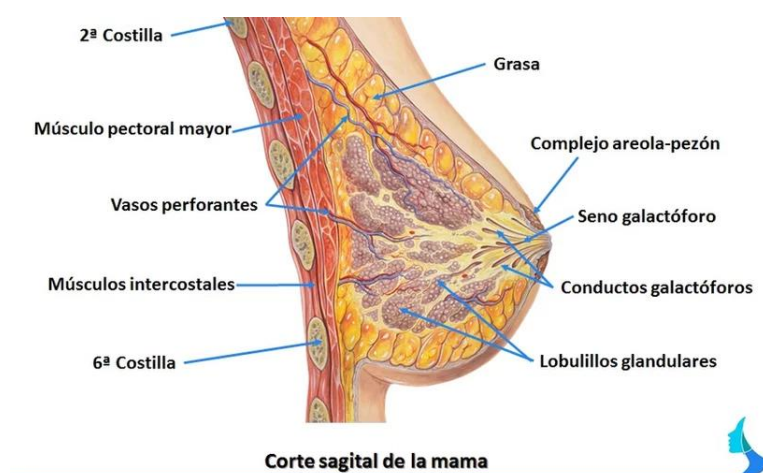


Figura 11. Se muestran las diferentes estructuras de una mama con su nombre

-Vasos sanguíneos: el oxígeno y los nutrientes llegan a partir de la sangre de las arterias y los capilares. Los vasos del tejido mamario proceden principalmente de los vasos perforantes de la arteria y venas mamarias internas (situados a los lados del esternón), de los vasos torácicos laterales y de las arterias intercostales (Figura 12).

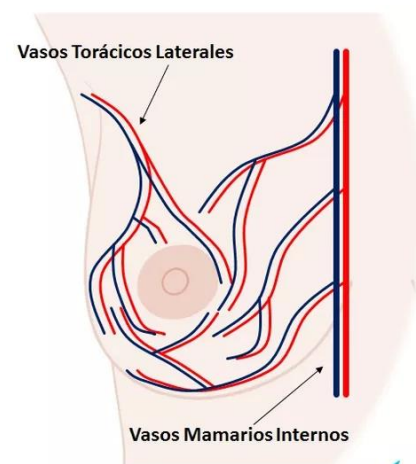


Figura 12. Vascularización de la mama

³ Glándula sebácea: Situada en la dermis media y compuesta de adipocitos que tienen la función de sintetizar el sebo, una secreción lipídica cuya función es la de "lubricar" y proteger la superficie de la piel (33).

⁴ Glándula de Montgomery: glándulas sebáceas localizadas en las areolas encargadas de producir secreciones sebáceas para mantener el pezón y la areola lubricados y protegidos. Aumentan su tamaño durante la lactancia.

-Vasos linfáticos y ganglios linfáticos: las mamas también presentan vasos linfáticos que drenan el líquido intersticial a través de los vasos linfáticos interlobulillares que confluyen formando el plexo linfático subareolar. La linfa es transportada hasta los ganglios linfáticos situados principalmente debajo de las axilas, aunque también pueden estar alrededor de los vasos mamarios internos o supraclaviculares.

La linfa es un fluido acuoso que contiene sustancias de desecho, líquido intersticial y células inmunitarias para combatir las infecciones. Es transportada hasta los ganglios linfáticos, pequeñas agrupaciones en forma de frijoles que filtran la linfa y contienen células inmunitarias.



Figura 13. Se muestra la distribución de vasos linfáticos y ganglios linfáticos alrededor de la mama

El sistema linfático, parte del sistema inmunitario, es una de las vías por la cual tienden a propagarse los carcinomas de mama, ya que las células de cáncer de mama que ingresan en los vasos linfáticos pueden crecer en los ganglios linfáticos y posteriormente diseminarse a otras partes del cuerpo (Figura 13) (77).

-Nervios: podemos encontrar cientos de terminaciones nerviosas en los pezones, lo que los hace extremadamente sensibles al tacto y la excitación.

4. TIPOS DEL CÁNCER DE MAMA

Existen diferentes tipos de cáncer de mama (Figura 14) (113), dependiendo de (57):

- 1- El tipo de células del seno que se hayan vuelto cancerígenas.
- 2- El grado de extensión de la enfermedad.
- 3- Su evolución a lo largo del tiempo.

4.1 CÁNCER DE MAMA IN SITU O NO INVASIVO

En el cáncer de mama no invasivo, las células cancerosas se encuentran en el lugar originario (lobulillos o conductos galactóforos) de la mama y no tienen capacidad de diseminarse al tejido circundante o a otras partes del cuerpo. El término en latín “in situ” significa “en su lugar original”.

Dentro de este tipo encontramos el carcinoma lobulillar in situ y el carcinoma ductal in situ. Son llamados carcinomas porque el lugar original es en el tejido epitelial (112).

-Carcinoma lobulillar in situ (CLIS): es una afección poco común en la que se forman células anormales en las glándulas mamarias (lobulillos). El CLIS no es considerado como cáncer porque las células no se vuelven invasivas si no se tratan, aunque las mujeres que presentan carcinoma lobulillar in situ tienen un mayor riesgo de sufrir cáncer mamario invasivo a posteriori (20).

-Carcinoma ductal in situ (CDIS): se origina por la presencia de células anormales en los conductos galactóforos de la mama. Es considerado la forma más temprana del cáncer de mama. El CDIS no es invasivo, lo cual significa que no se ha diseminado fuera del conducto mamario y tienen un riesgo bajo de volverse invasivo (18).

4.2 CÁNCER DE MAMA INVASIVO O INFILTRANTE

En el cáncer de mama invasivo, las células cancerosas se han propagado al tejido mamario circundante y tienen capacidad de diseminarse a otras partes del cuerpo,

pero reciben el nombre por el lugar originario (Figura 14). Los tipos más comunes son el carcinoma ductal invasivo y el carcinoma lobulillar invasivo (112).

-Carcinoma lobulillar invasivo: se inició en los lobulillos de la mama y se ha desplazado hasta el tejido circundante. Es la segunda forma más común del cáncer de mama invasivo, representando del 10% al 15% del total de los casos. Al ser invasivo implica que las células cancerosas se han alejado previamente del lóbulo inicial y tienen el potencial de propagarse hacia los ganglios linfáticos y a otras áreas (21).

-Carcinoma ductal invasivo (CDI): Es el tipo de cáncer de mama más común, no solamente en mujeres sino también en cáncer de seno en los hombres. Ocurre en 7 u 8 de cada diez mujeres diagnosticadas, es decir, entre un 70-80%.

En CDI, el tumor se origina en los conductos galactóforos, conductos que conducen la leche materna hasta la abertura del pezón. Al ser invasivo, este tipo de tumor maligno tiene facilidad de diseminarse hacia los ganglios linfáticos y posteriormente a otras partes.

Además de estos tipos más frecuentes también existen otros, como la enfermedad de Paget, carcinoma inflamatorio y otros que son menos comunes entre la población en general.

-Enfermedad de Paget: Es un tipo poco común que representa sólo alrededor del 1% al 3% de todos los casos de cáncer de mama. Se origina en los conductos del seno y se propaga hacia la piel del pezón y después hacia la areola. La mayoría de los casos con esta enfermedad también presentan uno o dos tumores dentro del propio seno, carcinomas ductales in situ o cánceres invasores.

El nombre de Paget es en honor al médico británico del siglo XIX, Sir James Paget, quien observó una relación entre los cambios en el pezón y el cáncer de seno (40).

-Carcinoma inflamatorio de la mama (IBC⁵): Aunque es un tipo muy poco frecuente, menos del 3% de los casos, desgraciadamente es sumamente agresivo y con una alta tasa de mortalidad al no ser detectado a tiempo. A menudo es un tipo de carcinoma ductal invasivo, pero se diferencia de otros tipos de cáncer de seno por sus síntomas, pronósticos y tratamientos. Como su nombre indica, el IBC provoca síntomas de inflamación como hinchazón y enrojecimiento causados por el bloqueo de los vasos linfáticos por parte de las células cancerosas.

Aparecen con antelación síntomas de celulitis, conocida vulgarmente como “piel de naranja”. Aunque la celulitis es normal en zonas como glúteos o piernas, en los senos suele ser una señal de alarma, ya que es causada por la presencia excesiva de células malignas que se encuentran obstruyendo los vasos linfáticos en la dermis de la mama.

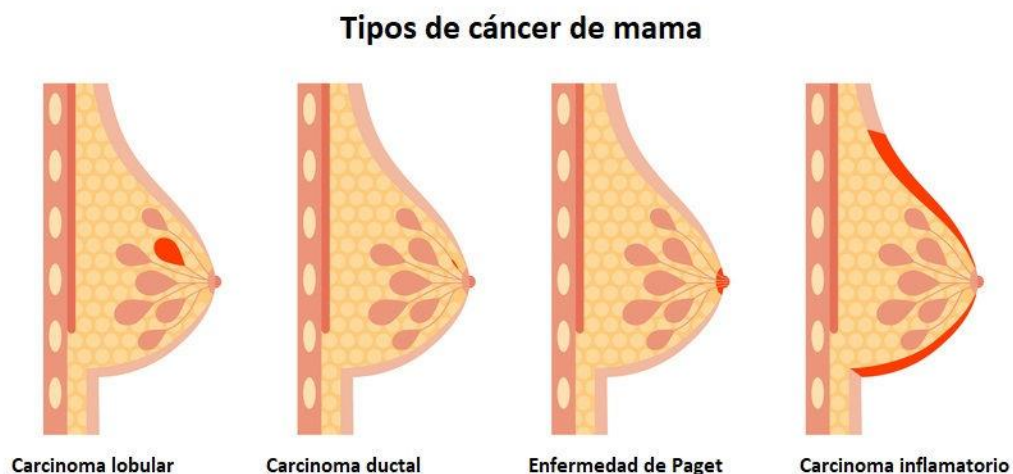


Figura 14. La imagen muestra diferentes tipos del cáncer de mama según el lugar donde se origina.

4.3 SUBTIPOS MOLECULARES

Aunque tradicionalmente siempre se ha clasificado el cáncer de mama según su morfología e histología, estas clasificaciones no son suficientes para la gran heterogeneidad que existe entre cada cáncer de mama que se desarrolla en las distintas personas, ya que cada cáncer tiene sus expresiones genéticas distintas según el paciente, independientemente del lugar de comienzo.

⁵ IBC: Inflammatory Breast Carcinoma

Gracias al desarrollo de técnicas más sofisticadas en los últimos años, se ha podido analizar los genes de cada cáncer de mama, lo cual es esencial para mejorar los tratamientos, incluyendo la quimioterapia.

Estas técnicas han dado lugar a una clasificación más precisa del cáncer de mama según el estado del receptor hormonal del cáncer. Esto implica la identificación de receptores de estrógenos y de progesterona que se encuentran o no en la superficie de las células cancerosas.

Actualmente, en las clínicas se usa la clasificación conocida como subtipos intrínsecos sustitutos (54), mostrados en la siguiente tabla.

Tabla 1. Clasificación intrínseca sustituta.

Subtipo	Perfil de expresión de receptores hormonales	Grado histológico	Índice de proliferación (expresión de Ki-67)	Respuesta al tratamiento	Pronóstico	Porcentaje de casos por subtipo (%)
Triple negativo	ER- PR- HER2-	Alto grado	Alto (~14%)	No se tiene una terapia específica	Malo	10-15%
Enriquecido con HER2 (no luminal)	ER- PR- HER2+	Alto grado	Alto (~14%)	Conducta agresiva Responde a terapias dirigidas	Intermedio	13-15%
Luminal A	ER+ PR+/- HER2-	Bajo grado (comúnmente)	Bajo (< 14%)	Responde a terapia dirigida	Bueno	60-70%
Luminal B (HER2-)	ER+ PR+/- HER2-	Alto grado	Muy alto (≥ 14%)	Responde a terapia dirigida	Intermedio	10-20%
Luminal B (HER2+)	ER+ PR+/- HER2-	Alto grado	Muy alto (≥ 14%)	Responde a terapia dirigida	Intermedio	13-15%

4.3.1. TIPOS DE RECEPTORES HORMONALES

Para distinguir receptores presentes en las células se usan técnicas llamadas pruebas inmunohistoquímicas (IHC). Consisten en la obtención de células cancerosas del seno a partir de una biopsia o cirugía para determinar si presentan uno, ambos o ninguno de estos receptores (6,47):

- **RE** (receptor de estrógeno): es un grupo de receptores celulares que son activados por la hormona de estrógeno, que ordena a las células crecer. Son proteínas ubicadas dentro y sobre las células mamarias, actuando como los ojos y los oídos de las células.

Los estrógenos son un grupo de hormonas sexuales producidas mayoritariamente por los ovarios, que juegan un papel clave en el desarrollo de las características físicas y las funciones reproductivas femeninas, incluyendo el crecimiento de los senos y el útero y la regulación del ciclo menstrual. Los hombres también producen estrógeno, pero en cantidades muy bajas producidas por las glándulas suprarrenales y/o células adiposas (31,95).

Las células cancerosas positivas al receptor de estrógeno se adhieren al estrógeno, y de esta forma favorecen el crecimiento del tumor. Más de un 66% de los carcinomas de mama expresan receptores de estrógeno alfa, y responden a las terapias antiestrógeno.

Algunos estudios han indicado que el riesgo de una mujer de presentar cáncer de seno está relacionado con los niveles de estrógeno y de progesterona (16), y la exposición por largo tiempo a las concentraciones elevadas aumenta el riesgo de cáncer de seno (69).

- **RP** (receptor de progesterona): es un tipo de proteínas receptoras que se encuentra dentro o en la cara externa de la membrana plasmática de una célula que responde al estímulo por parte de las hormonas de progesterona.

Durante el desarrollo normal de la glándula mamaria, se requieren estrógenos, progesterona y factores de crecimiento. Por una parte, el receptor de estrógeno promueve el crecimiento y elongación de los conductos mamarios; los receptores de progesterona, por su parte, inducen el desarrollo de los acinos mamarios (alveologénesis) (16). Juega un papel importante en el embarazo, ayudando a que el útero esté listo para mantener un óvulo fertilizado y preparando los senos para que produzcan la leche (96).

Los cánceres de seno con receptor de progesterona son llamados cánceres

positivos para receptores de progesterona o PR+.

- **HER-2** (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano): Es un tipo de receptores (proteína) que se encuentra en la superficie de todas las células de los senos y participa en su crecimiento. Cuando se produce una mutación en el gen que codifica al HER-2, se genera demasiada proteína HER-2 que hace que las células se dividan y crezcan con rapidez excesiva.

Alrededor del 20% de los tumores de mama se encuentran con concentraciones elevadas de esta proteína, la cual le confiere una mayor agresividad porque los HER-2+ tienden a crecer y extenderse más rápidamente que otros tipos de cáncer de seno (94).

- **Ki 67**: es una proteína nuclear (81) que se halla exclusivamente cuando las células se dividen. Ki-67 se usa para determinar el índice de proliferación de los tumores en las pruebas inmunohistoquímicas. Valores superiores a 20% significan que muchas células están dividiéndose, por lo que el cáncer es probable que crezca y se propague más rápidamente. La presencia de este antígeno se asocia con un alto riesgo de recurrencia y poca supervivencia en los pacientes con cáncer de mama temprano.

En la reunión de Saint Gallen del año 2011, se incluyó el punto de corte de Ki67 <14% para distinguir los tumores Luminal A y B, aunque en 2015 fue modificado el punto de corte de Ki-67 en 20% (0).

4.3.2 CLASIFICACIÓN SEGÚN SU ESTADO DE RECEPTOR HORMONAL

Cada vez más, los médicos usan la información genética de las células del cáncer de mama para categorizar cada caso específico y asignar al paciente el tipo de tratamiento que debe tomar.

Entre los grupos de cáncer de mama según su estado de receptor hormonal, encontramos los siguientes (

Tabla 2) (2,47,114):

- **Basal (RE-RP-HER2-):** Es conocido también como cáncer de mama triple negativo. Incluye tumores que son negativos para el receptor de estrógeno, el de progesterona y del factor de crecimiento epidérmico humano 2. En este caso, los pacientes son tratados con quimioterapia.
- **Luminal:** Las células se caracterizan por la expresión de receptores de estrógeno (ER). Es el más frecuente, alrededor del 75-80% de los tumores de mama son luminales. Dentro de este grupo diferenciamos dos subtipos con pronósticos distintos:
 - ↪ **Luminal A (RE+ RP+ HER- Ki67 <20%):** Este grupo incluye tumores que son positivos para el receptor de estrógeno y el receptor de progesterona, pero negativos para el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 y un Ki67 inferior a 20%. Los pacientes con cáncer de mama luminal A tienen mejores resultados con los tratamientos hormonales y la quimioterapia. Constituye el 50%-60% de los tumores luminales y es el subtipo de mejor pronóstico, con menos incidencia de recaídas y mayor índice de supervivencia.
 - ↪ **Luminal B (RE+ RP- HER+/- Ki67>20%):** En la IHC, los tumores son positivos para el receptor de estrógeno, negativos para el receptor de progesterona y positivos o negativos para el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2. Los pacientes con luminal B pueden beneficiarse de la quimioterapia, la terapia hormonal y también tratamientos dirigidos al HER-2(en los casos en que sean HER2+).
- **HER 2+:** Son tumores identificados como negativos para receptores de estrógeno

y progesterona, pero positivos al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2. Los pacientes de HER 2+ pueden someterse a la quimioterapia y tratamientos dirigidos al receptor.

Tabla 2. La tabla muestra los subtipos moleculares del cáncer de mama y su estado de receptor hormonal.

Luminal A-like	Luminal B- like		Triple negativo	Her2 sobreexpresado
RE positivo	RE positivo	RE positivo	RE negativo (<1%)	RE negativo
RP ≥ 20%	RP < 20%	RP +/-	RP negativo (<1%)	RP negativo
Her2 negativo	Her2 negativo	Her2 positivo	Her2 negativo	Her 2 positivo
Ki67 < 20%	Ki67 > 20%			

Nota: RE: receptores de estrógenos, RP: receptores de progesterona, HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2.

Conocer el estado de receptor hormonal es crucial para un tratamiento eficaz del cáncer, ya que impedir que el estrógeno y la progesterona se adhiera a los receptores puede ayudar a evitar el crecimiento del cáncer y su propagación. Teniendo en cuenta los receptores que haya, se puede aplicar uno u otros medicamentos de terapia hormonal; en caso de tumores con receptores de hormonas negativos (ambos RE y RP negativos) no serían eficaces este tipo de tratamientos.

4.4 ESTADIFICACIÓN

El desarrollo del cáncer de mama se clasifica principalmente en 4 estadios distintos según el lugar, el tamaño y la propagación de las células cancerosas.

El sistema que se usa con más frecuencia en el cáncer del seno es el sistema TNM del *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, donde la T indica tamaño del tumor, la N afectación de los ganglios linfáticos, y la M metástasis, si hay indicios de que el cáncer se ha propagado al resto del cuerpo (8,10).

Sin embargo, no profundizaremos hasta los subniveles y en este trabajo solo las clasificaremos en los 4 estadios básicos según la gravedad (Figura 15):

- **0:** El estadio 0 se usa para describir los casos de cáncer de mama no invasivos como carcinoma ductal in situ (CDIS), cuyas células permanecen en el lugar donde se originaron y no hay indicios de que salgan e invadan tejidos circundantes.
- **I:** Se tratan de cánceres invasivos y se dividen en:
 - IA:** el tumor mide 20 mm o menos y puede o no haber diseminado en los ganglios linfáticos.
 - IB:** el tumor mide entre 20-50 mm y puede o no haber diseminado a los ganglios linfáticos
- **II:** Incluyen a tumores que miden hasta 5 cm y puede que presenten metástasis en 1-3 ganglios linfáticos axilares. Se dividen en IIA y IIB con la diferencia de que en estadio IIA puede que no haya evidencias de tumores en la mama, pero sí en los ganglios.
- **III:** El estadio III se divide en IIIA, IIIB y IIIC. Como definición general, el tumor mide más de 5 cm y puede haber hecho la metástasis en más de 3 ganglios linfáticos, llegando hasta los próximos al esternón y en la pared torácica o la piel de la mama, y produce inflamación o una úlcera.
- **IV:** Llamado también metastásico o avanzado, en el cual las células del cáncer de mama invasivo se han propagado más allá de la mama y los ganglios linfáticos circundantes hacia otros órganos del cuerpo, como los pulmones, los huesos, el hígado y el cerebro.

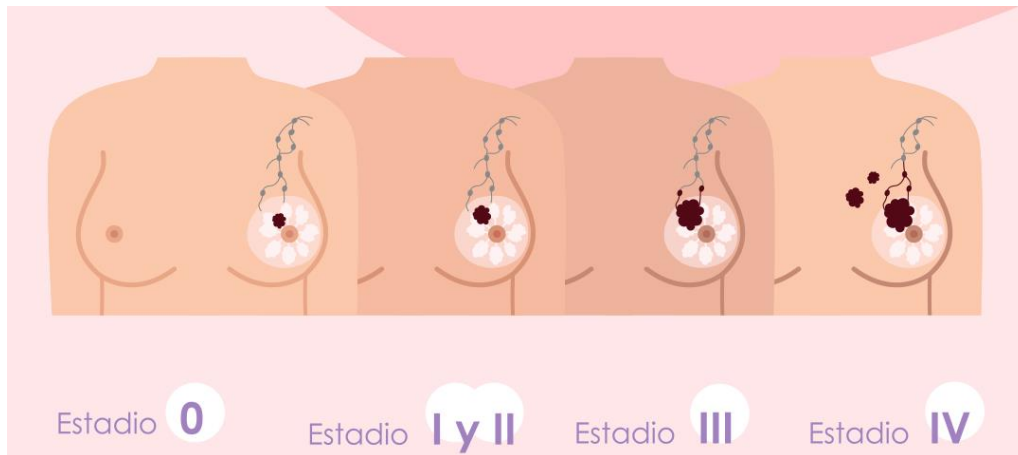


Figura 15. Se muestra los diferentes estadios del cáncer de mama. El estadio 0 no tiene posibilidad de metastatizar. Los estadios I y II son estadios tempranos del cáncer. El estadio III es considerado localmente avanzado y, finalmente, el de estadio IV ya se ha diseminado a otras partes del cuerpo.

Además de las etapas del desarrollo, existe un estadio más conocido como estadio recurrente.

Consiste en la reaparición del cáncer tras la eliminación del tumor maligno. En este caso, puede ser local, regional o distante.

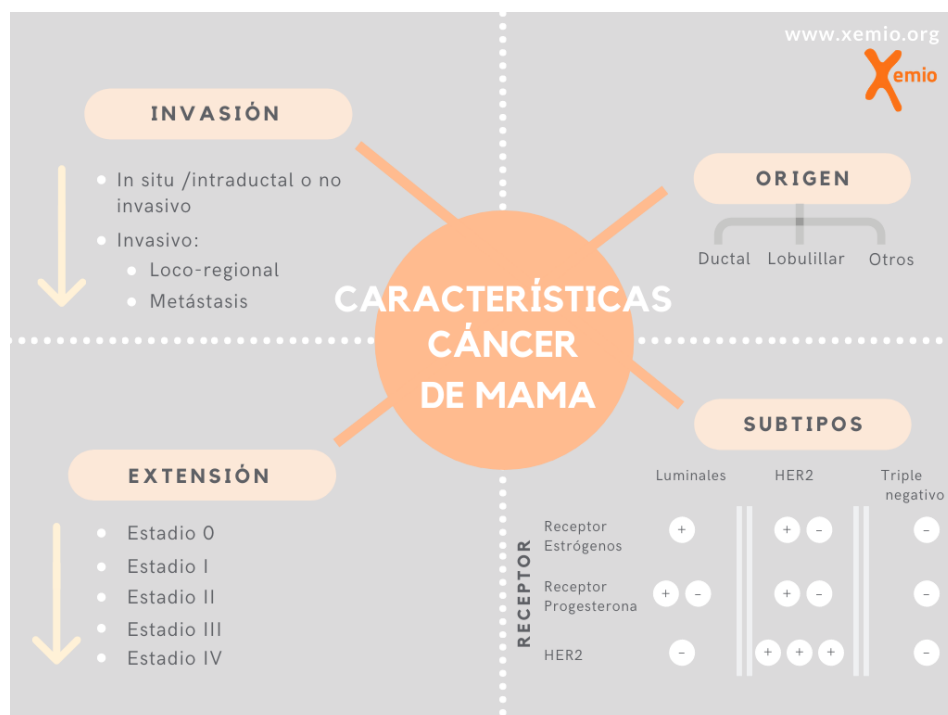


Figura 16. La imagen muestra las diferentes clasificaciones del cáncer de mama

III. METÁSTASIS

1. INTRODUCCIÓN

La metástasis es la diseminación de células cancerosas desde el lugar primario hasta las otras partes del cuerpo a partir de los vasos sanguíneos o linfáticos (82).

Es una capacidad característica de los tumores malignos que implica interacciones entre células normales y tumorales.

Cuando la enfermedad se desarrolla hasta este nivel es conocida como cáncer metastásico, cáncer avanzado o cáncer en estadio 4, donde las células desprendidas forman nuevas colonias tumorales en un tejido distinto del que ha dado origen al tumor primario.

El proceso de la metástasis es conocido como un proceso muy ineficiente, ya que el porcentaje de células que desarrollan con éxito macrometástasis en lugar secundario es del 1%. Esta ineficiencia es debida a que la implantación de una colonia metastásica es la consecuencia final de un proceso activo, continuo, complejo y multiescalonado denominado "cascada metastásica".

A nivel general, la metástasis es la causa principal de las muertes por el cáncer. Los expertos consideran que el 90% de los fallecimientos por cáncer se producen a causa de las metástasis (97), ya que las técnicas terapéuticas y quirúrgicas son capaces de eliminar la totalidad de los tumores sólidos primitivos, pero no pequeños grupos celulares que han salido de la masa tumoral.

Todos los tipos de cáncer pueden metastatizar a cualquier parte del cuerpo, pero se conoce la existencia de patrones metastásicos selectivos, es decir, tendencia de ciertos tumores a metastatizar preferentemente a un tipo determinado de órgano. Tal es el caso del cáncer rectal y de colon que tiende a diseminarse al hígado y a los pulmones. Actualmente, no se sabe la causa exacta de esta tendencia, pero la hipótesis de *la semilla y la tierra fértil* de Paget (101,109) y la de la *teoría mecanicista* de Ewing (101) nos ofrecen dos explicaciones distintas y complementarias a la vez.

En la hipótesis de *la semilla y la tierra fértil* anunciada en 1889, Paget compara las

células cancerosas como semillas que solamente pueden crecer en un terreno adecuado, es decir, órganos específicos que tienen un microambiente apropiado. En cambio, Ewing, en su hipótesis publicada en el 1920, afirma que la metástasis en determinadas partes se debe únicamente a factores anatómicos y hemodinámicos.

A pesar de que hubo defensores para cada hipótesis, hoy en día se observa que la propagación a lugares próximos parece estar regida por criterios hemodinámicos, mientras que la diseminación a órganos distantes puede estar controlada por factores químicos.

2. FORMACIÓN DE LA METÁSTASIS

Aunque exista una diversidad de factores genéticos para la tumorigénesis, los procesos de la metástasis son similares en todo tipo de células cancerosas.

La creación de nuevos vasos sanguíneos, adhesión a otras células o matrices y la colonización del nuevo tejido son esenciales para la migración y la proliferación de células tumorales (37, 101).

2.1 ANGIOGÉNESIS

Es la formación de vasos sanguíneos nuevos. Consiste en la migración, crecimiento y diferenciación de células endoteliales, las cuales recubren las paredes internas de los vasos sanguíneos. En un contexto tumoral, el proceso requiere interacciones entre las células tumorales, las células endoteliales y la matriz extracelular (Figura 17).

La angiogénesis está controlada por señales químicas, entre las cuales están el factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF), los inhibidores de la angiogénesis, el factor de crecimiento fijador de heparina, etc (70).

En condiciones sanas, los efectos estimulantes e inhibidores están equilibrados de modo que los vasos sanguíneos se forman únicamente cuando y donde son necesarios. No obstante, las células cancerosas pueden secretar señales que induzcan la angiogénesis y así desequilibrar los efectos estimulantes e inhibidores. Las células tumorales también pueden estimular a células vecinas normales para que produzcan

moléculas de señalización de angiogénesis.

La nueva vascularización es esencial tanto para el crecimiento del tumor como para la formación de la metástasis, ya que para que las células cancerosas puedan dividirse rápidamente, se necesita una enorme cantidad de nutrientes y oxígeno, los cuales son proporcionados por la sangre, y la gran cantidad de vasos alrededor del tumor puede facilitar el paso de las células cancerosas al torrente sanguíneo y viajar a través de la sangre hacia el resto del cuerpo.

Teniendo en cuenta este mecanismo de inicio y que los tumores no pueden diseminarse sin suministro de sangre, los tratamientos con inhibidores de la angiogénesis pueden resultar muy útiles para el cáncer metastásico.

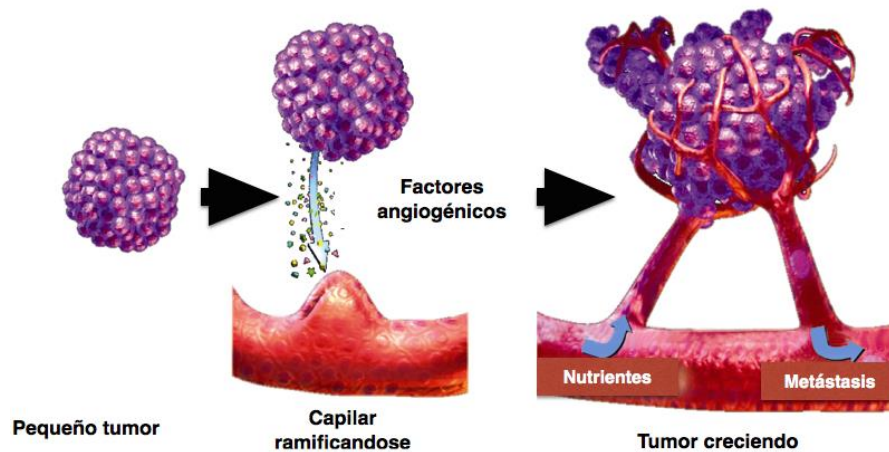


Figura 17. En la imagen se muestra la angiogénesis inducida por un tumor. Las células tumorales pueden secretar factores angiogénicos para aumentar el crecimiento de vasos sanguíneos de su alrededor que le aportan nutrientes necesarios para crecer rápidamente y diseminarse a otras partes formando metástasis.

2.2 PROCESO I: INVASIÓN LOCAL DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

Es el paso inicial de la metástasis, en la que las células tumorales empiezan su migración desde el tumor primario hacia los tejidos adyacentes.

Para empezar, las células “líderes” que dirigen el proceso de invasión escapan del tumor primario mediante la modificación del citoesqueleto, la emisión de pseudópodos y el movimiento ameboide (101).

Para llegar al torrente sanguíneo necesitan cruzar la matriz extracelular que separa los diferentes tejidos de su alrededor. Esta capa puede dividirse en membrana basal y tejido conectivo intersticial compuestos principalmente por colágeno (Figura 18).

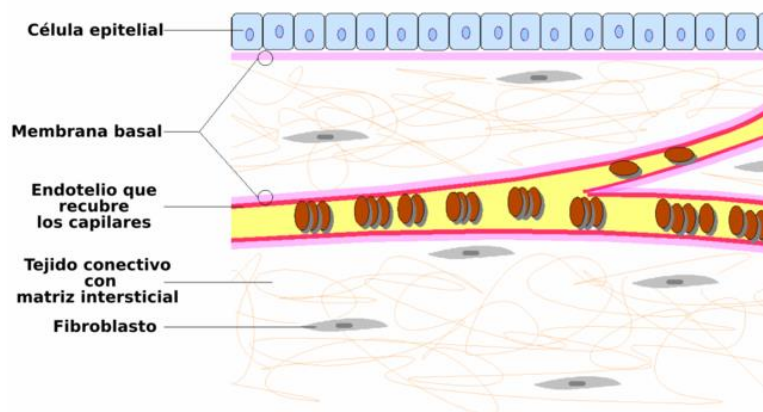


Figura 18. La imagen muestra la matriz extracelular que separa el tejido epitelial del endotelio de los vasos sanguíneos.

La membrana basal es una red insoluble e impermeable que se encuentra debajo del tejido epitelial, en el recubrimiento de los aparatos digestivo y respiratorio y debajo del recubrimiento endotelial de los vasos sanguíneos. Confiere soporte mecánico a las células que se unen a ellas y sirven como sustrato de migración celular (75). Separa los tejidos adyacentes dentro de un organismo y no permite el paso de macromoléculas; por lo tanto, tampoco permitiría el paso de las células tumorales.

Ahora bien, en contra de esta red, las células cancerosas secretan enzimas digestivas llamadas metaloproteasas o MMP, por sus siglas en inglés, como mecanismo para desintegrar esta membrana basal

Una vez cruzada la barrera, pasan al torrente sanguíneo o al sistema linfático por el proceso de la intravasación.

2.3 PROCESO METASTÁSICO II: INTRAVASACIÓN

Después de que las células cancerosas hayan invadido la matriz extracelular local, pueden entrar al sistema circulatorio para establecer focos secundarios (Figura 19). La elección del medio de diseminación depende del origen y la ubicación del tumor

originario. Así, los tumores óseos se diseminan primariamente a través de la sangre, mientras que el melanoma se riega principalmente a través del sistema linfático.

- **Diseminación linfática:** Siendo una de las principales fuentes de diseminación, es la propagación metastásica a partir de la invasión de los capilares linfático. Presenta conexiones con la diseminación hematológica, como se ha visto en la comprobación experimental de que las células tumorales pueden pasar de uno a otro.

Una vez que las células tumorales invaden los capilares linfáticos, llegan a los ganglios linfáticos, estructuras en forma de frijol, donde pueden crecer y liberar nuevos émbolos (102).

- **Diseminación hemática:** Constituye la vía de propagación más importante para una gran parte de tumores malignos como carcinomas y adenocarcinomas. Se entiende por esta vía la diseminación de células cancerosas a los vasos sanguíneos para viajar hacia otras partes mediante el torrente sanguíneo. Los diferentes tipos de vasos tienen distinto grosor; las células cancerosas suelen atravesar las paredes de los capilares, especialmente los capilares inducidos por su estímulo, ya que son más permeables y finas (102).

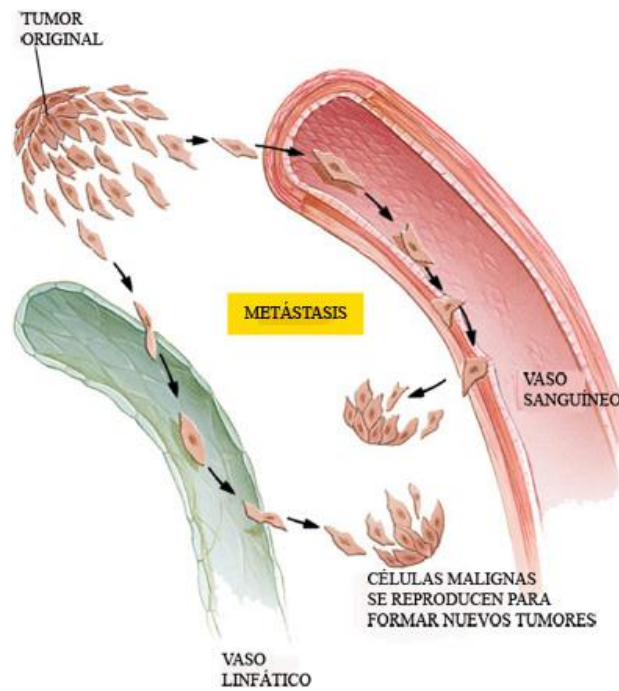


Figura 19. Las células cancerosas pueden migrar a otras partes del organismo a través de los vasos linfáticos o sanguíneos

2.4 PROCESO III: DISEMINACIÓN POR EL TORRENTE CIRCULATORIO

Al iniciar el proceso de la diseminación, millones de células pueden ser liberadas del tumor diariamente. Sin embargo, solo una pequeña fracción de estas pueden sobrevivir y formar un nuevo tumor.

Las células migratorias pueden morir por razones distintas como *anoikis*, muerte celular programada por desprenderse de la matriz extracelular circundante; lesiones o atascos en los vasos; y destrucción por parte de las células del sistema inmunológico. Sin embargo, si sobreviven y encuentran un lugar adecuado para posarse, pueden entrar al nuevo tejido por el proceso de la extravasación e instalarse formando un tumor secundario (103).

2.5 PROCESO IV: EXTRAVASACIÓN

Dentro del proceso de diseminación hemática, las células que han sobrevivido durante el viaje y han tenido la oportunidad de detenerse en el lecho vascular de un órgano diana, atraviesan la pared capilar para acceder al parénquima de dicho órgano.

2.6 PROCESO V: DESARROLLO DEL TUMOR SECUNDARIO

En este último proceso, las células tumorales que se hayan instalado en el tejido funcional del órgano, deberán proliferar hasta alcanzar un tamaño adecuado para su futuro crecimiento y desarrollo. Aunque parece ser fácil, existen una serie de factores que dificultan la formación de la nueva colonia. Por ejemplo, es inevitable que el estroma del órgano diana sea muy distinto que el originario. En este caso, el tumor no podrá colonizar exitosamente al nuevo lugar y entrará en fase de latencia si no cambiara el microambiente, como promover suficiente angiogénesis.

De todas formas, si a lo largo del tiempo el portador adquiere mutaciones adicionales, permite que estas micrometástasis latentes superen las barreras, formando así un verdadero tumor metastásico (Figura 20).

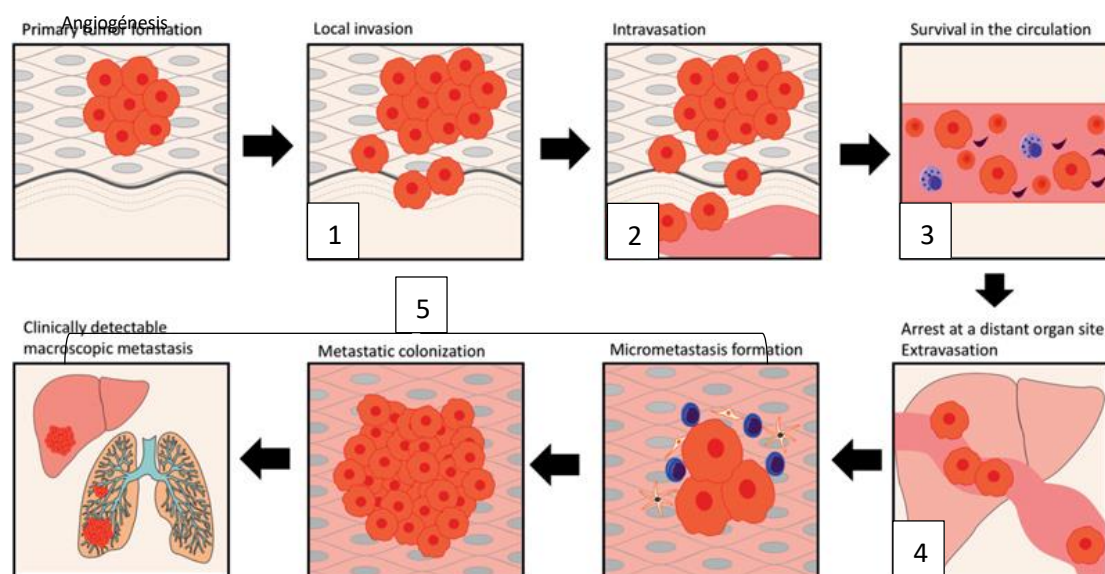


Figura 20. Esta imagen muestra los diferentes procesos de una metástasis exitosa. El primer paso consiste en inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). A continuación, se produce la invasión local en la que las células cancerosas se extienden hacia los tejidos adyacentes (1). Seguidamente, pasan a los vasos a través de la intravasación (2) y viajan junto al torrente (3). Cuando consiguen detenerse en el lecho vascular de un órgano diana, vuelven a atravesar el endotelio y la matriz extracelular hasta el parénquima de dicho órgano (4). Finalmente, tras adaptarse al nuevo microambiente, empiezan a crecer hasta formar un nuevo tumor (5).

3. CÁNCER DE MAMA METASTÁSICO

El cáncer de mama metastásico es el tipo de cáncer invasivo o infiltrante que previamente ya ha migrado a otros órganos, es decir, cáncer en estadio IV.

Las células malignas son capaces de diseminarse a cualquier parte del cuerpo, pero de acuerdo con el patrón metastásico selectivo, en el caso del cáncer de mama, tienden a propagarse a los huesos, el hígado, los pulmones y el cerebro.

Aproximadamente, se detectan cada año unos 33.000 casos nuevos de cáncer de mama en España, entre los cuales un 5-6% presenta metástasis en el momento del primer diagnóstico y un 30% de los casos tempranos sufren recurrencia metastásica después del primer tratamiento (11).

Aunque la palabra cáncer nos puede causar pánico, el cáncer de mama cuenta con grandes probabilidades de supervivencia si se detecta a tiempo. Así el cáncer de mama invasivo no metastásico tiene un 99% de tasa de supervivencia a 5 años.

No obstante, en caso de tratarse de un cáncer metastásico, la tasa de supervivencia a 5 años se reduce hasta el 28%. Por este motivo es importante invertir tiempo y recursos en el estudio de las bases del cáncer de mama metastásico.

La siguiente tabla, registrada por la base de datos de SEER, muestra la tasa relativa de supervivencia a 5 años en mujeres de EEUU según el área de propagación de un cáncer de mama invasivo (Tabla 3) (48).

-Localizado: el cáncer no se ha propagado fuera del seno

-Regional: el cáncer se ha diseminado hasta los tejidos circundantes o ganglios linfáticos

-Distante: el cáncer se ha extendido hasta órganos distantes como hueso, pulmón o hígado.

Tabla 3. La tabla superior muestra la tasa relativa de supervivencia a 5 años teniendo en cuenta el área de propagación.

Estapa SEER	Tasa relativa de supervivencia a 5 años
Localizada	99%
Regional	86%
Distante	28%

4. TRATAMIENTOS

Como he visto en los puntos anteriores, existe una multitud de tipos de cáncer de mama, sea por el tipo de célula originaria, los receptores hormonales o el estadio de desarrollo. Por este motivo, los tratamientos del cáncer de mama también son muy variados, ya que tienen que adaptarse no solamente al tumor en sí, sino también a las condiciones del paciente, como es la edad, otras enfermedades que puedan existir y el deseo del propio paciente.

Gracias al desarrollo tecnológico y la divulgación, esta enfermedad cuenta con gran probabilidad de curación si se diagnostica a tiempo y empleando un tratamiento adecuado.

Actualmente, las principales modalidades de tratamiento son cirugía, radioterapia y quimioterapia, pero también se emplean otros tipos de terapias específicas como la hormonoterapia, la inmunoterapia, etc. (41,87).

El empleo de la cirugía puede ser el tratamiento más exitoso (54) y el más frecuente en la eliminación total del tumor primitivo (55). En defecto, la extirpación puede causar daños en tejidos sanos y, muchas veces, debe estar complementado por otras terapias como la radioterapia, un tratamiento con rayos X de alta energía que destruyen las células cancerosas.

La radioterapia en dosis altas puede destruir las células cancerosas o ralentizar su crecimiento causando daños en el ADN (73). Sin embargo, el tratamiento requiere días o semanas para ver resultados. Durante esta etapa el paciente puede padecer graves efectos secundarios

Además de los tratamientos locales anteriores, encontramos tratamientos sistémicos cuyos medicamentos administrados pueden alcanzar las células cancerosas de cualquier parte del cuerpo; son terapias sistémicas la quimioterapia, la terapia hormonal, la inmunoterapia, etc. (41).

- **Quimioterapia:** Uso de fármacos para destruir las células en división. Tiene mayor

efecto en células cancerosas debido a su rapidez en crecer, pero también daña a otras células sanas, produciendo efectos secundarios como la caída de pelo, úlceras, diarrea, etc. (45, 98).

- **Terapia hormonal:** Tiene el objetivo de detener el crecimiento del tumor. Se emplean fármacos para reducir los niveles o bloquear la actividad de las hormonas sexuales femeninas (estrógeno y progesterona) que inducen el desarrollo del tumor (46, 110).
- **Inmunoterapia:** Es un tipo de terapia biológica para mejorar el sistema inmunitario de manera que combata las células cancerosas (64).

IV. LATENCIA DEL CÁNCER DE MAMA

Después de haber visto las múltiples opciones de tratamientos, debemos constatar que a pesar de que un tumor haya sido tratado por completo, permanecen posibilidades de que regrese después de un largo periodo, a causa de que existen grupos pequeños de células que escapan de las terapias e incluso pruebas de seguimiento.

Estas células liberadas del tumor primario viajan a lo largo del cuerpo y permanecen “dormidas” durante años hasta que un nuevo estímulo las despierte. Esta fase es conocida como latencia tumoral, en la que las células durmientes se mantienen inactivas (37,52), es decir, sin proliferar.

El motivo por el cual las células entran al estado de latencia puede ser diverso, así como pueden inactivarse debido a un microambiente inhóspito.

Realmente, estas células no serían perjudiciales para el cuerpo si permanecieran latentes en toda su vida, ya que no proliferan ni causan daños. Sin embargo, las cosas no siempre suceden como nosotros queremos.

Las células latentes pueden recuperar su actividad proliferativa en cualquier momento y lo preocupante es que no se sabe la causa exacta.

Ahora bien, en los últimos años se ha descubierto que las células, para entrar en latencia, secretan una capa protectora para defenderse y esta misma cubierta puede

ser el interruptor de la latencia (78), aunque es probable que, además de esto, existan otros factores involucrados en la promoción y mantenimiento de la latencia.

En la publicación de la revista "*Nature Cancer*", el grupo de investigación del Mount Sinaí neoyorkino reveló que niveles altos de colágeno tipo III pueden obligar a las células a permanecer en un estado latente y evitar la reaparición del tumor (52).

En los modelos de ratón, se observó que al aumentar la cantidad de colágeno tipo III se aumentaba el tiempo de latencia o de inactividad tumoral. Además, altas cantidades de esta proteína alrededor de las células cancerosas liberadas interrumpían la progresión y les obligaba a entrar en estado latente.

De esta forma, la manipulación de estos mecanismos podría controlar la reactivación tumoral de las metástasis y permitiría desarrollar nuevas terapias.

V. RECURRENCIA DEL CÁNCER

El cáncer recurrente, también llamado recidiva, es el cáncer que se detecta después de haber finalizado el primer tratamiento y no se pudo detectar en las pruebas de control posteriores. En otras palabras, el cáncer recurrente es causado por células que se "despiertan" de la latencia (71).

Esto puede suceder meses o años después de la curación y se clasifica según el lugar en que reaparece (42):

-Recurrencia local: La recurrencia aparece en el mismo lugar del tumor primario.

-Recurrencia regional: El cáncer regresa a los ganglios linfáticos circundantes al tumor primario.

-Recurrencia distante: Reaparecen células cancerosas en partes distantes al tumor primario, así como el hueso, los pulmones, etc.

Al día de hoy, no se sabe el motivo exacto por el cual sucede la recurrencia.

Una de las posibilidades es que no se eliminó por completo las células cancerosas en el primer tratamiento. No significa que el tratamiento haya fracasado, sino que un número pequeño de células cancerosas sobrevivieron tras el tratamiento y eran tan pequeñas que pasaron desapercibidas por las pruebas de seguimiento. Con el tiempo,

estas células pueden crecer hasta alcanzar un tamaño considerable, dando lugar a un tumor.

Estas células recurrentes son más potentes que las anteriores, ya que superaron el primer tratamiento quimioterapéutico. Adoptan resistencia a la quimioterapia, lo cual dificulta el tratamiento.

Adicionalmente, la recurrencia de un cáncer está estrechamente relacionada con el microambiente en el cual se encuentra el cúmulo de células cancerosas. Igual que ambientes inhóspitos pueden inactivar las células cancerosas, ambientes favorables pueden estimularlas.

VI. INTERACCIONES ENTRE CÉLULAS

Aunque todas las células tanto vegetales como animales están delimitadas por la membrana plasmática, mantienen una relación estrecha con los materiales extracelulares e interaccionan de manera muy específica con otras células. Estas interacciones entre célula y célula juegan un papel fundamental en el desarrollo, la motilidad y la función en general de los organismos pluricelulares (24).

Las interacciones intercelulares pueden ser estables como las que se producen a través de las uniones celulares. Estas uniones son establecidas por un complejo proteico situado en la membrana plasmática.

Son importantes para el intercambio de información intercelular para mantener unidas a las células y para que las células se adhieran a células del mismo tejido en lugar de a otro tejido diferente (32,120). Existen tres tipos de uniones intercelulares (Figura 21):

-Uniones comunicantes o GAP: Están compuestas por proteínas transmembranales llamadas conexinas. Forman poros o canales, a través de los cuales pueden pasar iones y otras moléculas. Es el punto principal de la comunicación entre células adyacentes.

-Uniones de anclaje o adherentes: Existen tres tipos diferentes de uniones de anclaje, pero solo dos de ellas están implicadas en la interacción intercelular, son las uniones adherentes y los desmosomas.

Las uniones adherentes conectan las células epiteliales adyacentes y están compuestas por moléculas de adhesión celular de la familia de las cadherinas. Su función es dar forma y tensión a las células y permitir el paso de señales célula-célula.

Los desmosomas aportan fuerza y durabilidad a las células. Conecta las membranas celulares y los filamentos intermedios plasmáticos. Están compuestos por cadherinas, en concreto, desmogleínas y desmocolinas.

-Uniones oclusivas: Son conocidas también como uniones estrechas o apretadas. El complejo proteico permite la unión de células con firmeza entre sí, evitando completamente el paso de otras sustancias.

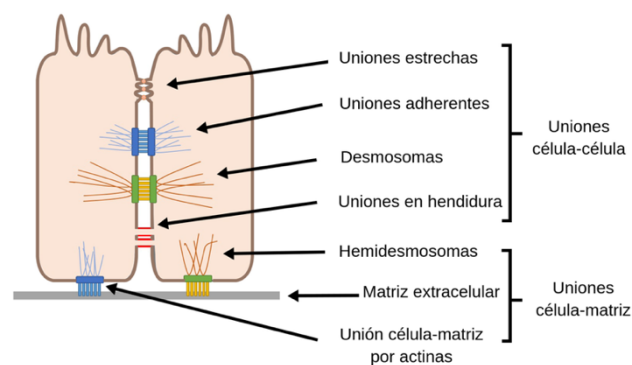


Figura 21. La imagen muestra las diferentes uniones que permiten el anclaje entre dos células. También se muestran las uniones entre las células y la matriz.

Mientras que la mayoría de células están organizadas unas unidas con otras, existen células como los leucocitos que no están fijas dentro de un tejido sólido. Todas ellas, unidas o no, cancerosas o normales, se relacionan regularmente con el ambiente extracelular y las células adyacentes mediante factores como moléculas, proteínas, ácidos nucleicos u otras sustancias formando una "comunidad" llamada microambiente (Figura 22).

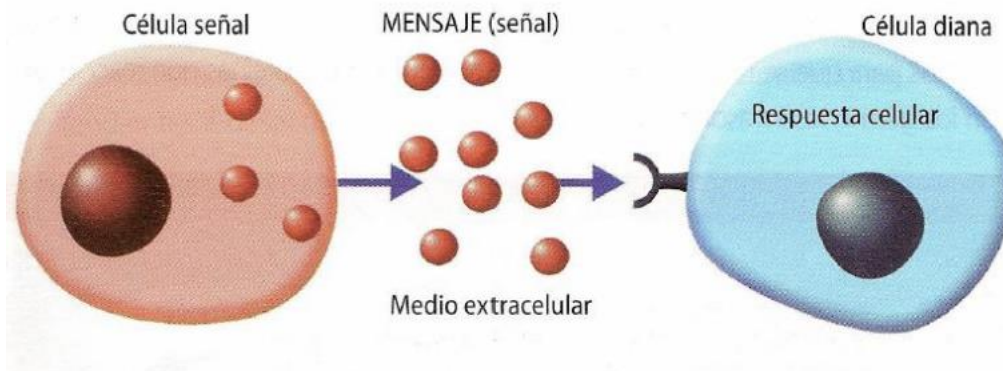


Figura 22. La célula señal emite moléculas de señal que viajan por el medio extracelular para unirse al receptor de la célula diana. Se desencadena la traducción de la señal y conduce a la respuesta de esta célula.

Las proteínas receptoras situadas en la cara externa de la membrana plasmática son únicas en cada tipo de células, incluso en las tumorales. Solo se permite la unión de moléculas de señalización específicas secretadas por determinadas células, sean adyacentes, paracrinas o endocrinas, para facilitar una comunicación precisa y sin confusiones.

Esta capacidad de enviar y recibir es esencial para la supervivencia de una célula normal, ya que la pérdida de comunicación puede provocar un crecimiento celular incontrolable o un cáncer. Esto es debido a que las células normales controlan su crecimiento mediante la inhibición por contacto, es decir, al entrar en contacto con células vecinas se retrasa el crecimiento celular.

Sin embargo, en las células cancerosas se pierde la expresión de E-cadherina, molécula de adhesión celular, y se pierde la inhibición por contacto, siendo una de las causas de la proliferación incontrolada (24).

VII. MICROAMBIENTE TUMORAL (MAT)

En el campo de la biología, el microambiente de una célula es el conjunto de células, moléculas y estructuras que la rodean y la sostienen (67).

En otras palabras, el microambiente es el espacio y el conjunto de objetos con los

cuales una célula convive. Dependiendo del tejido en el que se sitúa, la célula puede encontrarse con diferentes objetos y espacios.

Todos los microambientes están compuestos por la matriz extracelular, proteínas de comunicación y varios tipos celulares. Cuando una célula interacciona con otra, lo hace emitiendo señales que pueden ser percibidas por los receptores de esa célula. Posteriormente, la señal viaja por la matriz extracelular y estimula a la célula diana (Figura 22).

De esta forma, vemos que el microambiente es esencial para el desarrollo de una célula, ya que es el canal de la comunicación y proporciona el soporte. El microambiente de las células cancerosas es conocido como ecología tumoral o microambiente tumoral (106).

Aunque un microambiente sano puede favorecer el crecimiento celular, al mismo tiempo, puede ayudar a crecer la metástasis. En el caso de las células del cáncer de mama, su tendencia a metastatizar en los huesos está estrechamente relacionada con la estabilidad y composición del microambiente óseo.

Dos estudios dirigidos por el *Baylor College of Medicine* situados en México, revelaron que las células del cáncer de mama con receptores de estrógeno positivo (RE+) al metastatizar en los huesos, reducen su expresión de RE, lo que las hace menos susceptibles a las terapias endocrinas dirigidas al RE. Como consecuencia, tienen más posibilidad de desarrollar una macrometástasis o una recurrencia (51).

Por otra parte, las células cancerosas metastásicas tienen la capacidad de cambiar el microambiente al cual han migrado.

A diferencia de otros microambientes, el MAT o microambiente tumoral está caracterizado por concentraciones bajas de O₂, pH bajo y altas concentraciones de ácidos grasos (76). Los ácidos grasos son subproductos metabólicos de las células cancerosas con los cuales prosperan las células mieloides supresoras vía oxidación de ácidos grasos. Como resultado, se suprimen los linfocitos T apoyando el crecimiento tumoral.

Décadas atrás, se creía que la resistencia al tratamiento era debida a las mutaciones

genéticas. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que el microambiente tumoral (MAT) desempeña un papel clave en el desarrollo y la progresión del cáncer (54).

Varios grupos de investigación han llegado a la conclusión de que las células tumorales establecen diversos tipos de uniones comunicantes con las células del microambiente como fibroblastos, células endoteliales, astrocitos, macrófagos e incluso células del sistema inmunitario (Figura 23).

Por eso, en palabras del doctor Joan Albanell, portavoz de la SEOM a EFesalud, desde la ciencia y la medicina ya no se investiga solo la célula maligna, sino todo ese conjunto de células distintas que intervienen en el crecimiento tumoral (110).

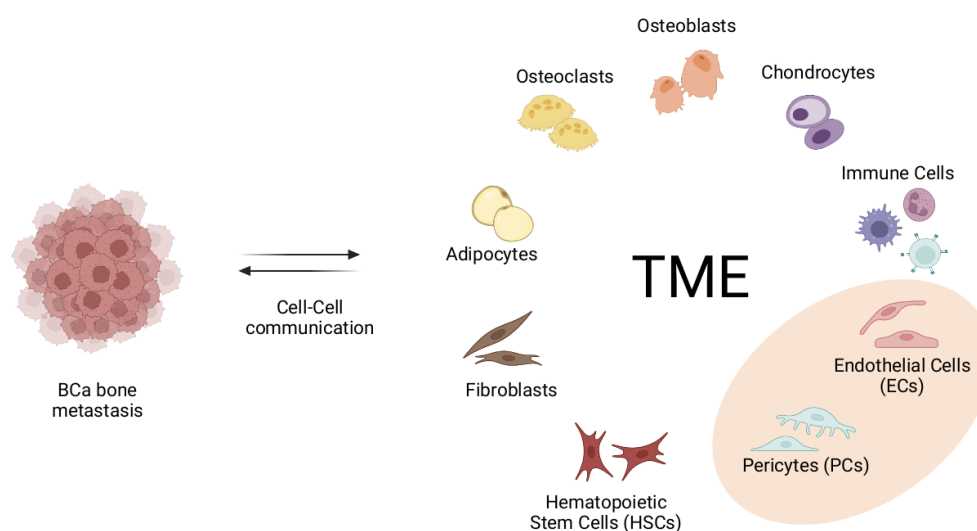


Figura 23. El tumor del cáncer de mama interacciona con los diferentes tipos de células que componen el microambiente óseo y viceversa. TME: *Tumor microenvironment*. Fuente propia

1. MICROAMBIENTE ÓSEO CON LA METÁSTASIS DE LAS CÉLULAS DEL CÁNCER DE MAMA

De todos los órganos, el hueso es uno de los lugares más frecuentes que sufre la metástasis, ya que casi todos los tipos de cáncer pueden propagarse a los huesos (91). Podemos decir que el microambiente de los huesos es el terreno fértil para las “semillas” del cáncer de mama, ya que estadísticamente las células del cáncer de mama tienden a extenderse más a los huesos que otras partes del cuerpo (83).

Asimismo, más de la mitad de las personas que desarrollan cáncer de mama en estadio IV tienen metástasis en los huesos.

1.1 TEJIDO ÓSEO

Para entender el motivo de esta facilidad, debemos recorrer a los componentes del microambiente óseo.

El hueso es un órgano firme, duro y resistente con la función principal de proteger a los órganos y dar estructura al organismo.

Está formado principalmente por el tejido óseo, un tejido conectivo mineralizado compuesto por matriz extracelular y tres tipos de células distintas: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Figura 24).

Por otra parte, los huesos poseen cubiertas de tejido conectivo (periostio) y cartílago, vasos sanguíneos, nervios, e incluso en algunos, tejido hematopoyético y adiposo (médula ósea).

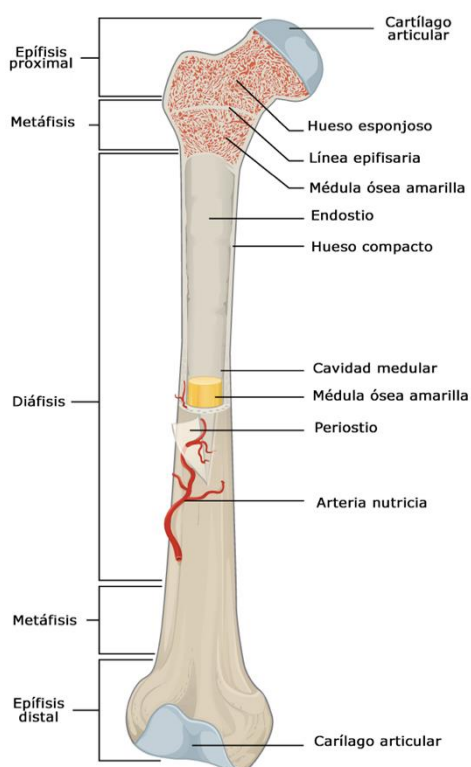


Figura 24. Partes de un hueso largo

A pesar de que el hueso aparenta no tener vida, renueva constantemente su estructura. Los componentes óseos no son inertes ni permanecen fijos, sino que son intercambiados y reemplazados mediante la remodelación ósea, un proceso de reestructuración del hueso que está en constante formación y reabsorción (63)

Mientras los osteoclastos, células formadas en la médula ósea, absorben y eliminan el tejido no deseado, los osteoblastos crean nuevos tejidos óseos.

Los osteocitos son el tipo de células más abundantes en el hueso y responsables del mantenimiento de la matriz ósea. Están situados dentro de cavidades rodeadas de material intercelular calcificado, ya que se forman a partir de los osteoblastos cuando se quedan atrapados en la matriz osteoide (88).

La matriz extracelular está formada por materia orgánica (no calcificada) e inorgánica (calcificada). La matriz orgánica, que ocupa un 35% del peso total, está formada fundamentalmente por proteínas, en la que el 90% es colágeno, tipo I (>90%) y tipo V (<5%). El 10% restante lo forman proteoglicanos o glicoproteínas. En cambio, la parte inorgánica del 65% restante (28) cuenta con fosfato de calcio, bicarbonato, fluoruro, magnesio, sodio, etc. (79).

1.2 TIPOS DE TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo está dividido en dos partes totalmente distintas, el tejido compacto y el esponjoso (Figura 25) (35).

Tejido compacto: Es un tejido óseo duro, denso y frágil situado principalmente en la capa externa de los huesos y ocupa el 80% de la masa de nuestro esqueleto.

Presenta estructuras cilíndricas llamadas osteonas o sistemas de Havers que están formadas por capas concéntricas de laminillas óseas. En el centro de la estructura se encuentra el canal de Havers, lugar por donde circulan los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios, y están unidos unos a otros por los canales de Volkmann (89).

Tejido esponjoso: El tejido esponjoso es conocido también como tejido trabecular, por el hecho de formar trabéculas óseas. Está ubicado sobre todo en la epífisis de los huesos y contiene la médula ósea.

Es un tejido que presenta muchos poros entrelazados (50-90%), lo que favorece el metabolismo, y rellenos por la médula ósea y la grasa (89,108).

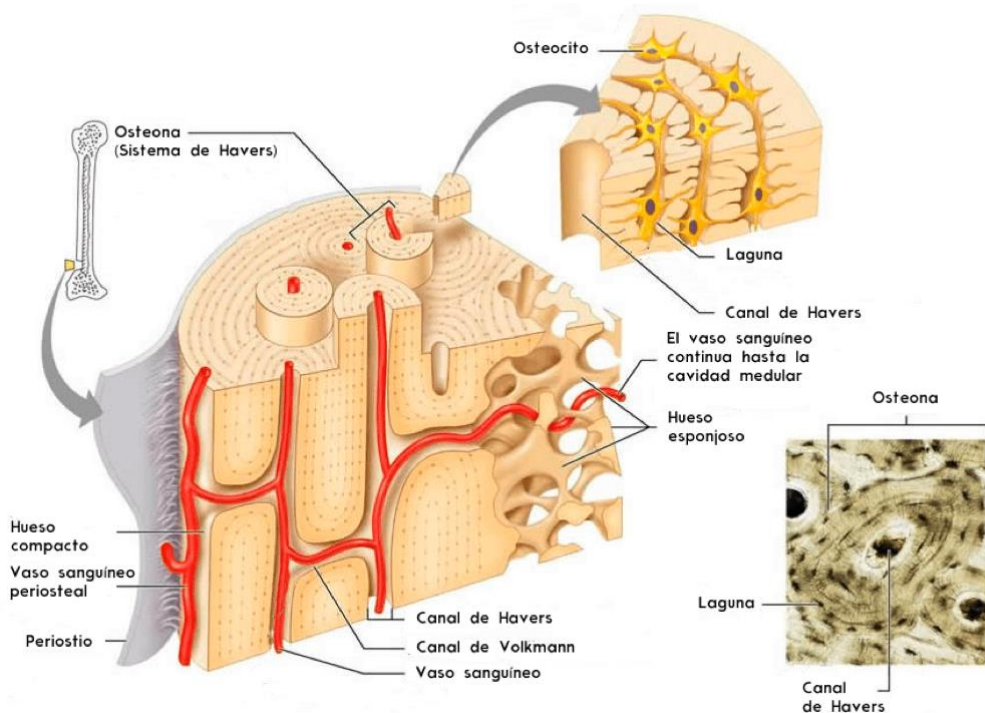


Figura 25. La imagen muestra las diferentes estructuras del tejido óseo.

2. VASOS SANGUÍNEOS

El hueso es un tejido altamente vascularizado que posee una malla estrecha de vasos sanguíneos en su cavidad interna y superficie ósea (Figura 26). Estas vascularizaciones son fundamentales para mantener la vitalidad de las células del tejido óseo, ya que transportan nutrientes desde el exterior hacia interior y también células sanguíneas e inmunes desde su lugar de origen, la médula ósea, hacia el exterior (56,111).

Un vaso sanguíneo es una estructura tubular que conduce la sangre impulsada por la acción del corazón, cuya función principal es transportar nutrientes, oxígeno y desechos del cuerpo. El conjunto de vasos sanguíneos (arterias, arteriolas, capilares, vénulas y venas) forman el sistema circulatorio (34).

Las arterias y venas se van ramificando en arteriolas

y vénulas a medida que van alejándose del corazón y estas se dividen en capilares,

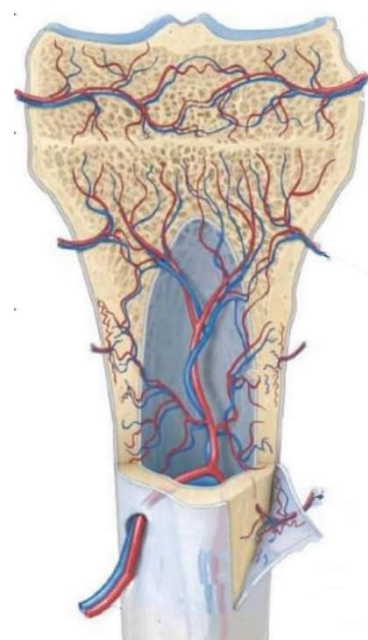


Figura 26. Vascularización de un hueso.

estructuras aún más finas.

Los vasos sanguíneos desempeñan un papel crucial en el desarrollo de tejidos y el crecimiento de los tumores. De hecho, las células cancerosas inducen la angiogénesis para crear nuevos vasos para alimentarse con oxígeno y nutrientes. Además, es una vía idónea para la propagación de la metástasis.

2.1 ESTRUCTURA DE LOS VASOS SANGUÍNEOS

La estructura anatómica de los vasos sanguíneos varía dependiendo del tipo de vaso y su ubicación en el sistema circulatorio (Figura 27), ya que la arteria aorta, que tiene contacto directo con el corazón, no presenta la misma composición que los capilares que llegan hasta la médula ósea.

Las arteriolas y vénulas de diámetro menor presentan estructuras similares a las de arterias y venas. Estos vasos poseen, en la parte más externa, una capa de tejido conjuntivo que envuelve a fibras elásticas y musculatura lisa. En la capa más interna, se encuentra el endotelio o tejido endotelial formado por células endoteliales (30).

Esta capa más interna es la única que conforma los capilares, los vasos sanguíneos más finos de nuestro cuerpo (99). Gracias a esta pared tan fina, permite el intercambio de sustancia entre la sangre y los tejidos.

Por los capilares arteriales llegan oxígeno y nutrientes a las células, y por los capilares venosos circula la sangre con sustancias resultantes del metabolismo para ser eliminadas en otros sistemas.

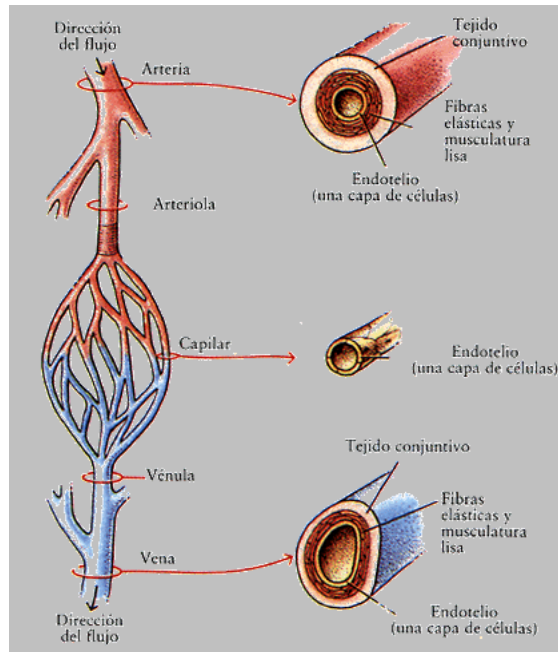


Figura 27. Se muestra los diferentes tipos de vasos sanguíneos y su anatomía interna

2.2 CÉLULA ENDOTELIAL (CE)

Es un tipo de células planas que conforma el revestimiento interno de todos los vasos sanguíneos (65) y está en contacto permanente con la sangre (Figura 29). Regulan el paso celular y molecular desde el torrente hacia el interior de los tejidos y la fluidez de tráfico sanguíneo mediante la secreción de sustancias vasoactivas y vasoconstrictoras (29).

Además, también es el tipo principal de células que cubre la cavidad interna del corazón y los vasos linfáticos.

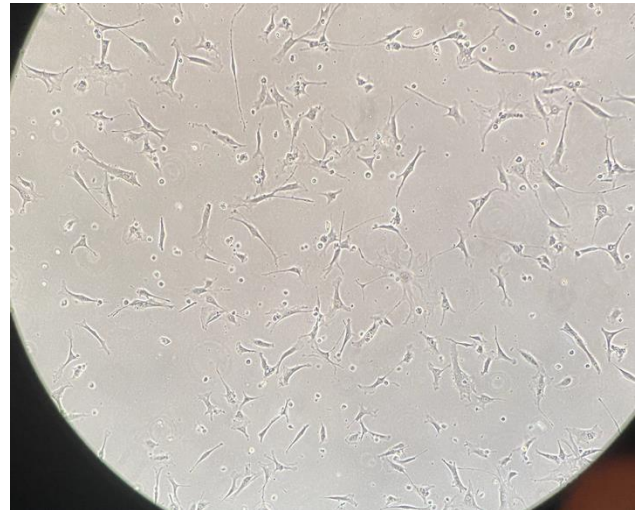
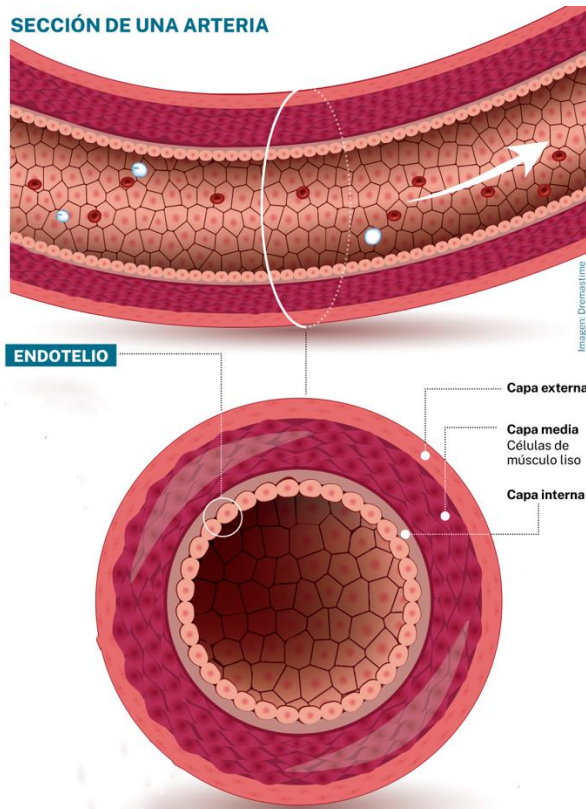


Figura 28. Células endoteliales hechos con microscopio óptico. Fuente propia.

Figura 29. Localidad de células endoteliales

2.2.1 FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES

El conjunto de células endoteliales forma el endotelio (Figura 29) que desempeña un papel importante en la homeostasis, equilibrio entre todo el sistema y funcionamiento de un organismo (22). Las CE tienen una multitud de funciones que son específicas a su localización, entre otras se destacan las siguientes (107):

- Facilitar el flujo laminar sanguíneo y prevenir la adherencia de las células para evitar coagulaciones.
- Regular el transporte de sustancias entre el plasma y el intersticio celular. Las células endoteliales están firmemente unidas entre sí para evitar la exposición al torrente sanguíneo de la lámina basal y solamente permiten el paso de determinadas sustancias.
- Regular la homeostasis vascular (66). Las CE sintetizan y secretan una gran variedad de sustancias, como sustancias vasoactivas que regulan el tono vascular,

la presión sanguínea y el flujo sanguíneo, y sustancias que intervienen en la coagulación, entre otras.

- La superficie celular del endotelio está tapizada de receptores, lo cual permite una gran actividad química.

2.2.2 SECRECIÓN CELULAR

Una célula endotelial es una verdadera célula de secreción interna, libera desde mensajeros extracelulares con funciones paracrinas y autocrinas hasta enzimas de metabolismo vasoactivas. En la siguiente tabla se muestra una serie de sustancias derivadas de células endoteliales (

Tabla 4).

Tabla 4. Elementos de secreción por parte de células endoteliales

Sustancias vasoactivas	
Vasodilatadores	Vasoconstrictores
Adrenomedulina Kininas Óxido nítrico Factor hiperpolarizante relajador del endotelio Prostaciclina	Angiotensina II Endotelina-1 Prostanoides vasoconstrictores
Coagulación y fibrinólisis	
Coagulación	Fibrinólisis
Factor V Heparán sulfato Proteína C y S Trombomodulina	Inhibidor del activador del plasminógeno Activador tisular del plasminógeno Urokinasa

Factor tisular Factor von Willebrand	
Factores de crecimiento	
Factor básico de crecimiento de fibroblastos Factor de crecimiento similar a insulina Factor de crecimiento transformante Mediadores inflamatorios e inmunológicos Factor de crecimiento derivado de plaquetas	
Mediadores inmunológicos e inflamatorios	
Citoquinas	Moléculas de adhesión
Interleucinas Proteínas quimioatrayentes de monocitos 1 Factor de necrosis tumoral- α	Moléculas de adhesión intercelular Moléculas de adhesión célula endotelio- plaqueta Selectinas Moléculas de adhesión de células vasculares
Especies relativas del oxígeno y del nitrógeno	
Especies relativas del oxígeno	Especies relativas del nitrógeno
H_2O_2 HO_2 O_2^-	NO_2^- NO_2 $ONOO^-$ NO_2Cl

PARTE EXPERIMENTAL

I. INTRODUCCIÓN AL TRABAJO

El cáncer de mama es un tipo de tumor originado en los tejidos de cualquier seno de una mujer o de un hombre.

A pesar de ser una enfermedad altamente frecuente, cuenta con grandes probabilidades de curación tras extirpar el tumor sólido principal. Sin embargo, al no ser detectado a tiempo, puede metastatizar a otros órganos, causando grandes obstáculos en la eliminación total de células cancerosas.

Según la estadística, el lugar que sufre con más frecuencia la metástasis de cáncer de mama son los huesos (83), aunque cuando estas llegan a través del sistema circulatorio pueden entrar en fase de latencia por motivos tales como encontrarse con un microambiente inhóspito u otras razones desconocidas. Estas células no resultarían peligrosas si permanecieran en “descanso” en toda su vida, pero el problema es que no es tan simple como pensamos. A la vez que pueden mantenerse “dormidas” durante largos periodos, son capaces de volver a activar su capacidad proliferativa anormalmente acelerada en cualquiera ocasión.

Como consecuencia, se origina un tumor secundario cuyas células son más potentes que el original.

Por este motivo, resulta esencial conocer cuál es el “interruptor” de este mecanismo de proliferación tras haber entrado en latencia, ya que una vez conseguida sería posible controlar las células cancerosas y reducir las posibilidades de la recurrencia facilitando la vida de los pacientes.

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, el objetivo de esta práctica consiste en comprobar si las células endoteliales influyen positivamente en el crecimiento de las células del cáncer de mama tras migrar a los huesos y verificar si inciden o no en la recurrencia del tumor.

II. MATERIAL

Se utilizó células endoteliales pertinentes del pulmón de los ratones y células cancerosas que se han metastatizado en los huesos de dicho roedor, ambas ofrecidas por la *Fundació Josep Carreras*. La estancia de la práctica se hizo principalmente en el centro del IRB Barcelona con los instrumentos y máquinas correspondientes, aunque el cultivo de las células endoteliales se completó previamente en el Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras por parte de mi tutora de prácticas.

III. HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta los conceptos teóricos tratados anteriormente, se planifica las siguientes hipótesis:

- 1- Puede ser que el crecimiento de las células cancerosas aumente proporcionalmente a la cantidad de factores generados y secretados por las células endoteliales (CEs), es decir, cuanto más angiogénicas sean las CEs mayor cantidad habrá de células cancerosas.
- 2- Es probable que las células cancerosas MAF+ o MAF- respondan de diferentes formas a los factores, moléculas, proteínas y nutrientes secretados por las células endoteliales, siendo que las células MAF+ crezcan más rápidamente que las MAF-.

IV. MÉTODO EXPERIMENTAL

Para comprobar las hipótesis planeadas hay que seguir una serie de protocolos para poder visualizar la cantidad de células que están en división en los diferentes tipos de medios.

Antes de empezar, se necesita cultivar las células implicadas (células de cáncer de mama y endoteliales) hasta alcanzar un número suficiente para poder realizar los experimentos. Se cultivan células de cáncer de mama MAF+ y MAF- y células endoteliales.

Para esto se requiere descongelar las células, cambiar los cultivos frecuentemente y

dejarlas en la incubadora.

En nuestro caso, las células endoteliales fueron aportadas por el Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras, mientras que las cancerosas fueron descongeladas y cultivadas en el centro de IRB Barcelona.

Optamos por las células endoteliales y no otras pertinentes del microambiente óseo como inicio de esta gran hipótesis porque creímos que estas células son más variables en la secreción de sustancias (

Tabla 4) y, por lo tanto, tienen más posibilidad de afectar a las células cancerosas y ser influenciados por mutaciones aleatorias, cambiando consecuentemente el estado de otras células por las interacciones intercelulares.

Una vez que tengamos las células cultivadas, dividimos las células del cáncer de mama en una placa de 10 cm con 12 pocillos, 6 pocillos para cada tipo. También, activamos el gen *Pik3Ca* en la mitad de células endoteliales, a las cuales llamamos ECs-*Pik3Ca*^{H1047R} y *wild type* (WT) a las normales.

Seguidamente, extraemos el medio con factores secretados por las células endoteliales normales y lo introducimos en 2 pocillos de células cancerosas MAF+ y en 2 de células MAF-.

Una vez acabado, repetimos el mismo proceso con el medio con factores generados y secretados por las CEs mutadas dejando, al final, 2 pocillos de control en cada mutación de célula cancerosa (Figura 30).

Finalmente, esperamos el tiempo necesario para poder visualizar las posibles diferencias o resultados y extraemos la conclusión.

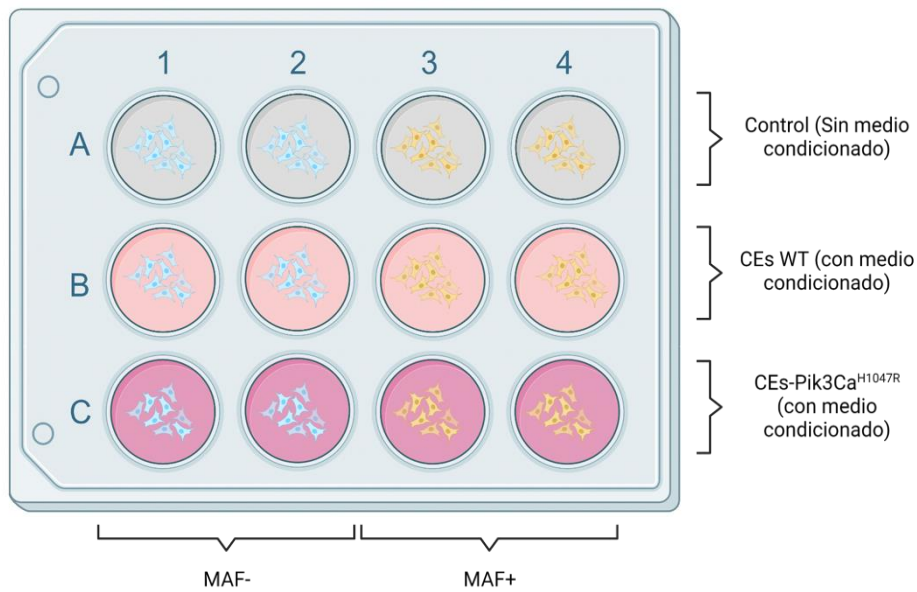


Figura 30: Diseño experimental en la que se observa diferentes pocillos con células del cáncer de mama MAF+/- en su determinado medio.

1. CONCEPTOS A ENTENDER

1.1 GEN MAF

El MAF es un gen presente pero no activo en todas las células. Se observa que las células cancerosas del cáncer de mama que tienden a metastatizar en los huesos tienen sobreexpresión de una porción del cromosoma 16 que codifica el factor de transcripción MAF por lo cual llamamos MAF+ y son más proliferativas que las que no expresan este gen (MAF-).

Actualmente no se sabe el motivo por el cual se activa ni las influencias que podría llegar a tener, lo único constatado es que existe una mayor cantidad de células cancerosas mamarias metastásicas en los huesos que expresan MAF que las que han proliferado a otras partes como pulmón o hígado.

Con el objetivo de simular lo mejor posible las condiciones del cáncer de mama metastásica ósea, usamos las células MAF+ para observar las diferencias al responder a los factores secretados por las células endoteliales en comparación con las MAF-.

Según un nuevo estudio internacional publicado en *Journal of Bone Oncology*, los tumores que tienen el factor de transcripción MAF alterado, el riesgo de metástasis a

hueso es 14 veces superior a los que no lo tienen alterado, por lo que se trata de un gen que puede predecir perfectamente la metástasis a hueso (122).

1.2 MUTACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES

En esta práctica se usa dos tipos distintos de células endoteliales, las ECs-Pik3Ca^{H1047R} que presentan una mutación haciéndolas más angiogénicas (proliferativas) y las que no la presentan (CEs WT). Esta mutación es activada por la 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT), una molécula que puede hacer cambios en el ADN y permitir la recombinación del gen mutado en el genoma de las células.

Además de usar las células endoteliales para observar la influencia que pueden tener los factores producidos y secretados en la proliferación de las células cancerosas (MAF- y MAF+), la finalidad de usar dos tipos de células endoteliales es para observar si las células endoteliales que están más activas (ECs-Pik3Ca^{H1047R}) tienen más capacidad de promover la proliferación de las células de cáncer de mama o no.

De tal manera, tras comparar los resultados se podría entender la influencia del factor angiogénico sobre el crecimiento de las células cancerosas, siendo un factor que se podría controlar considerablemente de forma externa.

1.3 TINCIONES

DAPI: es un marcador fluorescente que se une a las regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN.

EdU: es un marcador fluorescente de color rojo que permite detectar las células que están en proliferación mediante el microscopio fluorescente.

V. PROTOCOLOS DE LA PRÁCTICA

Fecha: 17/5/2022

PROTOCOLO 1: Descongelación de células de cáncer de mama

MATERIALES:

- 2mL de células cancerosas congeladas MAF+ i MAF- (Figura 31 y Figura 32)
- Medio: DMEM F-12 completo (1% P/S + 20% FBS) (Figura 33)
- Pipetas serológicas de 5, 10 y 25mL (Figura 34)
- Tubos cónicos de 50mL
- Pipeteador
- Pipetas

PROTOCOLO:

Parte I: Preparación previa

1. Preparar los materiales en una cabina de bioseguridad.
2. Calentar el medio en un baño de agua a 37°C (Figura 35).
3. Extraer las células del congelador minimizando exposición a la temperatura ambiente (15°C-25°C).
4. Colocar los viales en hielo seco en caso de no utilizarlos directamente.

PARTE II: Descongelación de las células (solo un vial a la vez para evitar la exposición prolongada del DMSO a T ambiental)

1. Limpiamos el exterior de los viales con etanol 70%.
2. En una cabina de bioseguridad (Figura 38), giramos el tapón un cuarto de vuelta para aliviar la presión interna y volvemos a taparla.
3. A continuación, descongelamos rápidamente uno de los viales dentro del baño de agua a 37°C agitándolo suavemente durante 1-2 minutos hasta que quede solo una pequeña cantidad de hielo.

PARTE III: Lavado y recuento de células (trabajar rápidamente para asegurar una alta viabilidad y recuperación celular)

1. Limpiamos el exterior del vial de nuevo con etanol 70%.
2. Transferimos la suspensión celular a un tubo cónico de 50mL con ayuda de una pipeta (Figura 7).
3. Enjuagamos el vial con unos 2mL de medio y lo transferimos gota a gota a las células, mientras se agita suavemente el tubo cónico de 50mL.
4. Lavamos añadiendo 15mL de medio gota a gota, mientras se agita suavemente el tubo.
5. Centrifugamos la suspensión celular a 300 x rpm durante 10 minutos a T ambiental (15-25°C). Para hacerlo, colocamos 20mL de agua en un tubo (*balance*) y lo colocamos en la posición opuesta de la centrifugadora (Figura 39) para igualar la masa.
6. Una vez acabado los 10min, retiramos cuidadosamente el sobrenadante (Figura 37) dejando una pequeña cantidad de medio para asegurar que el pellet celular no se altere y resuspendemos el pellet celular agitando suavemente el tubo.
7. Añadimos suavemente 15-20mL de medio al tubo y lo mezclamos de nuevo con las células.
8. Volvemos a centrifugar la suspensión celular a 300 x rpm durante 10min a T ambiental (15-25°C).
9. Retiramos cuidadosamente el sobrenadante dejando una pequeña cantidad de medio para asegurar que el pellet celular no se altere y resuspendemos el pellet celular agitando suavemente el tubo (Figura 41).
10. Añadimos de 10-12mL de medio al tubo, resuspendemos las células y vertemos suavemente la suspensión en una placa de 10cm.
11. Repetimos los procesos con el otro vial.
12. Finalmente, ponemos las placas en la incubadora hasta el día siguiente (Figura 40).

Fecha: 18/5/2022

PROTOCOLO 2: Pasaje de las células de cáncer de mama

MATERIALES:

- Placa de células MAF+ i MAF-
- Medio: DMEM F-12 completo (1% P/S+ 20% FBS)
- Medio: DMEM F-12 completo (1% P/S+ 10% FBS)
- PBS (Figura 33)
- Tripsina (diluida 1 por cada 10mL de PBS)
- Pipetas serológicas de 5, 10 y 20mL
- Tubos cónicos de 50mL
- Pipeteador
- Puntas de pipetas
- Pipetas
- Pipetas de vidrio

PROTOCOLO:

1. Calentamos el medio, el PBS y la tripsina en un baño de agua a 37°C.
2. Limpiamos el exterior de todo el material con etanol al 70%, excepto las placas con células.
3. En una cabina de bioseguridad, retiramos el medio de las células con las pipetas de vidrio y las limpiamos con 8-10mL de PBS.
4. Retiramos el PBS con una pipeta de vidrio.
5. Añadimos 8-10mL de tripsina diluida, sacudimos la placa suavemente y ponemos las células en la incubadora durante unos 5 minutos.
6. Pasados los 5 min, añadimos 5mL de medio (20% de FBS) a la placa.
7. Trasladamos toda la suspensión celular a un tubo cónico de 50mL utilizando una pipeta de 25mL.
8. Añadimos otros 5mL de medio a la placa, los mezclamos bien y los trasladamos en el mismo tubo cónico de 50mL para minimizar la pérdida de células.

9. Centrifugamos durante 5 minutos a 300 x g a T ambiente (15-25°C)
10. Retiramos cuidadosamente el sobrenadante dejando una pequeña cantidad de medio para asegurar que el pellet celular no se altere.
11. Resuspendemos el pellet celular agitando suavemente el tubo y le añadimos unos 10mL más de PBS.
12. Centrifugamos la suspensión celular a 300 x g durante 5 minutos a T ambiente (15-25°C)
13. Eliminamos cuidadosamente el sobrenadante dejando una pequeña cantidad de medio y resuspendemos las células.
14. Añadimos 24mL de medio (10% de FBS) al tubo y resuspendemos las células
15. Vertemos suavemente 6mL en cada una de las placas de 10cm.
16. Añadimos 6mL de medio a cada placa (4 en total)
17. Repetimos lo mismo con las células cancerosas de otra mutación y ponemos las células en la incubadora.

Fecha: 19/5/2022

PROTOCOLO 2: Pasaje de las células de cáncer de mama

Se siguió todos los pasos del día anterior con algunas pequeñas diferencias. Se utilizó el medio con 1% P/S + 5% FBS en vez de 1% P/S + 20% FBS o 10% FBS, ya que no quisimos que crecieran demasiadas células cancerosas, y a partir del paso 13 se procesó la congelación de una parte de células cancerosas, tanto MAF+ como MAF-.

PROTOCOLO 3: Congelación de células

Quisimos congelar una parte de las células cancerosas debido a la cantidad excesiva de estas.

1. Seguimos todo igual que el protocolo 2 hasta el paso 13 incluido.
2. Añadimos 1,5 – 1,8mL de medio de congelar que ayuda a la crioconservación de las células (FBS + 10% DMSO),

3. Resuspendemos las células con el nuevo medio.
4. Pasamos la suspensión al tubo de congelación.
5. Hacemos lo mismo con las células endoteliales de otra mutación.
6. Rellenamos un *Mr. Frosty* con isopropanol (Figura 45) por la parte de abajo y colocamos los tubos en la parte de arriba.
7. Guardamos el *Mr. Frosty* (Figura 46) a -82°C.

Fecha: 23/5/2022

PROTOCOLO 2: Pasaje de las células de cáncer de mama

Se siguió todos los pasos del protocolo 2, igual que el día 19 con la diferencia de haber usado un medio distinto: DMEM F-12 (1% P/S + 2,5% FBS)

PROTOCOLO 4: Descongelación de las células endoteliales del ratón

Se siguió todos los pasos del protocolo 1 (descongelación de las células de cáncer de mama), pero usamos placas de 6 pocillos en vez de placas de 10cm, llenando 4 de ellos con células endoteliales.

Fecha: 22/8/2022

PROTOCOLO 1: Descongelación de células del cáncer de mama

PROTOCOLO 4: Descongelación de las células endoteliales del ratón

Fecha: 23/8/2022

PROTOCOLO 5: Activación de la mutación en las células endoteliales

MATERIALES:

- Placa de células endoteliales
- Medio: DMEM F-12 completo
- 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT) en 2µM
- 4 microtubos
- Pipetas serológicas de 5, 10 y 20 ml
- Tubos cónicos de 50mL

- Pipeteador
- Puntas de pipetas
- Pipetas
- Pipetas de vidrio

PREPARACIÓN PREVIA:

Dividimos los 4 microtubos en 2 grupos, 2 para control y 2 para tamoxifeno (Figura 49). porque en total tenemos 4 placas de 6cm con células endoteliales y queremos tener 2 placas en control (sin 4-OHT) y 2 placas con la mutación activa (con 4-OHT).

Además, debido a que la concentración inicial de la solución del tamoxifeno era de 10mM y el deseado era de 2 μ M, tuvimos que añadir 0.2 μ l de solución inicial por cada ml de medio. Sin embargo, al tener 5ml de medio, al final, en total añadimos 1 μ l en cada microtubo.

PROTOCOLO:

1. Pasamos 2 microtubos de 5mL de solución de 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT) en concentración de 2 μ M a dos placas de células endoteliales (Figura 50).
2. Pasamos 2 microtubos de 5mL de medio sin 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT) a dos placas de células endoteliales para el control (Figura 50).
3. Ponemos las 4 placas en la incubadora hasta el día siguiente.

PROTOCOLO 2: Pasaje de las células de cáncer de mama

Pasamos las células del cáncer de mama (MAF+ y MAF-) a una placa de 10cm con 12 pocillos, 6 pocillos para cada tipo de célula cancerosa y colocamos un cubre de microscopía en cada pocillo evitando que haya células por debajo del cubre (Figura 52).

Fecha: 24/8/2022

PROTOCOLO 6: Experimento del medio condicionado (Conditioned Media Assay)

Parte I: preparación del medio de las células

- 1- Limpiamos las placas de las células endoteliales con 5ml de medio puro

- 2- Aspiramos el medio y añadimos de nuevo 5ml de medio en cada placa y las dejamos en la incubadora hasta el día siguiente.
- 3- Limpiamos las células cancerosas y añadimos 2 ml de medio puro en cada pocillo para dejarlas hasta el día siguiente.
- 4- Además, preparamos una placa con 7-8ml de medio puro en la incubadora para que esté sometido en las mismas condiciones que el medio de las células endoteliales (Figura 51).

Fecha: 25/8/2022

Parte II: poner las células cancerosas en contacto con el medio de las células endoteliales

MATERIAL

- Placa de células endoteliales
- Placa de células cancerosas
- Placa de medio puro
- 6 tubos cónico de 50mL
- Filtro
- Jeringa
- Pipetas serológicas
- Pipeteador

PROTOCOLO:

- 1- Añadimos medio puro en 3 tubos cónicos de 50 ml, 5ml por cada tubo.
- 2- Recogemos todo el medio de las células endoteliales y las pasamos a los tubos. Uno para medio mutado, uno para medio normal y otro para el medio puro.
- 3- Seguidamente, aspiramos el medio de las células cancerosas.
- 4- Limpiamos cada pocillo con 1ml de medio puro y lo aspiramos.
- 5- Antes de transferir el contenido de los tubos a los pocillos, necesitamos filtrarlo. Para hacerlo, usamos la jeringa enroscada con el filtro. Colocamos la jeringa encima de un tubo cónico nuevo y pasamos el contenido del tubo con medio

dentro de la jeringa. Hacemos presión para que el contenido pueda pasar al tubo nuevo. Repetimos lo mismo con los tres tubos de medios distintos (Figura 51).

6- Cogemos 8mL de cada tubo y las pasamos a los pocillos de las células cancerosas, 2mL para cada pocillo siguiendo el diseño.

7- Esperamos 24h.

Fecha: 26/8/2022

Parte III: Fijar las células

PREPACIÓN PREVIA:

PRM 0.5%: como que la concentración inicial era de 10% y queremos tenerlo a 0.5%, hacemos el siguiente cálculo y añadimos la cantidad necesaria.

Fórmula: $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$

Cálculos: $10\% \cdot V_i = 0.5\% \cdot 50\text{mL}$

$50\text{mL} - 2.5\text{mL} = 47.5\text{mL}$

$V_i = (0.5\% \cdot 50\text{mL}) / 10\% = 2.5\text{mL}$

Solución: Añadimos 2.5mL de PRM10% en 47.5mL de PBS

REACCIÓN DE EdU:

Necesitamos 400 μL en total para colocar 25 μL en cada pocillo, por lo tanto, multiplicaremos las cantidades x4 porque la dada está diluida a 100mL.

a. Componente D --- $86\mu\text{L} \cdot 4 = 344\mu\text{L}$	} 400.96 μL
b. Componente E --- $4\mu\text{L} \cdot 4 = 16\mu\text{L}$	
c. Componente B --- $0.24\mu\text{L} \cdot 4 = 0.96\mu\text{L}$	
d. Componente F --- $10\mu\text{L} \cdot 4 = 40\mu\text{L}$	

NOTA: debido a que los componentes D y F están concentrados 10x, debemos diluirlo en agua.

PROTOCOLO:

1- Añadimos la tinción de EdU a los pocillos y esperamos 2h.

2- Una vez pasadas las 24h desde que las células cancerosas están en contacto con el

medio de las células endoteliales, aspiramos todo el medio y limpiamos con 1mL de PBS.

- 3- En la campana para trabajar con químicos, adicionamos 1mL de 4% de PFA a cada pocillo y las dejamos en el agitador durante 15min a temperatura ambiente.
- 4- A continuación, aspiramos el PFA y limpiamos con PBS 3 veces.
- 5- Pasamos 1mL de PRM en cada pocillo y esperamos 20min.
- 6- Retiramos el PRM, limpiamos con 1mL de PBS y ponemos la placa en el agitador durante pocos minutos.
- 7- Limpiamos con PBS por 2 veces.
- 8- Transferimos 25 μ L de la reacción de EdU (Mix) (Figura 54) en la superficie de parafina (Figura 55).
- 9- Sacamos los cubres de los pocillos y los colocamos encima de las gotas del Mix, dejando la cara con células boca abajo y esperamos 1h protegido de la luz.
- 10- Preparamos 6mL de PBS con 3mL de DAPI.
- 11- Cogemos los cubres de nuevo y los colocamos dentro de los pocillos con 1mL de PBS.
- 12- Añadimos 0.5ml de solución con DAPI y lo ponemos en el agitador durante 10min.
- 13- Ponemos el medio de montaje en los cubreobjetos.
- 14- Quitamos el DAPI y lo limpiamos con PBS 2 veces.
- 15- Montamos 2 cubres para cada cubreobjetos (Figura 56).

Parte IV: Adquisición de imágenes y cuantificación

PROTOCOLO:

- 1- Miramos cada cubreobjetos y adquirimos 3 imágenes de cada cubre con el NIKON eclipse Ts2-FL, utilizando dos canales fluorescentes (el rojo y el azul) y con un objetivo con amplificación de 20x. Por lo tanto, tendremos 6 imágenes para cada tipo de células de diferentes campos de visión en las mismas condiciones (**Error! Reference source not found.**).
- 2- Cuantificamos las células marcadas con DAPI y las con EdU con el programa de Fiji.
- 3- Finalmente, calculamos la proporción de las células que se están dividiendo con la

totalidad de las células (Nº de células con Edu/ Nº células con DAPI) en cada condición para saber si la adición de los medios condicionados ha tenido algún efecto en la división de las células del cáncer de mama (Figura 58).

1. IMÁGENES

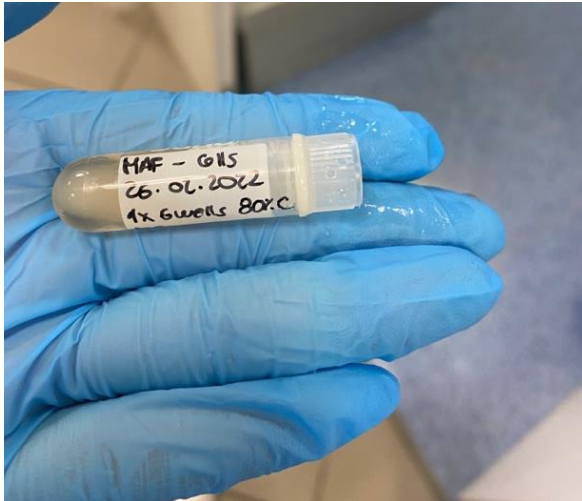


Figura 31. Células cancerosas MAF- congeladas.

Fuente propia

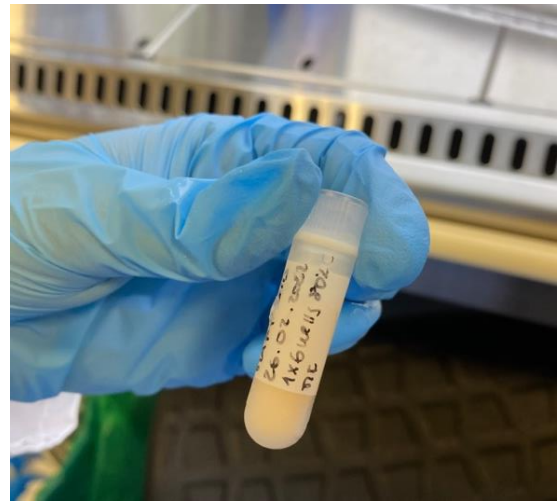


Figura 32. Células cancerosas MAF+ congeladas.

Fuente propia



Figura 33. FBS, F-12 puro, DMEM completo.

Fuente propia



Figura 34. Pipetas serológicas. Fuente propia



Figura 35. Calentamos el medio en un baño de agua a 37°C. Fuente propia



Figura 36. Pipeteador y pipeta serológica. Fuente propia



Figura 38. Cabina de bioseguridad. Fuente propia

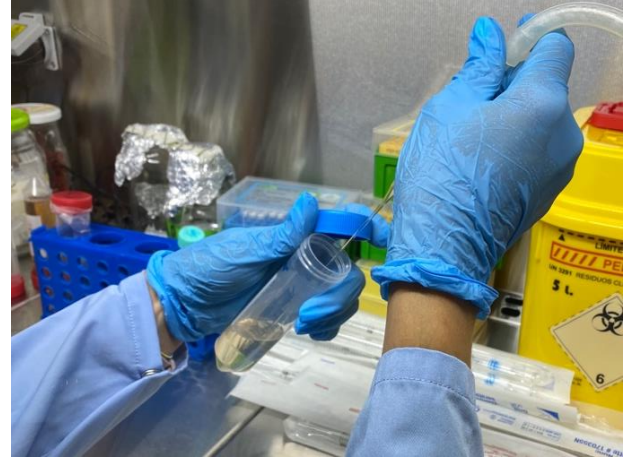


Figura 37. Quitamos el sobrenadante con pipeta. Fuente propia

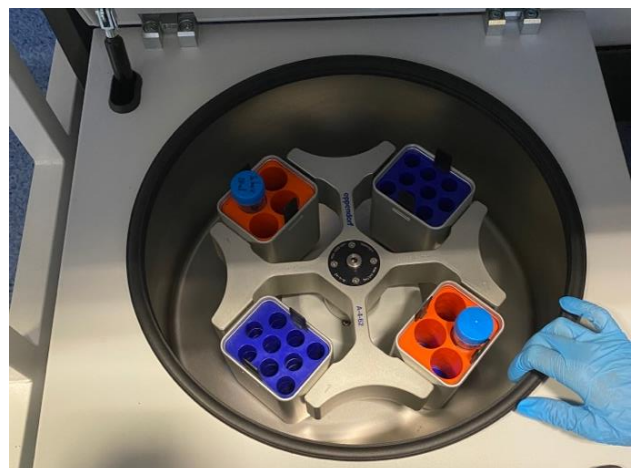


Figura 39. Centrifugadora. Fuente propia



Figura 41. Tubo cónico de 50mL con pellet. Fuente propia

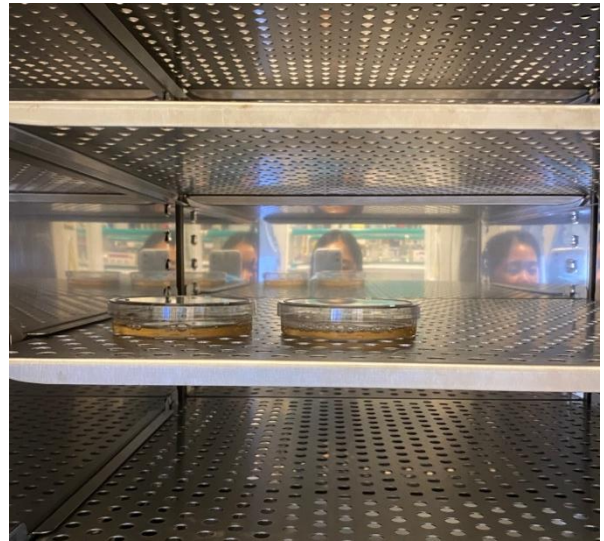


Figura 40. Placas con células cancerosas del 1r pasaje. Fuente propia



Figura 42. PBS, tripsina y DMEM F-12 Completo. Fuente propia

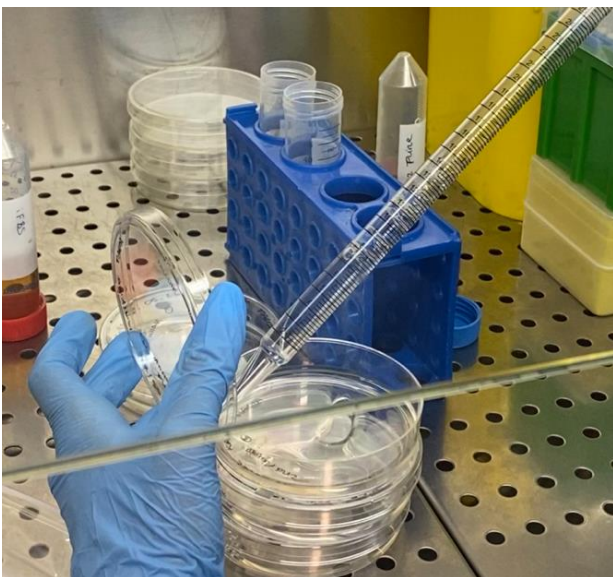


Figura 44. Transferimos la suspensión en 4 placas para cada placa de MAF+ y MAF-. Fuente propia



Figura 43. Placas de células cancerosas MAF+ y MAF-. Fuente propia

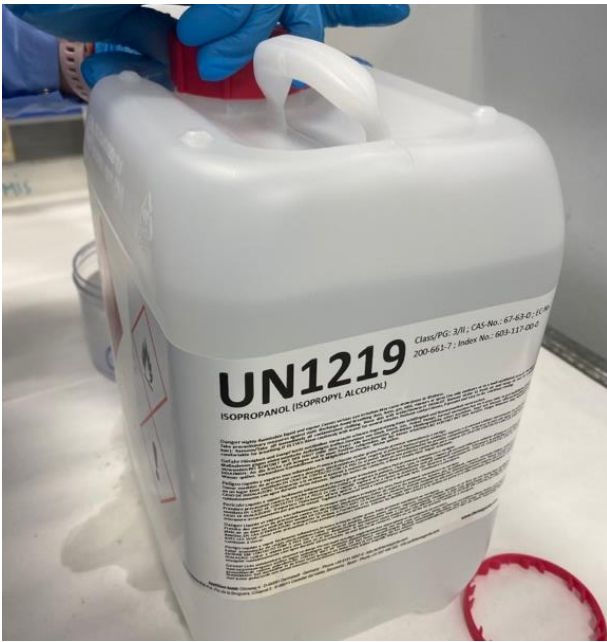


Figura 45. Isopropanol. Fuente propia



Figura 46. Mr. Frosty. Fuente propia



Figura 48. Células de cáncer de mama vistas al microscopio al día 19 de mayo de 2022. Fuente propia



Figura 47. Células de cáncer de mama vistas al microscopio al día 23 de mayo de 2022. Fuente propia



Figura 49. Microtubos con y sin tamoxifeno. Fuente propia



Figura 50. 2 placas de control y 2 con tamoxifeno. Fuente propia

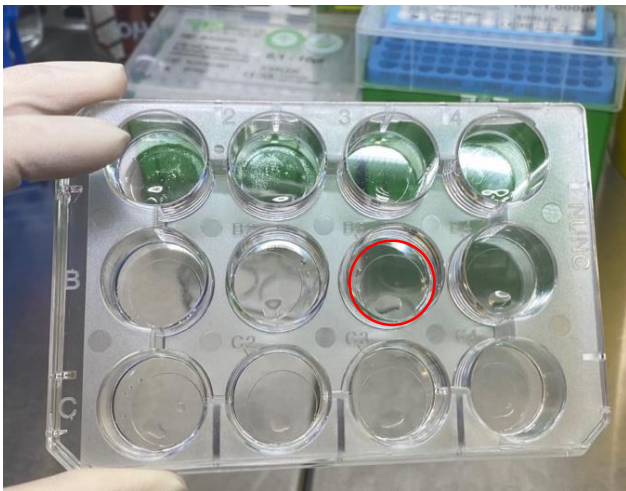


Figura 52. Placa de 12 pocillos con un cubre cada uno. Fuente propia.

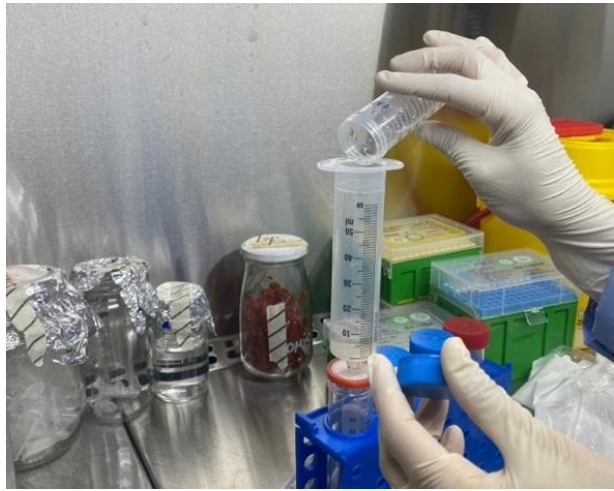


Figura 51. Filtro de los medios. Fuente propia.

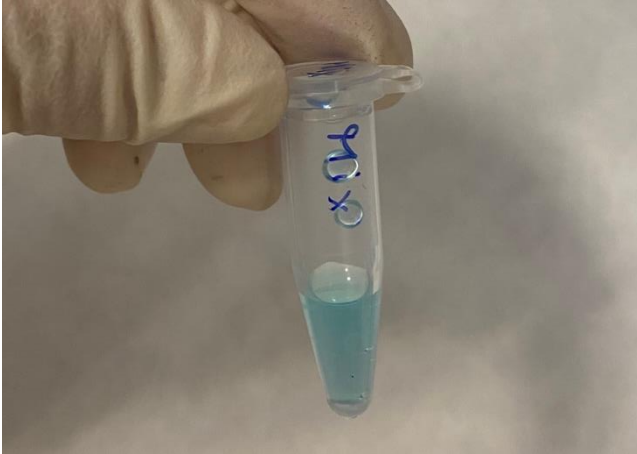


Figura 54. Reacción de EdU. Fuente propia.

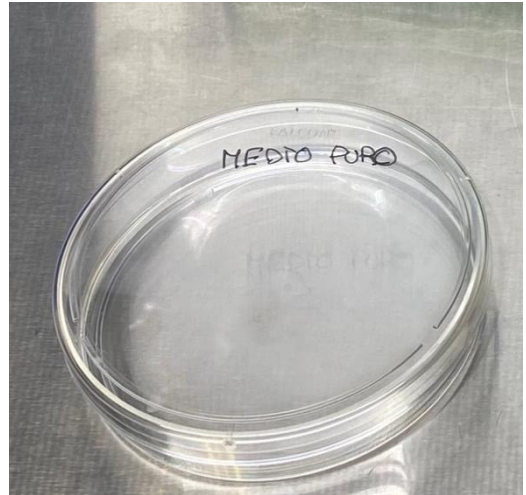


Figura 53. Medio puro. Fuente propia

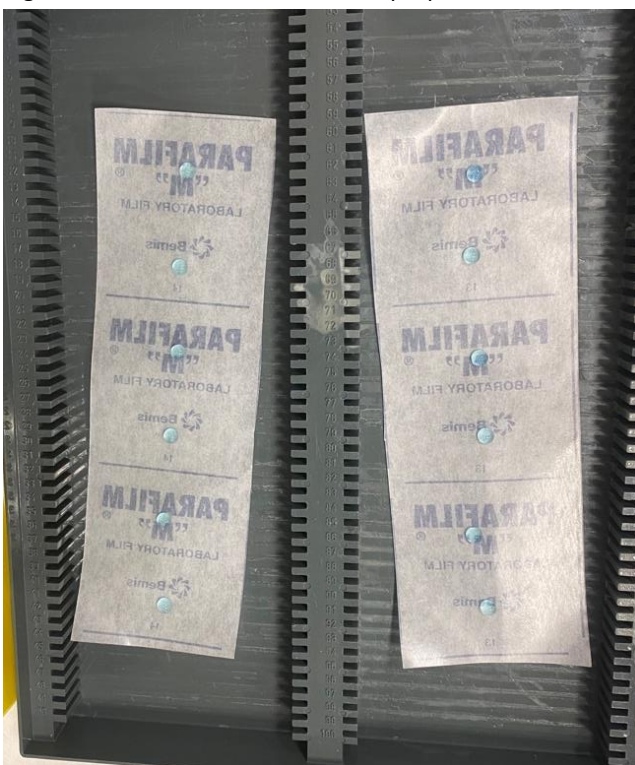


Figura 55. Gotas de reacción de Edu en la parafina.
Fuente propia.

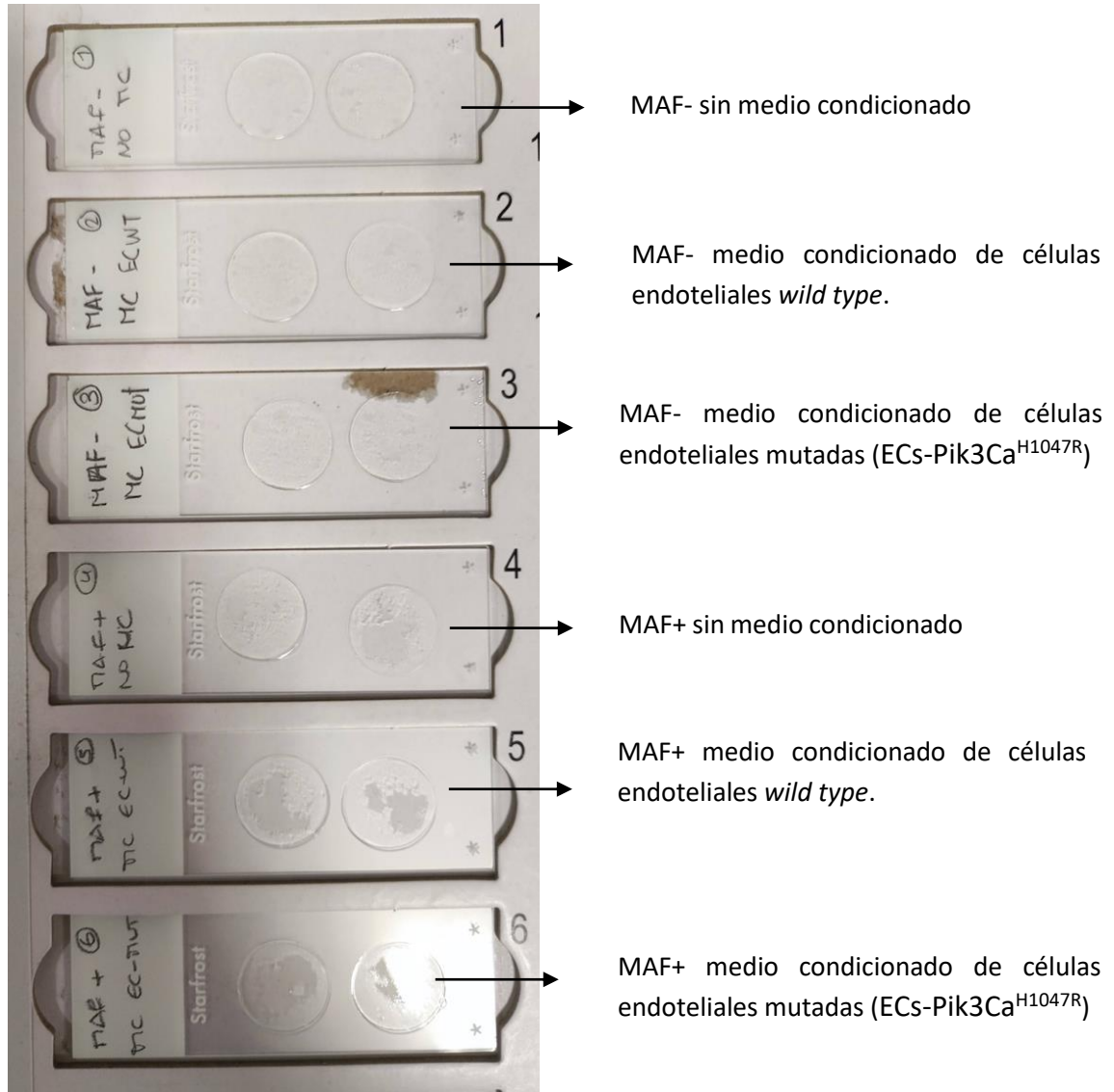


Figura 56. Portaobjetos con 2 cubres para cada muestra. Fuente propia.

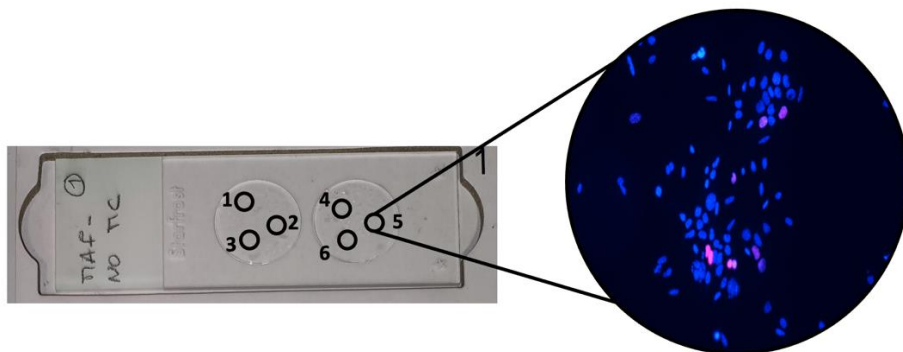


Figura 57. Ejemplo de los campos de visión en los que se toman las imágenes. Fuente propia

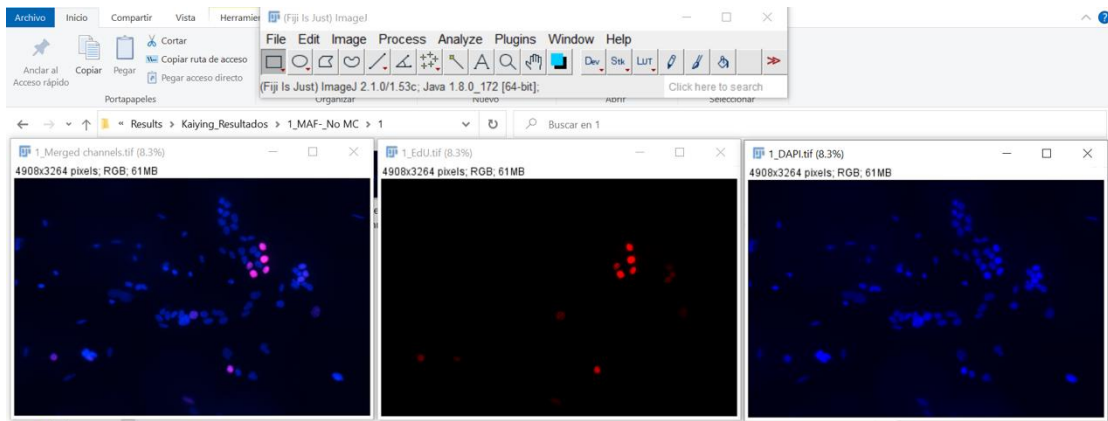


Figura 58. Cuantificación con el programa *Fiji*. Fuente propia.

VI.RESULTADOS

Tomamos 6 fotos de cada tipo de células y 3 fotos para cada uno de los cubres. Podemos observar 2 canales que pueden representarse juntos (*Merged channels*) o separados, uno de DAPI que muestra todas las células presentes y el de EdU que únicamente marca las células que están en división celular.

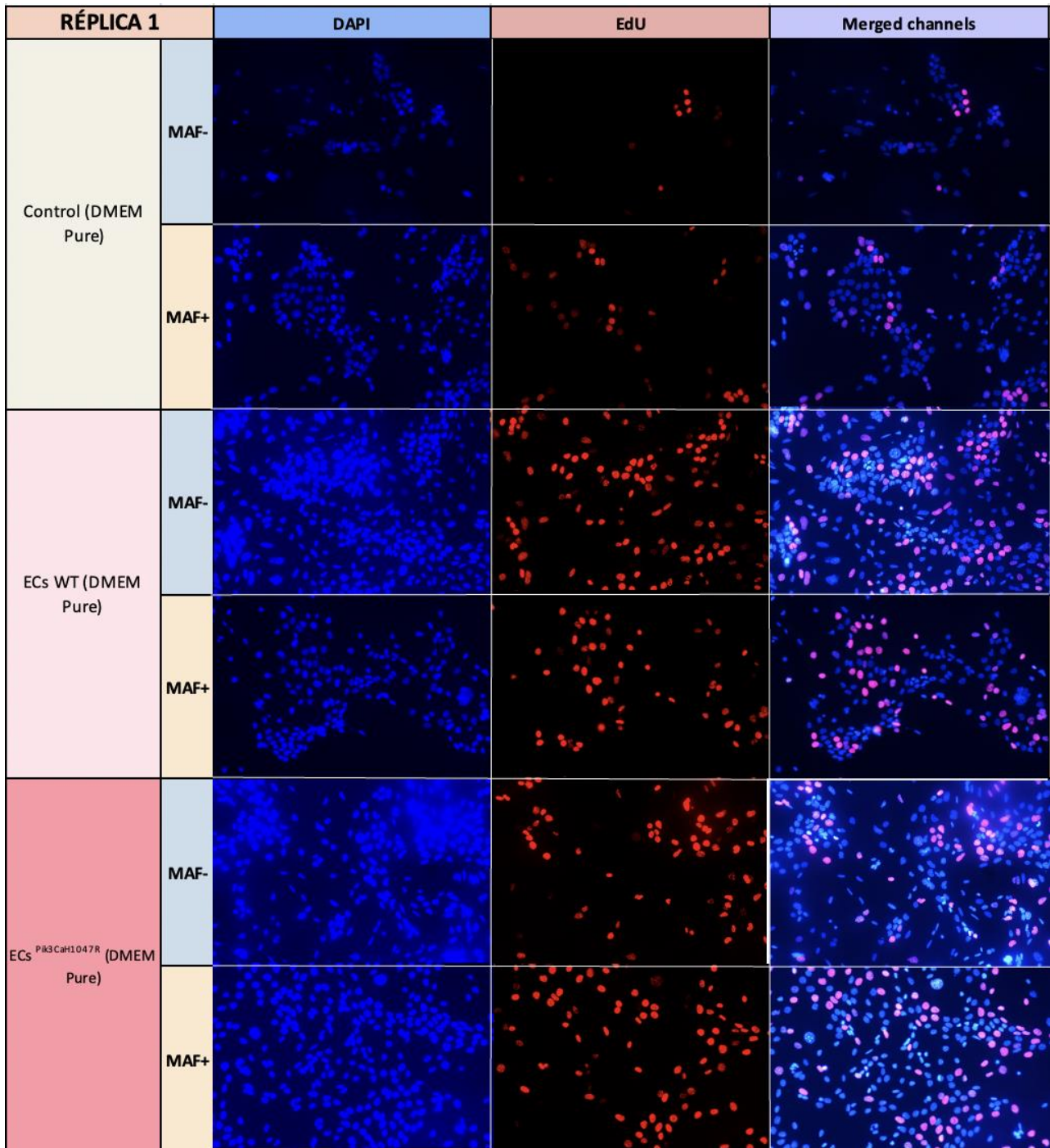


Figura 59. Réplica 1 (imágenes de células MAF-/+ en diferentes cultivos con tinción DAPI y EdU). Fuente propia

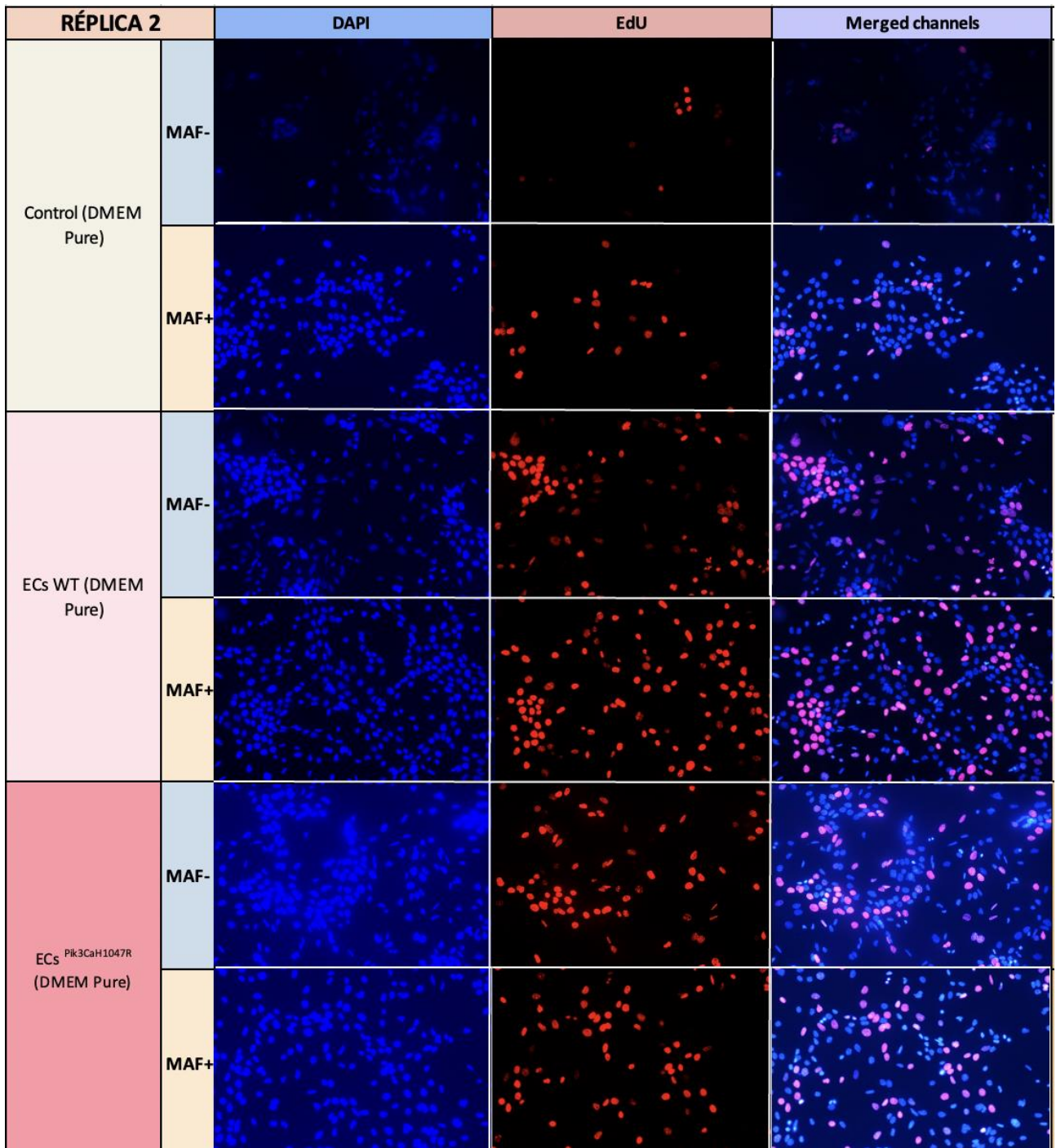


Figura 60. Réplica 2 (imágenes de células MAF-/+ en diferentes cultivos con tinción DAPI y EdU). Fuente propia

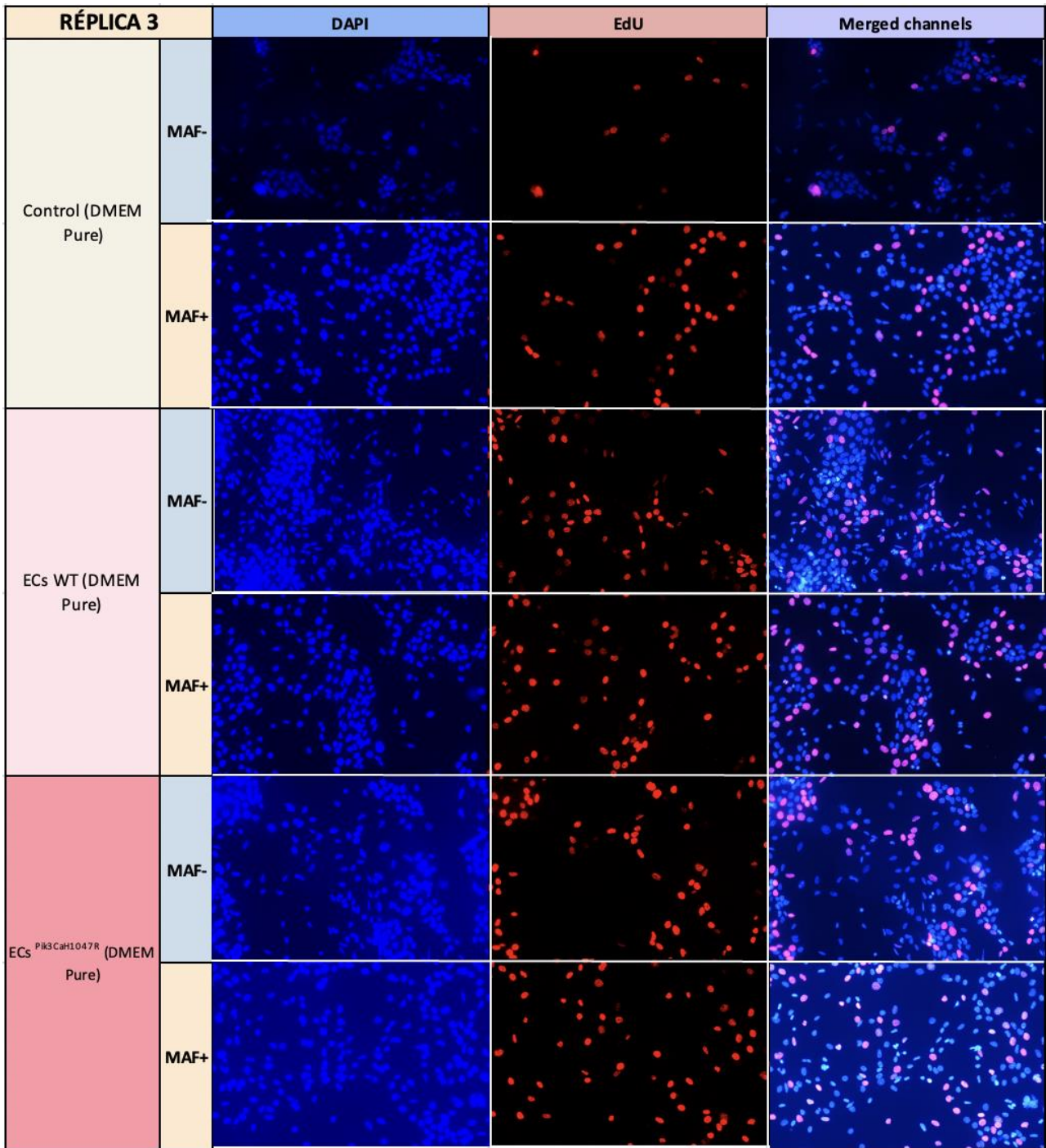


Figura 61. Réplica 3 (imágenes de células MAF-/+ en diferentes cultivos con tinción DAPI y EdU). Fuente propia

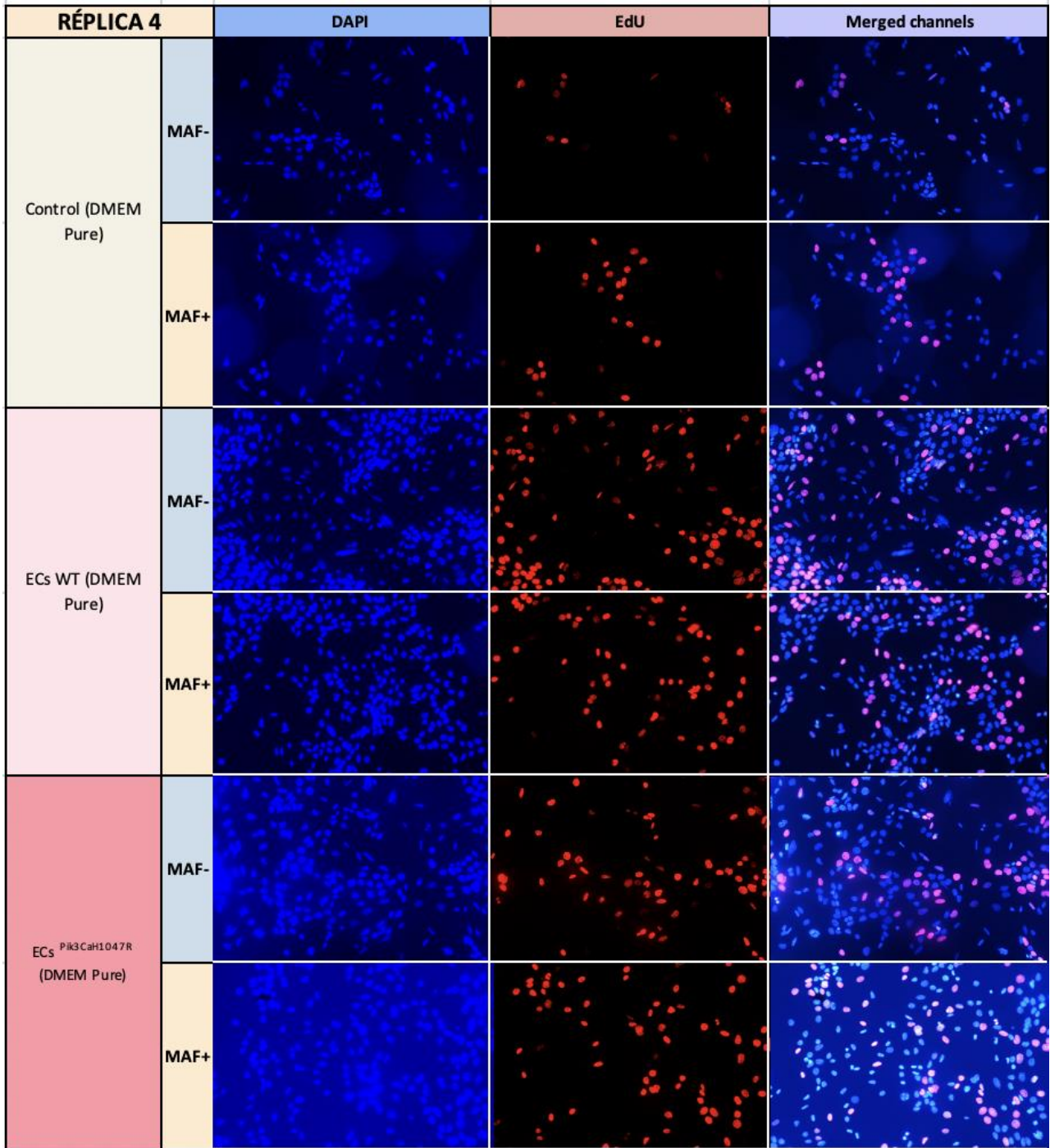


Figura 62. Réplica 4 (imágenes de células MAF-/+ en diferentes cultivos con tinción DAPI y EdU). Fuente propia.

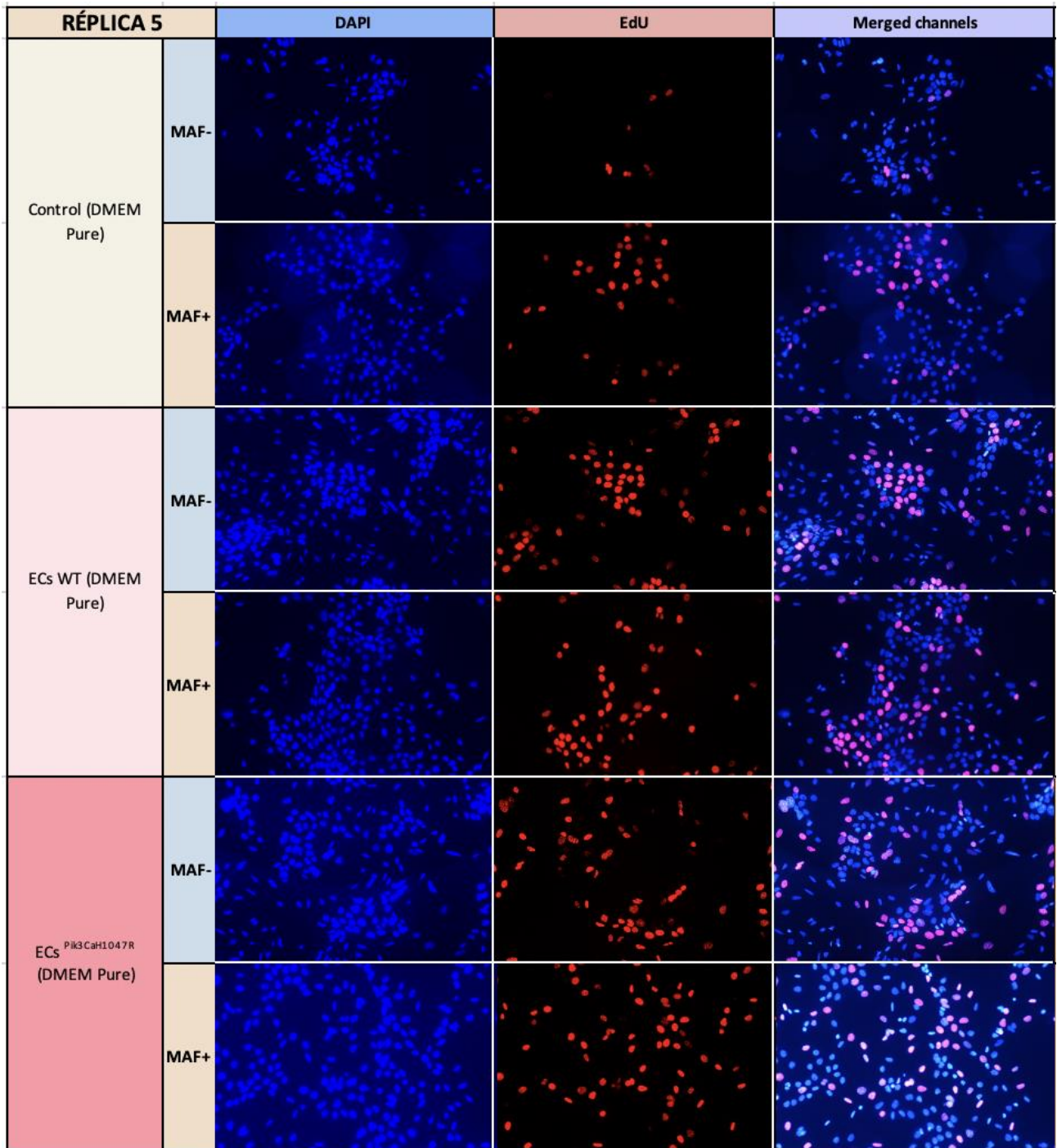


Figura 63. Réplica 1 (imágenes de células MAF-/+ en diferentes cultivos con tinción DAPI y EdU). Fuente propia.

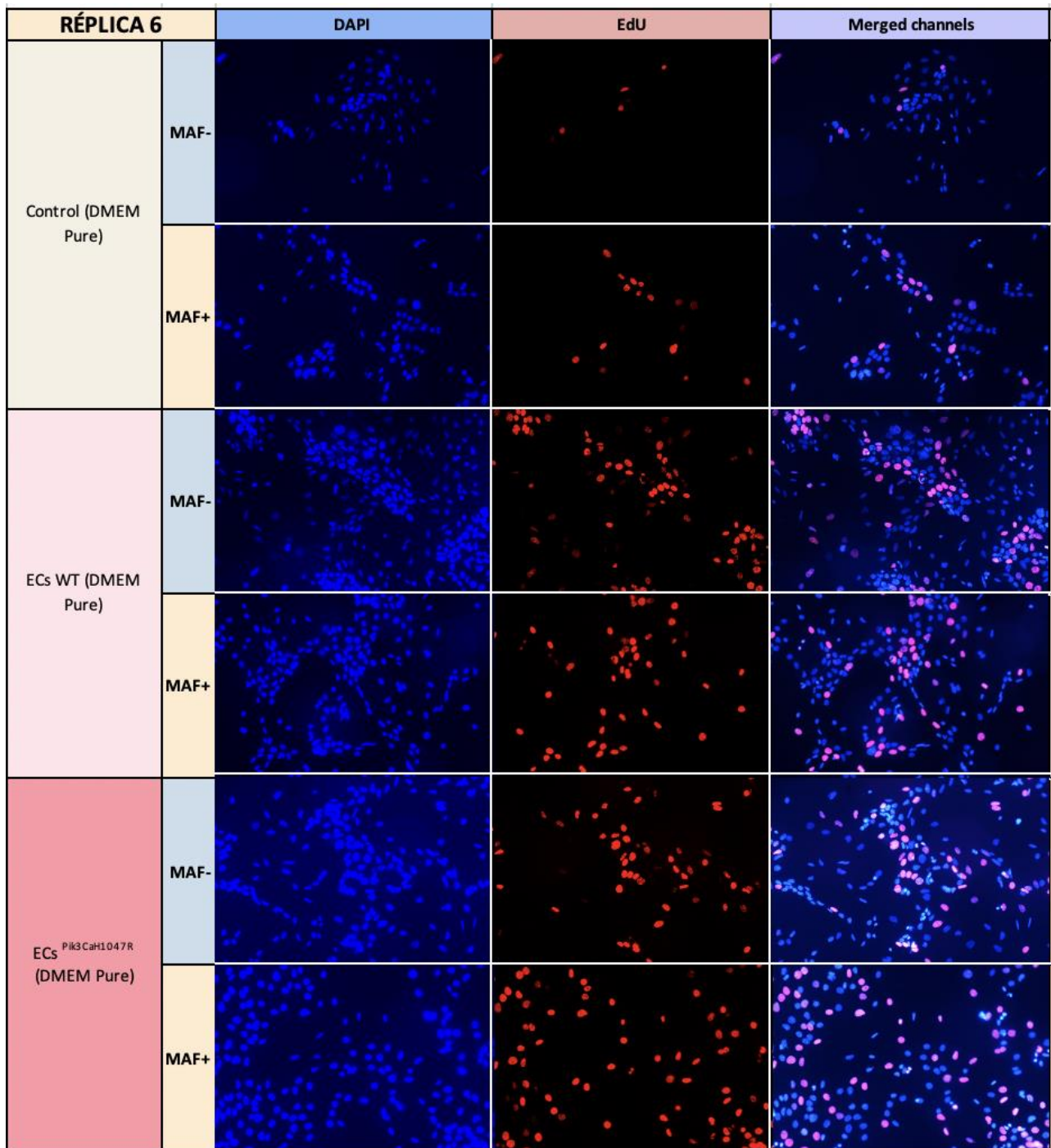


Figura 64. Réplica 6(imágenes de células MAF-/+ en diferentes cultivos con tinción DAPI y EdU). Fuente propia.

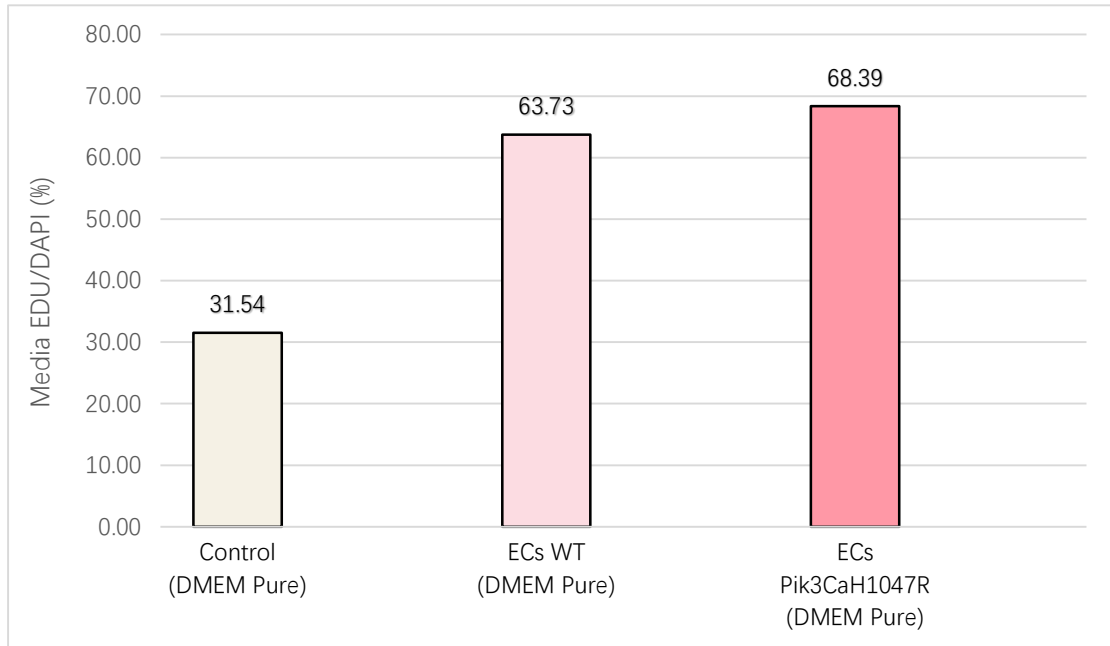
TABLA DE CUANTIFICACIÓN Y PORCENTAJE DE CÉLULAS EN DIVISIÓN EN CADA IMAGEN

Tabla 5. Gráfica de la cuantificación y porcentaje de células en división en cada imagen

Número de muestra	Descripción	Condición	Rep1		Rep2		Rep3		Rep4		Rep5		Rep6		Media		SD (standard deviation)		% Ratio Edu/DAPI	SD (%)	Media% Ratio Edu/DAPI
			DAPI	Edu	DAPI	Edu	DAPI	Edu	DAPI	Edu	DAPI	Edu	DAPI	Edu	DAPI	Edu	DAPI	Edu			
1	Control (DMEM Pure)	MAF-	92	14	122	16	156	18	112	16	121	11	79	7	113,67	13,67	24,46	3,68	12,02	0,15	31,54
		MAF+	232	51	215	27	277	55	99	30	180	36	109	18	185,33	36,17	64,25	13,08	19,51	0,20	
2	ECs WT (DMEM Pure)	MAF-	394	150	268	111	426	97	358	118	265	92	294	102	334,17	111,67	62,39	19,17	33,42	0,31	63,73
		MAF+	207	64	320	129	261	83	317	84	252	67	230	54	264,50	80,17	41,84	24,24	30,31	0,58	
3	ECs Pik3Ca ^{H1047R} (DMEM Pure)	MAF-	308	90	270	93	275	81	263	82	238	84	213	65	261,17	82,50	29,78	8,92	31,59	0,30	68,39
		MAF+	292	100	208	78	235	74	243	82	211	89	197	87	231,00	85,00	31,53	8,41	36,80	0,27	

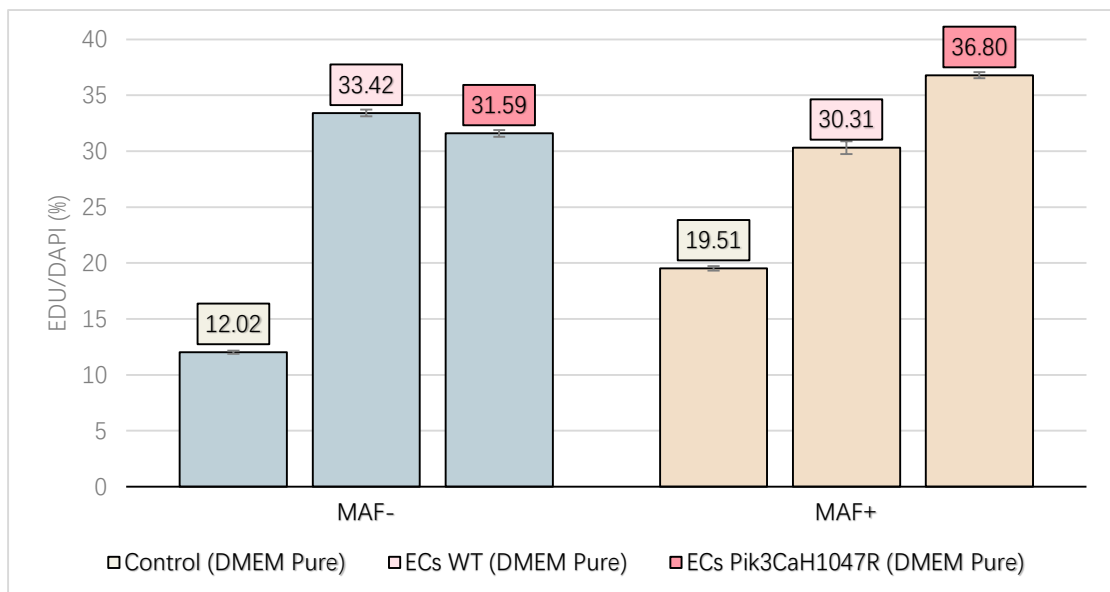
Nota: En la tabla se observa la cantidad de células que están en división (a partir de Edu) en relación con el número total de células (a partir de DAPI) que se observan en una imagen (cada una de las réplicas). En la columna de % Ratio Edu/DAPI se observa esta relación teniendo en cuenta el tipo de células cancerosas y en la columna de Media %Ratio Edu/DAPI se observa la relación en cuanto al tipo de medio.

*Rep: Réplica (cada una de las imágenes de una muestra)

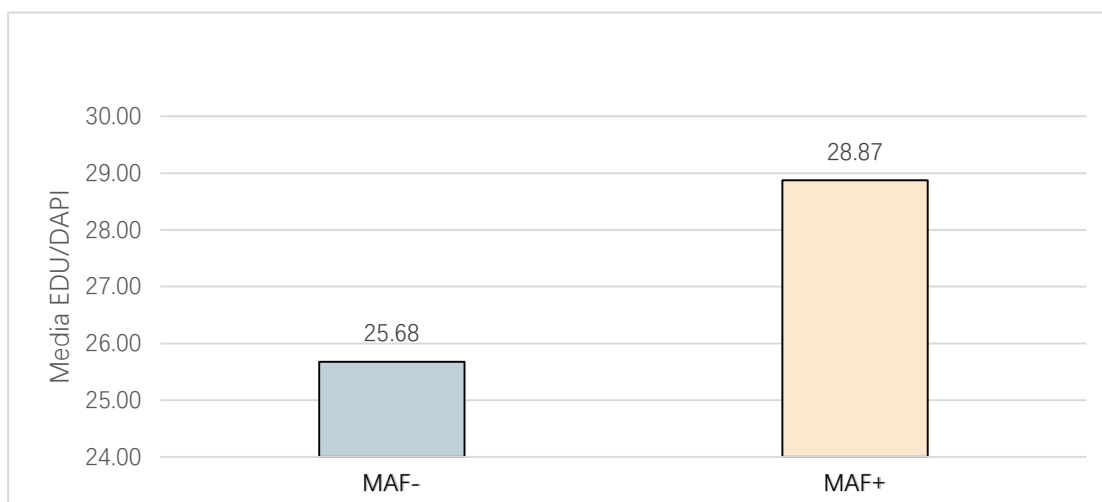


Gráfica 8. En la gráfica se observa la media de ratio EDU/DAPI (%) de los dos tipos de células cancerosas en función del tipo.

ECs: Endothelial cells



Gráfica 9. Diferencia de %EDU/DAPI entre las células cancerosas MAF- y MAF+ y el tipo de medio. De color azul se muestra la ratio de las células MAF- y de color beige, la ratio de las células MAF+. Cada una de las columnas de cada tipo de célula cancerosa representa la ratio en función del medio: Control, medio condicionado de células endoteliales wild type y medio condicionado de células endoteliales mutadas al gen $Pik2Ca^{h1047R}$.



Gráfica 10. Diferencia del Ratio medio EDU/DAPI respecto al tipo de células cancerosas, MA- MAF+.

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tras haber hecho los experimentos y extraído los resultados podemos analizarlos de la siguiente manera.

En la Gráfica 8 se muestra los resultados de la ratio de las células cancerosas teñidas con EdU respecto a la cantidad total de células cancerosas teñidas con DAPI para los dos tipos de células cancerosas en distintos medios. En otras palabras, la gráfica muestra el porcentaje de las células que están en división en el momento de la tinción. Podemos observar que el cultivo con medio condicionado de ECs-Pik3CaH1047R es el que presenta mayor número de células cancerosas en división (68.39%) con una ligera diferencia respecto al cultivo con medio condicionado de Células endoteliales (Ces) *wild type* (63.73%), mientras que el de control presenta la mitad.

En la Gráfica 9 podemos observar la influencia de la presencia del gen MAF en el crecimiento de las células cancerosas en distintos medios.

El crecimiento de las células MAF+ es mayor que el de las MAF- en medios de control y condicionado de ECs-Pik3CaH1047R, ya que mientras que las MAF+ presentan un 19.51% y un 36.80%, las MAF- presentan un 12.02% y un 31.59%, respectivamente. Sin embargo, el resultado es contrario en el medio de las Ces *wild type*, ya que el crecimiento de las células MAF- (33.42%) es mayor al de las células MAF+ (30.31%).

Finalmente, en la Gráfica 10 se muestra la media de ratio EdU/DAPI (%) de los dos tipos de células cancerosas en los 3 medios distintos.

CONCLUSIÓN

I. CONCLUSIONES

Tras haber buscado todas las informaciones relacionadas con el tema del cáncer de mama y la metástasis puedo decir que se han cumplido todos los objetivos del trabajo. Gracias a la oportunidad ofrecida por mi tutora de prácticas he podido vivir durante 3 semanas el trabajo científico de forma directa y conocer cómo trabajan los científicos en un laboratorio auténtico. He conocido las diferentes ramas de la Biomedicina y la investigación de la Oncología para aplicar a posteriori a los pacientes reales.

Después de casi un año, he podido finalizar el trabajo de investigación de forma autónoma y contrastar la certeza de las hipótesis experimentales tras el análisis de los resultados.

Para empezar, se puede afirmar con certeza la primera hipótesis: las células cancerosas de mama crecen con una relación proporcional a la cantidad de factores generados y secretados por las células endoteliales. Observamos en la Gráfica 8 que hay más cantidad de crecimiento en el medio condicionado por las células endoteliales mutadas respecto al medio condicionado por células endoteliales *wild type* y el control. Por lo tanto, la capacidad angiogénica de las células endoteliales afecta positivamente al crecimiento de las células cancerosas.

Sin embargo, se confirma la segunda hipótesis con cierto matiz. Según los resultados de la Gráfica 10, es cierto que la activación del gen MAF afecta al crecimiento de las células cancerosas, ya que existe una diferencia. Además, podemos afirmar que las células que presentan MAF+ crecen más rápidas que las células MAF- (28.87% > 25.68%).

Ahora bien, si nos fijamos en la Gráfica 9 en la columna de medio condicionado por células endoteliales *wild type*, el crecimiento de las células MAF- supera ligeramente al de las células MAF+. Para descartar que sea fruto del azar, es necesario hacer más experimentos y réplicas.

No obstante, a nivel genérico podemos reafirmar los resultados del estudio internacional publicado en *Journal of Bone Oncology*, en el cual se señala que los

tumores que tienen el factor de transcripción MAF alterado presentan mayor riesgo de metástasis ósea (122).

II. FUTURAS POSIBILIDADES

Teniendo de cuenta la certeza de la primera hipótesis, que el nivel de actividad angiogénica es proporcional al crecimiento del cáncer de mama, se podría tomar ciertas medidas de prevención para evitar este crecimiento, ya que el factor angiogénico es algo fácilmente modificable, por ejemplo, reduciendo la actividad física o suministrando al paciente inhibidores de la angiogénesis.

En segundo lugar, debido a que la activación del gen MAF afecta positivamente al crecimiento del cáncer de mama, este factor podría ser señal de metástasis ósea en los pacientes, ya que la mayoría de las células cancerosas metastásicas óseas presentan este gen activado y en este experimento confirmamos su efecto positivo en el crecimiento canceroso.

De esta forma, si se detecta su presencia en el diagnóstico de los pacientes, podríamos tomar ciertas medidas preventivas para evitar el empeoramiento de la enfermedad.

REFERENCIAS

I. INFORMACIÓN ESCRITA

1. Agudo, B. G. (2017). *Valor pronóstico y predictivo del índice de proliferación ki-67 en el carcinoma infiltrante de mama*. Dialnet. Recuperado 23 de julio de 2022, de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=202601>
2. Alcaide Lucena, M., Rodríguez González, C. J., de Reyes Lartategui, S., SáNchez BarrÓN, M. T., GarcÍA Rubio, J., & Torné Poyatos, P. (2021, 2 mayo). *Clasificación actual del cáncer de mama. Implicación en el tratamiento y pronóstico de la enfermedad*. Cirugía Andaluza. Recuperado 31 de abril de 2022, de https://www.asacirujanos.com/admin/upfiles/revista/2021/Cir Andal vol32 n2_09.pdf
3. *Anatomía de la mama | Glándula, complejo areola-pezón, Cooper, lóbulo*. (2017, 13 diciembre). cirugiasdelamama. Recuperado 2 de julio de 2022, de <https://www.cirugiasdelamama.com/anatomia-de-la-mama>
4. *Anatomía de las mamas*. (s. f.). Stanford Medicine Children's Health. Recuperado 27 de junio de 2022, de <https://www.stanfordchildrens.org/es/topic/default?id=anatomadelossenos-85-P03255>
5. Asociación Helping Cáncer. (2019, 10 enero). *Qué causa y qué es el cáncer*. helpingcancer.tv. Recuperado 27 de junio de 2022, de <https://www.helpingcancer.tv/que-causa-y-que-es-el-cancer/?gclid=CjwKCAjwquWVBhBrEiwAt1Kmwo6LVxdMWV5luQNclqO0RIYLuQi98jnzjupE6B10Tc7x-RldhVGgNBoCQ8lQAvD BwE>
6. Arrechea Irigoyen, M., Vicente García, F., Córdoba Iturriagagoitia, A., Ibáñez Beroiz, B., Santamaría Martínez, M., & Guillén Grima, F. (2011). Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 34(2), 219–233. <https://doi.org/10.4321/s1137-66272011000200008>

7. Bezerra, D. C. (2021, 19 julio). *Adenocarcinoma: qué es, tipos y tratamiento*. Tua Saúde. Recuperado 2 de mayo de 2022, de <https://www.tuasaude.com/es/adenocarcinoma/>
8. Brian Wojciechowski, M. D. (2022, 27 julio). *Estadios del cáncer de mama (seno)*. Breastcancer.org. Recuperado 17 de julio de 2022, de <https://www.breastcancer.org/es/informe-patologico/cancer-mama-estadios?gclid=CjwKCAjw5s6WBhA4EiwACGncZYY9euKbNBRP2zA2e72MBNRcRLOrB26KRRKg5yWlPF7x0jd RiZgRoCeOEQAvD BwE>
9. *Cáncer de mama*. (2021, 26 marzo). Organización Mundial de la Salud. Recuperado 18 de julio de 2022, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
10. *Cáncer de mama - Estadios*. (2021, 2 agosto). Cancer.Net. Recuperado 18 de julio de 2022, de <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-mama/estadios>
11. *El cáncer de mama en España*. (2021, 5 marzo). GEICAM - Investigación en Cáncer de Mama. Recuperado 2 de mayo de 2022, de <https://www.geicam.org/sala-de-prensa/el-cancer-de-mama-en-espana>
12. *Cáncer hematológico*. (s. f.). Instituto Nacional del Cáncer. Recuperado 2 de mayo de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/cancer-hematologico>
13. *Cáncer metastásico*. (2021, 17 marzo). GEICAM - Investigación en Cáncer de Mama. Recuperado 23 de julio de 2022, de <https://www.geicam.org/cancer-de-mama/tengo-cancer-de-mama/conoce-mejor-tu-enfermedad/cancer-de-mama-metastasis>
14. Cancer Research UK. (2021, 7 mayo). *Cancer cells*. Recuperado 16 de julio de 2022, de <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts/cancer-cells>
15. *Cancer today*. (s. f.). Internacional Agency for Research on Cancer. Recuperado 9 de julio de 2022, de <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis->

[sunburst?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=20&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=0&include_nmsc_other=1](https://sunburst.v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=20&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=0&include_nmsc_other=1)

16. Candanedo González, F., & Pérez Salazar, E. (2021). El papel de la progesterona en cáncer de mama. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 11(3), 182–188. <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-el-papel-progesterona-cancer-mama-X1665920112439404>
17. *Características de las células tumorales*. (2020, 10 julio). Entorno Estudiantil. Recuperado 17 de julio de 2022, de <https://www.entornoestudiantil.com/caracteristicas-de-las-celulas-tumorales/>
18. *Carcinoma ductal in situ - Síntomas y causas*. (2022, 18 mayo). Mayo Clinic. Recuperado 14 de julio de 2022, de <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/dcis/symptoms-causes/syc-20371889>
19. *Carcinoma epidermoide*. (s. f.). Instituto Nacional del Cáncer. Recuperado 2 de mayo de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/carcinoma-epidermoide>
20. *Carcinoma lobulillar in situ - Síntomas y causas*. (2022, 18 mayo). Mayo Clinic. Recuperado 14 de julio de 2022, de <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/lobular-carcinoma-in-situ/symptoms-causes/syc-20374529>
21. *Carcinoma lobulillar invasivo - Síntomas y causas*. (2022, 18 mayo). Mayo Clinic. Recuperado 14 de julio de 2022, de <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/invasive-lobular-carcinoma/symptoms-causes/syc-20373973>
22. Carvajal, C. C. (2017, diciembre). *El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial*. Scielo. Recuperado 30 de julio de 2022, de https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152017000200090
23. *Causas del Cáncer | PortalCLÍNICA*. (s. f.). Clínic Barcelona. Recuperado 22 de julio de 2022, de

<https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/cancer/causas-y-factores-de-riesgo>

24. *Cell–cell interaction*. (2021, 12 julio). Wikipedia. Recuperado 24 de julio de 2022, de https://es.abcdef.wiki/wiki/Cell%E2%80%93cell_interaction
25. *Célula escamosa*. (s. f.). Instituto Nacional del Cáncer. Recuperado 27 de junio de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/celula-escamosa>
26. *CÉLULAS TUMORALES, CÓMO APARECEN Y QUÉ CARACTERÍSTICAS TIENEN*. (2019, 29 enero). juntosxtusalud. Recuperado 16 de julio de 2022, de <https://juntosxtusalud.com/celulas-tumorales-como-aparecen-y-que-caracteristicas-tienen>
27. *Ciencia Canaria - Cáncer, ¿por qué lo llamamos así?* (2020, 18 junio). Ciencias Canaria. Recuperado 22 de julio de 2022, de <https://www.cienciacanaria.es/secciones/a-fondo/1165-cancer-por-que-lo-llamamos-asi>
28. colaboradores de Wikipedia. (2020, 17 octubre). *Matriz ósea*. Wikipedia, la enciclopedia libre. Recuperado 25 de julio de 2022, de https://es.wikipedia.org/wiki/Matriz_%C3%B3sea#Componentes_inorg%C3%A1nicos
29. colaboradores de Wikipedia. (2022a, enero 23). *Célula endotelial*. Wikipedia, la enciclopedia libre. Recuperado 30 de julio de 2022, de https://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A9lula_endotelial
30. colaboradores de Wikipedia. (2022a, marzo 17). *Capilar sanguíneo*. Wikipedia, la enciclopedia libre. Recuperado 26 de julio de 2022, de https://es.wikipedia.org/wiki/Capilar_sangu%C3%ADneo
31. colaboradores de Wikipedia. (2022b, marzo 20). *Receptor de estrógeno*. Wikipedia, la enciclopedia libre. Recuperado 23 de julio de 2022, de https://es.wikipedia.org/wiki/Receptor_de_estr%C3%B3geno

32. colaboradores de Wikipedia. (2022c, abril 13). *Unión celular*. Wikipedia, la enciclopedia libre. Recuperado 24 de julio de 2022, de <https://es.wikipedia.org/wiki/Unión celular>
33. colaboradores de Wikipedia. (2022b, mayo 20). *Glándula sebácea*. Wikipedia, la enciclopedia libre. Recuperado 29 de junio de 2022, de <https://es.wikipedia.org/wiki/Glándula sebácea>
34. colaboradores de Wikipedia. (2022e, junio 24). *Vaso sanguíneo*. Wikipedia, la enciclopedia libre. Recuperado 30 de julio de 2022, de <https://es.wikipedia.org/wiki/Vaso sanguíneo>
35. colaboradores de Wikipedia. (2022c, julio 16). *Tejido óseo*. Wikipedia, la enciclopedia libre. Recuperado 26 de julio de 2022, de <https://es.wikipedia.org/wiki/Tejido óseo>
36. colaboradores de Wikipedia. (2022d, julio 31). *Mama*. Wikipedia, la enciclopedia libre. Recuperado 22 de julio de 2022, de <https://es.wikipedia.org/wiki/Mama>
37. *Cómo se Propaga el Cáncer (Metástasis)*. (s. f.). CancerQuest. Recuperado 22 de julio de 2022, de <https://www.cancerquest.org/es/biologia-del-cancer/metastasis>
38. Corbin, J. A. (2016, 10 noviembre). *Tipos de cáncer: definición, riesgos y cómo se clasifican*. Psicología y mente. Recuperado 27 de junio de 2022, de <https://psicologiymente.com/salud/tipos-de-cancer>
39. CSIC. (2020, 27 octubre). *La relación entre el metabolismo y las propiedades mecánicas de las*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Recuperado 24 de julio de 2022, de <https://www.csic.es/es/actualidad-del-csic/la-relacion-entre-el-metabolismo-y-las-propiedades-mecanicas-de-las-celulas>
40. *Enfermedad de Paget de seno*. (2012, 10 abril). Instituto Nacional del Cáncer. Recuperado 14 de julio de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/hoja-informativa-paget-seno>
41. Equipo de redactores y equipo de editores médicos de la Sociedad Americana Contra El Cáncer. (s. f.). *Tratamiento del cáncer de seno*. American Cancer Society.

Recuperado 23 de julio de 2022, de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento.html>

42. Equipo de redactores y equipo de editores médicos de la Sociedad Americana Contra El Cáncer. (2016, 12 noviembre). *¿Qué es la recurrencia del cáncer?* American Cancer Society. Recuperado 23 de julio de 2022, de <https://www.cancer.org/es/tratamiento/supervivencia-durante-y-despues-del-tratamiento/preocupaciones-de-salud-a-largo-plazo/recurrencia-del-cancer/que-es-la-recurrencia-del-cancer.html>
43. Equipo de redactores y equipo de editores médicos de la Sociedad Americana Contra El Cáncer. (2018, 9 marzo). *¿Qué causa el cáncer de origen primario desconocido?* American Cancer Society. Recuperado 30 de abril de 2022, de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-origen-primario-desconocido/causas-riesgos-prevencion/que-lo-origina.html>
44. Equipo de redactores y equipo de editores médicos de la Sociedad Americana Contra El Cáncer. (2019a, septiembre 18). *¿Qué es el cáncer de seno?* American Cancer Society. Recuperado 31 de abril de 2022, de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/que-es-el-cancer-de-seno.html>
45. Equipo de redactores y equipo de editores médicos de la Sociedad Americana Contra El Cáncer. (2019b, septiembre 18). *Quimioterapia para el cáncer de seno.* American Cancer Society. Recuperado 22 de julio de 2022, de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento/quimioterapia-para-el-cancer-de-seno.html>
46. Equipo de redactores y equipo de editores médicos de la Sociedad Americana Contra El Cáncer. (2019c, septiembre 18). *Terapia hormonal para el cáncer de seno.* American Cancer Society. Recuperado 16 de julio de 2022, de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento/terapia-hormonal-para-el-cancer-de-seno.html>
47. Equipo de redactores y equipo de editores médicos de la Sociedad Americana Contra El Cáncer. (2019d, septiembre 20). *Estado del receptor hormonal del*

- cáncer de seno*. American Cancer Society. Recuperado 14 de julio de 2022, de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/estado-del-receptor-hormonal-del-cancer-de-seno.html>
48. Equipo de redactores y equipo de editores médicos de la Sociedad Americana Contra El Cáncer. (2020, 21 abril). *Tasas de supervivencia del cáncer de seno*. American Cancer Society. Recuperado 22 de julio de 2022, de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/tasas-de-supervivencia-del-cancer-de-seno.html>
49. Equipo de redactores y equipo de editores médicos de la Sociedad Americana Contra El Cáncer. (2020, 20 noviembre). *¿Qué es el cáncer?* American Cancer Society. Recuperado 30 de abril de 2022, de <https://www.cancer.org/es/tratamiento/como-comprender-su-diagnostico/que-es-el-cancer.html>
50. Europa Press. (2018, 19 octubre). *Guía práctica sobre el cáncer de mama*. Infosalus. Recuperado 18 de julio de 2022, de <https://www.infosalus.com/mujer/noticia-guia-practica-cancer-mama-20181019081934.html>
51. Europa Press. (2021a, abril 20). *El microambiente óseo favorece el comportamiento metastásico del cáncer de mama*. infosalus.com. Recuperado 24 de julio de 2022, de <https://www.infosalus.com/mujer/noticia-microambiente-oseo-favorece-comportamiento-metastasis-cancer-mama-20210420071935.html>
52. Europa Press. (2021, 14 diciembre). *¿Cómo las células cancerosas permanecen latentes y surge la metástasis?* Infosalus. Recuperado 31 de abril de 2022, de <https://www.infosalus.com/salud-investigacion/noticia-celulas-cancerosas-permanecen-latentes-surge-metastasis-20211214080453.html>
53. *Factores de riesgo de cáncer*. (s. f.). MD Anderson Cancer Center. Recuperado 22 de julio de 2022, de <https://mdanderson.es/el-cancer/prevencion/factores-de-riesgo-de-cancer>

54. Farías, C. R., Blas, D. G., & Stephano, A. Q. (2021, 19 diciembre). *El papel del microambiente tumoral y los fibroblastos asociados a cáncer en el desarrollo y la progresión del cáncer de mama* | *Revista de Senología y Patología Mamaria - Journal of Breast Science*. ScienceDirect. Recuperado 24 de julio de 2022, de <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-senologia-patologia-mamaria--131-avance-resumen-el-papel-del-microambiente-tumoral-S0214158221000955>
55. FEFOC Fundación Privada Jordi Estapé. (2019, 11 julio). *Tratamiento del cáncer*. Recuperado 22 de julio de 2022, de https://www.fefoc.org/tratamiento-del-cancer/?gclid=Ci0KCQjw8uOWBhDXARIsAOxKJ2FPQ1xyZrRxeKELAvxOcFxdIGl1SBnU0ya0YTdG9se4jhYwQVqm-saAqhfEALw_wcB
56. G., S. (2019, 21 enero). *Los huesos también tienen vasos sanguíneos*. abc. Recuperado 30 de julio de 2022, de https://www.abc.es/salud/enfermedades/abci-huesos-tambien-tienen-vasos-sanguineos-201901211710_noticia.html
57. Experts, E. (2022, 18 abril). *Tipos de tumores del cáncer de mama*. Eva. Recuperado 14 de julio de 2022, de <https://evacenter.com/blog/tumores-del-cancer-de-mama/>
58. *Gen*. (2022, 4 agosto). NIH. Recuperado 9 de julio de 2022, de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Gen>
59. *Gen supresor de tumores*. (s. f.). Instituto Nacional del Cáncer. Recuperado 11 de julio de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/gen-supresor-de-tumores>
60. *Gen supresor tumoral*. (2022, 4 agosto). Genome.gov. Recuperado 11 de julio de 2022, de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Gen-supresor-tumoral>
61. *La genética*. (2018, marzo). Cancer.Net. Recuperado 11 de julio de 2022, de <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atencion-del-cancer/conceptos-basicos-sobre-el-cancer/la-genetica/la-genetica-del-c%C3%A1nce>
62. *La historia del cáncer ¿Enfermedad moderna o avería biológica?* (2020, 22 octubre). OpenMind BBVA. Recuperado 17 de julio de 2022, de

<https://www.bbvaopenmind.com/ciencia/investigacion/enfermedad-moderna-averia-biologica-la-historia-del-cancer/>

63. *Hueso*. (s. f.). Quimica.es. Recuperado 26 de julio de 2022, de <https://www.quimica.es/enciclopedia/Hueso.html>
64. *Inmunoterapia para el cáncer*. (2019, 24 septiembre). Instituto Nacional del Cáncer. Recuperado 22 de julio de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia>
65. Instituto Nacional del Cáncer. (s. f.-a). *Célula endotelial*. Recuperado 26 de julio de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/celula-endotelial>
66. Instituto Nacional del Cáncer. (s. f.-b). *Homeostasis*. Recuperado 26 de julio de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/homeostasis>
67. Instituto Nacional del cáncer. (s. f.). *Microambiente*. Recuperado 24 de julio de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/microambiente>
68. Instituto Nacional del Cáncer. (s. f.-c). *Tumor*. Recuperado 30 de abril de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/tumor>
69. Instituto Nacional del Cáncer. (2015, 29 abril). *Factores de riesgo: Hormonas*. Recuperado 23 de julio de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/hormonas>
70. Instituto Nacional del Cáncer. (2018, 2 abril). *Inhibidores de la angiogénesis*. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/hoja-informativa-inhibidores-angiogenesis>

71. Instituto Nacional del Cáncer. (2020, 2 diciembre). *Cáncer que regresa*. Recuperado 24 de julio de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cancer-que-regresa>
72. Instituto Nacional del Cáncer. (2021, 5 mayo). *¿Qué es el cáncer?* Recuperado 30 de abril de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
73. Instituto Nacional del Cáncer. (2019, 8 enero). *Radioterapia para el cáncer*. Recuperado 22 de julio de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia>
74. Junquera, R. (s. f.). *Hueso esponjoso*. fisioonline. Recuperado 26 de julio de 2022, de <https://www.fisioterapia-online.com/glosario/hueso-esponjoso>
75. Karp, G. (2022). *Biología Celular Y Molecular* (7.^a ed., Vol. 7). MCGRAW HILL EDUCATION.
<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2036&ionid=153036290#1139752888>
76. Labclinics. (2021, 2 septiembre). *Tumor y microambiente: actividad mitocondrial*. Recuperado 24 de julio de 2022, de <https://www.labclinics.com/2020/02/03/tumor-y-su-microambiente-analisis-de-la-actividad-mitocondrial/>
77. Lcp, B. N. (2022, 24 febrero). *Mama femenina*. Kenhub. Recuperado 2 de julio de 2022, de <https://www.kenhub.com/es/library/anatomia-es/mama-femenina>
78. Lorca, J. (2021, 18 diciembre). *Controlando la latencia tumoral*. Diario de Sevilla. Recuperado 23 de julio de 2022, de https://www.diariodesevilla.es/opinion/analisis/Controlando-latencia-tumoral_0_1639336581.html
79. Lozano, Y. F. (2009, 1 septiembre). *Matriz ósea y consolidación*. Medwave. Recuperado 25 de julio de 2022, de <https://www.medwave.cl/revisiones/revisionclinica/4155.html>
80. M. (2022, 24 febrero). *¿Qué es un oncogén?* Convive con el Cáncer. Recuperado 11 de julio de 2022, de <https://conviveconelcancer.com/que-es-un-oncogen/>

81. Mayanga Sausa, S. L. (2019). Características clínico patológicas del cáncer de mama asociadas a la expresión del marcador celular Ki-67 en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, 2013–2017. *Anales de la Facultad de Medicina*, 80(4). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832019000400003
82. *Metástasis*. (s. f.). Instituto Nacional del Cáncer. Recuperado 5 de mayo de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/metastasis>
83. *Metástasis en los huesos*. (2022, 29 julio). Breascancer.org. Recuperado 25 de julio de 2022, de <https://www.breastcancer.org/es/tipos/metastasis/metastasis-en-los-huesos>
84. Moncada, S., & López-Jaramillo, P. (1991, mayo). *La actividad biológica del endotelio vascular*. Investigación y Ciencia. Recuperado 27 de julio de 2022, de <https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/embudos-de-luz-47/la-actividad-biolgica-del-endotelio-vascular-6312>
85. Nagy, J., & Fawcett, S. B. (s. f.). *Capítulo 19. Seleccionar y adaptar intervenciones comunitarias*. Caja de herramientas comunitarias. Recuperado 22 de julio de 2022, de <https://ctb.ku.edu/es/tabla-de-contenidos/analizar/elegir-y-adaptar-intervenciones-comunitarias/factores-de-riesgo-y-proteccion/principal>
86. *Oncogén*. (2022, 4 agosto). Genome.gov. Recuperado 11 de julio de 2022, de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Oncogen>
87. *Opciones de tratamiento*. (s. f.). Asociación española contra el cáncer. Recuperado 22 de julio de 2022, de <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/tratamientos/preparacion-tratamiento-contra-cancer/opciones-tratamiento>
88. *Osteocito*. (2013, 29 abril). Grupo Sobre Entrenamiento (G-SE). Recuperado 25 de julio de 2022, de <https://g-se.com/osteocito-bp-457cfb26e5e85a>

89. Padial, J. (2020, 18 febrero). *¿Qué es el hueso compacto y el hueso esponjoso?* Curiosoando. Recuperado 30 de julio de 2022, de <https://curiosoando.com/tejido-oseo-compacto-y-esponjoso#&gid=1&pid=1>
90. Pérez, M. D. F., Betancourt, S. M. R., & Fernández, M. T. (2016, 24 octubre). *Factores de riesgo modificables en algunos tipos de cáncer*. Infomed. Recuperado 27 de junio de 2022, de http://www.revzoilomarinello.sld.cu/index.php/zmv/article/view/940/pdf_349
91. personal de MayoClinic. (2022, 27 abril). *Metástasis ósea - Síntomas y causas*. MayoClinic. Recuperado 25 de julio de 2022, de <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/bone-metastasis/symptoms-causes/syc-20370191>
92. Picazo, J. G., & González, J. D. (2018, 20 febrero). *M LINFOMA ESP*. Clínic Barcelona. Recuperado 27 de junio de 2022, de <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/linfoma>
93. Puente, J., & de Velasco, G. (2019, 16 diciembre). *¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla?* Sociedad Española de oncología Médica. Recuperado 9 de julio de 2022, de <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>
94. *Prueba de cáncer de seno HER2*. (2021, 14 septiembre). MedlinePlus. Recuperado 23 de julio de 2022, de <https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/prueba-de-cancer-de-seno-her2/>
95. *Prueba de estrógeno*. (2021, 14 septiembre). MedlinePlus. Recuperado 23 de julio de 2022, de <https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/prueba-de-estrogeno/>
96. *Prueba de progesterona*. (2020, 2 diciembre). MedlinePlus. Recuperado 23 de julio de 2022, de <https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/prueba-de-progesterona/>

97. *¿Qué es la metástasis?* (s. f.). Sanitas. Recuperado 22 de julio de 2022, de <https://www.sanitas.es/sanitas/seguros/es/particulares/biblioteca-de-salud/enfermedades-y-trastornos/cancer/metastasis.html>
98. *Qué es la quimioterapia.* (2019, 5 febrero). Cancer.Net. Recuperado 22 de julio de 2022, de <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atencion-del-cancer/como-se-trata-el-cancer/quimioterapia/qu%C3%A9-es-la-quimioterapia>
99. *¿Qué son los capilares?* (2019, 25 abril). Vive tu piel. Recuperado 26 de julio de 2022, de <https://www.leti.com/vivetupiel/que-es/capilares/>
100. Retama Baldivia, O. (2019, 3 julio). *Glándula mamaria*. Médica Capacitación. Recuperado 2 de julio de 2022, de <https://diplomadomedico.com/glandula-mamaria/>
101. Román Curto, C. (1999). El proceso metastásico I: Invasión local de la matriz extracelular. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 90(4), 143–155. <https://www.actasdermo.org/es-el-proceso-metastatico-i-invasion-articulo-13003470>
102. Román Curto, C., & Armijo Moreno, M. (1999a). El proceso metastásico. II: diseminación tumoral directa, linfática y hemática (1ª parte). *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 90(6), 277–299. <https://www.actasdermo.org/es-el-proceso-metastatico-ii-diseminacion-articulo-13003498>
103. Román Curto, C., & Armijo Moreno, M. (1999b). El proceso metastásico. III: extravasación y proliferación en el órgano diana. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 90(7), 343–357. <https://www.actasdermo.org/es-el-proceso-metastatico-iii-extravasacion-articulo-13003512>
104. Roselló, J. P. (2021, 21 octubre). *Tipos de cáncer de mama, pronóstico y factores de riesgo*. Tu canal de salud. Recuperado 14 de julio de 2022, de <https://www.tucanaldesalud.es/es/teinteresa/preguntas-frecuentes-cancer-mama/tipos-cancer-mama-pronostico-factores-riesgo>
105. Sespm, A. (2019, 23 noviembre). *En 2019 se prevén iagnosticar 33.307 nuevos casos de cáncer de mama en España*. SESPM. Recuperado 2 de mayo de 2022, de

- <https://www.sespm.es/en-2019-se-preven-diagnosticar-33-307-nuevos-casos-de-cancer-de-mama-en-espana/>
106. Soteras, A. (2022, 19 enero). *El complejo microambiente que ayuda a crecer a la metástasis*. EFE Salud. Recuperado 25 de julio de 2022, de <https://efesalud.com/metastasis-investigacion-avances-microambiente/>
 107. Su, J. B. (2015, 26 noviembre). *NCBI - WWW Error Blocked Diagnostic*. National Library of Medicine. Recuperado 30 de julio de 2022, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4660468/>
 108. *TEMA 2. FISIOPATOLOGÍA ÓSEA*. (s. f.). ucm. Recuperado 30 de julio de 2022, de <https://www.ucm.es/data/cont/docs/420-2014-02-18-01%20fisiopatologia%20osea.pdf>
 109. *Teoría de «Semilla y Tierra»*. (s. f.). CancerQuest. Recuperado 24 de julio de 2022, de https://www.cancerquest.org/es/node/6228#footnote2_979t6xx
 110. *Terapia hormonal para el cáncer de mama*. (2021, 28 octubre). MedinePlus. Recuperado 16 de julio de 2022, de <https://medlineplus.gov/spanish/ency/patientinstructions/000909.htm>
 111. Terrazas, B. (2019, 22 enero). *Nuevo hallazgo, vasos sanguíneos en los huesos*. UNAM Global. Recuperado 26 de julio de 2022, de <https://unamglobal.unam.mx/nuevo-hallazgo-vasos-sanguineos-en-los-huesos/>
 112. *Tipos de cáncer de mama*. (2022, 29 junio). Breastcancer.org. Recuperado 31 de abril de 2022, de <https://www.breastcancer.org/es/tipos>
 113. *Tipos de tumores de mama | GEICAM - Investigación en cáncer de mama*. (2021, 17 marzo). GEICAM - Investigación en Cáncer de Mama. Recuperado 14 de julio de 2022, de <https://www.geicam.org/cancer-de-mama/tengo-cancer-de-mama/conoce-mejor-tu-enfermedad/tipos-de-tumores>
 114. *Tipos de cáncer de mama: qué significa tu tipo*. (2022, 24 febrero). Mayo Clinic. Recuperado 23 de julio de 2022, de <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/breast-cancer/in-depth/breast-cancer/art-20045654>

115. Tolosa, A. (2019, 17 abril). *¿Cuántos genes tiene el genoma humano?* Genotipia. Recuperado 4 de agosto de 2022, de https://genotipia.com/genetica_medica_news/genes-genoma-humano/
116. Tresguerres, J. A. F. (2010). *Fisiología humana* (4.ª ed., Vol. 40). McGraw-Hill Education.
117. Tuca Rodríguez, A. (2018, 20 noviembre). *Causas del Cáncer | Portal Cáncer*. Clínic Barcelona. Recuperado 27 de junio de 2022, de <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/cancer/causas-y-factores-de-riesgo>
118. *tumor definicion*. (s. f.). Google. Recuperado 2 de mayo de 2022, de https://www.google.com/search?q=tumor+definicion&sxsrf=ALiCzsbaflVDHYZT49Et4HB9lrstiZx-Kg%3A1659819581420&ei=PdbuYqibGZa-sAeNyoOoCA&ved=0ahUKEwjorarkjbP5AhUWH-wKHQ3IAIUQ4dUDCA4&uact=5&oq=tumor+definicion&gs_lcp=Cgdnd3Mtd2l6EAMyBQgAEMsBMgUIABDLATIFCAAQywEyBggAEB4QFjIGCAAQHhAWMgYIABAeEByyBggAEB4QFjIGCAAQHhAWMgYIABAeEBYyBggAEB4QFjoHCCMQsAMQJzoHCA AQRxCwAzoECCMQJzoFCAAQgAQ6BAgAEA06CAgAEB4QDxANOGYIABAeEA06CAgAEB4QCBANOGgIABAeEA8QFkoECEEYAEoECEYYAFCMAli5GGCLGmgCcAF4AIABnAGIAaoLkgEEMC4xMpgBAKABAcgBCsABAQ&sclient=gws-wiz
119. *Tumor sólido*. (s. f.). Instituto Nacional del Cáncer. Recuperado 27 de junio de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/tumor-solido>
120. Valderrey, J. L. M. (2014, 13 agosto). *Uniones intercelulares*. Naturaleza y turismo. Recuperado 24 de julio de 2022, de <https://www.asturnatura.com/articulos/envoltura-celular/membrana-plasmatica-uniones-intercelulares.php>
121. *What Is Breast Cancer?* (2021, 22 septiembre). Centers for Disease Control and Prevention. Recuperado 27 de junio de 2022, de https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm

122. FarmacoSalud. (2018, 26 octubre). La identificación del gen MAF, avance frente a la metástasis ósea en cáncer de mama. Recuperado 16 de agosto de 2022, de <https://farmacosalud.com/la-identificacion-del-gen-maf-avance-frente-la-metastasis-osea-en-cancer-de-mama/>

II. FIGURAS

Figura 1. Freepik. (2022, 24 mayo). *Diagrama que muestra una célula normal y una célula cancerosa vector gratuito*. Recuperado 9 de julio de 2022, de https://www.freepik.es/vector-gratis/diagrama-que-muestra-celula-normal-celula-cancerosa_27282820.htm#query=celulas%20cancerosas&position=2&from_view=keyword

Figura 2. Daniel Mediavilla. (2020, 8 febrero). *Cuando el cáncer se pueda prevenir con años de antelación*. El País. Recuperado 28 de julio de 2022, de https://elpais.com/elpais/2020/02/07/ciencia/1581074463_703707.html

Figura 3. Freepik. (2021, 9 diciembre). *Vector ilustración aislada de tumor maligno y benigno en tejido sano. propagación de células cancerosas, desarrollo de tumores. infografía médica para carteles, educación, ciencia y uso médico. Vector Premium*. Recuperado 28 de julio de 2022, de https://www.freepik.es/vector-premium/vector-ilustracion-aislada-tumor-maligno-benigno-tejido-sano-propagacion-celulas-cancerosas-desarrollo-tumores-infografia-medica-carteles-educacion-ciencia-uso-medico_21139202.htm

Figura 4. *Gen supresor tumoral*. (2022, 15 agosto). Genome.gov. Recuperado 12 de julio de 2022, de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Gen-supresor-tumoral>

Figura 5. *Oncogén*. (2022, 15 agosto). Genome.gov. Recuperado 12 de julio de 2022, de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Oncogen>

Figura 6. Freepik. (2022a, marzo 3). *Contaminación ambiental por residuos industriales sucios contaminación nuclear* Vector Premium. Recuperado 28 de julio de 2022, de https://www.freepik.es/vector-premium/contaminacion-ambiental-residuos-industriales-sucios-contaminacion-nuclear_24126304.htm

Depositphotos, Inc. (s. f.). *Gráfico vectorial Dieta deficiente* ►Imagen. vectorial *Dieta deficiente*. Depositphotos. Recuperado 28 de julio de 2022, de <https://sp.depositphotos.com/vector-images/dieta-deficiente.html>

Freepik. (2019, 10 junio). *Persona de diferentes culturas y razas* vector. gratuito. Recuperado 28 de julio de 2022, de https://www.freepik.es/vector-gratis/persona-diferentes-culturas-razas_4723818.htm#&position=0&from_view=detail#&position=0&from_view=detail

ico-genetica-molecular-osc. (s. f.). Longwood. Recuperado 28 de julio de 2022, de <https://www.dlongwood.com/ico-genetica-molecular-osc/>

Icono Tumores, cáncer, humano, biología en Diseases and Injury. (s. f.). icons. Recuperado 28 de julio de 2022, de <https://icons.com/es/icono/tumores-c%C3%A1ncer-humano-biolog%C3%ADa-enfermedad-m%C3%A9dico-de-salud-celular/133488>

Figura 7. *Cáncer hematológico*. (s. f.). BIOSALAB. Recuperado 30 de julio de 2022, de <https://biosalab.com/producto/cancer-hematologico/>

Depositphotos, Inc. (s. f.-b). *Imágenes similares a 106932230 organism. tumor. cancer disease*. Depositphotos. Recuperado 30 de julio de 2022, de <https://sp.depositphotos.com/similar-images/106932230.html>

Figura 8. Creative Commons CC0 License. (2020, 7 noviembre). *File:Breast invasive scirrhous carcinoma histopathology (2) HER2 expression.JPG*. Wikipedia commons. Recuperado 13 de agosto de 2022, de

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Breast_invasive_scirrhous_carcinoma_histopathology_\(2\)_HER2_expression.JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Breast_invasive_scirrhous_carcinoma_histopathology_(2)_HER2_expression.JPG)

Figura 9. *Diccionario de cáncer del NCI*. (s. f.). Instituto Nacional del Cáncer.

Recuperado 2 de julio de 2022, de

<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/mama>

Figura 10. *Diccionario de cáncer del NCI*. (s. f.). Instituto Nacional del Cáncer.

Recuperado 2 de julio de 2022, de

<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/mama>

Figura 11. *Anatomía de la mama | Glándula, complejo areola-pezones, Cooper, lóbulo*.

(2017, 13 diciembre). cirugiasdelamama. Recuperado 3 de julio de 2022, de

<https://www.cirugiasdelamama.com/anatomia-de-la-mama?lightbox=datatem-ipmxcgm8>

Figura 12. *Anatomía de la mama | Glándula, complejo areola-pezones, Cooper, lóbulo*.

(2017, 13 diciembre). cirugiasdelamama. Recuperado 3 de julio de 2022, de

<https://www.cirugiasdelamama.com/anatomia-de-la-mama?lightbox=datatem-ipmxcgm8>

Figura 13. *BioDigital Human: Explore the Body in 3D!* (s. f.). Memorial Sloan Kettering

Cancer Center. Recuperado 3 de julio de 2022, de

<https://human.biodigital.com/widgets/mskcc-patient->

[ed/?m=client/MSKCC_Patient_Ed/breast_anatomy.json&imageDisplay=fallba
ck&dk=afca52df4e80ca355d10dad621beea60e9d0a2eb](https://www.tucanaldesalud.es/es/teinteresa/preguntas-frecuentes-cancer-mama/tipos-cancer-mama-pronostico-factores-riesgo)

Figura 14. Roselló, J. P. (2021, 21 octubre). *Tipos de cáncer de mama, pronóstico y factores de riesgo*. Tu canal de salud. Recuperado 4 de julio de 2022, de <https://www.tucanaldesalud.es/es/teinteresa/preguntas-frecuentes-cancer-mama/tipos-cancer-mama-pronostico-factores-riesgo>

Figura 15. FUCAM cáncer de mama. (s. f.). *Facebook - Meld je aan of registreer je*. Facebook. Recuperado 4 de julio de 2022, de <https://www.facebook.com/unsupportedbrowser>

Figura 16Figura 15. Equipo de Redacció (2021, 10 julio). *Tipos de células y tipos de tumores*. Xemio. Recuperado 4 de julio de 2022, de <https://www.xemio.org/es/cancer-de-mama/tipos-de-cancer-de-mama>

Figura 17. V. T. L. E. P. A. T. C. (2015, 7 marzo). *La angiogénesis: esa gran desconocida*. La Ciencia es fácil. Recuperado 30 de julio de 2022, de <https://lacienciaesfacil.com/2014/10/22/la-angiogenesis-esa-gran-desconocida/>

Figura 18. colaboradores de Wikipedia. (2022, 20 julio). *Matriz extracelular*. Wikipedia, la enciclopedia libre. Recuperado 23 de julio de 2022, de https://es.wikipedia.org/wiki/Matriz_extracelular

Figura 19. *Metástasis - Enciclopedia Médica Ferato*. (2010, 2 junio). Enciclopedia Médica Ferato. Recuperado 30 de julio de 2022, de <https://www.ferato.com/wiki/index.php/Met%C3%A1stasis>

Figura 20. Pachmayr, E. (2017). *Underlying Mechanisms for Distant Metastasis - Molecular Biology*. FullText - Visceral Medicine 2017, Vol. 33, No. 1 - Karger Publishers. Recuperado 22 de julio de 2022, de <https://www.karger.com/Article/FullText/454696>

Figura 21. www.django-wiki.org. (2021, 14 octubre). *Uniones celulares - Labster Theory*. LABSTER Theory. Recuperado 24 de julio de 2022, de https://theory.labster.com/cell_junctions-es/

Figura 22. *Kennisgeving voor omleiding*. (s. f.). Fisiologia. Recuperado 24 de julio de 2022, de <https://www.google.com/imgres?imgurl=x-raw-image:///ee516fc7f98308279507213c18c0fbaec2819a178756ec09a5110397d006ab23&imgrefurl=https://biologiaycienciasnaturales.jimdofree.com/app/download/9130033569/U1%2520-%2520Fisiolog%25C3%25ADa%2520celular%25202017.pdf?t%3D1510093375&tbnid=JwiD-cdvUe4zcM&vet=1&docid=MqnO5GrDQfTWeM&w=783&h=386&itg=1&source=sh/x/im>

Figura 24. colaboradores de Wikipedia. (2022b, julio 27). *Hueso*. Wikipedia, la enciclopedia libre. Recuperado 30 de julio de 2022, de https://es.wikipedia.org/wiki/Hueso#/media/Archivo:603_Anatomy_of_Long_Bone_esp.jpg

Figura 25. Padiál, J. (2020, 18 febrero). *¿Qué es el hueso compacto y el hueso esponjoso?* Curiosoando. Recuperado 30 de julio de 2022, de <https://curiosoando.com/tejido-oseo-compacto-y-esponjoso#&gid=1&pid=1>

Figura 26. Centro de Especialidades Medicas-San Antonio. (2021, 20 marzo). *Facebook*

- *Meld je aan of registreer je*. Facebook. Recuperado 30 de julio de 2022, de

https://www.facebook.com/unsupportedbrowser?_rdr

Figura 27. *APB2 - ESTRUCTURA DE LOS VASOS SANGUÍNEOS*. (s. f.). APB2. Recuperado

30 de julio de 2022, de

http://www7.uc.cl/sw_educ/biologia/bio100/html/portadaMlval7.1.13.html

Figura 29. Bonilla, R. (2021, 12 diciembre). *Tratar el endotelio ayuda a frenar la Covid-*

19. *La Razón*. Recuperado 30 de julio de 2022, de

<https://www.larazon.es/salud/20211212/6zfdqqr3czhuxkz5dczupcacs.html>

III. GRÁFICAS

Gráfica 1. *Cancer today*. (s. f.). Cancer Today. Recuperado 9 de julio de 2022, de.

https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0

Gráfica 2 *Cancer today*. (s. f.). Cancer Today. Recuperado 9 de julio de 2022, de

https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0

[B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0)

Gráfica 3. *Cancer today*. (s. f.). Cancer Today. Recuperado 9 de julio de 2022, de.

https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0

Gráfica 4. *Cancer today*. (s. f.). Cancer Today. Recuperado 9 de julio de 2022, de.

https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D

Gráfica 5. *Cancer today*. (s. f.). Cancer Today. Recuperado 9 de julio de 2022, de

https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=20&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0

Gráfica 6. *Cancer today*. (s. f.). Cancer Today. Recuperado 9 de julio de 2022, de.

https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=20&type=1&statistic=5

https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=2&statistic=5&prevalence=1&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0

Gráfica 7. *Cancer today*. (s. f.). Cancer Today. Recuperado 9 de julio de 2022, de.

https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=2&statistic=5&prevalence=1&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0

IV. TABLAS

Tabla 1. Farías, C. R., Blas, D. G., & Stephano, A. Q. (2021, 19 diciembre). *El papel del*

microambiente tumoral y los fibroblastos asociados a cáncer en el desarrollo y

la progresión del cáncer de mama | Revista de Senología y Patología Mamaria

- Journal of Breast Science. ScienceDirect. Recuperado 24 de julio de 2022, de

<https://www.elsevier.es/es-revista-revista-senologia-patologia-mamaria-->

[131-avance-resumen-el-papel-del-microambiente-tumoral-](https://www.elsevier.es/es-revista-revista-senologia-patologia-mamaria--131-avance-resumen-el-papel-del-microambiente-tumoral-)

[S0214158221000955](https://www.elsevier.es/es-revista-revista-senologia-patologia-mamaria--131-avance-resumen-el-papel-del-microambiente-tumoral-S0214158221000955)

Nota: RE: receptores de estrógenos, RP: receptores de progesterona, HER2: receptor

del factor de crecimiento epidérmico humano 2. . Alcaide Lucena, M., Rodríguez

González, C. J., de Reyes Lartategui, S., SáNchez Barrón, M. T., GarcíA Rubio, J.,

& Torné Poyatos, P. (2021, 2 mayo). *Clasificación actual del cáncer de mama*.

Implicación en el tratamiento y pronóstico de la enfermedad. Cirugía Andaluza.

Recuperado 31 de abril de 2022, de

https://www.asacirujanos.com/admin/upfiles/revista/2021/Cir_Andal_vol32_n2_09.pdf

Tabla 3. Equipo de redactores y equipo de editores médicos de la Sociedad Americana

Contra El Cáncer. (2020, 21 abril). *Tasas de supervivencia del cáncer de seno.*

American Cancer Society. Recuperado 22 de julio de 2022, de

<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/tasas-de-supervivencia-del-cancer-de-seno.html>

Tabla 4. Su, J. B. (2015, 26 noviembre). *NCBI - WWW Error Blocked Diagnostic.*

National Library of Medicine. Recuperado 30 de julio de 2022, de

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4660468/>