

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**Nuevos tratamientos para el carcinoma inflamatorio de mama
humano y canino**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Beatriz Monsalve Roquero

Directores

Juan Carlos Illera del Portal
Laura Peña Fernández

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

Nuevos tratamientos para el carcinoma inflamatorio de mama humano y canino

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Beatriz Monsalve Roquero

DIRECTOR

Dr. Juan Carlos Illera del Portal y Dra. Laura Peña Fernández

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

SECCIÓN DEPARTAMENTAL DE FISIOLÓGÍA



**NUEVOS TRATAMIENTOS PARA EL CARCINOMA
INFLAMATORIO DE MAMA HUMANO Y CANINO**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por:

Beatriz Monsalve Roquero

**Bajo la dirección de los Doctores Juan Carlos Illera del
Portal y Laura Peña Fernández**

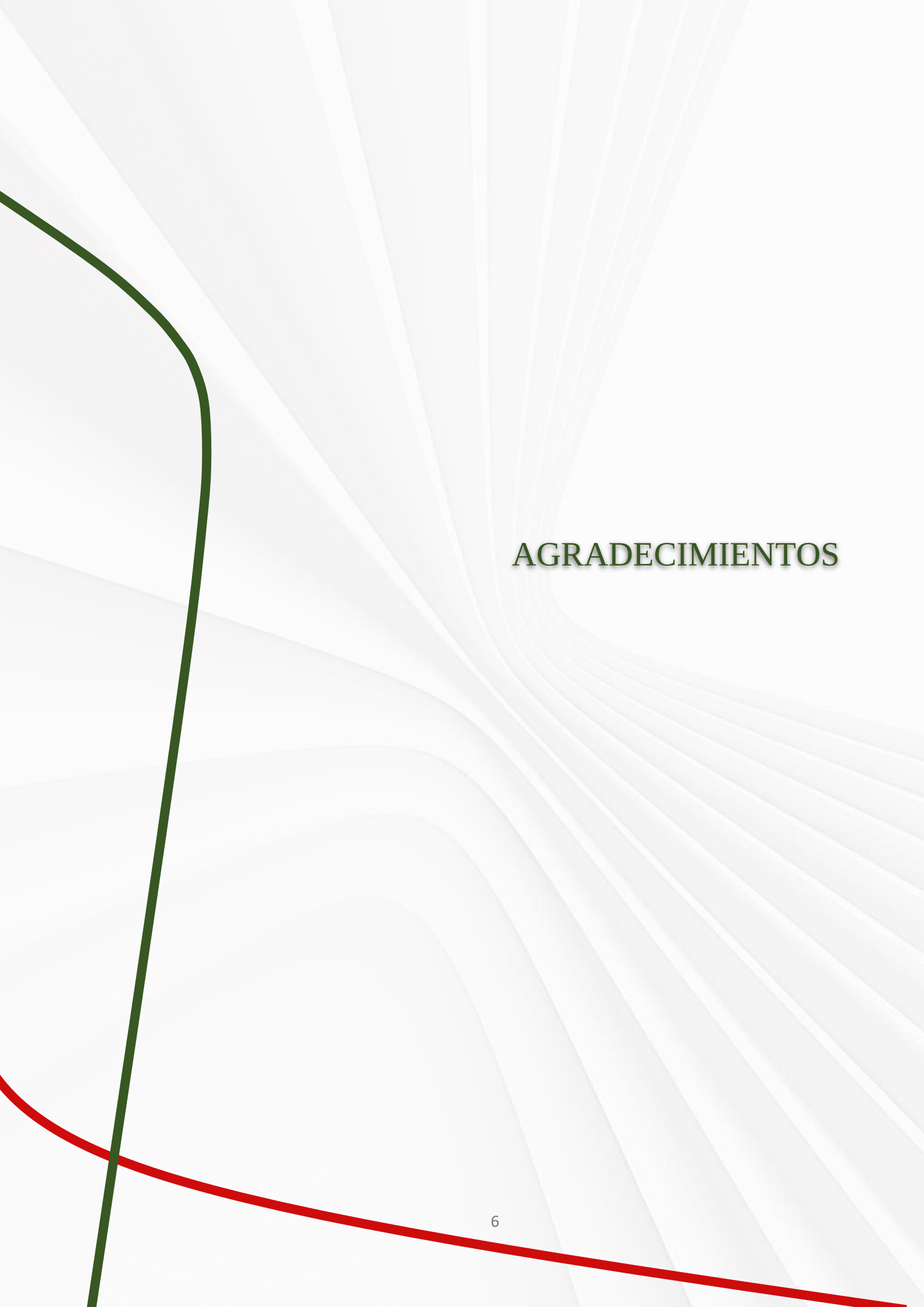
Madrid, 2020



“Cualquier momento es perfecto para aprender algo nuevo.”

Albert Einstein

A mi familia y amigos, por ser lo más importante que tengo.



AGRADECIMIENTOS

Ha sido un largo camino, mucho más de lo esperado en un primer momento. Sin embargo, todos estos años como estudiante de Doctorado han venido cargados de lecciones que me han ayudado a crecer personal y profesionalmente. En este difícil camino he estado acompañada por dos importantes personas, mis Directores de Tesis, que han supuesto para mí un ejemplo y una fuente de inspiración por su absoluta vocación docente y pasión por la ciencia. Juan Carlos Illera, gracias por creer en mí, por hacer fácil lo difícil, por tu flexibilidad, apoyo incondicional y por tus ánimos, acompañados de tu siempre cariñosa sonrisa. Y Laura Peña, gracias por transmitirme tus conocimientos y tu pasión por la anatomía patológica, sin duda espero que dedique a lo que me dedique el resto de mis días, pueda disfrutar algún día de ello tanto como tú de esta ciencia.

A la preciosa familia del Departamento de Fisiología, que además de aprender con y de ellos durante años, he podido ver de primera mano lo que significa el verdadero valor de la amistad mantenida durante toda una vida. Gema, May, María José, Sara, Alberto, Alfredo, Carmen, Carlota y Sara, por todos esos momentos de ciencia, de animalario, de comidas y de congresos de alumnos que, si pudiese, volvería a vivir. Especial agradecimiento a Gema por ayudarme con las últimas correcciones de esta Tesis, sin duda has sido clave para que este trabajo luzca lo máximo posible. Muy especial agradecimiento a Sara Cáceres por acompañarme en mis inicios en el apasionante mundo de los cultivos celulares y enseñarme durante esas incontables horas de laboratorio todo lo que sabías con ese cariño y paciencia que te caracteriza, sin ti esto no habría sido posible. Y gracias May, por tanto y por ser el origen de mi vínculo con el Departamento.

A mi querida Facultad de Veterinaria y a todos sus integrantes, vosotros hacéis que me sienta como en casa cuando vuelvo a la que fue mi vida durante 5 apasionantes años, cargados de momentos, aprendizajes y personas que se han convertido en pilares fundamentales de mi vida. A mis compañeros de vocación y de batallas: Fran, Cris,

Carlos, Dani, Baty, Félix, Eva, Alejandra, Monica, Sergio y muy especialmente a mi amiga del alma, Violeta, mi Pichi, por tantas cosas importantes que aprendimos juntas.

A todas esas fantásticas personas que han aparecido en mi vida y que la enriquecen por ser como son: Ana, Sofía, Mai, Roi, Carmen, Julia, Luis, Javier, Juanjo y muchos más.

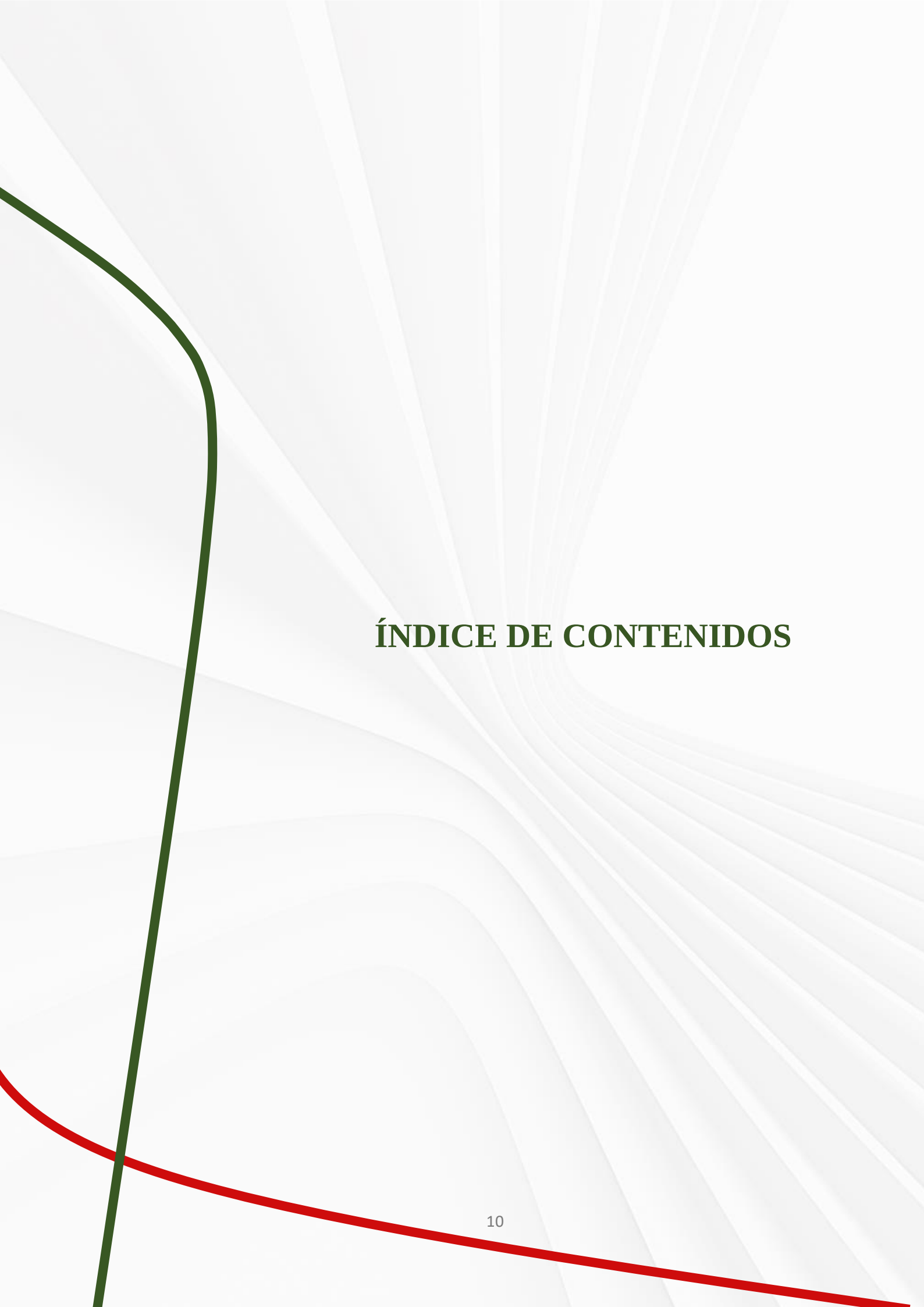
Sin duda alguna, este trabajo se lo dedico muy especialmente a mi familia. A mis padres, que siempre me han apoyado y animado a seguir aprendiendo, da igual de lo que se tratase, siempre respetaron mi afán por la ciencia, los animales y el arte. A mi madre por estar a mi lado siempre. A mi hermano, mi Tron, ese ingeniero del que tan orgullosa estoy, que por muy distintos que seamos y pensemos, compartimos la pasión por aprender. A mis abuelos, tíos abuelos, tíos y primos, por ser un pilar muy importante de mi vida.

A Antonio, por su incondicional apoyo diario en este durísimo camino. Sin duda, eres parte de este éxito y te doy las gracias por impulsarme a ser mi mejor versión cada día. Infinita gratitud siempre a ti y a toda la familia Palomo y Yagüe por el gigantesco cariño con el que siempre me han tratado.

Muy especial recuerdo a esas bellísimas personas que esa terrible enfermedad llamada cáncer, pilar central de esta Tesis Doctoral, me los arrebató antes de tiempo. Mi entrañable abuelo Rafa, mis queridísimos tíos Carlos y Juan, mi tía Begoña, mi querido Juanito y Cristina, os he tenido muy presentes cuando las fuerzas flaqueaban.

A los que sugirieron que abandonase la Tesis, gracias, vuestras palabras fueron la mejor gasolina.

Y por último, a ese ángel con el que comparto la pasión por viajar, los animales y el arte y que tengo presente cada día y especialmente cada vez que sonrío. Abuelo Luis, siempre en mi corazón.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	6
ÍNDICE DE CONTENIDOS	10
ACRÓNIMOS	16
I. RESUMEN	22
II.SUMMARY	30
III.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	38
1. Introducción general al carcinoma inflamatorio mamario humano y canino	40
1.1. Epidemiología del IBC e IMC	43
1.2. Características clínicas de IBC e IMC	48
1.3. Características histopatológicas de IBC e IMC	51
1.4. Diagnóstico y pronóstico de IBC y IMC	53
1.5. Clasificación molecular del cáncer de mama	57
1.6. Producción de hormonas esteroides en cáncer de mama y sus receptores.	60
1.6.1. Progestágenos	62
1.6.2. Estrógenos	64
1.6.3. Andrógenos	66
2. Modelos experimentales en la investigación de IBC e IMC	68
2.1. Modelos in-vitro	70
2.2. Modelos <i>in vivo</i>	75
2.2.1. Utilidad de modelos <i>in vivo</i> en investigación del cáncer de mama	76
3. Opciones terapéuticas actuales en IBC e IMC	78

3.1.	Importancia de los tratamientos hormonales en el éxito terapéutico del cáncer de mama en general y de IBC e IMC en particular.	83
3.2.	Estrategias de tratamiento actuales en IBC e IMC	86
3.2.1.	Terapia hormonal antiandrogénica	86
3.2.2.	Terapia hormonal antiestrogénica	90
3.2.2.1.	Tratamiento del cáncer de mama con fármacos con acción antiaromatasa	92
3.2.2.2.	Tratamiento del cáncer de mama con fármacos con acción antisulfatasa	96
IV.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	100
V.	MATERIAL Y MÉTODOS	104
1.	Cultivos celulares utilizados: IPC-366 y SUM 149	106
1.1.	Origen de las líneas celulares	106
1.2.	Mantenimiento y pase celular.	106
1.3.	Curva de crecimiento celular	108
2.	Fármacos utilizados en los tratamientos	109
2.1.	Flutamida: descripción, mecanismo de acción y preparación	109
2.2.	Letrozole: descripción, mecanismo de acción y preparación	110
2.3.	STX-64: descripción, mecanismo de acción y preparación	111
3.	Tratamiento <i>in vitro</i>	111
3.1.	Preparación de las líneas celulares.	111
3.2.	Tratamiento <i>in vitro</i> de las líneas celulares	112
3.3.	Obtención de medios de cultivo y pellets	112

4. .	Tratamiento <i>in vivo</i>	113
4.1.	Animales	113
4.2.	Inoculación de las células	114
4.3.	Desarrollo del tratamiento <i>in vivo</i>	115
4.4.	Eutanasia, análisis <i>post-mortem</i> y obtención de muestras para posterior análisis laboratorial.	115
5.	Técnicas EIA	117
5.1.	Desarrollo de las técnicas EIA	117
5.2.	Extracción de hormonas esteroides en muestras de sueros	118
5.3.	Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida	119
5.4.	Preparación de las curvas estándar	119
5.5.	Reacción de competición	120
5.6.	Tapizado de placas para el EIA de amplificación	120
5.7.	Adición del sustrato y del cromógeno	121
5.8.	Lectura de las placas.	121
5.9	Procesado de los resultados	121
6.	Análisis estadístico	122
VI.	RESULTADOS	124
1.	Tratamiento con Flutamida.	126
1.1.	Tratamiento <i>in vitro</i>	126
1.1.1.	Contaje y viabilidad celular	126
1.1.2.	Hormonas en medio de cultivo	129

1.2. Tratamiento <i>in vivo</i>	132
1.2.1. Hormonas en suero y homogeneizados tumorales	133
1.2.2. Crecimiento tumoral	135
1.2.3. Metástasis	135
2. Tratamiento con Letrozole	135
2.1. Tratamiento <i>in vitro</i>	135
2.1.1. Contaje y viabilidad celular	136
2.1.2. Hormonas en medio de cultivo	139
2.2. Tratamiento <i>in vivo</i>	142
2.2.1. Hormonas en suero y homogeneizados tumorales	143
2.2.2. Crecimiento tumoral	145
2.2.3. Metástasis	145
3. Tratamiento con STX-64	146
3.1. Tratamiento <i>in vitro</i>	146
3.1.1. Contaje y viabilidad celular	146
3.1.2. Hormonas en medio de cultivo	148
3.2. Tratamiento <i>in vivo</i>	152
3.2.1. Hormonas en suero y homogeneizados tumorales	152
3.2.2. Crecimiento tumoral	153
3.2.3. Metástasis	153
VII. DISCUSIÓN	154
VIII. CONCLUSIONES	182
IX. BIBLIOGRAFÍA	186

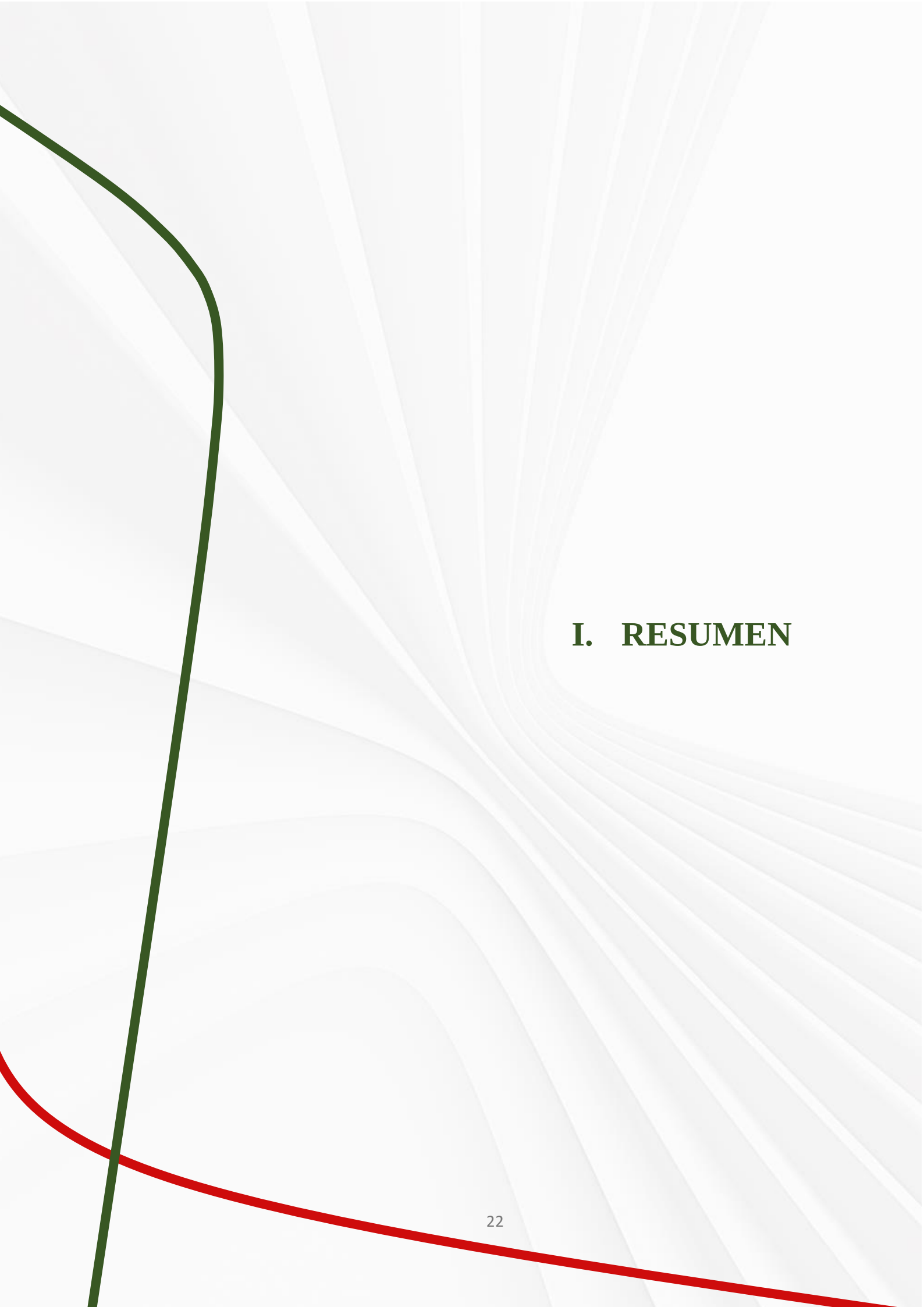


ACRÓNIMOS

- 17 β HSD-1 - 17 β hidroxiesteroidehidrogenasa tipo 1
- A4 – Androstenodiona
- AECC – Asociación Española Contra el Cáncer
- AJCC - Comité americano del cáncer (American Joint Committee of Cancer)
- ASCO - Sociedad Americana del Cáncer (American Society of Clinical Oncology)
- BRCA – Cáncer de mama (BRest CAncer)
- BSA - Albúmina de Suero Bovino (Bovine Serum Albumin)
- CK - Citoqueratina
- COX - Ciclooxigenasa (puede ser tipo 1 o 2)
- CYP19 - Enzima aromatasa
- CYP19A1 - Gen que codifica para la enzima aromatasa
- DHEA - Dehidroepiandrosterona
- DHT - Dehidrotestosterona
- DMEM/F12 - Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12
- DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium.
- DMSO - dimetil sulfóxido
- E2 - 17 β estradiol
- EDTA - Ácido Etilendiaminotetraacético (Ethylenediamine tetracetic acid)
- EGFR - Receptor del factor de crecimiento epidérmico (Receptor of the Endothelial Growth Factor)
- EIA - Enzimo-Inmuno-Análisis
- ER-X - Receptor estrogénico de membrana
- FDA - Administración de alimentos y fármacos (Food and Drug Administration)
- FSH - Hormona folículo-estimulante (Follicle-Stimulating Hormone)
- GPR30 - Receptor de estrógenos acoplado a la proteína G

- HBSS - Hank's Balanced Salt Solution
- hEGF-2 - Factor de crecimiento endotelial humano tipo 2 (Human Epidermal Growth Factor – type 2)
- HER-2 - Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial humano (Human Epidermal growth factor Receptor – type 2)
- HRT: Terapia de reemplazo hormonal (Hormone Replacement Therapy)
- IA - Inhibidor de la Aromatasa
- IBC - Inflammatory Breast Cancer
- IMC - Inflammatory Mammary Cancer
- LH - Hormona luteinizante (Luteinizing Hormone)
- LHRH - Hormona liberadora de gonadotropina (Luteinizing Hormone Releasing Hormone)
- MCF - Michigan Cancer Foundation
- MTS - (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] – 5- (fenil 3-carboximetil) -2- (sulfofenil) 2H – (tetrazolio).
- NCCN – Fundación nacional del cáncer (National Comprehensive Cancer Foundation)
- P4 - Progesterona
- P5 - Pregnenolona
- PBS - Buffer fosfato salino (Phosphate-Buffered Saline)
- PET - Tomografía por emisión de positrones (Positron Emission Tomography)
- RA - Receptor de andrógenos
- RE - Receptor de estrógenos (puede ser α o β)
- RP - Receptor de progestágenos
- SAS - Statistical Analysis Systems

- SFB - Suero Fetal Bovino
- SCID - Inmunodeficiencia combinada severa (Severe Combined Immunodeficiency)
- SERM - Modulador selectivo del receptor estrogénico (Selective Estrogen Receptor Modulator)
- SESPM - Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria
- SO4E1 - Sulfato de estrona
- SOP - Síndrome de ovarios poliquísticos
- STS - Enzima Sulfo-Transferasa
- T - Testosterona
- TAC - Tomografía Axial Computerizada
- TNBC - Cáncer de mama triple negativo (Triple Negative Breast Cancer)
- VEGF - Factor de crecimiento endotelial vascular (Vascular Endothelial Growth Factor)
- VM - Mimetismo vascular (Vasculogenic Mimicry)



I. RESUMEN

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común en mujeres y la cuarta causa de muerte de las mismas a nivel global, cuya incidencia no ha dejado de aumentar en los últimos años debido a muy diversos factores: genéticos, cambios demográficos, hábitos de vida, exposición a radiaciones y tratamientos hormonales, entre otros.

Un caso particular de cáncer de mama es el carcinoma inflamatorio mamario o Inflammatory Breast Carcinoma (IBC). Descrito por primera vez en 1814 por Charles Bell, es el subtipo de tumor mamario menos prevalente pero que destaca por su gran mortalidad.

Actualmente, la definición de IBC aceptada es la del American Joint Committee of Cancer (AJCC), que dice así: “es una entidad clínico-patológica caracterizada por un eritema difuso y un edema del pecho, frecuentemente sin encontrarse una masa palpable”.

En la especie canina, a pesar de que se dispone de menos datos registrados sobre la incidencia y prevalencia del cáncer de mama, se sabe que es la neoplasia más frecuente en las hembras, suponiendo más del 50% de los diagnósticos oncológicos. Al igual que en la especie humana, existen numerosos tipos de cáncer de mama en perras y el más agresivo y con peor pronóstico en la especie canina es el carcinoma inflamatorio mamario o Inflammatory Mammary Carcinoma (IMC), que fue descrito años más tarde que el IBC, en concreto en 1983 por Susaneck.

El carcinoma inflamatorio, tanto en humanos como en perros, presenta una serie de características clínicas que lo diferencian del resto de tumores de la glándula mamaria, siendo su aparición súbita uni o bilateral. Además, en ambas especies se caracteriza por la presencia de eritema que ocupa al menos un tercio de la mama y que tiende a crecer hasta ocupar casi la totalidad de la misma, apareciendo también un aumento de la temperatura del parénquima mamario acompañado de un edema que le confiere su

aspecto característico de “piel de naranja”. Tanto el IBC como el IMC destacan también por su alto potencial linfangioinvasivo, causante de la presencia de émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis superficial, que provocan el eritema y edema tan característicos de esta patología.

A pesar de ser el tipo de cáncer de mama con peor pronóstico y menor supervivencia de todos, gracias a la mejora de los protocolos terapéuticos basados en la implementación de tratamientos combinados de quimioterapia, radioterapia y cirugía, tanto el pronóstico como la supervivencia de las pacientes con IBC ha mejorado con el paso de los años.

Múltiples estudios han demostrado la importancia de las hormonas esteroideas en la génesis, desarrollo y crecimiento de tumores mamarios tanto en mujeres pre como postmenopáusicas, destacando el papel de los estrógenos. Sin embargo, el tratamiento hormonal no está indicado en primera instancia para tratar IBC e IMC como sí está indicado para tratar otros tumores mamarios.

En medicina veterinaria las opciones terapéuticas son muy limitadas y desde que la perra es diagnosticada, la supervivencia media reportada es de 1 mes.

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado el efecto de tres fármacos (Flutamida, Letrozole y STX-64) a nivel *in vitro* en una línea celular de IBC (IPC-366) y otra de IMC (SUM 149) y a nivel *in vivo* en ratones Balb/SCID con tumores generados con las citadas líneas celulares mediante una técnica de xenotrasplante.

La Flutamida es un fármaco antiandrogénico no esteroideo que compite con los andrógenos por la unión al receptor androgénico, bloqueando o inhibiendo su acción. Este fármaco estaba indicado únicamente para el tratamiento de neoplasias prostáticas y, actualmente, también se utiliza en el tratamiento de algunos tumores mamarios.

Letrozole es un inhibidor de la aromatasa de tercera generación que inhibe de forma selectiva y reversible la enzima aromatasa, impidiendo con ello la síntesis de estrógenos. Actualmente es uno de los fármacos más pautados en la terapia hormonal adyuvante para el cáncer de mama.

STX-64 es un inhibidor irreversible de la enzima sulfatasa y, por ello, impide la síntesis de estrógenos biológicamente activos. Actualmente se está investigando su eficacia y seguridad en el tratamiento de cáncer de mama metastático y en el cáncer de mama localmente avanzado.

Los tres tratamientos se realizaron de forma sucesiva y siguieron el mismo protocolo en el que se establecieron 4 grupos tanto para los ensayos *in vivo* como *in vitro*: control, dosis 1, dosis 2 y dosis 3, correspondiendo los grupos “dosis” a los tratados con cada fármaco, siendo la dosis administrada creciente según avanzaba la numeración del grupo asignado. Las líneas celulares utilizadas para estos experimentos fueron dos: IPC-366 y SUM149, habiendo 3 flask de cada línea en cada grupo del estudio. En cuanto a los ratones, cada grupo contó con 7 individuos hembra, todos ellos alojados en el animalario de la sección departamental de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense siguiendo la normativa vigente.

Los tratamientos se administraron en 3 días consecutivos en el medio de cultivo en el caso de los tratamientos *in vitro* y cada 72 horas en el ensayo *in vivo* por inyección subcutánea en las ratonas. Se analizó el efecto de cada uno de los tratamientos en la multiplicación y viabilidad celular y se cuantificó la concentración de hormonas esteroideas en el medio de cultivo, en el suero sanguíneo de las ratonas y en homogeneizado de tumor mediante una técnica de ELISA previamente validada.

Adicionalmente, se estudió el impacto de los tratamientos en la progresión del tamaño de tumor en los ratones y en su capacidad de metástasis.

La Flutamida produjo una reducción significativa de la proliferación y crecimiento de ambas líneas celulares en los ensayos *in vitro* y del crecimiento del tumor en el experimento *in vivo*, así como un aumento de la concentración de andrógenos en el medio de cultivo, suero y homogeneizado del tumor. Estos altos niveles de andrógenos en suero y en el tumor pudieron ser la causa de la reducción de la incidencia de metástasis, también observada en el estudio, coincidiendo con los resultados publicados por otros autores. Por esto, la terapéutica de IBC e IMC con terapias dirigidas al receptor de andrógenos, y concretamente con Flutamida, ha demostrado ser una opción a considerar para el tratamiento de IBC e IMC.

Letrozole demostró ser eficaz tanto en el ensayo *in vivo* como *in vitro*, generando una reducción significativa de la proliferación y viabilidad celular, así como del tamaño tumoral e incidencia de metástasis. A nivel hormonal destacó la reducción de la síntesis estrogénica *in vitro* e *in vivo* y un aumento de la concentración de SO4E1. En línea con los resultados publicados por otros autores, esta reducción de la síntesis estrogénica puede explicar la observada reducción de la viabilidad celular, tamaño celular e incidencia de metástasis, debido a la elevada afinidad que tienen las células de los tumores mamarios con los estrógenos. Adicionalmente, este aumento de la síntesis de SO4E1 puede ser consecuencia de esta reducción de la concentración de estrógenos, actuando esta hormona como reservorio para una futura síntesis de estas hormonas.

Actualmente este fármaco es una opción de primera línea en la terapéutica de tumores mamarios no inflamatorios y estos resultados aportan evidencia para que esté

también indicado para tratar tumores mamarios de tipo inflamatorio tanto en mujeres como en perras.

Respecto al experimento con STX-64, destacar que se observó una reducción significativa de la proliferación y viabilidad celular, además de una ausencia total de metástasis en los ratones tratados. A nivel hormonal, se observó una discreta reducción de la síntesis estrogénica y de P4, así como una elevada concentración de T. Esta reducción de la síntesis de estrógenos y la alta concentración de T podrían explicar esta ausencia de metástasis como consecuencia del mecanismo de acción antiproliferativo de los andrógenos.

Los resultados obtenidos en los distintos experimentos *in vitro* e *in vivo*, evidencian que los tres tratamientos impactan sobre la viabilidad y multiplicación celular, sobre la síntesis hormonal tanto *in vitro* como *in vivo* y sobre el crecimiento tumoral y/o metástasis de distintas maneras, siendo interesante contemplar su uso combinado para obtener mejores resultados clínicos. Además, podrían ser considerados para el tratamiento de IBC e IMC y también para los TNBC (Triple Negative Breast Cancer).. Adicionalmente, debido a las grandes similitudes de los resultados obtenidos a nivel *in vitro* como *in vivo* de ambas líneas celulares, se puede confirmar la utilidad del modelo canino del IMC para investigación del IBC.



II. SUMMARY

Breast cancer is the most common type of cancer in women and the fourth cause of death in women globally whose the incidence is increasing in the recent years due to many different factors: genetics, demographic changes, lifestyle habits, exposure to radiation and hormonal treatments, among others.

A particular case of breast cancer is Inflammatory Breast Carcinoma (IBC). First described in 1814 by Charles Bell, it is the least prevalent breast tumor subtype, but it stands out for its high mortality rate.

Actually, the accepted definition of IBC is the one developed by the American Joint Committee of Cancer (AJCC), which says: "it is a clinicopathological entity characterized by diffuse erythema and edema of the breast, frequently without finding a palpable mass."

In the canine species, despite the fact that there is less recorded data regarding the incidence and prevalence of breast cancer, it is known that it is the most frequent neoplasia in female dogs, accounting for more than 50% of oncological diagnoses. As in the humans species, there are numerous types of breast cancer in canine species and the most aggressive and with the worst prognosis is inflammatory carcinoma or Inflammatory Mammary Carcinoma (IMC), which was described years later than IBC, specifically in 1983 by Susaneck.

Inflammatory carcinoma, both in humans and in dogs, has a series of clinical characteristics that differentiates it from the rest of mammary gland tumors, being its appearance sudden and unilateral or bilateral. In both species it is characterized by the presence of erythema that occupies at least one third of the breast that tends to grow and occupy almost the entire breast, appearing also an increase in the temperature of the mammary parenchyma accompanied by edema that gives it its characteristic "orange

peel" appearance. Both IBC and IMC also stand out for their high lymphangioinvasive potential, causing the presence of tumor emboli in the lymphatic vessels of the superficial dermis, which will generate the erythema and edema so characteristic of this pathology.

Although IBC is the type of breast cancer with the worst prognosis and lowest survival rates of all, thanks to the improvement of therapeutic strategies based on the implementation of combined treatments of chemotherapy, radiotherapy, surgery, both prognosis and survival rates of the IBC patients have improved over the years.

Multiple studies have shown the importance of steroid hormones in the genesis, development and growth of breast tumors in both pre and postmenopausal women, having the estrogens an important paper. However, hormonal treatment is not indicated as a first treatment option to treat IBC and IMC as it is indicated to treat other breast tumors.

In veterinary medicine, the therapeutic options are very limited and after the diagnosis of the dog, the average survival-time reported is 1 month.

In this Doctoral Thesis, the effect of three drugs (Flutamide, Letrozole and STX-64) has been studied at a *in vitro* level in a IBC cell line (IPC-366) and in a IMC cell line (SUM 149) and at a *in vivo* level in Balb / SCID mice with tumors generated with the cited cell lines by a xenotransplantation technique.

Flutamide is a non-steroidal antiandrogenic drug that competes with androgens for binding to the androgen receptor, blocking or inhibiting it's action. This drug was only indicated for the treatment of prostate tumors and actually is being used for the treatment of some breast tumors as well.

Letrozole is a third generation aromatase inhibitor, which selectively and reversibly inhibits the aromatase enzyme and thereby preventing estrogen synthesis. In

nowdays, it is one of the most commonly prescribed adjuvant hormonal therapies for breast cancer.

STX-64 is an irreversible inhibitor of the sulfatase enzyme and therefore prevents the synthesis of biologically active estrogens. It's efficacy and safety in the treatment of metastatic breast cancer and locally advanced breast cancer is currently being investigated.

The three treatments were carried out successively and followed the same protocol in which 4 groups were established for both *in vivo* and *in vitro* tests: control, dose 1, dose 2 and dose 3, where the "dose" groups corresponded to those treated with each drug, being the administrated dose greater when the assigned number of the group raised. There were two cell lines used for these experiments: IPC-366 and SUM149 and 3 flasks of each line in each study group. Regarding the mice, each group had 7 individuals, all of them housed in the animal facility of the Departmental Section of Physiology of the Faculty of Veterinary Medicine of the Complutense University of Madrid, following current regulations.

The treatments were administered on 3 consecutive days in the culture medium in the case of the *in vitro* treatments and every 72 hours in the *in vivo* test by subcutaneous injection in the mice. The effect of each of the treatments on cell multiplication and viability was analyzed and the concentration of steroid hormones in the culture medium, in the blood serum of the mice and in the tumor homogenate was quantified using a previously validated ELISA technique. Additionally, the impact of the treatments on the progression of tumor size in mice and their ability to metastasize was also studied.

Flutamide produced a reduction on the proliferation and growth of both cell lines in the *in vitro* tests and in the tumor growth in the *in vivo* experiment as well as an increase

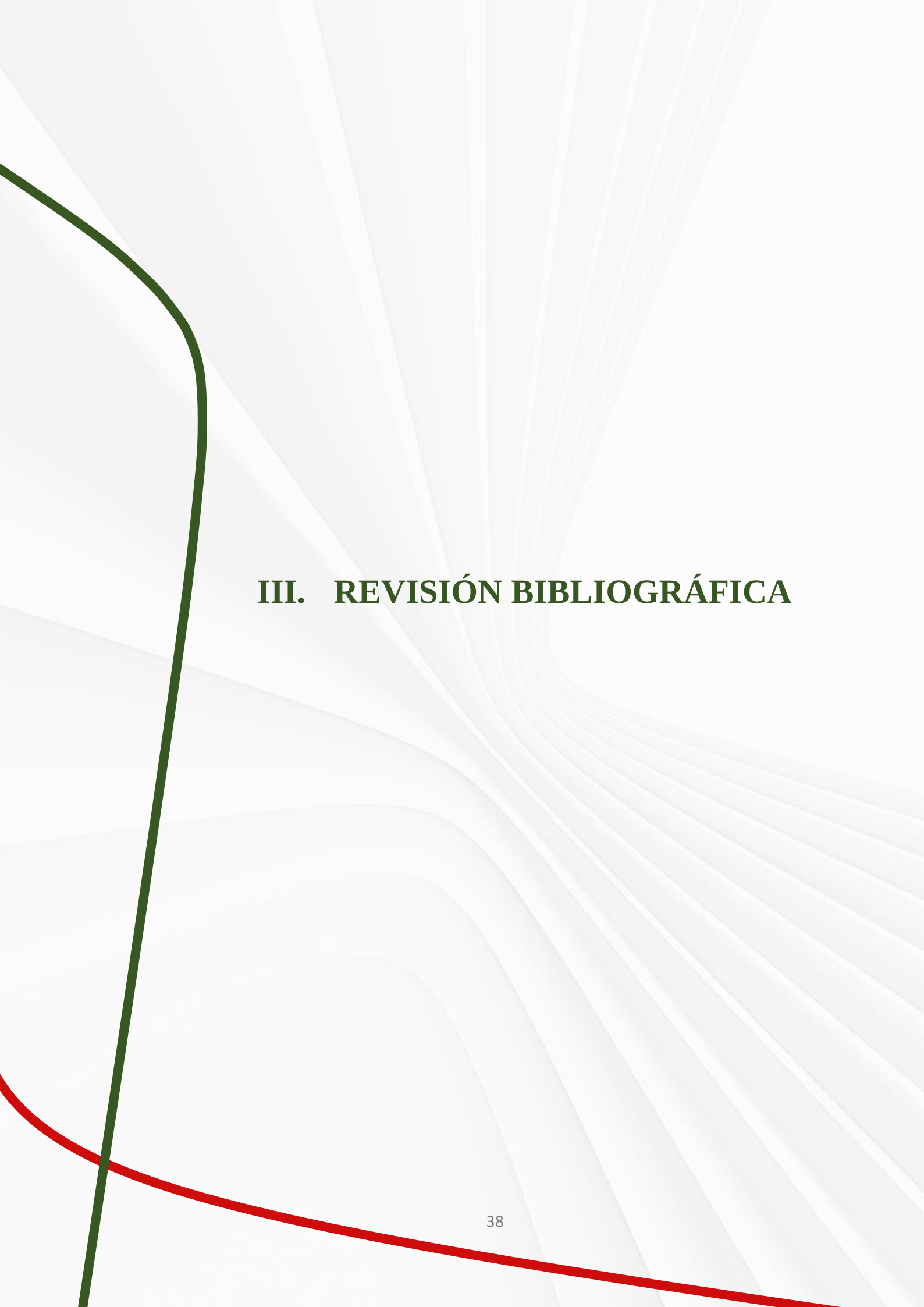
of the concentration of androgens in the culture medium, serum and tumor homogenate. These high levels of androgens in serum and in the tumor could be the cause of the metastasis's incidence reduction observed in the study, coinciding with the results published by other authors. For this reason, the treatment of IBC and IMC with androgen receptor targeted therapies, and specifically with Flutamide, has proven to be an option to consider for the treatment of IBC and IMC.

Letrozole proved to be effective both in the *in vivo* and *in vitro* assay, generating a reduction in cell's proliferation and viability, tumor's size and metastasis's incidence. At the hormonal level, an *in vitro* and *in vivo* reduction of estrogen synthesis and an increase in the concentration of SO4E1 was observed. In line with the results published by other authors, this reduction of the estrogen synthesis may explain the observed reduction in cell viability, cell size and incidence of metastasis due to the high affinity that breast tumor cells have for estrogens. Additionally, this increase in SO4E1 synthesis may be a consequence of this reduction in the estrogen concentration as this hormone acts as a reservoir for future estrogen synthesis.

Currently, this drug is a first-line treatment option for non-inflammatory mammary tumors and these results provide evidence to expand it's use to treat inflammatory-type mammary tumors in both women and female dogs.

Regarding STX-64, a reduction of cell proliferation and viability as well as a total absence of metastasis in the treated mice was observed. At the hormonal level, a slight reduction in estrogens and P4 synthesis was measured, as well as a high concentration of T. This reduction in the estrogen synthesis and the high concentration of T could explain this absence of metastasis as a consequence of the antiproliferative androgens' mechanism of action.

The results obtained in the different *in vitro* and *in vivo* experiments show that the three treatments impact on cell viability and multiplication, on the hormonal synthesis both *in vitro* and *in vivo* and on tumor growth and / or metastasis in different ways, being interesting to contemplate their combined use to achieve better clinical results. Additionally, this drugs could be considered for the treatment of IBC and IMC and TNBC (Triple Negative Breast Cancer) tumors. Also, due to the great similarities of the results obtained at the *in vitro* and *in vivo* tests of both cell lines, the usefulness of the canine model of IMC for IBC research can be confirmed.



III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Introducción general al carcinoma inflamatorio mamario humano y canino

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte en mujeres a nivel global, sólo superado por las enfermedades cardiovasculares, nerviosas y respiratorias. Con más de 2 millones de casos diagnosticados en el mundo y 33.307 en España en 2019 (Informe AECC 2019), el cáncer de mama es el tipo de cáncer más común en mujeres, seguido del colorrectal y el pulmonar (Informe Global Cancer Statistics, 2019).

La incidencia de esta patología no ha dejado de aumentar en los últimos años debido a muy diversos factores: genéticos, cambios demográficos, hábitos de vida, exposición a radiaciones y tratamientos hormonales, entre otros. Este aumento de la incidencia también se relaciona con aumento en la realización de mamografías y/o controles ginecológicos a nivel global, dando lugar a un aumento de diagnósticos precoces consecuencia, entre otras, de las campañas de cribado en población considerada de riesgo (a partir de los 40-50 años según la región). En estos casos diagnosticados precozmente, hay una importante mejora de la supervivencia de las pacientes y una mayor tasa de curación respecto a los casos que han sido diagnosticados más tarde (Informe Sociedad Española de Oncología Médica, 2019).

En regiones menos desarrolladas económicamente, además de un aumento de la incidencia y prevalencia de la enfermedad, también se ha observado un aumento de la mortalidad debido al gran número de diagnósticos tardíos o falta de acceso al tratamiento óptimo para cada caso (Informe Global Cancer Statistics, 2019).

Un caso particular de cáncer de mama es el carcinoma inflamatorio mamario o Inflammatory Breast Cancer (IBC). Es el subtipo de tumor mamario menos prevalente pero que destaca por su gran letalidad y su baja tasa de supervivencia cuando lo comparamos con tumores no-IBC. Además, este particular subtipo de cáncer de mama

supone menos del 5% de todos los casos diagnosticados, suponiendo un 7% de todas las muertes por cáncer de mama en Estados Unidos (Anderson *et al.*, 2005; Hance *et al.*, 2005; Menta *et al.*, 2018). Se ha estimado que el tiempo medio de supervivencia de las pacientes con IBC es de 2,9 a 3,8 años (Pan *et al.*, 2019).

Esta alta mortalidad es consecuencia principalmente de la malignidad del tumor pero también al retraso en su diagnóstico y a un tratamiento subóptimo del mismo. En muchos casos, el tratamiento administrado es semejante a un tumor no-IBC en estadio avanzado, a pesar de ser una entidad patológica muy distinta y con unos requerimientos terapéuticos poco conocidos hasta el momento (Dawood *et al.*, 2011).

El IBC fue descrito por primera vez en 1814 por Charles Bell y fue denominado a lo largo del tiempo de múltiples maneras: síndrome de Von Volkmann o Wokmann en mujeres embarazadas, cáncer de lactancia, carcinoma mastitoide, mastitis carcinomatosa, carcinoma mamario agudo, carcinomatosis mamaria aguda, cáncer musculoso agudo, carcinoma escirroso agudo y carcinoma medular agudo, hasta que en 1924, finalmente, fue denominado “Carcinoma inflamatorio de mama” por Lee y Tannenbaurn (Anderson *et al.*, 2005).

En 1938 se establecieron los términos “IBC primario” e “IBC verdadero” para distinguirlo del “IBC secundario”, este último característico de mamas con tumores localmente avanzados o recurrentes, que han sufrido cambios secundarios en la mama, presentando inflamación, edema y/o eritema (Yamauchi *et al.*, 2012). A día de hoy, esta clasificación ha variado ligeramente y ahora se distinguen dos presentaciones clínicas del IBC: primaria y secundaria, correspondiendo la primera con un desarrollo “de-novo” en la glándula mamaria, mientras que la segunda se corresponde con cambios inflamatorios en una mama con patología tumoral previa (Robertson *et al.*, 2010). De la misma manera,

en la especie canina, debido al paralelismo fisiopatológico y clínico, la clasificación clínica de la enfermedad es la misma (Pérez Alenza *et al.*, 2001).

Actualmente, a nivel global, la definición aceptada es la del American Joint Committee of Cancer (AJCC) de 1978, que contempla el IBC como “una entidad clínico-patológica caracterizada por un eritema difuso y un edema de la glándula mamaria, frecuentemente sin encontrarse una masa palpable”.

En la especie canina, a pesar de que se dispone de menos datos registrados sobre la situación actual del cáncer mamario, se sabe que es la neoplasia más frecuente en las hembras, suponiendo más del 50% de los diagnósticos oncológicos (Moe *et al.*, 2001; Salas *et al.*, 2015).

Al igual que en la especie humana, existen numerosos tipos de cáncer mamario en perras, siendo el más agresivo y con peor pronóstico el carcinoma inflamatorio mamario canino o Inflammatory Mammary Cancer (IMC).

El IMC fue descrito posteriormente al IBC, en concreto en 1983 por Susaneck y colaboradores. La mayor parte de la evidencia científica sobre esta entidad ha sido generada en los últimos 20 años con sucesivos trabajos de investigación como los de Pérez-Alenza y colaboradores (2001) y Peña y colaboradores (2003a), que describieron las características epidemiológicas, clínicas y patológicas de este tipo de cáncer. Otros trabajos también han aportado información en este area, en concreto en lo relativo a diferencias de expresión génica entre tumores IMC y no-IMC (Millanta *et al.*, 2010; Raposo *et al.*, 2016) o la capacidad de síntesis hormonal del propio tejido tumoral (Illera *et al.*, 2015).

La última definición validada del IMC lo define como “una entidad patológica caracterizada por un curso clínico fulminante de presentación repentina con edema,

eritema y calor de las glándulas mamarias con o sin nódulos” y, además, como característica histopatológica diferenciadora, destaca su capacidad invasiva de vasos linfáticos de la dermis por émbolos neoplásicos (Goldschmidt *et al.*, 2011). Recientemente, Chocteau y colaboradores (2019) han propuesto la creación de una clasificación histológica en carcinomas mamarios en hembras de la especie canina y felina, definiendo 5 estadios (0, I, II, IIIA y IIIB) dependiendo de las características del tumor y del contexto clínico del paciente.

1.1.Epidemiología de IBC e IMC

A diferencia de otros tumores, los datos epidemiológicos que se disponen tanto del IBC como del IMC son limitados, como consecuencia de su baja incidencia y la falta de conocimiento de esta entidad clínica, generando diagnósticos incorrectos y/o tardíos y haciendo que la transmisión de la información epidemiológica desde los centros sanitarios a las instituciones sanitarias competentes sea incompleta e, incluso, en ocasiones incorrecta (Dawood *et al.*, 2011). Por este motivo, el volumen de datos de los que se dispone es notablemente menor que de otros cánceres mamarios.

La prevalencia del IBC oscila entre el 1% y el 5% de todos los tumores mamarios diagnosticados y supone un 7 % de las muertes por cáncer de mama (Menta *et al.*, 2018), afectando, como hemos señalado previamente, más a mujeres jóvenes que de edad avanzada (Pan *et al.*, 2019). A pesar de que la incidencia en general es baja, hay regiones en las ésta es notablemente alta en comparación con otras. Este es el caso de algunos países del norte de África, destacando especialmente Marruecos, Argelia, Túnez y Egipto, en donde la incidencia de IBC es superior a la de la media global, encontrándose entre el 6% y el 15% según el país (Dawood *et al.*, 2011). En Estados Unidos, la incidencia se ha mantenido estable en los últimos años aunque se observan grandes diferencias entre las pacientes que lo sufren, habiendo una clara predisposición racial a padecer esta patología

y destacando una mayor incidencia en la comunidad afroamericana (Dawood *et al.*, 2011; Global Cancer Statistics 2019).

En 2004 Wingo y colaboradores observaron que en una población de 3.626 mujeres diagnosticadas de IBC entre 1994 y 1998, la incidencia media de IBC fue de 1,3 por 100.000 para todas las etnias y de 1,6 para la población afroamericana presente en el estudio. Estos resultados son semejantes a los que comunicaron Goldner y colaboradores en 2014 (Figura 1) en un estudio realizado con pacientes de Estados Unidos, en las cuales la tasa de incidencia de IBC fue significativamente más alta entre las mujeres afroamericanas (3,1 por 100.000 mujeres/año) que entre las caucásicas (2,2 por 100.000 mujeres/año). Por el contrario, es interesante señalar que también observaron que las mujeres asiáticas e isleñas del Pacífico, presentaron la tasa de incidencia más baja (0,7 por 100.000).

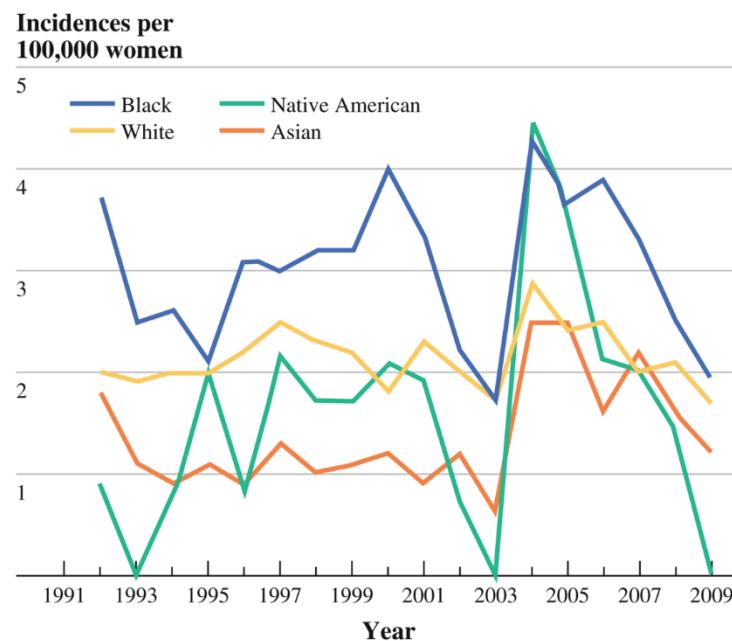


Figura 1. Incidencia de IBC por etnia. Goldner *et al.*, 2014.

Además de la raza, el IBC presenta diferencias respecto a los tumores no-IBC en lo que se refiere a la edad de las pacientes en el momento del diagnóstico y en el estado hormonal de las mujeres. Generalmente, el riesgo de padecer cáncer de mama

aumenta significativamente con la edad y con la llegada de la menopausia salvo en el caso del IBC, que afecta especialmente a mujeres más jóvenes tanto premenopáusicas como menopáusicas (Robertson *et al.*, 2010). La edad media de las mujeres con cáncer de mama es de 62 años mientras que la de las pacientes con IBC es de 51,6 años. Dentro de las mujeres con IBC, la etnia con una menor edad de aparición es la afroamericana con una edad promedio de 50,3 años (Fouad *et al.*, 2018).

Adicionalmente a lo anterior, se han establecido otros factores de riesgo de importancia para IBC, como es el caso de ciertos parámetros reproductivos y la obesidad. Se ha observado que las mujeres que tuvieron una menarquia temprana, fueron madres jóvenes u ofrecieron a sus hijos una lactancia materna mayor a 24 meses, tienen un mayor riesgo de ser diagnosticadas con IBC (Fouad *et al.*, 2018). Paradójicamente, para los casos de cáncer de mama no inflamatorio, los factores de riesgo citados anteriormente resultan ser protectores para la mujer, disminuyendo el riesgo a padecer la enfermedad (Sun *et al.*, 2017).

Fouad y colaboradores (2018) afirmaron en un estudio realizado recientemente que existe una relación entre la edad del primer embarazo y número de gestaciones con el riesgo de padecer IBC, observándose, además, diferencias raciales en el proceso fisiopatológico por el que este fenómeno sucede (Figura 2). Así mismo, describen que en la población afroamericana el período entre la edad de la menarquia y la edad del primer embarazo, unido a una falta de lactancia materna, crea un microambiente favorable para desarrollar cáncer de mama. Durante el embarazo, la remodelación mamaria genera un aumento en la multiplicación de las células del parénquima mamario y con ello, la aparición de mediadores pro y antiinflamatorios, que descienden después del fin de la lactancia. Sin embargo, la falta de lactancia materna conduce a la acumulación de los

mismos, generando un microambiente proinflamatorio y de estrés oxidativo, que genera daños en el ADN. Si esto se sucede en repetidos embarazos, estos daños en el material genético se acumulan, creando un ambiente favorable para la carcinogénesis (Fouad *et al.*, 2018).

El escenario es diferente para las mujeres de etnia caucásica, para quienes la edad promedio al primer parto es más avanzada y el número medio de embarazos es menor. Este mayor período entre la edad de la menarquia y la edad en el primer parto provoca un envejecimiento del tejido mamario favorable también para desarrollar una patología mamaria maligna. La proliferación celular generada por la estimulación hormonal en un tejido mamario envejecido también puede favorecer la carcinogénesis (Fouad *et al.*, 2018).

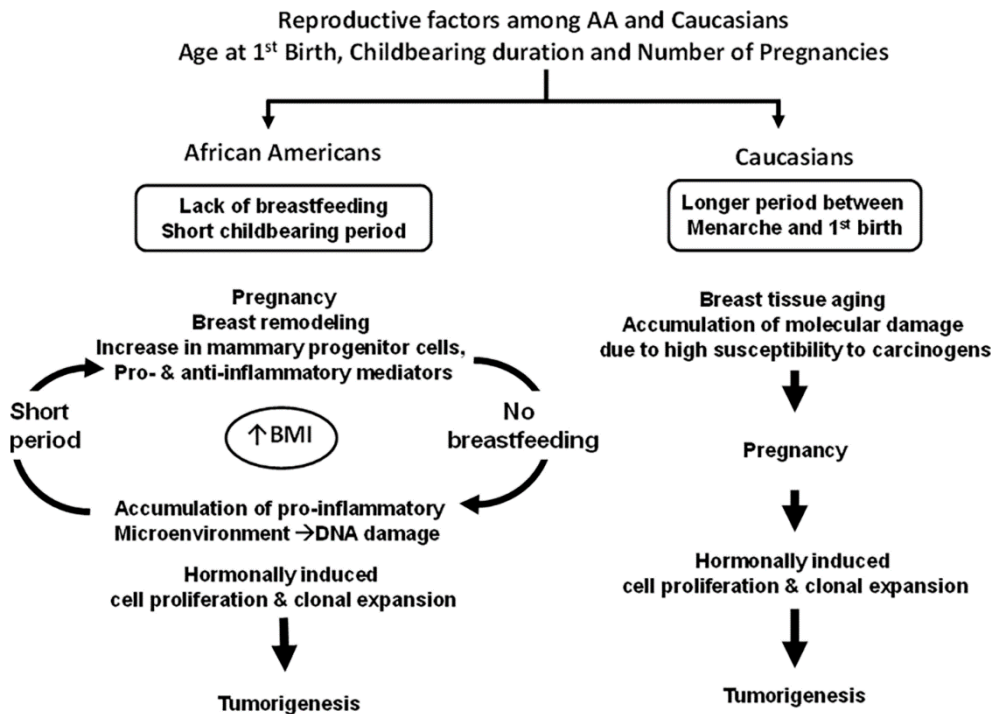


Figura. 2. Factores reproductivos que favorecen carcinogénesis en mujeres afroamericanas y caucásicas (Fouad *et al.*, 2018).

En lo que se refiere al sobrepeso y la obesidad, se ha observado que el riesgo de padecer cáncer de mama en general, y de IBC en particular, aumenta debido a que se

favorece la expresión de la enzima aromatasa, implicada en el desarrollo de esta clase de tumores, ya que participa en la síntesis de estrógenos. Por ello, el riesgo de parecer IBC es 2,45 veces mayor cuando la mujer es obesa (Bulum *et al.*, 2005)

Aunque sigue siendo el cáncer de mama con peor pronóstico y menor supervivencia, se ha producido un notable aumento de la supervivencia gracias a un mejor diseño del protocolo terapéutico para esta entidad, basado en la implementación de tratamientos combinados de quimioterapia, radioterapia y cirugía (Dawood *et al.*, 2014). En 2005 se estimó que la supervivencia media de las pacientes con IBC era de 2,9 años, muy por debajo de los 6,4 años de las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado (Hance *et al.*, 2005). Estos datos coinciden con los publicados recientemente por Pan y colaboradores en 2019, que afirmaron que los pacientes con IBC presentan una tasa de supervivencia media de 2,9 a 3,8 años. Adicionalmente, Anderson y colaboradores ya señalaron en 2005 esta tendencia al alza en la supervivencia, pero remarcaron que existen diferencias según las características moleculares del tumor, siendo mayor la mortalidad en pacientes con IBC negativo al RE (receptor de estrógenos). Estos resultados coinciden con los publicados recientemente por otros autores que afirman que dentro del IBC, los pacientes con mayor supervivencia a 5 años son los que presentan tumores positivos a receptores hormonales y HER-2 (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial humano o Human Epidermal growth factor Receptor – type 2) mientras que los que menor supervivencia presentan son los que tienen tumores negativos a receptores hormonales y HER-2 (van Uden *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020).

En la especie canina, el IMC es un tipo de cáncer poco frecuente de mayor prevalencia que en el caso del IBC. En un estudio publicado recientemente, se afirma que más del 40% de los tumores en perras son tumores mamarios y de ellos, entre el 30 y 50%

son malignos (Marconato *et al.*, 2019). Las tasas de incidencia anual reportadas oscilan entre 145 y 250 casos por cada 100.000 perras/año (Vascellari *et al.*, 2016).

Además, se estima que un 7,6% del total de los tumores de mama diagnosticados en perras se corresponden con IMC sin observarse diferencias entre razas (Pérez Alenza *et al.*, 2001). Al igual que en la especie humana, se ha observado que la incidencia ha aumentado en las últimas décadas (Peña *et al.*, 2003a).

A diferencia de la especie humana, en la que se ha observado que el IBC aparece a edades más tempranas que otros cánceres mamarios, en la especie canina el IMC aparece más tarde que otros tumores mamarios caninos, concretamente, 11,4 años frente 9,9 años (Pérez Alenza *et al.*, 2001).

En lo que se refiere a la supervivencia, el IMC cuenta con una tasa de supervivencia media de entre 35 y 57 días, en función de si el animal recibe un tratamiento quimioterápico o paliativo, respectivamente (Clemente *et al.*, 2009). Algunos tratamientos han conseguido aumentar la supervivencia de los perros con IMC a 183 días tratando con piroxicam, un antiinflamatorio no esteroideo que inhibe la actividad de las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 (De M. Sousa *et al.*, 2009).

1.2.Características clínicas de IBC e IMC

El carcinoma inflamatorio, tanto en la especie humana como canina, presenta una serie de características clínicas que lo diferencian del resto de tumores de la glándula mamaria: de aparición súbita uni o bilateral, en ambas especies se caracteriza por la presencia de eritema y edema (Figura 3. A y B) que ocupa al menos un tercio de la mama, y que tiende a crecer hasta ocupar casi la totalidad de la misma, habiendo además un edema que le confiere un aspecto característico de “piel de naranja” (Figura 3. C) (Yamauchi *et al.*, 2011; Reich *et al.*, 2016) y un aumento de la temperatura del parénquima

mamario, evidente a la exploración física o por termografía (Figura 3.D) (Köşüş *et al.*, 2010). Este cuadro se agrava con el paso de las semanas, haciendo que el pecho se inflame hasta duplicar o triplicar su tamaño original y su consistencia cambie, sufriendo un endurecimiento generalizado y una pérdida de su forma original (Yamauchi *et al.*, 2011).

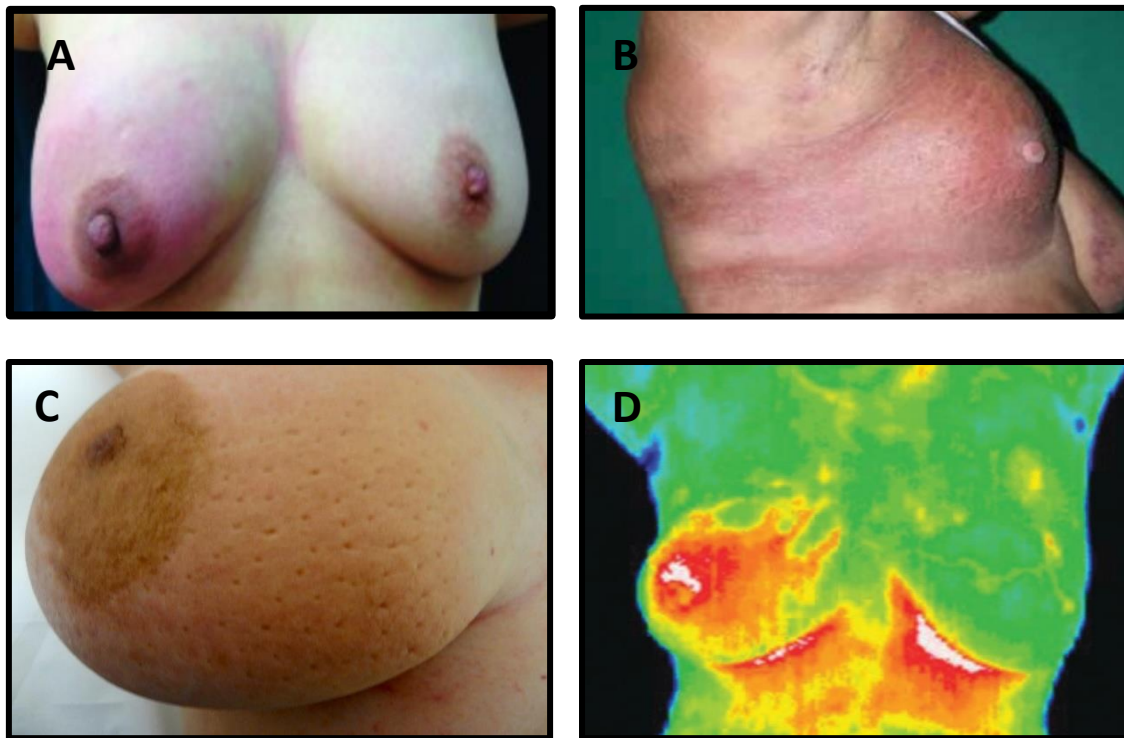


Figura 3. A: Presentación aguda unilateral con eritema y leve inflamación. (Yamauchi *et al.*, 2012); B: IBC subagudo con eritema extenso, endurecimiento del parénquima y edema (Reich *et al.*, 2016); C: Mama con IBC con la clásica imagen de piel de naranja (Fuente: www.radiopaedia.org); D: Termografía de una mama con IBC (Köşüş *et al.*, 2010).

Algunos autores sugieren que puede haber tres subtipos de IBC teniendo en cuenta tanto sus características clínicas como patológicas (Anderson *et al.*, 2005).

- IBC “clínico”: caracterizado por inflamación clínica sin obstrucción patológica de los vasos linfáticos dérmicos.

- IBC “patológico”: en el que destaca el taponamiento patológico de los vasos linfáticos dérmicos.
- IBC “clínico-patológico”: se caracteriza por presentar inflamación clínica y afectación patológica de los vasos linfáticos dérmicos.

La presencia de afectación ganglionar es un aspecto fundamental para clasificar la enfermedad del paciente y emitir un pronóstico. En el caso del IBC, entre el 55% y el 85% de las pacientes presentan metástasis en el momento del diagnóstico, siendo esto un predictor de la mala evolución clínica que va a experimentar (Robertson *et al.*, 2010). Los órganos diana de estas metástasis son los huesos, cerebro, pulmón e hígado, observándose diferencias entre los distintos tipos de IBC según su expresión de receptores hormonales (Uden *et al.*, 2019).

En el caso del IMC, el cuadro clínico es comparable al de la especie humana, observándose de forma aguda, edema, eritema (Figura 4. A), aumento de la temperatura local en la región de las mamas y dolor (Susaneck *et al.*, 1983; Pérez Alenza *et al.*, 2001). Debido a la anatomía de la perra, es común que el IMC afecte a varias mamas contiguas, e incluso invada la región inguinal y/o axilar (Figura 4. B), afectando a los linfonodos regionales, así como a las extremidades del animal, infiltrándose en el tejido muscular y adiposo en la mayoría de los casos (Pérez Alenza *et al.*, 2001).

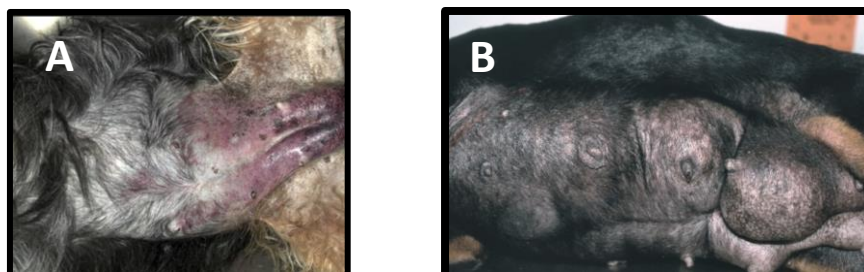


Figura 4. A: Múltiples mamas afectadas de IMC con invasión de la región inguinal. (Clemente *et al.*, 2010a). **B:** Múltiples mamas afectadas de IMC con evidente inflamación, edema y eritema (www.cliniciansbrief.com, Autor: Schaer, 2006).

En cuanto a la aparición de metástasis en IMC, en muchos casos el órgano diana donde aparecen nódulos secundarios es el pulmón (Pérez Alenza *et al.*, 2001). No obstante, estudios más recientes señalan que las perras con IMC metastatizan a vejiga y tracto reproductivo y, en menor medida que en los tumores no-IMC, en pulmón, hígado y riñón (Clemente *et al.*, 2010a).

1.3.Características histopatológicas de IBC e IMC

El IBC no se considera un subtipo histológico específico de carcinoma de mama y no existen criterios diagnósticos patológicos especiales para identificarlo. Las pacientes con IBC presentan con mayor frecuencia tumores ductales con altos grados histológicos; y por ello, en muchos casos, no hay una masa tumoral definida (Yamauchi *et al.*, 2012).

Tanto el IBC como el IMC, presentan una característica histopatológica que hace que este tumor sea una entidad clínica única: su alto potencial linfangioinvasivo, causante de la presencia de émbolos tumorales (Figura 5. B) en los vasos linfáticos de la dermis superficial, que van a dar lugar al eritema y al edema (Figura 5.A) tan característicos de esta patología (Pérez Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003a, Robertson *et al.*, 2010; Marconato *et al.*, 2019).

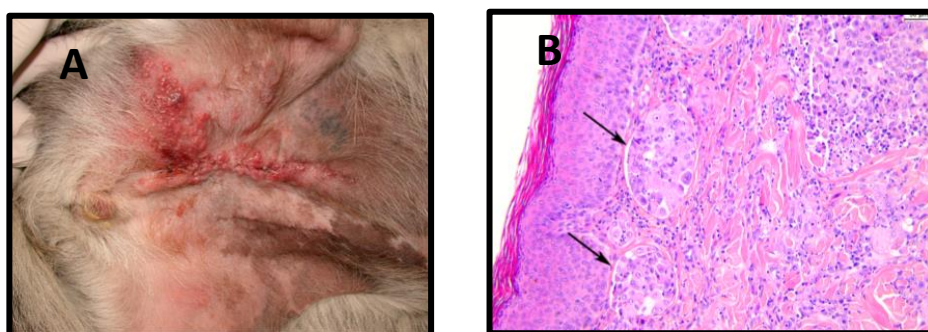


Figura 5. A: Presentación aguda de IMC multifocal con eritema. **B:** Émbolos tumorales en conductos linfáticos (Marconato *et al.*, 2019).

En el caso de los tumores mamarios caninos, Chocteau y colaboradores (2019) propusieron la creación de una clasificación histológica a partir de un estudio realizado en 433 perras diagnosticadas de carcinoma mamario canino, con un seguimiento clínico medio de 2 años. Definieron 5 estadios (0, I, II, IIIA y IIIB) dependiendo de la invasividad del tumor, su tamaño, la presencia o ausencia de invasión linfovascular y de la presencia o ausencia de linfonodos afectados. Esta nueva clasificación complementa y actualiza la primera clasificación histológica de los tumores mamarios caninos, publicada por Elston y Ellis en 1991.

En el IBC las células que forman estos émbolos tumorales se caracterizan por presentar un alto grado nuclear y de fenotipo ductal (Robertson *et al.*, 2010). En cuanto a las células que forman parte del propio parénquima tumoral, son pleomórficas y es común encontrar mitosis atípicas (Kleer *et al.*, 2000), junto con un elevado índice mitótico (Peña *et al.*, 2003a).

A comienzos del siglo XX se describió que el crecimiento tumoral puede estar acompañado de la formación de nuevos vasos sanguíneos en un proceso conocido como angiogénesis (Ide *et al.*, 1939). Se postuló que los tumores podrían producir una "sustancia estimuladora del crecimiento de los vasos", identificada posteriormente como factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Durante las siguientes décadas, varios estudios confirmaron la existencia de "un efecto vasoproliferativo" de las neoplasias malignas y que la neovascularización era necesaria para el crecimiento tumoral, pero no fue hasta 1999 cuando se describió este nuevo mecanismo de angiogénesis tumoral por Maniotis y colaboradores en pacientes con melanoma, que denominaron mimetismo vascular (VM o vasculogenic mimicry).

El VM es una característica importante de tumores agresivos y de gran plasticidad fenotípica (Robertson *et al.*, 2010) siendo más común encontrarlos, por ejemplo, en IBC e IMC que en otros tumores mamarios. (Shirakawa *et al.*, 2002; Peña *et al.*, 2003a; Clemente *et al.*, 2010b).

En 2017, Cáceres y colaboradores observaron en dos líneas celulares de carcinoma inflamatorio (concretamente IPC-366 y SUM149), la presencia de VM. Recientemente, ha sido publicado el que, probablemente, sea el primer estudio comparativo de la ultraestructura de líneas de células de carcinoma inflamatorio humano y canino en condiciones adherentes (2D) (Figura 6. A y B) y no adherentes (3D) (Figura 6. C y D). Este estudio reveló por primera vez la diferenciación morfológica de las células de IBC e IMC de tipo epitelial a células de tipo endotelial, confirmando además que en ambas líneas se producía el fenómeno de VM (Barreno *et al.*, 2019).

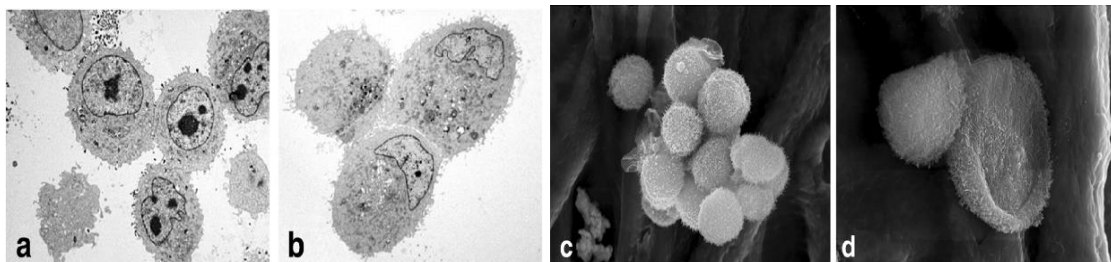


Figura 6. A: Imagen de microscopía electrónica de transmisión a x4000 de IPC-366; **B:** Imagen de microscopía electrónica de transmisión a x4000 de SUM149; **C:** Imagen de microscopía electrónica de barrido de IPC-366; **D:** Imagen de microscopía electrónica de barrido de SUM149 (Fuente de las imágenes: Barreno *et al.*, 2019).

1.4. Diagnóstico y pronóstico de IBC e IMC

El cáncer de mama es un serio problema para la salud pública mundial debido a su creciente incidencia y prevalencia en mujeres tanto pre como postmenopáusicas (Anderson *et al.*, 2005, Costa *et al.*, 2017; Fouad *et al.*, 2018).

Se conoce que hay una relación directa y positiva entre diagnóstico temprano de cáncer de mama y un pronóstico positivo de las pacientes, incluso cuando éste es identificado en fases avanzadas, hecho que refuerza la necesidad de diseñar un protocolo adaptado a la realidad y capacidad de cada hospital con el objetivo de desarrollar un diagnóstico final y certero lo antes posible. Esta clase de protocolos se encuentran ya optimizados en el diagnóstico del cáncer de mama en general, pero cuando se trata de IBC o variantes agresivas de otros tumores mamarios, queda mucho por hacer (Mego *et al.*, 2015). Un dato alarmante es que en el 40% de los casos de IBC, en el momento del diagnóstico, la enfermedad se encuentra en estadio IV y la mayoría de los restantes en estadio III, habiendo además una gran incidencia de micrometástasis, lo que agrava el cuadro (Uden *et al.*, 2019). Por ello, ante la sospecha de un IBC, ha de agilizarse lo máximo posible el proceso asistencial para obtener un diagnóstico final certero (Mego *et al.*, 2015), como se ilustra en el protocolo esquematizado (Figura 7) propuesto por Yamauchi y colaboradores (2012).

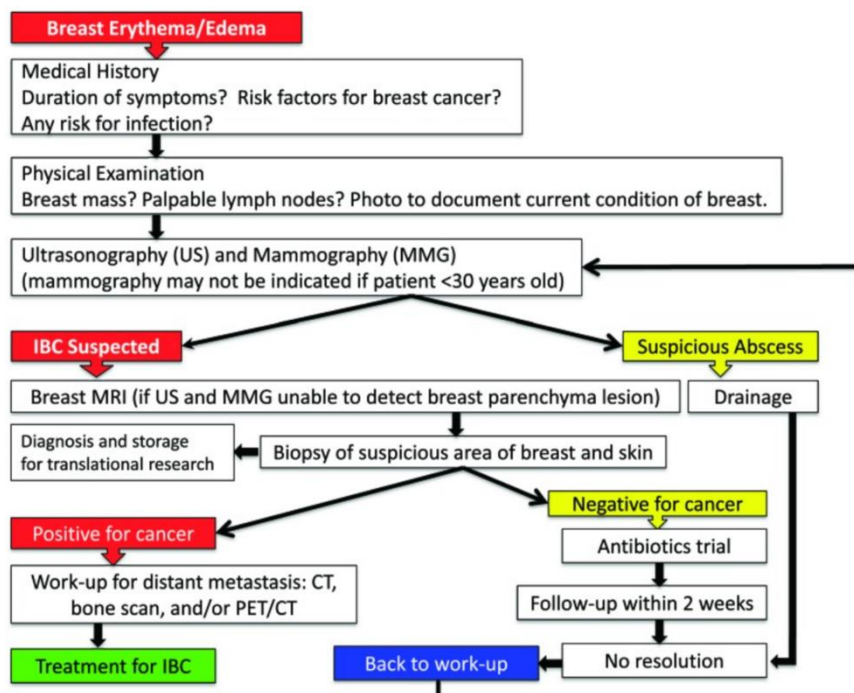


Figura 7: Protocolo diagnóstico para un paciente con sospecha de IBC (Yamauchi *et al.*, 2012).

Después de un análisis de la historia clínica y anamnesis, ha de realizarse un detallado examen del estado físico general de la paciente, de la mama afectada y de la contralateral. En casos de IBC, generalmente se observan cambios cutáneos (como ya se ha señalado anteriormente, es común observar eritema, edema y piel de naranja en al menos un tercio de la mama) y no será hasta después de 3-6 meses del inicio de los primeros síntomas cuando se empiecen a notar cambios a nivel del parénquima mamario, siendo ésta una importante característica que lo diferencia de los carcinomas no inflamatorios (Dawood *et al.*, 2011). En casos más avanzados, se podrán observar alteraciones cutáneas en la mama contralateral, extremidades superiores y cuello (Yamauchi *et al.*, 2012).

Los signos y síntomas clínicos, a veces confusos y poco específicos, hacen que en ocasiones IBC e IMC se diagnostiquen erróneamente como una infección bacteriana, mastitis, absceso de mama, metástasis de otro cáncer, dermatitis post-radiación o incluso edema de mama por insuficiencia cardíaca congestiva (Yamauchi *et al.*, 2012).

Para el diagnóstico y el análisis del alcance de esta patología es necesario recurrir a técnicas de diagnóstico por imagen, existiendo para este escenario distintas técnicas útiles:

- Mamografía: útil para visualizar microcalcificaciones, distorsión de la arquitectura del parénquima, engrosamiento trabecular y engrosamiento generalizado de la pared. No obstante, no se suele utilizar en IBC por el dolor que genera la compresión del pecho durante el examen y la pérdida de calidad de imagen que se obtiene debido al edema clásico de este tipo de tumor. Sin embargo, se considera útil para analizar la mama contralateral si no se encuentra, a priori, afectada (Yamauchi *et al.*, 2012).

- Ecografía: es capaz de detectar masas sólidas, pero también cambios patognomónicos del IBC en el parénquima mamario (dilatación de conductos linfáticos), así como engrosamiento de la piel, debido al clásico edema de esta entidad, con una sensibilidad de entre el 92 y 96% (Abeywardhana *et al.*, 2016).
- Resonancia magnética estándar (RMN) (Figura 8.A) o con imagen molecular de la mama (Molecular Breast Imaging o MBI) que presenta una sensibilidad mayor en el diagnóstico de tumores mamarios invasivos, como es el caso del IBC (Ueno *et al.*, 2018; Menta *et al.*, 2018). Esta modalidad de resonancia aporta información adicional relacionada con los cambios cutáneos o con émbolos tumorales, que no aportan ni la mamografía ni la ecografía.
- PET/TAC (Figura 8.B): esta técnica ha demostrado ser superior al tradicional TAC para definir el estadio de la enfermedad y controlar la respuesta al tratamiento, especialmente en tumores IBC, pudiendo realizar no sólo un diagnóstico sino también un pronóstico mucho más preciso (Menta *et al.*, 2018).

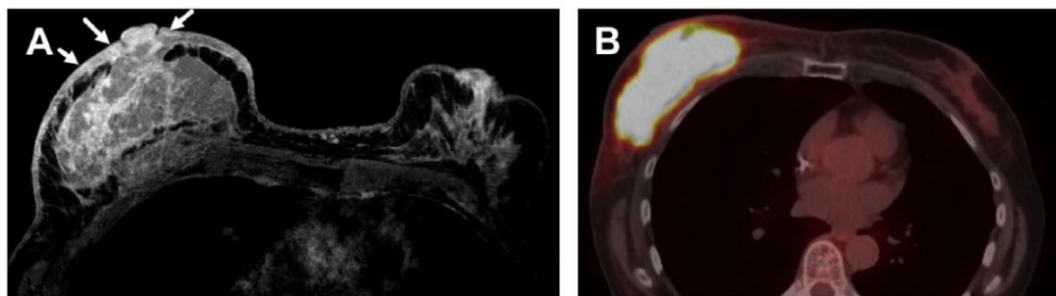


Figura 8. **A** Resonancia magnética de mama con IBC: se observan lesiones multicéntricas con un marcado engrosamiento de la piel (flechas). **B.** PET/TAC de un caso de IBC: se visualiza un tejido con lesiones multicéntricas hipermetabólicas (Menta *et al.*, 2018).

Toda la información generada, tanto en estudios clínicos como por la práctica clínica diaria, apoya el tratamiento multimodal de IBC e IMC como el camino para mejorar el mal pronóstico de unas pacientes diagnosticadas con este complejo subtipo de cáncer de mama (Dawood *et al.*, 2014).

Antes de la era de la quimioterapia, las pacientes con IBC eran tratadas con cirugía y/o radioterapia, siendo la supervivencia a 5 años del 5% (Dawood *et al.*, 2014). Hoy en día, el consenso general es que las pacientes con IBC sin evidencia de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico, deben recibir quimioterapia sistémica (neoadyuvante) seguida de cirugía con o sin radioterapia, según el caso. Además, en aquellas pacientes con tumores con receptores hormonales positivos, se pauta la terapia hormonal coadyuvante, que ha demostrado ser eficaz y mejorar la supervivencia (Weibe *et al.*, 2000; Yamauchi *et al.*, 2012).

1.5. Clasificación molecular del cáncer de mama

El cáncer de mama no se considera una entidad clínica única, sino que engloba un conjunto de subtipos de tumores que vienen definidos por diversas características genéticas e inmunohistoquímicas propias (Phipps *et al.*, 2008 y 2011), que dan lugar a diferentes formas de la enfermedad y diferentes respuestas a las terapias sistémicas y locales (Nguyen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2020).

Actualmente, el cáncer de mama se clasifica teniendo en cuenta la presencia o ausencia de expresión del RE, receptor de progesterona (RP) y HER-2 (Robertson *et al.*, 2010). De esta forma, encontramos 4 tipos distintos de tumores mamarios (Holliday y Speirs, 2011), cuyas características principales se resumen a continuación en la Tabla 1:

Clasificación	Expresión de receptores	Otras características
Luminal A	RE+ , RP+/- , HER-2 -	Ki67 ↓
Luminal B	RE+ , RP+/- , HER-2 +	Ki67 ↑
Basal	RE- , RP- , HER-2 -	Ki67 ↑, EGFR+, CK5/6 +
HER-2	RE- , RP- , HER-2 +	Ki67 ↑

Tabla 1. Clasificación molecular de los tumores mamarios según la expresión de receptores hormonales y otras características.

Además de los receptores anteriormente citados, hay factores que son de importancia en la caracterización del cáncer de mama: índice de proliferación celular (Ki67), expresión de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o epidermal growth factor receptor) o citoqueratinas (CK) (Hammond *et al.*, 2011, Holliday y Speirs, 2011).

La expresión de los distintos receptores hormonales en cada tumor va a ser determinante para su patogenicidad ya que va a definir su comportamiento a nivel celular, su agresividad, el pronóstico en la paciente y las opciones terapéuticas del mismo (Dai *et al.*, 2017) (Figura 9).

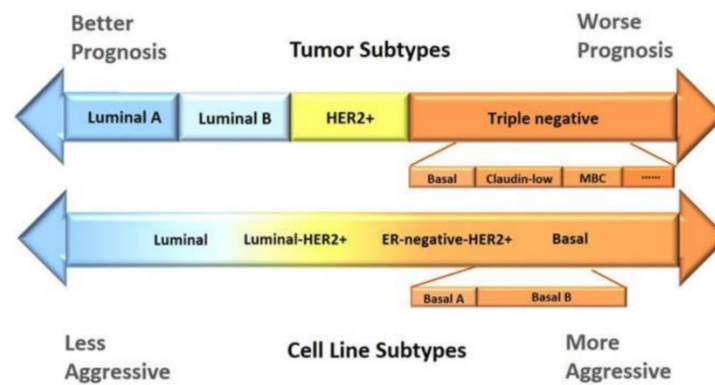


Figura 9. Esquema que resume la agresividad de los distintos subtipos tumorales y su pronóstico según la expresión de los receptores hormonales (Dai *et al.*, 2017).

Según un estudio publicado recientemente, la supervivencia de los pacientes depende de forma importante de la expresión de los receptores hormonales, siendo el cáncer de mama triple negativo el que peor supervivencia presenta (Wang *et al.*, 2020). Estos resultados coinciden con los publicados en un interesante estudio realizado por Uden y colaboradores (2019) en el que se analizó la supervivencia de 744 pacientes con IBC a 5 años con distintas expresiones de receptores hormonales y HER-2 (Figura 10), observándose claras diferencias según la presencia o ausencia de estos receptores, teniendo un peor pronóstico los casos de IBC triple negativos.

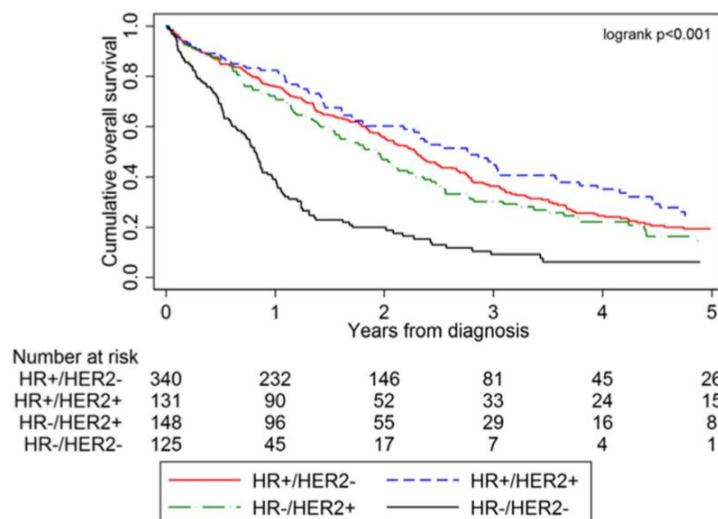


Figura 10. Curva Kaplan- Meier de supervivencia de pacientes con IBC estadio IV según su expresión de receptores hormonales y HER-2 (Uden *et al.*, 2019).

Diversos autores afirman que el IBC puede presentarse como cualquier subtipo de tumores mamarios, sin embargo, la gran mayoría se engloban en el subtipo basal (Robertson *et al.*, 2010, Zhou *et al.*, 2014).

Gracias a esta clasificación, se han mejorado las indicaciones de cada tipo de tratamiento sistémico. Así, el subtipo “Luminal A” y “Luminal B” generalmente solo requieren terapia endocrina. Por su parte, la quimioterapia se considera indicada para la mayoría de los pacientes con subtipo “HER2” o “Basal” (Goldschmidt *et al.*, 2011).

Adicionalmente a lo anterior, los valores y variaciones del índice de proliferación o Ki-67, pueden orientar sobre el pronóstico de la paciente y así, por ejemplo, se ha demostrado que las pacientes con un Ki-67 alto al inicio, pueden responder bien a la quimioterapia y reducir significativamente el índice de proliferación, haciendo que su pronóstico sea más favorable que en aquellos casos en los que no se producen grandes cambios a nivel de este índice (Dowset *et al.*, 2005).

Es importante señalar que la expresión de Ki-67 es clave en la distinción entre los subtipos "Luminal A" y "Luminal B" (Hammond *et al.*, 2011). De todos estos subtipos, los de mayor incidencia son los de subtipo Luminal A seguido del Basal y Luminal B, siendo el subtipo Basal el que tiene el peor pronóstico (Gama *et al.*, 2008).

En lo que respecta al IMC, hasta el momento no ha habido consenso respecto a su clasificación molecular, debido a la disparidad de resultados en diversos estudios (Im *et al.*, 2014). No obstante, sí que se ha analizado la expresión de receptores hormonales (Peña *et al.*, 2003b; Illera *et al.*, 2006; De Andrés *et al.*, 2016).

En medicina veterinaria, algunos estudios han demostrado que la expresión de uno o ambos receptores hormonales era más frecuente en tumores benignos y, en general, su expresión estaba relacionada con un pronóstico más favorable (Nieto *et al.*, 2000; Millanta 2005; Maineti *et al.*, 2014).

Además de la importancia de los receptores hormonales y HER-2, varios estudios han señalado el importante papel de EGFR, perteneciente a la familia de los receptores de tirosina quinasa transmembrana. La alta expresión de EGFR se asocia con un gran tamaño tumoral, necrosis tumoral, alto índice mitótico, alto grado histológico de malignidad tumoral y un estado clínico deficiente del paciente afectado (Peña *et al.*, 2003a; Clemente *et al.*, 2010a; Carvalho *et al.*, 2013).

1.6. Producción de hormonas esteroides en el cáncer de mama y sus receptores.

La glándula mamaria es un tejido hormonalmente sensible que se desarrolla después del nacimiento y es capaz de experimentar ciclos secuenciales de desarrollo a través de embarazo, lactancia e involución gracias a la acción de las hormonas esteroides (Obr *et al.*, 2012). Tanto las glándulas mamarias sanas como las patológicas, son

consideradas por algunos autores como un tejido endocrino debido a su capacidad de síntesis de estrógenos y andrógenos, de vital relevancia en el crecimiento y progresión tumoral, debido a su interacción con receptores específicos presentes en la superficie de las células del parénquima mamario (Finlay-Schulz *et al.*, 2015). Además, algunos autores han señalado que, tanto los tumores mamarios humanos como los caninos, presentan una alta concentración de hormonas esteroides que podrían corresponder a una síntesis hormonal local (Peña *et al.*, 2003b; McNamara *et al.*, 2015). Histológicamente, esta síntesis hormonal puede observarse gracias a la presencia de abundantes gotas lipídicas en el citoplasma de las células tumorales del IMC. Dentro de la síntesis de hormonas por parte del tumor, se ha señalado que la producción de estrógenos podría provocar la agresividad característica del IMC (Peña *et al.*, 2003b; Sánchez-Archidona *et al.*, 2007).

El colesterol es el precursor de todos los esteroides endógenos, que son sintetizados gracias a la activación de la cascada esteroidogénica (Figura 11), que se inicia con la conversión del colesterol en pregnenolona (P5) en un proceso catalizado por la enzima P450scc (ahora llamada CYP11A1) (Kristensen and Borrensens-Dale *et al.*, 2000). Se ha observado que, tanto en IBC como en IMC, esta enzima se encuentra sobre-expresada (Kristensen and Borrensens-Dale *et al.*, 2000; Peña *et al.*, 2003b).

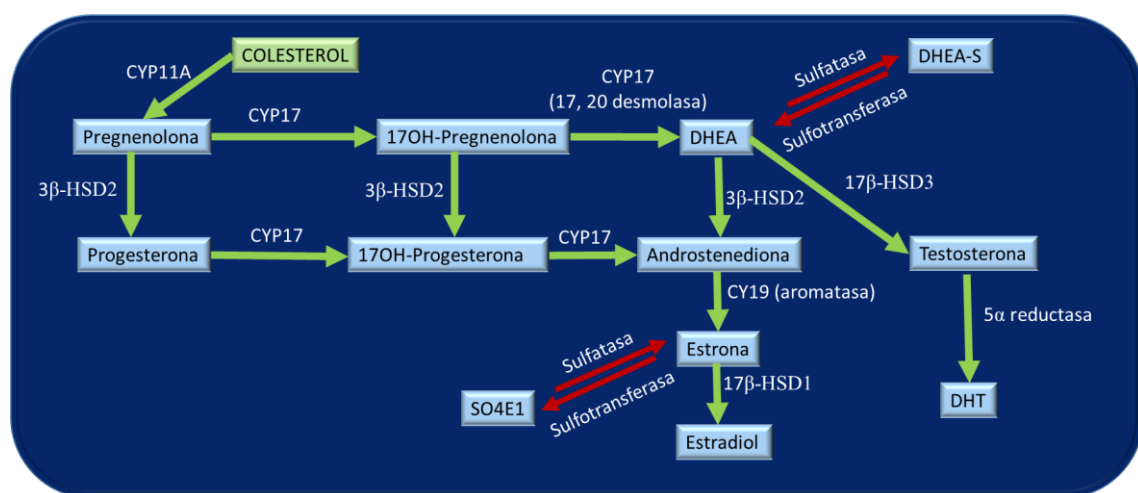


Figura 11. Cascada esteroidogénica (Fuente: elaboración propia)

En la glándula adrenal y en el ovario, la hormona P5 puede dar lugar a la síntesis de progesterona (P4) y de dehidroepiandrosterona (DHEA) por dos vías distintas encaminadas a generar la síntesis de estrógenos, como el sulfato de estrona (SO4E1) y el 17 β -estradiol (E2), y de andrógenos, como la 5alfa-dihidrotestosterona (DHT) y la testosterona (T) (Labrie *et al.*, 2003; McNamara y Sasano *et al.*, 2015).

En el cáncer mamario humano, se ha propuesto que la vía de la DHEA es la precursora principal para la producción de andrógenos y estrógenos (Labrie *et al.*, 2003; McNamara y Sasano *et al.*, 2015).

1.6.1. Progestágenos

La P4 es una hormona esteroide sintetizada en el ovario, esencial para el desarrollo de la glándula mamaria tanto en mujeres como en el resto de hembras de mamíferos y clave en la preparación de la mama para la lactancia y durante la misma. Además, se ha relacionado la P4 con la aparición y crecimiento de tumores, aunque por ahora se desconoce en gran medida su mecanismo de acción (Weibe *et al.*, 2006).

La acción de esta hormona se encuentra principalmente mediada por sus receptores de alta afinidad, que incluyen el RP clásico y sus isoformas -A y -B, ubicadas en diversos tejidos como la glándula mamaria, los órganos reproductivos y el cerebro (donde la P4 controla el comportamiento reproductivo). Esta hormona es frecuentemente prescrita para la anticoncepción o durante la terapia de reemplazo hormonal postmenopáusica, en la cual se une selectivamente con estrógenos para bloquear el crecimiento endometrial, que es precisamente inducido por éstos (Lange *et al.*, 2008). El papel de los estrógenos como un potente mitógeno mamario es indiscutible y tanto los inhibidores del RE como de las enzimas productoras de estrógenos, son terapias de

primera línea eficaces contra el cáncer (Kulendran *et al.*, 2009). Sin embargo, la acción del RP en el cáncer de mama está muy poco estudiada y sigue siendo controvertida (Lange *et al.*, 2008). Además, diversos autores han señalado la relación entre el uso de progestinas y el desarrollo del cáncer de mama, aunque se desconoce el mecanismo fisiopatológico por el que favorecen la carcinogénesis (Trabert *et al.*, 2020).

Algunos estudios relacionan la P4 con en el desarrollo del cáncer de mama, a pesar de que los datos epidemiológicos que se disponen hasta el momento no han podido apoyar ni contrarrestar dicha afirmación (Trabert *et al.*, 2020). Weibe y colaboradores (2006), sugirieron que los metabolitos de P4 tienen efectos pro y anticancerígenos y que el desequilibrio de estos factores puede contribuir, de alguna manera, a aumentar el riesgo de padecer cáncer de mama.

Existen diversos factores que complican el establecimiento de la relación entre la P4 y el cáncer de mama. Trabert y colaboradores (2020), en una reciente publicación, enumeran algunos de estos factores:

1. Dependencia e interacción con estrógenos y otras hormonas (andrógenos, prolactina, etc.).
2. Variación en los niveles de exposición, por ejemplo, durante el ciclo menstrual o el embarazo.
3. Disponibilidad de ensayos sensibles.
4. Ausencia de evidencia sobre el papel de los metabolitos de progesterona.
5. Dificultades para evaluar los isotipos del RP en analíticas rutinarias.

Por otro lado, la actividad ovárica prolongada, ya sea por menarquia temprana o por menopausia tardía, aumenta notablemente el riesgo de padecer cáncer de mama. Al

contrario, con la extirpación de los ovarios se reduce el riesgo de padecer esta clase de tumor en más del 50% (Hilton *et al.*, 2015).

La 5 α -reductasa es la enzima que cataliza la conversión de la P4 a diversos metabolitos como los 5 α -pregnanos, muy presentes en los tumores mamarios. Es por este motivo que se cree que una actividad aumentada de la 5 α -reductasa favorece la tumorigénesis (Weibe *et al.*, 2006). Otros autores como Trabert y colaboradores (2020) también han señalado este fenómeno y han afirmado que, comparando las concentraciones de algunos de estos metabolitos de la P4 en tejido mamario sano y tumoral, los niveles de 5 α -pregnanos pueden llegar a ser hasta 10 veces superior a otros metabolitos de la misma familia en el tejido tumoral.

1.6.2. Estrógenos

Los estrógenos son las principales hormonas sexuales femeninas y juegan un papel importante en el sistema reproductivo y no reproductivo, pudiéndose sintetizar en tejidos como el hígado, el corazón, los músculos, los huesos y el cerebro. Los estrógenos ejercen su acción uniéndose a sus receptores específicos, que pueden ser de dos tipos: los nucleares clásicos (ER α y ER β) y los receptores de membrana (GPR30 y ER-X). Ambos tipos de receptores de estrógenos se expresan en los tejidos periféricos y el cerebro con distribuciones específicas en las células y tejidos (Cui *et al.*, 2013).

Existen tres tipos de estrógenos en las mujeres: estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) y estriol (E3). Cada uno de ellos se forma en un paso distinto de la cascada de síntesis de hormonas esteroides. Por su parte, el E2 es el estrógeno más potente durante el período premenopáusico en la vida de una mujer, existiendo dos vías principales para la formación del mismo en los tejidos (Cui *et al.*, 2013):

- Vía de la aromatasa (CYP19): La aromatasa, codificada por el gen CYP19A1, es la enzima limitante que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos
- Vía de la sulfatasa: Esta enzima convierte la E1 en sulfato de estrona (SO₄E1) mediante la enzima estrona sulfotransferasa (STS).

En mujeres premenopáusicas, la principal fuente de estrógenos son los ovarios, controlados por la hormona folículo-estimulante (FSH) y por la hormona luteinizante (LH), mientras que en mujeres postmenopáusicas la actividad del ovario y la hipófisis cesan, produciéndose la síntesis de estrógenos en tejidos periféricos como el hígado, piel, músculo y tejido adiposo (Kuledran *et al.*, 2009). En las mujeres premenopáusicas, el E2 es el estrógeno más importante y es sintetizado en los ovarios, mientras que en las mujeres postmenopáusicas predomina la E1 sintetizada en los tejidos periféricos (Tsuchiya *et al.*, 2005).

Actualmente, diversos autores afirman que los estrógenos juegan un papel crítico en la tumorigénesis y la progresión del cáncer de mama (Fouad *et al.*, 2018; Trabert *et al.*, 2020). Los estrógenos y sus metabolitos se han estudiado tanto en mujeres premenopáusicas como postmenopáusicas, habiendo un mayor número de estudios con resultados más consistentes en estas últimas, entre otros motivos, debido a la mayor incidencia de la enfermedad en mujeres con este estatus hormonal (Samavat *et al.*, 2015).

Además de los estrógenos, las enzimas que participan en su síntesis y conversión han ganado paulatinamente protagonismo. Se ha observado que la aromatasa es expresada por el propio tejido mamario tumoral, así como en células como fibroblastos y adipocitos indiferenciados (Bulun *et al.*, 2005), fenómeno que puede facilitar la conversión de andrógenos a estrógenos y, con ello, favorecer la proliferación de células tumorales mamarias (Baglietto *et al.*, 2010). Cuando además su expresión en el cáncer mamario es

elevada, se puede llegar a provocar una sobreproducción de E2, que estimula no sólo la génesis del tumor sino también su progresión (Catalano *et al.*, 2009). A pesar de que la concentración sistémica de estrógenos en mujeres postmenopáusicas es baja debido a su condición, resulta suficiente para estimular el crecimiento tumoral (Kitendran *et al.*, 2009). Así, aunque los ovarios dejen de sintetizar estrógenos, otros tejidos del cuerpo son capaces de sintetizarlos, generando a nivel sistémico una cantidad de estrógenos de naturaleza hidrofóbica que tendrán que ser convertidos a SO4E1, que aunque tenga poca afinidad por el RE y sea biológicamente inactivo, actúa de reservorio para la síntesis de estrógenos biológicamente activos (Cui *et al.*, 2013).

Por otro lado, algunos autores han reportado niveles altos de SO4E1 en los tejidos tumorales, que se piensa que pueden representar un reservorio para la formación de estrógenos biológicamente activos (Pasqualini *et al.*, 1996; Illera *et al.*, 2006). Además, se ha observado que los tumores de mama son capaces de sintetizar localmente estrógenos, haciendo que los niveles de los mismos en el parénquima tumoral sean mayores que en el parénquima mamario normal (Kulendran *et al.*, 2009).

En tumores mamarios caninos también se ha observado que los niveles de E2 se encuentran aumentados si los comparamos con los niveles de una mama normal (Peña *et al.*, 2003b).

1.6.3. Andrógenos

Los andrógenos son hormonas que se sintetizan en los testículos, ovarios y corteza adrenal. Aunque son más conocidos por el importante papel que tienen en el desarrollo sexual masculino, las mujeres y todas las hembras del reino animal en general, también los sintetizan y son importantes, entre otros, para el correcto funcionamiento del sistema reproductor (Burger *et al.*, 2002). En mujeres, la T se sintetiza y secreta principalmente en los ovarios y las glándulas suprarrenales; además se produce una

biosíntesis adicional en los tejidos periféricos a través de la conversión metabólica de los precursores androgénicos suprarrenales circulantes (Labrie *et al.*, 2003).

Los principales andrógenos son la T y DHT y también destacan debido a su relevancia sus intermediarios metabólicos, la DHEA y la A4, ya que juegan un importante papel en la síntesis y regulación hormonal tanto en tejidos sanos como patológicos (McNamara *et al.*, 2014). Los andrógenos ejercen su función gracias a la unión con el receptor de andrógenos (RA) (Hanamura *et al.*, 2013).

Los receptores de andrógenos se encuentran en, prácticamente, todos los tejidos tanto de mujeres como de hombres, incluidos la glándula mamaria, los huesos y el cerebro, lo que indica que los andrógenos y sus metabolitos pueden desempeñar un papel importante en la homeostasis de los tejidos normales y, posiblemente, en patologías como el cáncer de mama, la osteoporosis y enfermedades cognitivas, entre otros (Schover *et al.*, 2008).

Los andrógenos tienen importantes efectos fisiológicos en las mujeres y, al mismo tiempo, pueden estar implicados en el desarrollo del cáncer de mama (McNamara *et al.*, 2014). En el tejido mamario normal, la producción de andrógenos está mediada principalmente por dos enzimas: la 17 β HSD y la 5 α -reductasa, cuyas acciones combinadas generan T y DHT (Hanamura *et al.*, 2013). Adicionalmente a lo anterior, se demuestra que la presencia de estas enzimas androgénicas en los tumores de mama está asociada con una menor capacidad invasiva de los tumores TNBC (McNamara *et al.*, 2014).

Además, estudios realizados *in vitro* e *in vivo*, sugieren que los andrógenos también pueden ejercer un efecto antiproliferativo, apoptótico (Baglietto *et al.*, 2010) e

incluso, que podrían ejercer efectos inhibitorios en células del cáncer de mama hormono-dependientes (McNamara *et al.*, 2013).

2. Modelos experimentales en la investigación de IBC e IMC

Los principales modelos experimentales que se utilizan en investigación en oncología son dos: los modelos *in vitro* (Figura 12.A) e *in vivo* (Figura 12.B). Los modelos *in vitro* en investigación oncológica sirven para profundizar en la biología y genética de las células tumorales, así como para analizar la respuesta a tratamientos realizados en las células y evaluar su utilidad en animales o humanos. Los modelos *in vivo* son una gran herramienta para diseñar nuevas estrategias terapéuticas, además de servir para ahondar en el conocimiento de la biología del tumor estudiado (Ruggeri *et al.*, 2014), de células en general y de las cancerosas en particular. Con ellos, podemos conocer detalles de su capacidad de replicación, mutación y adaptación al medio, que serán de enorme utilidad para aplicaciones futuras en modelos *in vivo* (Lacroix y Leclercq *et al.*, 2004).

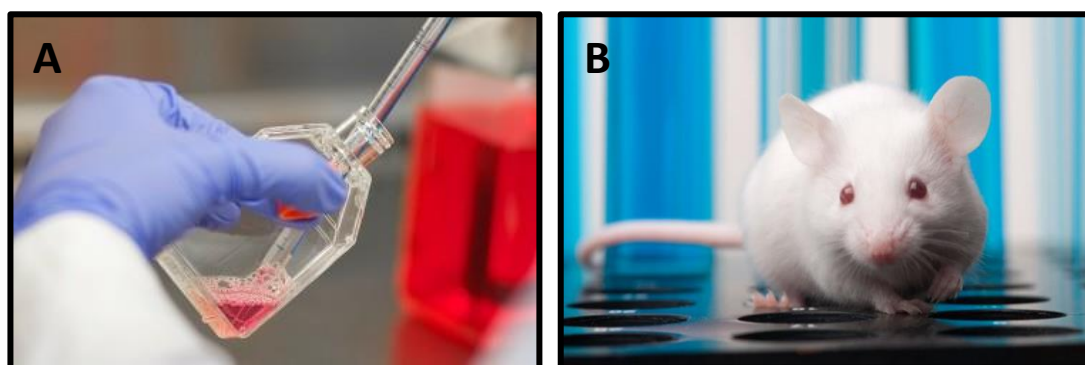


Figura 12. Modelos experimentales en investigación. **A:** Modelo *in vitro* (fuente: www.lobov.com); **B:** Modelo *in vivo* (fuente: www.istock.com).

Las técnicas de cultivo celular comenzaron a gestarse en 1882, año en el que Sydney Ringer desarrolló la solución de Ringer, una solución salina equilibrada de una composición bioquímicamente semejante a la de los fluidos corporales, pudiendo mantener con éxito células procedentes de corazones de unas ranas después de su disección y extracción del cuerpo (Ringer *et al.*, 1882). Se dice que esta fue la primera instancia de un cultivo *in vitro* de tejido animal. Años más tarde, en 1907, Ross G. Harrison monitorizó con éxito una aparente proliferación de fibras nerviosas de una rana, durante varias semanas, en el líquido linfático recién extraído de los sacos linfáticos de una rana adulta (Harrison *et al.*, 1907). Este experimento es considerado el comienzo de la era del cultivo de células animales.

Poco tiempo después, Alexis Carrel, Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1912, contribuyó al desarrollo de esta tecnología al diseñar un prototipo del matraz de cultivo celular que se usa ampliamente en la actualidad, además de establecer la técnica de manipulación aséptica del material, fundamental para el correcto mantenimiento de los cultivos. Se cree que Carrel fue la primera persona en la historia en cultivar con éxito células somáticas de mamíferos, concretamente médula ósea de cobaya (Yao *et al.*, 2017).

La primera línea celular de cáncer de mama que se estableció fue la BT-20 en 1958 (Lasfargues y Ozzello *et al.*, 1958). Sin embargo, pasaron otros 20 años antes de que las líneas celulares de cáncer de mama se generalizaran, incluida la serie MD Anderson y lo que sigue siendo la línea celular de cáncer de seno más comúnmente utilizada en el mundo, MCF-7 establecida en 1973 en la Fundación del Cáncer de Michigan (Brooks *et al.*, 1973). En el ámbito de la oncología mamaria canina no fue hasta 1982 cuando se estableció REM-134, la primera línea de cáncer de mama canino por Else y colaboradores.

2.1. Modelos in-vitro

Se entiende por cultivo celular el resultado del conjunto de técnicas que persiguen establecer y mantener células originarias de un ser vivo, suspendidas en un medio enriquecido, conservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Los cultivos primarios suelen considerarse los más semejantes al tejido de origen por tratarse de aquellos que se establecen tras el aislamiento de un conjunto de células y antes del primer subcultivo, utilizándose con preferencia a las líneas celulares cuando se buscan condiciones experimentales más representativas del tejido *in vivo* (Freshney, 2005).

Los cultivos primarios son obtenidos a partir de explantes (fragmento escindido desde un órgano o tejido), por disgregación de tejidos, de órganos o tumor sólido, o bien de aislados de fluidos orgánicos como la sangre. Como vemos en la Figura 13, una muestra biológica es procesada mediante tratamientos enzimáticos o mecánicos, que persiguen que el tejido se disocie en células aisladas con las que podemos proceder a realizar distintos tipos de cultivo (Mitra *et al.*, 2013).

La mayoría de los cultivos tienen una viabilidad finita debido a la senescencia o pérdida progresiva de las células que lo forman por muerte celular y, reciben el nombre de líneas celulares primarias (o líneas celulares finitas). Por el contrario, puede darse la situación en que algunas células del cultivo sufran un cambio genético, adquiriendo la capacidad de proliferar indefinidamente (convirtiéndose en células variantes inmortales), constituyendo lo que se conoce como una línea celular inmortal (Martínez-Carpio y Navarro-Moreno *et al.*, 2003; Gil-Loyozaga *et al.*, 2011).

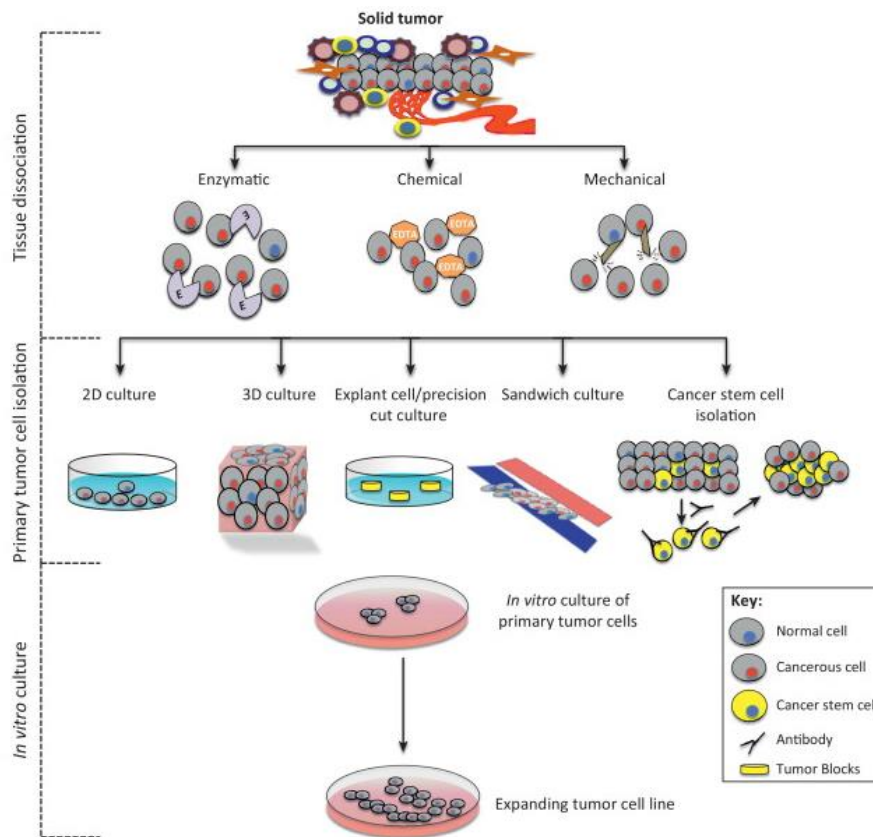


Figura 13: Esquema del proceso de establecimiento de una línea celular a partir de un tumor sólido (Mitra *et al.*, 2013).

Es importante señalar que las células que componen las líneas celulares ya establecidas adquieren con el paso del tiempo alteraciones citomorfológicas características: menor tamaño celular, menor adherencia, morfología generalmente más redondeada y mayor relación núcleo/citoplasma. Además, también experimentan ciertos cambios relacionados con su multiplicación y supervivencia: incremento de la tasa de proliferación celular, reducción del tiempo de doblaje, menor dependencia en el medio de cultivo y más facilidad para crecer en suspensión (Martínez-Carpio y Navarro Moreno *et al.*, 2003).

En los últimos años, los cultivos celulares han demostrado ser de gran utilidad en investigación por diversos motivos (Tominaga *et al.*, 1999):

- Son una interesante alternativa al uso de animales, reduciéndose el uso de los mismos.
- Son útiles para el cribado de productos químicos: se puede evaluar la citotoxicidad de los mismos antes de ser testados en animales.

Además, durante décadas, las líneas celulares han constituido un gran recurso para investigar la biología del cáncer y analizar la potencial eficacia de ciertos medicamentos para ser utilizados en la terapia oncológica. Sin embargo, diversos estudios sugieren que las líneas celulares presentan numerosas limitaciones debidas a la heterogeneidad y diversidad de respuesta de los tumores en cada paciente (Mitra *et al.*, 2013).

La primera línea celular cancerígena humana establecida en cultivo fue la conocida HeLa (Gey *et al.*, 1952), que actualmente es la línea celular humana más utilizada en investigación biológica. Su aplicación como organismo modelo ha contribuido a la caracterización de importantes procesos biológicos y ha hecho posibles más de 70.000 publicaciones. Esta línea celular se originó en un tumor de cáncer cervical de una paciente llamada Henrietta Lacks, quien luego murió de cáncer en 1951 (Skloot *et al.*, 2010). Uno de los primeros usos de las células HeLa fue desarrollar la vacuna contra el virus de la polio (Scherer *et al.*, 1953) y desde ese momento, su utilidad en diversos ámbitos de la medicina ha sido enorme.

Posteriormente se han establecido muchas más líneas celulares, destacando la primera línea celular para el cáncer mamario denominada BT-20, establecida en 1958 (Lasfargues y Ozzello *et al.*, 1958, revisado por Holliday y Speirs *et al.*, 2011).

Actualmente se dispone de múltiples líneas celulares de cáncer de mama humano obtenidas directamente de pacientes o de animales xenotrasplantados. Así, a día de hoy,

hay disponible información de más de 80 líneas celulares de cáncer de mama (Dai *et al.*, 2017), de las cuales aproximadamente el 85% derivan de carcinomas intraductales o tumores metastásicos, generalmente procedentes de efusiones pleurales (Martínez-Carpio y Navarro Moreno, 2003; Lacroix y Leclercq, 2004; Neve *et al.*, 2006; Visan *et al.*, 2016). De esas 80 líneas celulares de cáncer de mama descritas, sólo algunas han sido estudiadas en detalle y utilizadas extensamente en investigación oncológica, como es el caso de MCF-7 (de la serie MCF o Michigan Cancer Foundation), la línea hormono-dependiente MDA-MB-231 (de la serie MDA o MD Anderson Cancer Center de Houston) o las líneas SUM149 y SUM190 (originadas por Steve Eicher en la Universidad de Michigan y procedentes de pacientes con IBC).

Aparte de las líneas de cáncer de mama humano, existen también algunas líneas celulares de cáncer mamario canino. La primera de ellas fue establecida por el profesor Else y colaboradores (1982) y recibió el nombre de REM13. Poco después fueron establecidas 6 líneas celulares por Wolfe y colaboradores (1986) y 3 años más tarde se estableció la primera línea generada a partir de una metástasis de un tumor negativo al RE de un carcinoma mamario canino (Hellmén *et al.*, 1992).

En 2015, Cáceres y colaboradores establecieron IPC-366, la primera línea celular de carcinoma inflamatorio mamario de tipo basal, negativa para la expresión de RE, RP, HER-2 y con alta capacidad proliferativa tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta nueva línea celular, mantiene la histología característica de IMC *in vivo* y exhibe VM. Dado el hecho de que el IMC comparte características epidemiológicas, histopatológicas y clínicas con el IBC, esta nueva línea celular es una gran herramienta para desarrollar estudios oncológicos comparativos y para investigar posibles terapias contra el IBC, además del IMC (Peña *et al.*, 2003a; Cáceres *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2017; Barrero *et al.*, 2019).

Adicionalmente a esta línea, destacan otras líneas de tumores mamarios caninos como DTK-E y DTK-PYME (Hsiao *et al.*, 2014), CMT1, CMT-U27, CMT9, P114, CNMP y CIPP (Gracanin *et al.*, 2014).

Actualmente, las líneas de cáncer de mama más utilizadas en investigación son las siguientes:

Línea celular	Clasificación molecular	Fenotipo			Origen	Tumor de origen
		RE	RP	HER-2		
BT-20	Basal A	-	-	-	Mama	Carcinoma ductal infiltrante
MCF7	Luminal	+	+	-	Efusión pleural	Carcinoma ductal infiltrante
MDA-MB-231	Basal B	-	-	-	Efusión pleural	Adenocarcinoma
MDA-MB-435	Basal B	-	-	-	Efusión pleural	Carcinoma ductal infiltrante
SkBr3	Luminal	-	-	+	Efusión pleural	Adenocarcinoma
SUM149	Basal B	-	-	-	Mama	IBC
SUM 159	Basal B	-	-	-	Mama	Carcinoma anaplásico
SUM 190	Basal A	-	-	+	Mama	IBC
T47D	Luminal	+	+	-	Efusión pleural	Carcinoma ductal infiltrante
IPC366	Basal	-	-	-	Mama	IMC

Tabla 2: Resumen de las principales líneas celulares de cáncer de mama usadas en investigación (Neve *et al.*, 2006; Cáceres *et al.*, 2015).

Los estudios preclínicos con líneas celulares de cáncer han jugado un papel importante en nuestra comprensión de la biología tumoral y la detección de alto rendimiento para el desarrollo de fármacos (Gazdar *et al.*, 2010). Además de para investigar, la utilización de cultivos a corto plazo de células primarias de tumores sólidos, ha adquirido una importancia significativa en la terapia personalizada contra el cáncer (Mitra *et al.*, 2013). A pesar de los importantes avances realizados gracias a diversos estudios *in vitro*, nuestra comprensión sobre aspectos tan importantes como el proceso de carcinogénesis, la progresión tumoral o la metástasis, el éxito clínico logrado es todavía mejorable (Zhou *et al.*, 2009).

2.2. Modelos *in vivo*

En las últimas décadas, la creación y desarrollo de modelos animales para el estudio de enfermedades ha sido una herramienta vital para generar conocimiento en el ámbito de la medicina en general, y de la oncología mamaria en particular, mejorando en gran medida nuestra comprensión sobre los mecanismos de progresión tumoral y metástasis (Ruggeri *et al.*, 2014).

Dentro de los distintos modelos animales aprobados para ser utilizados en investigación oncológica, el animal de experimentación mayoritariamente utilizado de forma global es el ratón, debido especialmente a su pequeño tamaño, su facilidad para reproducirse, su corto ciclo vital, la posibilidad de ser modificados genéticamente y de extrapolar los datos obtenidos a la especie humana (Jong y Maina, 2010).

2.1.1. Utilidad de los modelos *in vivo* en la investigación del cáncer de mama

Una de las técnicas más extendidas para la experimentación en oncología mamaria en modelos animales, es el injerto de tejido tumoral en animales inmunocomprometidos, en un proceso denominado xenotransplante (Neve *et al.*, 2006). Este procedimiento ha demostrado ser útil para la evaluación de la genética del cáncer de mama, patogenicidad, potencial metastásico y su respuesta a diversos tratamientos, determinando la evolución del tamaño tumoral (Figura 14.A), cambios a nivel hormonal o presencia/ausencia de metástasis en necropsias realizadas tras los experimentos (Figura 14. B). No obstante, la validez de los datos obtenidos y su aplicabilidad a la práctica clínica es limitada (Whittle *et al.*, 2015).

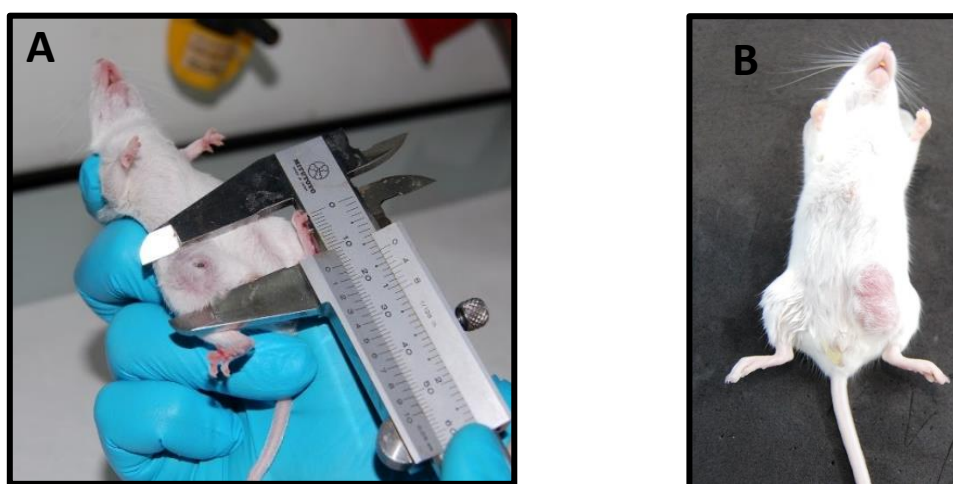


Figura 14. Ratones Balb/SCID con tumores de IMC generados por la inoculación subcutánea de células de la línea SUM149. **A.** Medición *in vivo* del tumor. **B.** Observación post-mortem antes de la necropsia y extracción de muestras para su posterior análisis. Fuente: fotografías de elaboración propia.

Es interesante señalar que la metástasis espontánea de los modelos murinos xenotransplantados es rara, lo que dificulta los estudios de metástasis de cáncer de mama

con este tipo de modelo. Sin embargo, algunas líneas celulares murinas previamente caracterizadas metastatizan en modelos singénicos, aunque actualmente son un recurso limitado (Paschall y Liu, 2016). Adicionalmente, la inyección directa de células de cáncer de mama en localizaciones ectópicas (por ejemplo, torrente sanguíneo, fémur) puede usarse como un ensayo experimental de metástasis. Debido a esta dificultad para visualizar en ocasiones el crecimiento del tumor, su distribución y las metástasis, se han desarrollado técnicas moleculares de imagen en tiempo real que permiten observar el desarrollo tumoral, como es el caso de la bioluminiscencia (Teicher, 2006).

Existen distintos modelos murinos validados para su utilización en cáncer de mama, pero son pocos los validados específicamente para la investigación del IBC, destacando dos: MARY-X y WIBC-9. MARY-X es el único modelo de IBC RE-, RP-HER2- que simula la presentación clínica de este tipo de tumor en modelos murinos. Por su parte, WIBC-9 es un modelo *in vivo* que se ha empleado para estudiar el fenómeno del mimetismo vascular, dado que se ha observado que sus tumores presentan esta característica (Shirakawa *et al.*, 2001).

Camacho y colaboradores (2013) establecieron el primer modelo murino de IMC en ratones SCID. El desarrollo y validación de esta clase de modelos es vital para avanzar en el conocimiento tanto del IMC como del IBC, ya que aportará información sobre la diferencia de velocidad de crecimiento tumoral de ambos tipos de tumor, así como conocer su capacidad angiogénica y angioinvasiva, además de caracterizar el inmunofenotipo tanto en la neoplasia canina original como en el xenotransplante (Camacho *et al.*, 2013).

Debido a sus similitudes en ensayos *in vitro* y en sus características clínico-patológicas entre los carcinomas mamarios caninos y humanos, recientemente se ha

propuesto la especie canina como modelo animal del cáncer de mama espontáneo humano (Peña *et al.*, 2003a, Camacho *et al.*, 2013; Cáceres *et al.*, 2015, Barrero *et al.*, 2019).

La corta historia natural de los carcinomas espontáneos invasivos caninos con la elevada tasa de muerte debida a esta patología, hacen que este modelo sea de interés, entre otros motivos, por la duración de los ensayos preclínicos y el volumen de información que se obtiene en un corto espacio de tiempo.

Los factores pronósticos y la biología de los tumores son muy similares en ambas especies, siendo interesante valorar la especie canina como modelo de estudio de los tumores mamarios humanos, así como para extrapolar los avances en la patología humana a la patología animal, de la que se tiene mucha menos evidencia.

3. Opciones terapéuticas actuales en IBC e IMC

Una vez realizado el diagnóstico clínico, patológico y molecular certero que confirma que la paciente tiene IBC o IMC, hay que diseñar un plan terapéutico a medida para cada caso, estando validado para este tipo de tumor un abordaje trimodal, como así ha sido establecido en las guías clínicas de la NCCN (National Comprehensive Cancer Center) y en las guías internacionales de expertos de IBC que recomiendan tratar esta patología con quimioterapia sistémica primaria, cirugía y radioterapia (Dawood *et al.*, 2011). Esta terapia trimodal ha demostrado tener un impacto muy positivo en la supervivencia de las pacientes, como afirmaron van Uden y colaboradores en 2019 en un estudio en el que concluyeron que cuando se compara la supervivencia de pacientes con IBC en estadio III a 5 años de seguimiento que han sido sometidas a una terapia trimodal (Figura 15. A) o no (Figura 15. B), hay diferencias numéricas significativas entre los distintos tipos moleculares de tumores tratados.

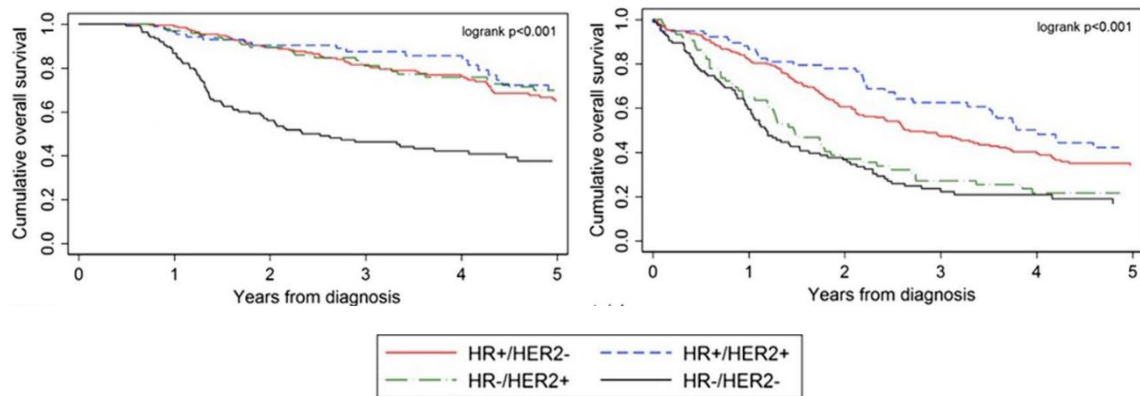


Figura 15. A. Supervivencia a 5 años de los 4 tipos moleculares de IBC que han seguido una terapia trimodal. **B.** Supervivencia a 5 años de los 4 tipos moleculares de IBC que no la han seguido (Uden *et al.*, 2019).

Antes de la llegada de las guías de práctica clínica, el IBC se trataba principalmente con cirugía con o sin radioterapia, obteniendo una supervivencia a 5 años del 5% (Dawood *et al.*, 2014).

Es importante recordar que los protocolos que se establecieron para IBC se han desarrollado, principalmente, a partir de los existentes para tumores no-IBC y de la evidencia generada en pequeños estudios retrospectivos y prospectivos (Uden *et al.*, 2019). Desde 2009 se han publicado decenas de artículos sobre IBC que tratan de profundizar en el conocimiento sobre su biología y generar más conocimiento que favorezca el desarrollo de terapias específicas para IBC, así como herramientas de diagnóstico certero (Menta *et al.*, 2018).

Los primeros tratamientos neoadyuvantes en cáncer de mama se remontan a la década de 1970, con la llegada de las primeras guías de práctica clínica en oncología y fue entonces cuando dichos tratamientos fueron prescritos en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado (Velasco *et al.*, 2012). Los principales objetivos de la terapia neoadyuvante son controlar de forma temprana la enfermedad micrometastásica, conocer

la respuesta temprana del tumor al tratamiento y disminuir el tamaño tumoral (Martí *et al.*, 2020).

En la década de los años 90, la MD Anderson estableció que los tumores IBC debían tratarse en primer lugar con quimioterapia neoadyuvante, con antraciclinas como tratamiento de elección antes de la cirugía (Ueno *et al.*, 1997). Después de los resultados positivos que se obtuvieron, se iniciaron diversos estudios con el objetivo de comparar distintas moléculas y combinaciones de las antraciclinas con otras potencialmente eficaces en este escenario, evaluando principalmente la supervivencia libre de enfermedad, la supervivencia global en las mujeres reclutadas en el estudio, así como el impacto del tratamiento en la cirugía posterior. Además, se incorporaron los taxanos a este protocolo de tratamiento neoadyuvante tras evidenciarse en diversos estudios prospectivos los beneficios de esta doble terapia en pacientes con IBC (Cristofanilli *et al.*, 2004). También se observó que los tumores que requerían en el momento del diagnóstico una cirugía agresiva, tras el tratamiento neoadjuvante muchos de esos tumores pudieron ser extirpados con cirugías conservadoras gracias a la reducción de su tamaño (Velasco *et al.*, 2012).

Actualmente, los tratamientos neoadyuvantes forman parte del tratamiento estándar en el cáncer de mama localmente avanzado e inflamatorio y es necesario hacer distinciones en el tratamiento de pacientes pre y postmenopáusicas, debido a sus notables diferencias en lo que se refiere a su contexto hormonal. La mayor parte de los estudios clínicos se han desarrollado en mujeres postmenopáusicas debido a que la incidencia y prevalencia del cáncer de mama es mayor que en premenopáusicas (Wu *et al.*, 2015).

Adicionalmente a la quimioterapia neoadyuvnte, numerosos estudios han demostrado el beneficio de administrar un tratamiento hormonal a las pacientes con

tumores positivos a receptores hormonales, mejorando el pronóstico y la supervivencia de las mismas (Purohit *et al.*, 2012).

Actualmente, las pacientes con IBC en las que no se ha evidenciado la presencia de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico, se recomienda que sean tratadas con quimioterapia neoadyuvante para reducir al máximo el tamaño del tumor con el fin de realizar una mastectomía lo más conservadora posible, completando el tratamiento con radioterapia (Yamauchi *et al.*, 2012).

En línea con lo anterior, autores como Menta y colaboradores (2018) afirman que para obtener óptimos resultados clínicos y mejorar la supervivencia en pacientes en estadios avanzados, el control local del tumor es necesario y, para ello, hay que incluir tanto la cirugía como la radioterapia en el plan terapéutico, ya que se ha observado que la respuesta sistémica en pacientes en estadio III y IV de IBC es corta y es necesario complementarla con un control local del tumor. Este control local tiene una serie de puntos críticos que Menta y colaboradores (2018) definieron como se señala a continuación en la Figura 16:

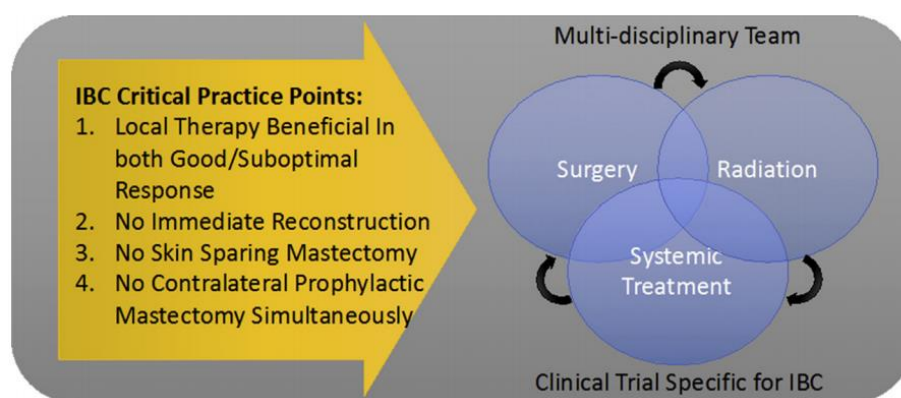


Figura 16: Recomendaciones para el tratamiento del IBC y puntos críticos en la práctica clínica cuando se trata pacientes con IBC (Menta *et al.*, 2018).

Estas observaciones coinciden con las realizadas por Wang y colaboradores (2020) en un estudio recientemente publicado que afirma que la combinación de mastectomía con radioterapia, mejora significativamente la supervivencia en pacientes con cáncer de mama en general y de TNBC en particular (Wang *et al.*, 2020).

Además de las moléculas anteriormente citadas, desde hace menos de una década, los tumores en general y los mamarios en particular, se tratan con una clase de terapia conocida como inmunoterapia, que ha demostrado prometedores resultados en tumores con pocas opciones terapéuticas, como es el caso de tumores TNBC positivos a HEGF-2. En el caso de tumores IBC hay algunos estudios iniciados que tienen como objetivo evaluar la eficacia de esta terapia en este tipo específico de cáncer de mama (Bayraktar *et al.*, 2019).

En pacientes con tumores IBC que sobreexpresan HER-2, la quimioterapia con trastuzumab en combinación con pertuzumab está indicada como parte del régimen terapéutico neoadyuvante (Yamauchi *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2017).

En el caso de los tumores mamarios caninos, como en medicina humana, es vital caracterizar el tumor mamario antes de comenzar el tratamiento, siendo necesario para ello realizar analíticas, radiografías torácicas y/o abdominales y biopsia (Shafiee *et al.*, 2013). Actualmente la mastectomía o lumpectomía (extracción de la masa tumoral) son las opciones terapéuticas más validadas para el tratamiento del cáncer mamario canino y, además, según afirma un estudio que compara la supervivencia entre los pacientes con un tipo u otro de cirugía, no hay diferencias entre ellas (Dos Santos *et al.*, 2014). No obstante, otros estudios indican que en el caso de que se realice la lumpectomía, la aparición de tumores en la cadena mamaria ipsilateral es común, siendo necesaria una cirugía más radical en un segundo tiempo (Stratmann *et al.*, 2008). Además, se ha observado que la

ovariohisterectomía mejora las tasas de supervivencia para tumores RE+ y aquellos perros con niveles elevados de estrógenos en suero (Kristiansen *et al.*, 2016).

En cuanto a los fármacos utilizados en quimioterapia, existen menos opciones validadas que en medicina humana, no obstante, existen varios quimioterápicos que se usan comúnmente en perras para tratar una variedad de tumores (Shafiee *et al.*, 2013). Se ha demostrado que el tratamiento con 5-fluorouracilo y ciclofosfamida tras la mastectomía mejora la supervivencia en perras con tumores mamarios malignos, en comparación con perras que solo son sometidas a cirugía (Karayannopoulou *et al.*, 2001).

Respecto a la terapéutica de tumores RE+, es interesante señalar que se han realizado algunos tratamientos con Tamoxifeno como en los tumores mamarios humanos pero con resultados pobres (Morris *et al.*, 1993) y además, las perras desarrollaron importantes efectos adversos (Morris *et al.*, 1993; Tavares *et al.*, 2010)

3.1. Importancia de los tratamientos hormonales en el éxito terapéutico del cáncer de mama en general y de IBC e IMC en particular.

La historia de la hormonoterapia en cáncer de mama se remonta hasta hace algo más de un siglo, cuando en 1896 el cirujano Sir George Beatson obtuvo una inesperada y positiva evolución clínica tras practicar una ooforectomía (extirpación quirúrgica de los ovarios o de una parte de ellos) a una paciente diagnosticada de cáncer de mama avanzado (Beatson *et al.*, 1896). Tras ese hallazgo, se sucedieron numerosas teorías sobre la relación que podría haber entre las hormonas, especialmente los estrógenos, y el cáncer de mama. Así, Lacassagne y colaboradores (1932), demostraron que la administración de estrógenos en ratones aumentó la incidencia de cáncer de mama. Más tarde, Engelsman

y colaboradores describieron la presencia de receptores de estrógenos en tumores de mama, aportando luz a casi un siglo de teorías diversas (Engelsman *et al.*, 1973).

Tras la publicación de estos importantes hallazgos, el tratamiento del cáncer de mama se centró en reducir la síntesis local de estrógenos mediante cirugía y/o radioterapia, especialmente en mujeres premenopáusicas. Es poco frecuente pero se continúan realizando en casos muy seleccionados ooforectomías y radioterapia ovárica con éste fin, ya que se trata de técnicas relativamente sencillas aunque irreversibles (Espinós *et al.*, 2008).

En las últimas décadas, los mecanismos moleculares relacionados con la dependencia hormonal de los tumores de mama han sido ampliamente estudiados (Wu *et al.*, 2015). A día de hoy, aproximadamente el 11% de los cánceres de mama son diagnosticados antes de la menopausia y debido a que, en la mayoría de los casos, el tumor expresa receptores hormonales, el tratamiento endocrino se ha postulado como una gran opción dentro del protocolo terapéutico (Martí *et al.*, 2020).

El tratamiento hormonal tiene diversas aplicaciones en el cáncer de mama, ya que es útil en el manejo del cáncer de mama metastásico como tratamiento sistémico, pero también como abordaje inicial en pacientes de avanzada edad o clínicamente inoperables (Velasco *et al.*, 2012). Tiene un destacado papel como tratamiento adyuvante en los estadios más precoces y se está estudiando su seguridad y eficacia en neoadyuvancia, así como tratamiento preventivo en pacientes de alto riesgo, como por ejemplo las mujeres portadores de mutaciones en el gen BRCA (Purohit *et al.*, 2012).

Aunque el tratamiento hormonal tiene un mecanismo de acción más lento que la quimioterapia, sus efectos secundarios son menores y se considera que, conseguida la respuesta a nivel molecular ésta es más sostenida, generando un impacto positivo en la

supervivencia de las pacientes con tumores positivos a receptores hormonales en general y estrogénicos en particular (Espinós *et al.*, 2008).

Actualmente, las terapias hormonales se pautan con el objetivo de conseguir uno o varios de los fenómenos citados a continuación (Maximov *et al.*, 2018):

- Bloqueo selectivo del receptor hormonal.
- Degradación del receptor hormonal.
- Bloqueo de la cascada hormonal mediante el bloqueo selectivo de las enzimas que catalizan la conversión de hormonas en sus formas activas.

Recientemente Martí y colaboradores (2020) han publicado en la revista de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria (SESPM), los resultados de una encuesta realizada a 79 unidades de mama de hospitales públicos (74,7% del total de hospitales) y privados de todo el territorio español, sobre el uso de hormonoterapia neoadyuvante en pacientes con cáncer de mama. El 77,2% de los médicos encuestados afirmó emplear la hormonoterapia en su práctica clínica diaria, siendo Letrozole el fármaco más utilizado (45,5% del total) seguido de Anastrozole, Exametasona, cualquier inhibidor de la aromatasa y Tamoxifeno. Un 16% no aportó información. Cuando se les preguntó por el escenario en el que se decantaban por esta clase de estrategia terapéutica, más de un 70% correspondía a mujeres postmenopáusicas pluripatológicas o con un tumor luminal (Figura 17).

Esta encuesta señala varios puntos de interés e importancia. El primero de ellos es que la terapia con inhibidores de la aromatasa (IA) está muy establecida en nuestro país, probablemente gracias a la evidencia que se ha generado en las últimas décadas. Otro punto interesante es que, a la vista de estos resultados, la terapia del cáncer de mama

está más protocolizada y estandarizada en mujeres postmenopáusicas y también en mujeres con tumores luminales.

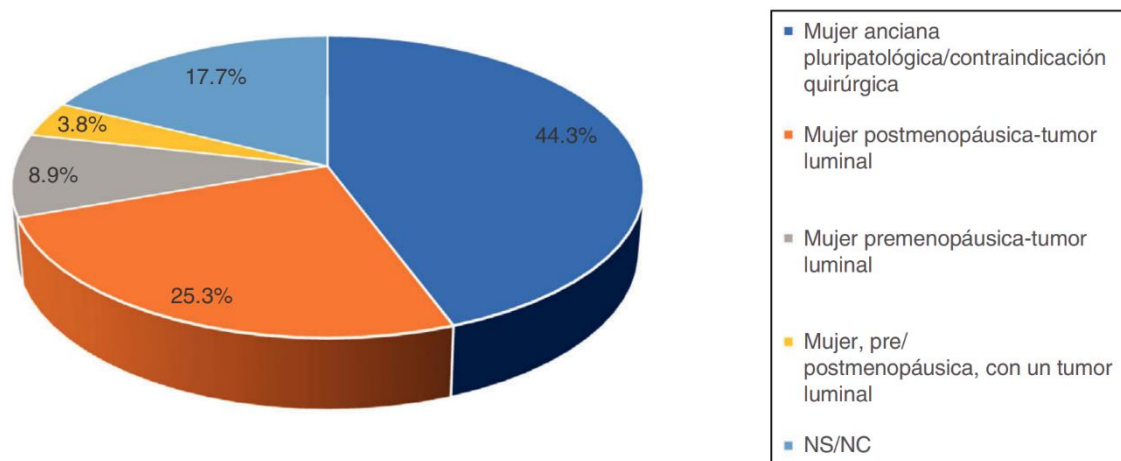


Figura 17. Perfil de pacientes tratados con hormonoterapia publicado en la encuesta de la SESPM. (Martí *et al.*, 2020).

Por todo lo expuesto anteriormente, es importante seguir explorando nuevas opciones terapéuticas que se centren en otras dianas terapéuticas (ya sean hormonas, enzimas o receptores hormonales) en tumores luminales, pero también en los basales, cuya terapia está menos establecida, especialmente en mujeres premenopáusicas.

3.2. Estrategias de tratamiento actuales en IBC e IMC

3.2.1. Terapia hormonal anti-androgénica

A diferencia de otras hormonas en las que la relación con la génesis y progresión de tumores mamarios es conocida, en el caso de los andrógenos esta relación no está tan clara. Katsopoulos y colaboradores (2011) afirman que entender el papel de los andrógenos en la carcinogénesis mamaria es importante debido a que actualmente, por ejemplo, se prescribe la T en numerosas mujeres adicionalmente a los estrógenos que se

prescriben en la terapia de reemplazo hormonal o HRT (Hormone Replacement Therapy) para aliviar los síntomas de la menopausia, especialmente en aquellas que la sufren precozmente debido al importante impacto que tiene este fenómeno en el bienestar de la mujer. Además, este mismo grupo afirma que existen dos líneas de pensamiento que relacionan los andrógenos con el aumento de riesgo a padecer cáncer de mama:

- Directo: vía RA al favorecer el crecimiento y la proliferación celular.
- Indirecto: A través de la aromatización de andrógenos mediante la enzima aromatasa.

Desde 1960 se han desarrollado distintas teorías como la “teoría hiperandrogénica” (Grattarola *et al.*, 1960) y la “teoría del exceso de andrógenos” (Secreto *et al.*, 2009). Ambas teorías comparten que el nivel elevado de andrógenos circulantes en sangre se relaciona con un mayor riesgo a padecer cáncer de mama en mujeres sanas. No obstante, se ha observado que las mujeres con síndrome de ovarios poliquísticos (SOP) tienen mayores niveles de andrógenos circulantes debido a su condición y no se ha observado ningún aumento de la incidencia de este tipo de patología (Gadducci *et al.*, 2005). Otros estudios señalan que la T limita la mitogenicidad y los efectos pro-cancerígenos que los estrógenos ejercen en el epitelio mamario (Glaser *et al.*, 2015).

Existen estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran que los andrógenos tienen un efecto inhibitorio sobre la multiplicación del epitelio mamario sano mientras que, otros estudios epidemiológicos han señalado la relación entre un nivel elevado de andrógenos y riesgo a padecer cáncer de mama. Además, la expresión del RA se considera un factor pronóstico positivo (Katsopoulos *et al.*, 2011).

El RA se expresa en, aproximadamente, el 70% a 90% de los casos de cáncer de mama invasivos, una frecuencia comparable o superior a la reportada para RE (70% - 80%) y PR (50% -70%) (González-Ángulo *et al.*, 2007). En el caso particular del TNBC, el RA se encuentra expresado en un 12–55% de los casos (Gucalp y Traina *et al.*, 2015). La presencia de RA en pacientes con TNBC, sugiere que la manipulación de las vías androgénicas en las células tumorales podría servir como una opción terapéutica adicional (McNamara *et al.*, 2013). En 2014, McNamara y colaboradores, establecieron por primera vez la relación entre la presencia de RA y la agresividad del TNBC, siendo ésta mayor en ausencia de dichos receptores.

Los primeros fármacos anti-androgénicos que se desarrollaron se utilizaron para tratar tumores prostáticos y, posteriormente, se planteó su utilidad para tratar tumores mamarios al tratarse, en la mayoría de los casos, de tumores hormono-dependientes (Proverbs-Singh *et al.*, 2015). Así, a principios de la década de 1970, se describió por primera vez la Flutamida, un antiandrógeno no esteroideo (Neri *et al.*, 1979), que fue aprobado en 1989 por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento del cáncer de próstata. Este descubrimiento fue seguido por otros antiandrógenos no esteroideos, como la Nilutamida (Raynaud *et al.*, 1977) y la Bicalutamida (un agonista parcial no esteroideo), (Furr *et al.*, 1987).

Esta citada investigación llevada a cabo para generar terapias dirigidas a RA para tratar el cáncer de próstata está facilitando el desarrollo de nuevas líneas de investigación para desarrollar tratamientos que inhiban el RA en el cáncer de mama triple negativo (TNBC), como ha sido el caso de la Bicalutamida, la Enzalutamida (un inhibidor de la localización nuclear de RA) y el VT-464, (un inhibidor dual de CYP17 y RA), entre otros (Proverbs-Singh *et al.*, 2015).

Actualmente, existen diversos estudios clínicos en curso encaminados a evaluar la eficacia de diversas moléculas de acción anti-androgénica (Enzalutamida, Bicalutamida y otros), solas o en combinación con otras moléculas (Pembrolizumab, Ribociclib, Seviteronel o Paclitaxel, entre otros). Adicionalmente a las terapias anti-RA, existen otros ensayos en curso, o ya completos, de fármacos que inhiben la síntesis de la DHEA o la testosterona 4-OH (Gerratana *et al.*, 2018).

La Flutamida es un fármaco antiandrogénico no esteroideo con una estructura similar a los andrógenos que compite con ellos por la unión a RA, bloqueando o inhibiendo su acción y denominándose por ello antagonista del RA. Además, esto produce un bloqueo de la retroalimentación negativa ejercida por la T en el hipotálamo, produciendo un aumento de los niveles plasmáticos de LH y T (Ji *et al.*, 2006).

La Flutamida fue descrita en 1970 y la FDA aprobó su uso como tratamiento del cáncer de próstata en 1976 (Raynaud *et al.*, 1977). Actualmente, está indicada para el tratamiento del cáncer de próstata metastásico humano, sola o combinada con agonistas de la LH-RH (hormona liberadora de LH) como son la buserelina, goserelina y leupride, ya que esta administración conjunta demostró aumentar la supervivencia de los pacientes con cáncer de próstata (Crawford *et al.*, 1989) y también en tumores que no responden a la ablación androgénica. En el cáncer de próstata canino también se usa como un tratamiento efectivo habiéndose observado mínimos efectos adversos (Frank *et al.*, 2004).

Este fármaco no está indicado para su uso en primera línea para el tratamiento del cáncer de mama y algunos autores como Cáceres y colaboradores (2017) han planteado su utilidad en IBC e IMC, en concreto en las líneas celulares IPC-366 y SUM149, ambas TNBC.

3.2.2. Terapia hormonal anti-estrogénica

Numerosos estudios han demostrado la importancia de los estrógenos en la génesis, desarrollo y crecimiento de tumores mamarios tanto en mujeres pre como postmenopáusicas (Cui *et al.*, 2013; Pistelli *et al.*, 2018). Se sabe que un alto porcentaje de los tumores mamarios son estrógeno-dependientes, suponiendo, aproximadamente, el 60% de los tumores mamarios en mujeres premenopáusicas y el 75% de los casos en postmenopáusicas (Jonat *et al.*, 2006). Además, según algunos autores, la concentración de estrógenos puede llegar a ser de 10 a 20 veces mayor en tumores mamarios que en el tejido mamario normal (Pasqualini *et al.*, 1996; Geisler *et al.*, 2003),

Se han descrito diversas técnicas y tratamientos encaminados a reducir su síntesis total o parcial en mujeres con cáncer de mama, (Beatson *et al.*, 1896; Purohit *et al.*, 2012) destacando:

- Ablación de la función ovárica: ooforectomía, radioterapia o análogos de la hormona liberadora de la LHRH (hormona luteinizante).
- Moduladores selectivos del receptor estrogénico (SERM): Tamoxifeno.
- Degradación de receptores hormonales con Fulvestrant.
- Reducción de la síntesis de estrógenos:
 - Con inhibidores de la aromatasa esteroideos (exametasano) o no esteroideos (Letrozole, Anastrozole).
 - Con inhibidores de la sulfatasa como STX-64.

El Tamoxifeno ha sido la terapia endocrina de elección durante más de 20 años y se ha estimado que este medicamento ha ayudado a que 400.000 mujeres sobrevivan al cáncer de mama (Larionov *et al.*, 2009; Puhalla *et al.*, 2009). Fue el primer antiestrógeno aprobado por la FDA, utilizado en la terapia del cáncer de mama en la década de 1970 y se encuadró dentro de la familia de los moduladores selectivos de los receptores de

estrógenos (SERM). Consta de una estructura química que le confiere afinidad para unirse a los receptores estrogénicos y que, dependiendo del tejido diana donde se realiza esta unión, inducen efectos agonistas estrogénicos (tejido óseo, sistema cardiovascular, hígado, etc.) o antagonistas estrogénicos (mama, endometrio) (Larionov *et al.*, 2009; Puhalla *et al.*, 2009).

Diversos estudios (ATLAS, ATTOM) realizados con Tamoxifeno en pacientes con cáncer de mama han señalado que se observó una reducción en el riesgo de muerte y de recurrencia con tratamientos prolongados de Tamoxifeno, con tiempos de seguimiento de hasta 15 años (Gray *et al.*, 2013).

Sin embargo, el Tamoxifeno también tiene algunos efectos adversos típicos de agonistas de estrógenos y puede estar asociado con un mayor riesgo a padecer, por ejemplo, un episodio de tromboembolismo. La actividad agonista también puede provocar progresivamente el desarrollo de resistencias al Tamoxifeno, siendo necesario cambiar el tratamiento de la paciente (Smith y Dowsett *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004).

Paulatinamente, con el paso del tiempo y con la creación de nuevas moléculas, el Tamoxifeno ha dejado de ser la única opción farmacológica a la hora de seleccionar una molécula para pautar la hormonoterapia en pacientes con cáncer de mama (Smith y Dowsett *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004). Ha sido sustituido, parcialmente, por otros fármacos que también tienen como objetivo reducir la concentración de estrógenos en sangre mediante un mecanismo de acción completamente distinto que ha demostrado tener menos efectos adversos en las pacientes. Estos fármacos se conocen con el nombre de inhibidores de la aromatasa y, como su propio nombre señala, intervienen en todas aquellas reacciones de aromatización que ocurren durante la síntesis de hormonas esteroides, en concreto, durante la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos,

bloqueando así la actividad de esta enzima en el epitelio mamario y otros tejidos periféricos, reduciendo así la producción local de estrógenos, lo que a su vez ayuda a suprimir la recurrencia del tejido tumoral de mama (Bulun *et al.*, 2012).

En el caso de la medicina veterinaria los IA no son utilizados rutinariamente para tratar a perras con tumores mamarios debido a la multitud de efectos adversos que se han reportado (Morris *et al.*, 1993).

3.2.2.1. Tratamiento del cáncer de mama con fármacos con acción anti-aromatasa

La aromatasa es una enzima de importancia en la cascada esteroidogénica, que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos, ya sea por la vía de la A4 o de la T, dando lugar a la síntesis de E1 y E2 respectivamente (Carpenter *et al.*, 2005).

La aromatasa se expresa en diversos tejidos, entre ellos, la placenta y en las células de la granulosa de los folículos ováricos. También está presente en tejidos periféricos, incluyendo tejido adiposo, hígado, músculo, cerebro (Simpson y Davis *et al.*, 2001). Además, se ha observado una mayor actividad de la aromatasa en el tejido adiposo adyacente a los cánceres de mama y puede promover el crecimiento de células malignas (Carpenter *et al.*, 2005).

Por lo tanto, la inhibición de esta enzima conduce selectivamente a la privación de estrógenos y a la posterior inhibición de la transcripción mediada por hormonas, así como a una pérdida de efectos estrogénicos, efecto que no es posible obtener con el tratamiento con SERMs (Gobbi *et al.*, 2014). Este mecanismo de acción sería particularmente efectivo en el cáncer de mama en mujeres menopáusicas, mientras que en mujeres premenopáusicas la reducción de las hormonas circulantes inducidas por la inhibición de su síntesis generaría, a partir de un proceso de retroalimentación negativa,

un aumento en la secreción de gonadotropinas, lo que llevaría a un aumento en la producción de estrógenos en el ovario (Gobbi *et al.*, 2014).

Los inhibidores de aromatasa inhiben parcialmente la secreción de estrógenos endógenos sin interactuar directamente con los RE y, por lo tanto, tienen un mecanismo de acción diferente al del Tamoxifeno (Pistelli *et al.*, 2018). Por todo esto, los IA son una alternativa viable al Tamoxifeno como primera línea de tratamiento para el cáncer de mama temprano y avanzado en mujeres postmenopáusicas (Chumsri *et al.*, 2011).

Dentro de los inhibidores de la aromatasa encontramos dos tipos:

- Esteroideos como la Exametasona.
- No esteroideos como el Letrozole (IA de primera generación) o Anastrozole (IA de tercera generación).

Estos fármacos, a día de hoy, están indicados como terapia de primera línea en tumores RE+ y/o metastáticos, y de segunda línea en casos en los que hay una resistencia adquirida al Tamoxifeno, haciendo que éstos sean especialmente interesantes para ser usados en terapias prolongadas (Testa *et al.*, 2020). También están indicados en mujeres postmenopáusicas con comorbilidades tromboembólicas o sin osteoporosis (Carpenter *et al.*, 2005).

Letrozole es un inhibidor no esteroideo de la síntesis de estrógenos con actividad antineoplásica. Como inhibidor de la aromatasa de tercera generación, Letrozole inhibe de forma selectiva y reversible la aromatasa, lo que puede provocar la inhibición del crecimiento de las células de cáncer de mama dependientes de estrógenos. Letrozole bloquea la síntesis de estrógenos en mujeres postmenopáusicas y se usa como terapia para el cáncer de mama positivo para el RE, generalmente después de la resección y después del fracaso del Tamoxifeno (Gobbi *et al.*, 2014; Carpenter *et al.*, 2005). Además,

Letrozole demostró ser un 20% más efectivo que el tratamiento de elección hasta el momento, el Tamoxifeno, consiguiendo una reducción significativa del tamaño del tumor antes de la cirugía, pudiendo realizarse en muchos casos resecciones tumorales o mastectomías más conservadoras (Miller *et al.*, 2002).

Por otro lado, Anastrozole es uno de los dos IA más utilizados y validados actualmente (Martí *et al.*, 2020), que demostró en el estudio ATAC (The Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination trial) su superioridad respecto al Tamoxifeno cuando se evaluó su uso individual o bien suministrado de forma combinada con otros fármacos. Tras 68 meses de seguimiento, las pacientes que recibieron Anastrozole presentaron una supervivencia libre de enfermedad significativamente superior a las tratadas con Tamoxifeno. El estudio incluía un tercer brazo que combinaba ambos fármacos sin mostrar beneficios (Baum *et al.* 2002).

En cuanto a los efectos secundarios, Anastrozole se asoció a una disminución significativa de eventos cerebrovasculares, fenómenos tromboembólicos, sofocos, síntomas vaginales y carcinoma endometrial, aunque con mayor frecuencia se asoció a problemas musculoesqueléticos como fracturas. Éstos pueden deberse a la deprivación estrogénica y no ocurren con el Tamoxifeno ya que éste tiene una acción agonista estrogénica sobre endometrio y hueso (Espinós *et al.*, 2005).

En 2015, el Grupo Cooperativo de Ensayos de Cáncer de Mama Temprano, realizó un metaanálisis para determinar qué protocolo terapéutico era más eficaz a 5 años en mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama, valorando 3 protocolos adyuvantes distintos: IA continuo versus monoterapia con Tamoxifeno, Tamoxifeno secuencial e IA versus monoterapia con Tamoxifeno y Tamoxifeno secuencial e IA versus monoterapia con IA continua. Se mostró que las terapias que combinaban IA y Tamoxifeno

presentaron mejores tasas de recidivas y menor tasa de muerte a 5 años, aunque estas diferencias parecen disminuir a los 10 años de seguimiento (EBCTCG *et al.*; 2015).

Las últimas guías clínicas de ASCO (American Society of Clinical Oncology) de 2018 para el tratamiento de cáncer de mama RE+ afirman que, en mujeres premenopáusicas con un tumor mamario RE+ está indicada la terapia adyuvante con Tamoxifeno. Sin embargo, para pacientes postmenopáusicas, indica que existen cuatro regímenes de tratamiento diferentes (Burststein *et al.*, 2018):

1. Monoterapia con IA durante 5 años.
2. Tratamiento secuenciado con Tamoxifeno e IA durante 5 años.
3. Monoterapia con Tamoxifeno extendido durante 10 años.
4. Tamoxifeno seguido de IA prolongada durante 10 años.

Actualmente y desde hace ya una década, numerosos protocolos terapéuticos se han desarrollado para administrar tratamientos adyuvantes en mujeres con cáncer de mama positivos a receptores hormonales, especialmente RE+. En este escenario, se ha recomendado la administración de IA (Anastrozole, Letrozole, principalmente) solos o de forma combinada con Tamoxifeno (van Hellemond *et al.*, 2018).

Respecto a la evidencia disponible en medicina veterinaria sobre resultados de tratamientos de tumores hormodepedientes (prostáticos o mamarios, principalmente) con IA, destacar que hay poca evidencia al respecto. González y colaboradores (2009) afirmaron que el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna en perros es seguro y eficaz.

Por otro lado, de Andrés y colaboradores (2016) realizaron un estudio *in vitro* en el que compararon la respuesta al tratamiento con Letrozole de una línea celular de

IBC (IPC-366) y otra de IMC (SUM149), observando que dicho fármaco producía una disminución de la proliferación celular en ambas líneas celulares de IBC e IMC.

3.2.2.2. Tratamiento del cáncer de mama con fármacos con acción antisulfatasa

La sulfatasa esteroidea o STS es una enzima citoplasmática responsable de la conversión de las formas inactivas y circulantes de sulfato de estradiol (SO₄E₂) y sulfato de estrona (SO₄E₁) en estradiol (E₂) y estrona (E₁) no conjugados y biológicamente activos, haciendo que puedan unirse selectivamente a sus receptores para ejercer su mecanismo de acción (Foster *et al.*, 2006). Además, algunos autores señalan que estas formas sulfatadas actúan como reservorios en los tejidos, de sus formas biológicamente activas y, por ello, es interesante contemplar la enzima que participa en su conversión como una diana terapéutica para reducir la concentración de estrógenos en sangre (Purohit *et al.*, 2012). La concentración de estas formas sulfatadas es mucho mayor que la de sus formas no conjugadas (Pasqualini *et al.*, 1989) debido a que son capaces de unirse a la albúmina y aumentar su vida media en sangre hasta, aproximadamente 9 horas, un tiempo mucho mayor que el que tienen la E₁ y el E₂ (Ruder *et al.*, 1972).

Adicionalmente a lo anterior, es importante señalar que la STS también hidroliza el DHEA-S a DHEA, un andrógeno que también podría ser importante en tumores mamarios y también de próstata (Pasqualini *et al.*, 2004; Foster *et al.*, 2006). Algunos estudios han señalado que tanto el DHEA-S como la DHEA pueden actuar como precursores para la formación de esteroides con propiedades estrogénicas como el 5-androstenediol (también conocido como adiol) y, existen hipótesis de que tanto el adiol como la DHEA estimulan la proliferación de células tumorales mamarias (Saha *et al.*,

2019). No obstante, hay otros autores que defienden que la DHEA tiene un efecto protector frente al cáncer de mama (López-Marure *et al.*, 2011).

Se cree que la STS es una enzima ubicua presente en todo el cuerpo y, como consecuencia de ello, cuando se activa su mecanismo de acción, las concentraciones de estrógenos que es capaz de generar son significativas (Reed *et al.*, 2005).

Cada vez hay más pruebas que apoyan la importancia de STS en tumores mamarios. El resultado de una mayor actividad de STS podría dar lugar a una concentración de E2 10 veces mayor en el tejido mamario patológico, cuando se compara con su concentración en el plasma sanguíneo de las pacientes, originada a través de la ruta de la sulfatasa y no a través de la ruta de la aromatasa (Pasqualini *et al.*, 1996).

Existen diversos tipos de inhibidores de la sulfatasa, entre los cuales destacamos el STX-64 (también conocido como Irosustat o 677 Coumato). Es un sulfamato tricíclico cumarínico de primera generación cuyo mecanismo de acción hace que actúe como un inhibidor irreversible de la enzima sulfatasa, impidiendo la síntesis de estrógenos biológicamente activos, así como el crecimiento celular en tumores hormono-dependientes como son los de mama, ovario y endometrio (Reed *et al.*, 2005). Actualmente, se está investigando su eficacia y seguridad en el tratamiento de cáncer de mama metastático y en el cáncer de mama localmente avanzado (Shah *et al.*, 2016).

Se han realizado dos estudios de fase I con este fármaco y en ambos estudios, STX-64 no produjo toxicidades bioquímicas o hematológicas en las pacientes con IBC tratados con esta molécula (Stanway *et al.*, 2006; Coombes *et al.*, 2013). En ambos estudios se determinó que STX-64 tenía un buen perfil de seguridad, era bien tolerado y no presentaba toxicidades hematológicas y bioquímicas. Además, se observó una reducción significativa a nivel sistémico (en suero sanguíneo) de las concentraciones de

E1, E2, androstenediol y DHEA, así como una reducción significativa del tamaño del tumor. También se realizaron tratamientos a nivel *in vitro* de STX-64 utilizando las líneas de cáncer de mama MCF-7 WT y MCF-7 STS, observándose una marcada reducción de la multiplicación celular. Estos resultados abrieron una posible nueva opción de combinarse con otros fármacos para obtener sinergias terapéuticas, como por ejemplo los inhibidores de la aromatasa, fármacos de conocida eficacia y seguridad en el cáncer de mama (Stanway *et al.*, 2006). Esta posible nueva estrategia fue evaluada posteriormente (estudio IRIS), en fase II realizado en pacientes con cáncer de mama RE+ localmente avanzado o metastático, a las que previamente se les había suministrado IA con el objetivo de evaluar si suministrándose IA de forma continuada junto con STX-64, se traducía en una mejora clínica o no. Se determinó que, aunque es necesario seguir investigando esta nueva combinación, se observó una mejoría clínica o estabilización de la enfermedad en un conjunto de pacientes tratadas y que el protocolo terapéutico era seguro y bien tolerado por las pacientes (Palmieri *et al.*, 2017).

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

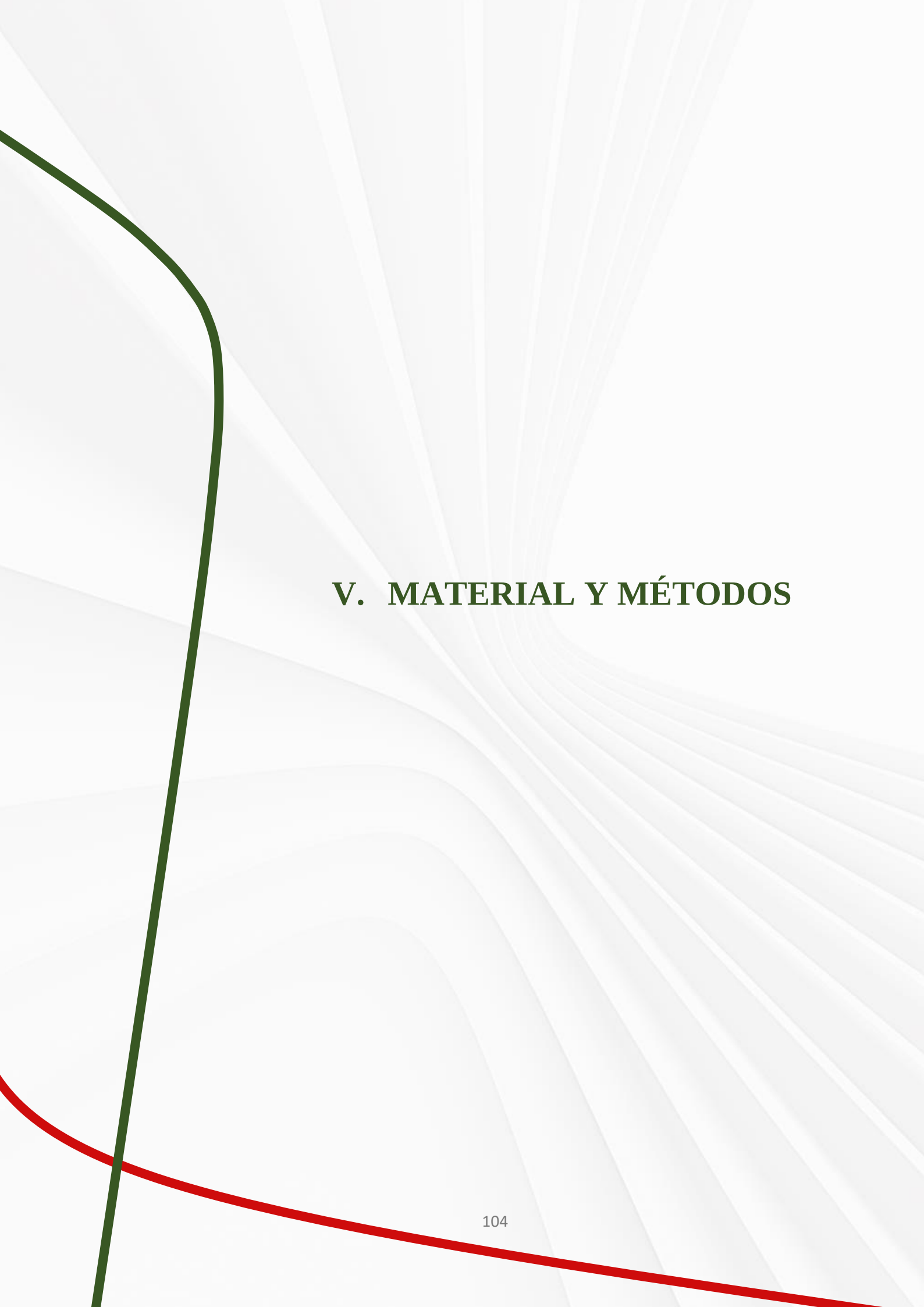
En la investigación del carcinoma inflamatorio de mama humano (IBC) existen un número limitado pero creciente de líneas celulares disponibles para la realización de estudios, siendo la más utilizada SUM-149. En la variante de esta enfermedad que afecta a la especie canina, conocida como IMC o Inflammatory Breast Carcinoma o carcinoma inflamatorio mamario canino, la disponibilidad de líneas celulares para investigar es muy reducida. Hace escasos años se estableció la línea IPC366, primera línea inmortal de IMC triple negativo. IPC-366 y SUM149 comparten muchas características tanto *in vitro* como *in vivo*. Ambas líneas celulares son triple negativas y presentan un inmunofenotipo similar de expresión de marcadores de células madre.

Nuestra hipótesis es que las líneas celulares IPC-366 y SUM 149 van a responder de forma similar a los tratamientos *in vitro* e *in vivo* con Flutamida, Letrozole y STX-64, lo que permitirá establecer el IMC como modelo para estudiar el IBC.

Para confirmar esta hipótesis, en esta Tesis Doctoral se analizarán las similitudes y diferencias entre el IBC e IMC *in vitro* e *in vivo*, centrándose en estudiar su respuesta a Flutamida (fármaco con acción antiandrógeno), Letrozole (fármaco con acción antiaromatasa) y STX-64 (fármaco con acción antisulfatasa) y así también evaluar la utilidad de establecer el IMC como modelo para estudiar el IBC, valorando los tres tratamientos anteriormente citados como una opción terapéutica más. Para ello, se han establecido los siguientes objetivos:

1. Comparar la respuesta de las líneas celulares IPC366 y SUM 149 al tratamiento *in vitro* con Flutamida, Letrozole y STX-64. Para ello, se analizará la respuesta a los mismos controlando diariamente durante la duración del experimento la viabilidad de las células y su proliferación.

2. Realizar un análisis de hormonas (P4, P5, DHEA, A4, SO4E1, E2, T, DHT) presentes en el medio de cultivo con el objetivo de conocer cómo varía su síntesis durante el tratamiento y se compararán dichas variaciones entre las dos líneas celulares.
3. Analizar la tumorigenicidad de ambas líneas celulares en ratones hembra Balb/SCID que han sido xenotrasplantadas para determinar las similitudes y diferencias derivadas del microambiente hormonal del tumor, en el crecimiento y la evolución del tumor generado, así como la aparición de metástasis.
4. Comparar la respuesta a los tratamientos administrados, analizando la evolución del tamaño del tumor, la presencia o ausencia de metástasis y la respuesta a nivel hormonal de cada tratamiento, tanto en sangre como en el homogeneizado del tumor.



V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares utilizados: IPC-366 y SUM 149

1.1. Origen de las líneas celulares

La línea celular SUM149 fue establecida en 1999 por Forozen y colaboradores a partir de un carcinoma ductal invasivo de una mujer con Carcinoma Inflamatorio Mamario (IBC) que no respondía a la quimioterapia. Se trataba de un IBC RE negativo, PR negativo y HER-2 positivo (no activado), de morfología celular mixta. SUM 149 es una línea celular inmortal de cariotipo anormal y que expresa citoqueratinas lumbinales 8 y 18 (Neve et al., 2006). Las células utilizadas para la realización de esta Tesis Doctoral se obtuvieron de Asterand, Plc (Detroit, EEUU).

La línea celular IPC-366 fue establecida en 2015 en el Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Se desarrolló a partir de muestras de un carcinoma inflamatorio mamario canino, tomadas inmediatamente después del sacrificio humanitario de una perra de raza mestiza de 10 años de edad. La necropsia, realizada por el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense de Madrid, confirmó el diagnóstico de IMC (tratándose específicamente de un carcinoma tipo lobulillar de grado II) y tras éste, se procedió al procesado de las muestras para obtener la primera línea celular inmortal de Carcinoma Inflamatorio Canino triple negativo (Cáceres et al., 2015).

1.2. Mantenimiento y pase celular.

La línea IPC-366 se cultivó en la mezcla de nutrientes media Eagle modificada de Dulbecco F-12 Ham (DMEM/F12) que contiene 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Sigma Aldrich), solución de penicilina-estreptomicina al 1%, 1% de anfotericina B y 1% de L-glutamina (Sigma Aldrich). La línea SUM149 se mantuvo en medio Ham's F-12

suplementado con SFB al 10% (Sigma Aldrich), hidrocortisona 1 µg/ml, insulina 5 µg/ml y solución de penicilina-estreptomicina al 1% y 1% de anfotericina B (Sigma Aldrich).

Ambas líneas celulares se cultivaron en flask T-75 cm² (Controltecnica, Madrid), los cuales se mantuvieron en un incubador de CO₂ (Nuair modelo NU-4750E) (Plymouth, MN, EEUU) a 37°C con un 5% de CO₂ y una atmósfera humidificada.

Los cultivos celulares se observaron diariamente mediante microscopía invertida (Optika, modelo XDS-2, Italia) para verificar la viabilidad y el crecimiento celular. Durante el período de preparación de los cultivos celulares (Figura 18), necesarios para el desarrollo de los tratamientos *in vitro* y la inoculación en las ratonas objeto del ensayo *in vivo*, se procedió al cambio de medio de cultivo cada 72 horas con el objetivo de garantizar que las líneas celulares se encontrasen en óptimas condiciones para multiplicarse. Cada vez que se observó en los controles diarios una confluencia celular del 75% en un flask, se procedió al despegado y transferencia de las células a nuevos flask.

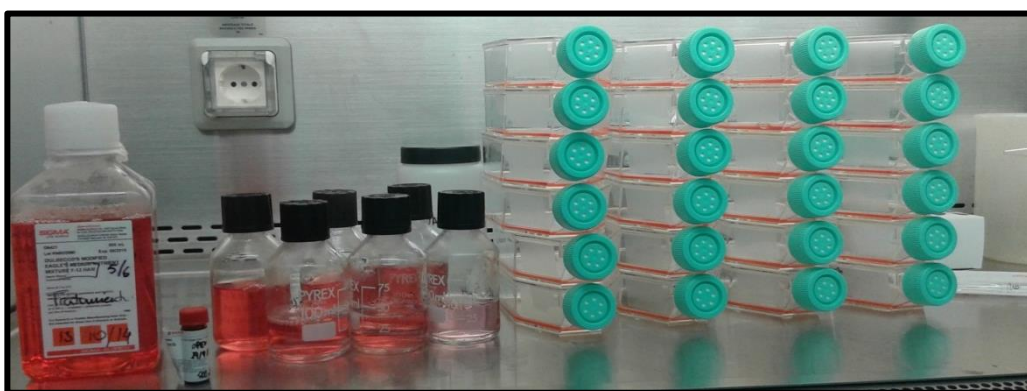


Figura 18: Flask que contienen las líneas celulares IPC-366 y SUM149 en proceso de preparación para el inicio del experimento *in vitro*. (Fuente: elaboración propia)

Para la realización de este proceso de transferencia de células, en primer lugar, las células se lavaron con una solución Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), con 1%

de antibiótico, para retirar todos los artefactos que pudiera haber. Una vez lavadas, se les agregó una solución de tripsina (Trypsin-EDTA Solution al 0,25%) (Sigma Aldrich, Madrid) que se dejó actuar durante 2 minutos en el incubador de CO₂. Transcurrido este tiempo, se observaron las células al microscopio invertido para comprobar si se habían despegado del frasco de cultivo y se encontraban en suspensión.

Posteriormente, sin desechar la tripsina, se inactivó la misma con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma Aldrich, Madrid) suplementado con un 10% de SFB. Todo este contenido fue transferido desde el frasco de cultivo a un tubo Falcon y éste se centrifugó a 1000 r.p.m durante 5 minutos a 20°C. El pellet de células resultante fue resuspendido en medio DMEM/F12 suplementado y transferido a los nuevos flask de cultivo. Generalmente estas células resuspendidas se repartían en 2-3 flask hasta un máximo de 6 para facilitar y estimular la multiplicación de las mismas.

1.3. Curva de crecimiento celular

Para conocer el crecimiento de las líneas celulares IPC-366 y SUM 149, las células fueron transferidas a placas de cultivo de 6 pocillos (Controltecnica, Madrid) en una concentración de 10⁶ células por pocillo con el medio específico de cada línea celular. Cada día, durante 10 días, se contaron las células de tres pocillos usando un hemocitómetro. Se utilizó la media del conteo de cada día para, posteriormente, representarla gráficamente y observar la evolución del crecimiento de las células en cultivo.

2. Fármacos utilizados en los tratamientos

2.1. Flutamida: descripción, mecanismo de acción y preparación.

La Flutamida (Figura 19) es un agente antiandrogénico no esteroideo con una estructura similar a los andrógenos y, por lo tanto, debido a su similitud, compite con los andrógenos y se une a su receptor, bloqueando o inhibiendo su acción.

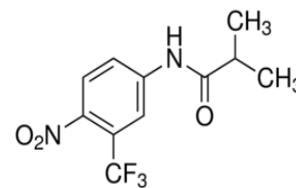


Figura 19. Fórmula química de la Flutamida

Se diluyeron 5mg de Flutamida (Sigma Aldrich) en 1ml de dimetil sulfóxido (DMSO), que utilizamos como disolución madre, para luego elaborar las disoluciones problema con las tres concentraciones seleccionadas para la realización de este experimento. Se calculó el volumen de disolución madre necesario para obtener la dosis deseada en un volumen final de 100ml, que se completó con medio de cultivo.

Dosis Flutamida <i>in vivo</i>	Dosis Flutamida <i>in vitro</i>
5 mg/Kg	5µM
10 mg/Kg	10µM
15 mg/Kg	15µM

Tabla 3. Dosis calculadas para la elaboración de las diluciones para los tratamientos de Flutamida.

2.2. Letrozole: descripción, mecanismo de acción y preparación.

Letrozole (Figura 20) inhibe selectivamente la enzima aromatasa, por unión competitiva al grupo hemo del citocromo P450 de la aromatasa, dando lugar a una reducción de la síntesis de estrógenos en todos los tejidos donde está presente.

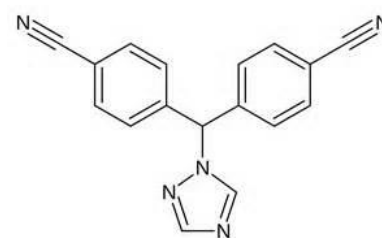


Figura 20. Fórmula química de Letrozole

Se diluyeron 5mg de Letrozole (Sigma Aldrich) en 1ml de DMSO, que utilizamos como disolución madre para luego elaborar las tres disoluciones problema. De la misma manera que en el tratamiento anterior, se calculó el volumen de disolución madre necesaria para obtener la dosis deseada en un volumen final de 100ml, que se completó con medio de cultivo (Tabla 4).

Dosis Letrozole <i>in vivo</i>	Dosis Letrozole <i>in vitro</i>
1 mg/Kg	0,35 μ M
5 mg/Kg	0,7 μ M
10 mg/Kg	1,05 μ M

Tabla 4. Dosis calculadas para la elaboración de las diluciones para los tratamientos de Letrozole.

2.3. STX-64: descripción, mecanismo de acción y preparación.

STX-64 (Figura 21) es un inhibidor de la enzima sulfatasa, y por ello impide la conversión de sulfatos de esteroides hormonalmente inactivos, tales como DHEA sulfato (DHEA-S) y sulfato de estrona (E1S), en sus respectivas formas activas, DHEA y estrona (que, a su vez, pueden ser transformadas en andrógenos y estrógenos más potentes, respectivamente).

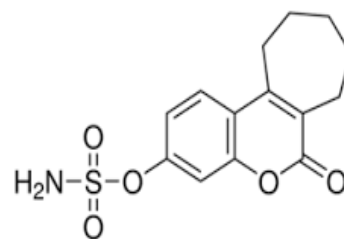


Figura 21. Fórmula química de STX-64

Se diluyeron 5mg de STX-64 (Sigma Aldrich) en 1ml de DMSO, que utilizamos como disolución madre para luego elaborar las tres disoluciones problema (Tabla 5).

Dosis STX-64 <i>in vivo</i>	Concentración STX-64 <i>in vitro</i>
1 mg/Kg	1,5 µM
5 mg/Kg	3 µM
10 mg/Kg	4,5 µM

Tabla 5. Dosis calculadas para la elaboración de las diluciones para los tratamientos de S3TX-64.

3. Tratamientos *in vitro*

3.1. Preparación de las líneas celulares.

Para cada tratamiento se prepararon 6 flask control y 6 flask para cada una de las tres dosis, conteniendo cada uno 1,5 millones de células previamente sembradas el día anterior al comienzo del experimento. Diariamente se realizó un control visual y fotográfico de las células (a 20X) para identificar cualquier clase de anomalía y estudiar la morfología celular durante el experimento. Las fotografías se realizaron a todos los grupos de tratamiento, seleccionando aleatoriamente 3 flask por grupo.

3.2 Tratamiento *in vitro* de las líneas celulares

Cada fármaco, previamente preparado a partir de la solución madre, se administró a tres dosis distintas y crecientes, analizando sus efectos a las 24, 48 y 72 horas tras la administración. Cada día del tratamiento se seleccionaron 2 flask al azar por dosis, siguiendo en todos los casos el mismo procedimiento:

1. Fotografiado de las células a 20X.
2. Retirada de medio de cultivo para posterior análisis EIA (Enzimo-inmuno-análisis)
3. Realización de análisis (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] – 5- (fenil 3-carboximetil) -2- (sulfofenil) 2H – tetrazolio) (MTS).
4. Obtención de pellet para futuro análisis anatómico-patológico.

3.3. Obtención de medios de cultivo y pellets

De cada tratamiento se seleccionaron cada día 2 flask, de los cuales se recogieron dos alícuotas del medio en tubos Eppendorf Maldi-tof y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento. Estos flask, seguidamente, se tripsinizaron para obtener el pellet de células (Figura 22).

A continuación, se procesaron 2 flask control y otros 2 de cada tratamiento para realizar el análisis MTS con el objetivo de conocer cómo varió el número de células vivas según la dosis del tratamiento y el tiempo de exposición al mismo. Por último, se volvió a centrifugar el homogeneizado a 1.000 r.p.m. 5 minutos a 20°C y una vez desechado el sobrenadante, se adicionó formol al pellet obtenido, se homogeneizó el contenido de todos los eppendorf en un vortex y se volvieron a centrifugar, esta vez a 3.200 r.p.m

durante 15 minutos a 20°C. Una vez completado todo el protocolo, se enviaron las muestras al laboratorio de Anatomía Patológica para su procesado.

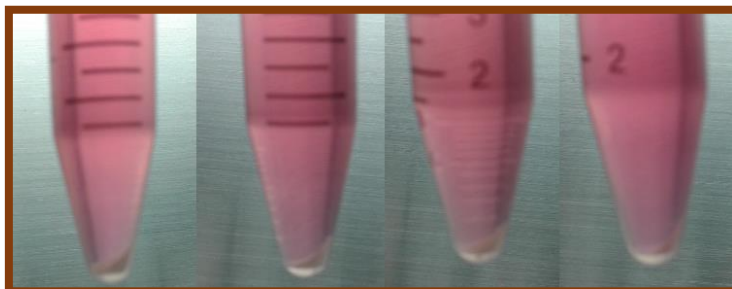


Figura 22. Fotografía de los pellet obtenidos tras la centrifugación (Fuente: elaboración propia)

4. Tratamiento *in vivo*

4.1. Animales

Se obtuvieron ratones hembra Balb/SCID de los Laboratorios Harlan (Barcelona, España) que fueron enviados a primera hora de la mañana para minimizar el estrés del envío y se alojaron en el animalario (con número de registro de la comunidad de Madrid: ES-28079-00000090) de la Sección Departamental de Fisiología (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid).

El tamaño de muestra requerido para comparar simultáneamente las medias normales de los cuatro grupos experimentales (control más tres tratamientos) se calculó asumiendo un riesgo de falsos positivos (nivel significativo) $\alpha = 0.05$, un riesgo de falsos negativos $\beta = 0.1$. La estimación del tamaño de la muestra se realizó utilizando el módulo de determinación del tamaño de la muestra, del paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA) y para este experimento, el tamaño de muestra requerido para cada grupo de tratamiento fue de 7.

Las ratonas se alojaron en jaulas de policarbonato dentro de un rack ventilado (Figura 23), en una habitación de ambiente controlado (temperatura: $23 \pm 2^\circ \text{C}$, humedad

relativa: $50 \pm 10\%$, ventilación frecuente y ciclo de luz de 12 h). Fueron alimentados con pellets libres de soja (Dyets Inc., Bethlehem, PA). Antes de su utilización, los animales fueron sometidos a un periodo de aclimatación de 4 días.



Figura 23. Jaulas de policarbonato en un rack ventilado de las ratonas del estudio en el Animalario de la Sección Departamental de Fisiología

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Complutense de Madrid, España, aprobó el protocolo experimental para este estudio (número: 115). Todos los procedimientos se completaron de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio y se ajustaron a la directiva pertinente de la UE.

4.2. Inoculación de las células

En el presente estudio, se inoculó subcutáneamente una suspensión de 10^6 células IPC-366 o SUM149 en la región ventral de las ratonas Balb/SCID de 8 semanas de edad. Antes de cada procedimiento, los animales fueron anestesiados con isofluorano (IsoVet) al 4% para la inducción y posteriormente a 1,5% para el mantenimiento de la sedación, siendo éste suministrado con un flujo de 0,5 litros de oxígeno/minuto.

Las ratonas fueron inspeccionadas semanalmente para vigilar el desarrollo de los tumores y cuando éstos alcanzaron un diámetro de 0,5 cm, se inició el tratamiento de los animales.

4.3. Desarrollo del tratamiento *in vivo*

Las ratonas se dividieron en cuatro grupos: grupo control y tres grupos de tratamiento (dosis 1, 2 y 3). Se inyectó a las ratonas cada tres días y durante un total de 15 días, el tratamiento que correspondiese y se midió el tamaño del tumor (largo y ancho) con un calibre (Figura 24), anotando cualquier anomalía física que se observase.



Figura 24: Momento de medición del tamaño del tumor (Fuente: elaboración propia).

4.4. Eutanasia, análisis *post-mortem* y obtención de muestras para posterior análisis laboratorial.

Las ratonas fueron sacrificadas cuando los tumores alcanzaron un volumen de $1,5 \text{ cm}^3$ o bien a los 15 días de iniciar el tratamiento. Todas ellas fueron sacrificadas con una dosis letal de isoflurano (IsoVet). Las muestras recogidas para su posterior análisis fueron:

- **Suero sanguíneo:** Previo a la eutanasia y tras ser anestesiados los animales, se extrajo toda la sangre intracardíaca posible con el objetivo de obtener el mayor volumen de suero para cuantificar las hormonas deseadas de la cascada estereidogénica, mediante la técnica EIA.

- **Necropsia:** tras sacrificar a las ratonas, se les practicó la necropsia con el objetivo de encontrar metástasis y cualquier otra alteración orgánica en los animales. Se tomaron muestras de hígado y pulmón para futuros estudios histológicos.
- **Tumores:** todos los tumores fueron extraídos con piel y medidos de nuevo (Figura 25). Se dividieron en dos mitades: una mitad se depositó en un frasco, previamente identificado, conteniendo paraformaldehído 5% para realizar un estudio anatómo-patológico y la otra mitad se homogeneizó en suero fisiológico, para cuantificar las hormonas presentes en dicha muestra mediante EIA.
- **Homogeneizados de tumores:** Se pesaron 0,5 g de tejido que se cortó y se introdujo en un macerador Pobel con 5mL de PBS. Posteriormente, se maceró el tejido hasta que estuvo homogeneizado y el líquido resultante se pasó a un tubo de ensayo que se centrifugó a $1.452 \times g$, 20 min a 4°C . Por último, se recogió el sobrenadante, en tubos debidamente etiquetados, y se congeló hasta su posterior análisis hormonal.



Figura 25: Medición *ex situ* del tumor recién extirpado (Fuente: elaboración propia).

5. Técnicas EIA

Para la determinación de las concentraciones de hormonas esteroides en los medios de cultivo, se realizó una técnica EIA de amplificación mientras que para los macerados de tumores y sueros se realizó una técnica EIA de competición.

Tanto en homogeneizados tumorales y sueros como en los medios de cultivo, las hormonas esteroides que se determinaron fueron P4, P5, A4, SO4E1, E2, T y DHT. Las técnicas EIA utilizadas han sido desarrolladas y validadas en el Laboratorio de Endocrinología de la sección departamental de Fisiología Animal (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid).

El EIA de competición se basa en la competición que se establece entre la hormona libre sin marcar (estándar o problema) y la hormona marcada con peroxidasa (HRP), por unirse a un anticuerpo específico fijado a una fase sólida. Posteriormente, mediante una reacción colorimétrica que se produce entre la enzima y un sustrato-cromógeno, es posible medir la cantidad de hormona unida al anticuerpo. La técnica EIA de amplificación es una variante del EIA de competición. En esta variante no existe tal competición, sino que se favorece que la hormona problema se una al anticuerpo y, posteriormente, el conjugado se une a los sitios de unión del anticuerpo que hayan quedado libres.

5.1. Desarrollo de las técnicas EIA

Ambas técnicas, tanto el EIA de competición como el de amplificación, comparten pasos del proceso. A continuación se detalla el protocolo a seguir del EIA de competición incluyendo, donde sea pertinente, las modificaciones que se llevan a cabo en el EIA de amplificación. En la Tabla 7, se resumen todos los anticuerpos y conjugados utilizados en esta técnica, así como las diluciones utilizadas y los tiempos de incubación de sustrato.

Anticuerpo	Dilución	Conjugado	Dilución	Tiempo de Sustrato
Anti-A4 (C9111)	1/4.000	A43CMO:HRP	1/20.000	30 min
Anti-E1 GLUC (R522-2)	1/4.000	E1GLUC:HRP	1/40.000	5 min
Anti-E2 (C6E91)	1/4.000	E2 3CMO:HRP	1/40.000	10 min
Anti-P4 (CL425)	1/6.000	P4 3CMO:HRP	1/80.000	5 min
Anti-T (R156)	1/8.000	T 3CMO:HRP	1/40.000	5 min

Tabla 7. Anticuerpos y conjugados utilizados para las técnicas EIA

Para la cuantificación de las hormonas P5, DHEA y DHT se utilizaron kit comerciales de Demeditec Diagnostics (Alemania).

5.2. Extracción de hormonas esteroides en muestras de sueros

Antes de comenzar con la técnica, para la determinación de las hormonas E2 y P4 en las muestras de suero, éstas deben ser extraídas, ya que estas hormonas se encuentran unidas a proteínas de transporte. En el caso de E2, se tomaron 20µL de suero y se disolvieron en 2mL de éter dietílico (Panreac, Barcelona). Dicha mezcla se agitó en un vórtex (Reax 2000, Heindolph) durante 40 segundos. A continuación, se sumergió una gradilla con los tubos de ensayo en una cubeta con metanol (Panreac, Barcelona) y nieve carbónica de tal manera que en el fondo del tubo se formó un sedimento congelado y un sobrenadante líquido, donde se encontraba el esteroide libre. Este sobrenadante se volcó a otro tubo de ensayo limpio y se mantuvo durante 24 horas en una campana de extracción para su completa evaporación.

Para la extracción de P4, se tomaron 20µL de la muestra y se disolvieron en 2mL de éter de petróleo (Panreac, Barcelona). El proceso de extracción fue el mismo que para E2.

5.3. Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida

En esta primera fase del ensayo se tapizaron microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Greiner Bio-one; Frickenhausen, Alemania) con la dilución apropiada del anticuerpo para la hormona a determinar (Tabla 7). Todas las diluciones de anticuerpo se realizaron en buffer coating (carbonato sódico (0.05M), carbonato de sodio hidrógeno (0.05M), thimerosal 1%; pH: 9,6).

Una vez realizadas las diluciones de anticuerpo, se añadieron 100µL de las mismas en todos los pocillos de la placa dejando libre el primer pocillo para utilizarlo como blanco. Por último, las placas se sellaron con una tapa de acetato y se dejaron incubar 16 horas a 4°C. Al día siguiente, se lavaron las placas tapizadas con solución de lavado utilizando un lavador de placas (Anthos Washer Fluido 1WK Model 24 500, Anthos Labtec Instruments, USA).

5.4. Preparación de las curvas estándar

Para trazar la curva estándar de cada una de las hormonas, se partió de una solución madre de hormona esteroide, a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas de la misma en etanol absoluto (Panreac, Barcelona), hasta obtener un total de 6 estándares (0,1 pg; 1 pg; 10 pg; 100 pg; 1000 pg; 10000 pg/100µL). Se prepararon seis tubos con 10µL de cada uno de los estándares.

Posteriormente, se evaporó el etanol en un evaporador y el extracto se disolvió en 500µL de conjugado. Cuando se tapizó la placa con las muestras, se añadieron 50µL de cada estándar con conjugado y 50µL de buffer EIA (Fosfato de sodio dihidrógeno monohidratado (0.01M), fosfato di-sodio hidrógeno anhidro (0.01M), cloruro de sodio (0.9M), BSA 1%, Thimerosal 1%; pH: 7,0) en los pocillos apropiados de la placa.

5.5. Reacción de competición

Este paso solo se da en la técnica EIA de competición. En esta fase tiene lugar la reacción entre la hormona libre (muestra estándar o muestra problema) y la hormona conjugada con peroxidasa. Para ello se realizó una dilución de conjugado en solución buffer EIA. Una vez obtenida la dilución de conjugado, se añadieron 250µL de la misma en 50µL de las muestras problema. Por otro lado, a las muestras de sueros extraídas previamente, se les añadió 150µL de conjugado. Con esta mezcla de muestra (extraída o no extraída) y conjugado, se tapizaron los pocillos de la placa añadiendo 60µL de la misma y 40µL de buffer EIA. Cada muestra se analizó por duplicado. Por último, se volvieron a tapar las placas y se dejaron incubar 2 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) y en agitación.

Para la cuantificación de las hormonas P5, DHEA y DHT con el Kit Demeditec Diagnostuics se utilizaron microplacas cuyos pocillos estaban recubiertos con un anticuerpo anti P5, anti-DHEA y anti-DHT. Una cantidad desconocida de DHEA presente en la muestra compitió con un conjugado de P5, DHEA y DHT-peroxidasa por unirse al anticuerpo recubierto. Después de la incubación, se lavó el conjugado no unido. La cantidad de conjugado de peroxidasa unida es inversamente proporcional a la concentración de DHEA en la muestra.

5.6. Tapizado de placas para el EIA de amplificación

El tapizado se realiza de la misma manera que se explicó en el 5.3. Una vez lavada la placa, se dispensaron 50µL de estándares de cada hormona y 50µL de buffer EIA, además de 60µL de muestra y 40µL de buffer EIA en los pocillos correspondientes por duplicado. A continuación, se cubrió la placa y se dejó incubando en agitación a 4°C

durante toda la noche. Al día siguiente, sin lavar la placa, se añadieron 50µL de la dilución de conjugado correspondiente en todos los pocillos de la placa. Se taparon las placas y se dejaron incubando 2 horas a temperatura ambiente y agitación.

5.7. Adición del sustrato y del cromógeno

En primer lugar, se lavaron las placas; de esta forma, se tiene en la placa sólo la cantidad de hormona que se haya unido al anticuerpo.

Como sustrato se utilizó peróxido de hidrógeno que va diluido en un tampón sustrato que lleva el cromógeno timidilbencidina (Enhanced K Blue, Neogen, USA). Se añadieron 100µL del mismo en todos los pocillos.

Posteriormente, se selló y se incubó a temperatura ambiente el tiempo necesario según la hormona (Tabla 7). Transcurrido este tiempo, se frenó la reacción enzimática añadiendo 100µL de una solución de ácido sulfúrico al 10% en todos los pocillos de la placa.

5.8. Lectura de las placas.

Se basa en cuantificar la densidad óptica del color desarrollado en cada pocillo cuya intensidad es inversamente proporcional a la concentración de la hormona en la muestra. Para ello se utilizó un lector automático EIA (Microplate Reader A4, Eurogenetics, Bélgica) con filtros de 450 y 600 nm, y de lectura bicromática, lo cual elimina el color producido por una posible reacción inespecífica de fondo.

5.9. Procesado de los resultados

Los resultados se evaluaron mediante un software diseñado por el Departamento de Informática de la Universidad de California (Davis, EEUU) que traza las curvas patrón enfrentando en el eje de abscisas las concentraciones estándar de las hormonas y en el eje

de ordenadas el porcentaje de unión de las muestras con el anticuerpo. Una vez calculadas las curvas patrón, el programa calcula las concentraciones hormonales de las muestras tomando como referencia estas curvas. Para expresar las concentraciones en unidades correctas se introdujo un factor de corrección. En el caso de los medios de cultivo y sueros las concentraciones se expresaron en ng/ml, excepto las concentraciones de E2 en suero que se expresaron en pg/ml. Sin embargo, en el caso de los homogeneizados tumorales, las concentraciones se expresaron en ng/g.

6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el apoyo del Centro de Cálculo de la Universidad Complutense de Madrid, mediante el empleo de los programas estadísticos SAS 9.4 (Statistical Analysis Systems, SAS/STAT, Inst. Inc, Cary NC, EEUU) y Sigma Plot (Systat software Inc, Chicago, IL, EEUU). Se analizaron variables estadísticas sobre:

- Líneas celulares IPC-366 y SUM149.
- Respuestas a los tratamientos *in vivo* e *in vitro*.
- Parámetros de crecimiento tumoral y % metástasis.
- Concentraciones de P4, P5, T, DHT, A4, SO4E1, DHEA y E2 en macerados, sueros y medios de cultivo.
- Parámetros de la técnica de EIA de amplificación: precisión, sensibilidad, coeficientes de variación y paralelismo.

En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de todas las variables numéricas incluyendo los valores de media, desviación estándar y error estándar. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnoff para evaluar la distribución de los datos obtenidos de los tratamientos *in vitro* e *in vivo*. Dado que los datos no seguían una normalidad, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los datos y la prueba de

Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar las medias. Para comparar los resultados de los tratamientos *in vitro* e *in vivo* entre IPC-366 y SUM-149, se usó un test no paramétrico de Wilcoxon de suma de rangos con el programa SAS 9.4. Los datos se mostraron como medias $\pm$ error estándar y en las comparaciones estadísticas, los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

En el caso de la viabilidad celular medida por el análisis de MTS, los test estadísticos utilizados fueron los mismos. En las pruebas de tumorigenicidad o crecimiento de las células en ratones SCID, se realizó el test de Suma de Rangos de Wilcoxon para comparar las dos líneas celulares (IPC-366 y SUM149) en cada grupo de tratamiento. Para las comparaciones entre grupos en cada línea, se utilizó el test de Kruskal-Wallis seguido de un test de comparaciones múltiples para ver las comparaciones por pares, en el caso de que el contraste general fuera significativo. Para las comparaciones entre las semanas en cada línea celular y grupo se realizó el test de Rangos Signados de Wilcoxon con la corrección de Bonferroni.

Los resultados de niveles hormonales en sueros y macerados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre las medias de los grupos se analizaron mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA), seguido de las pruebas de comparaciones múltiples post hoc.

Para la estadística de los parámetros de validación de la técnica EIA de amplificación se utilizó el análisis ANCOVA. Para la comparación las concentraciones hormonales y las líneas celulares se utilizó un análisis de regresión lineal. En todos los análisis estadísticos el nivel de confianza fue del 95% y se consideraron diferencias estadísticamente significativas para los valores $p < 0,05$. Los resultados han sido expresados como media $\pm$ error estándar.

VI. RESULTADOS

1. Tratamiento con Flutamida.

1.1.Tratamiento *in vitro*

1.1.1. Contaje y viabilidad celular

La adición de Flutamida a los medios de cultivo de IPC-366 y SUM 149 produjo una reducción significativa ($p<0,05$) y dosis-dependiente en ambas líneas celulares durante el tiempo de seguimiento (3 días) (Figura 26. A-B).

En consonancia con lo anterior, la viabilidad de ambas líneas celulares tratadas con Flutamida también se redujo de forma tiempo y dosis-dependiente pero sin observarse diferencias estadísticamente significativas (Figura 27).

Esta reducción de la viabilidad y densidad celular, unido a un cambio de morfología pudo visualizarse por microscopía invertida a 20X tanto en la línea IPC-366 (Figura 28) como en la línea SUM149 (Figura 29), respecto al grupo control según avanzó el experimento.

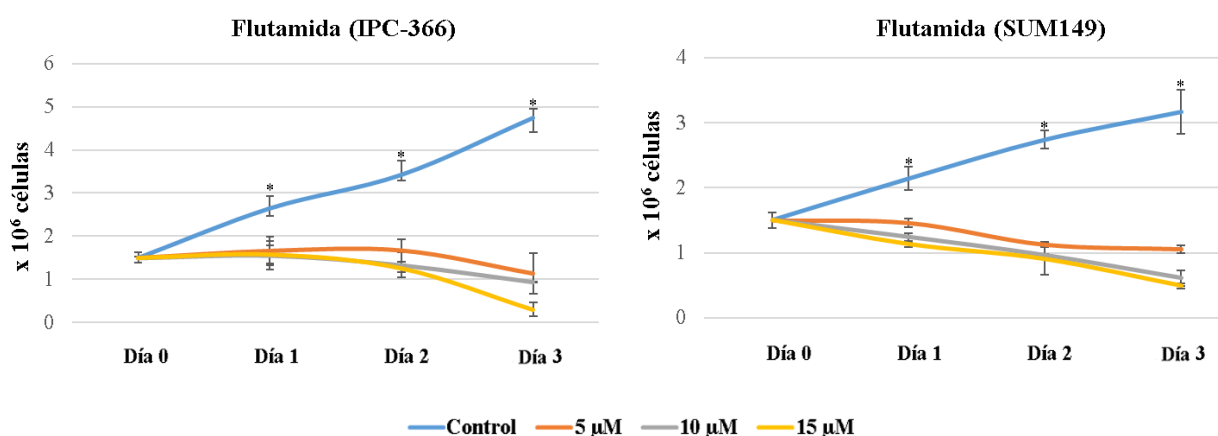


Figura 26. Proliferación celular de IPC-366 (A) y SUM 149 (B) tras la administración de Flutamida durante 3 días.

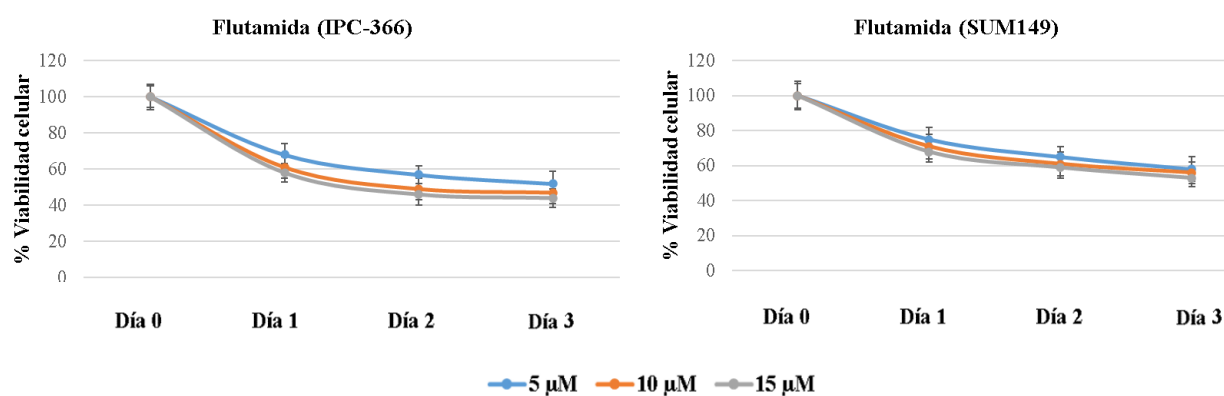


Figura 27. Viabilidad celular de IPC-366 (A) y SUM 149 (B) tras la administración de Flutamida durante 3 días.

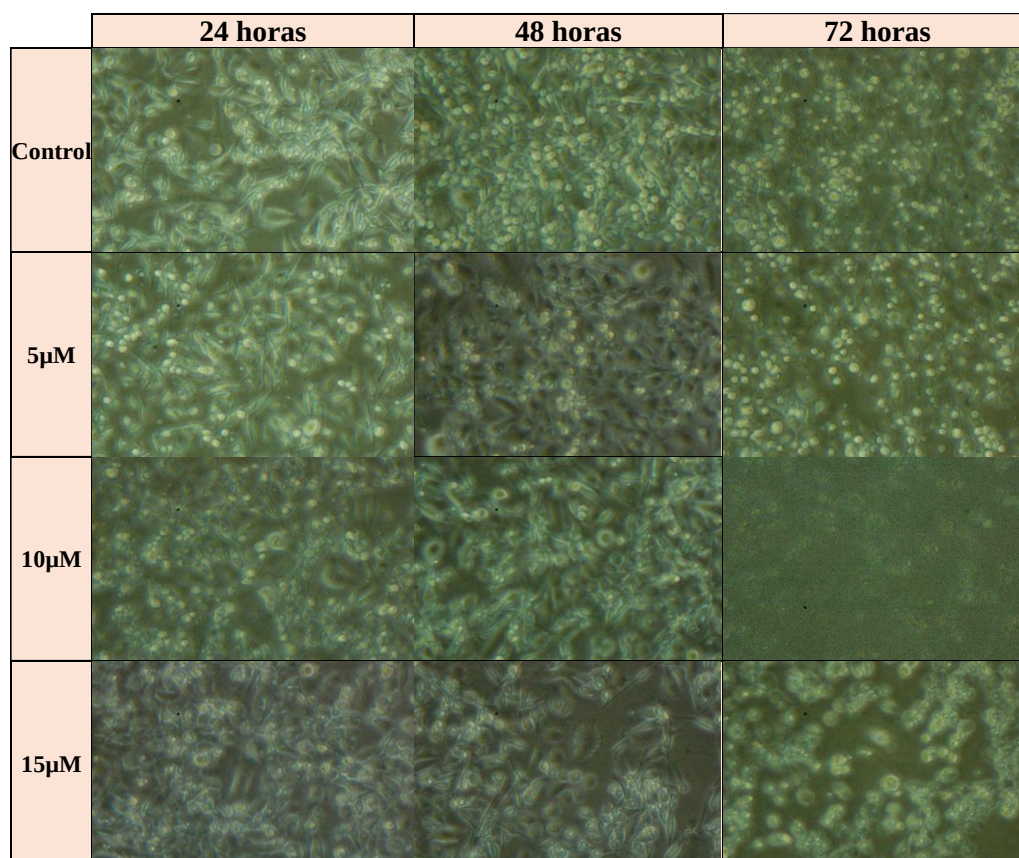


Figura 28. Fotografías a 20X por microscopía invertida de la línea IPC-366 durante el tratamiento con Flutamida a las 24, 48 y 72 horas.

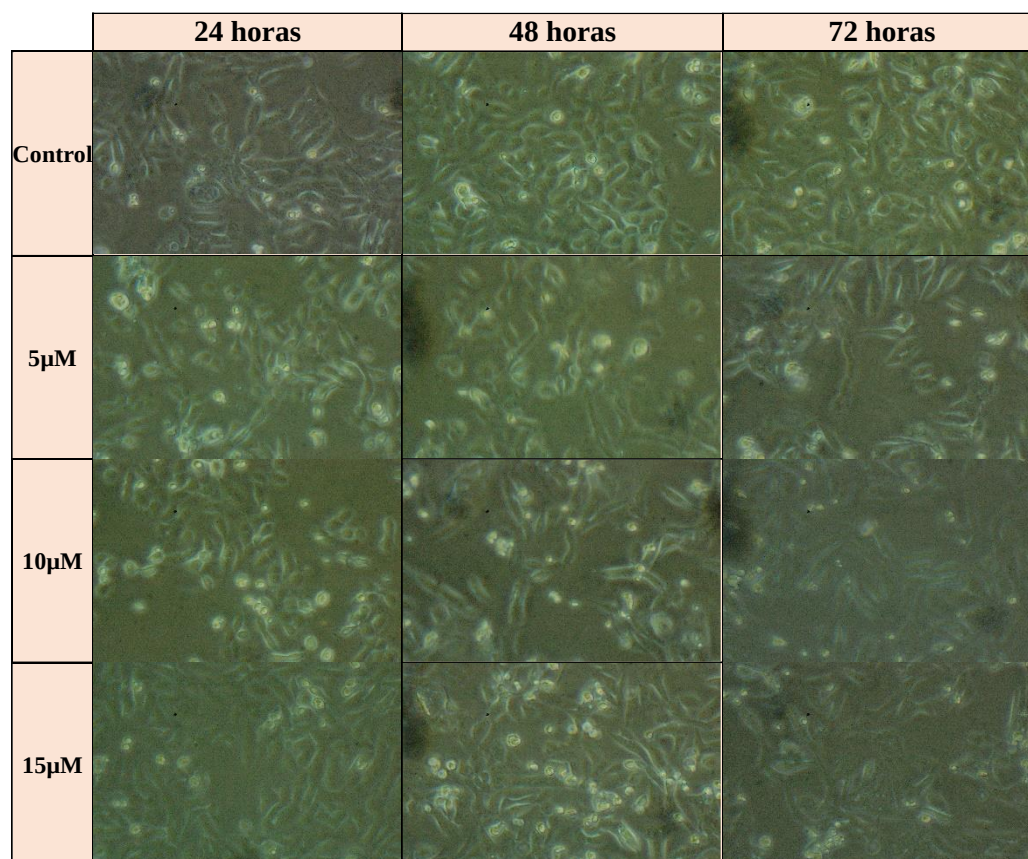


Figura 29. Fotografías a 20X por microscopía invertida de la línea SUM149 durante el tratamiento con Flutamida a las 24, 48 y 72 horas.

1.1.2. Resultados de hormonas en medio de cultivo

Se cuantificaron las concentraciones de hormonas esteroideas (P4, P5, SO4E1, E2, T, DHT, DHEA y A4) presentes en los medios de cultivo de IPC-366 y SUM 149 control y en los tratados con Flutamida.

En los grupos control de ambas líneas celulares, las concentraciones de P4, SO4E1 y E2 (Figura 30. A, C, D: IPC-366 y Figura 31.A, C, D: SUM 149) incrementaron con el avance del experimento y el crecimiento celular de una forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$). En los grupos tratados de ambas líneas celulares, las concentraciones de P4 y SO4E1 fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) que las del grupo control y su incremento fue dosis-dependiente, siendo significativamente mayor en todos los grupos tratados de SUM 149. En cuanto a las concentraciones de E2, sus niveles decrecieron significativamente ($p < 0,05$) de una forma dosis-dependiente en todas las dosis del experimento.

En los grupos control de ambas líneas, los niveles de P5 (Figura 30.B: IPC-366 y Figura 31.B: SUM 149) fueron similares durante todo el experimento. En los grupos tratados con Flutamida, en ambas líneas celulares se cuantificaron niveles de P5 significativamente mayores ($p < 0,05$), observándose una tendencia dosis-dependiente en los mismos. Respecto a las concentraciones de T, DHT, DHEA y A4 (Figura 30.E-H: IPC-366 y Figura 31.E-H: SUM 149) en los grupos control, se mantuvieron estables a lo largo del experimento en el caso de T, DHT y A4 y aumentaron significativamente ($p < 0,05$) en el caso de DHEA. En los grupos tratados, las concentraciones de T, DHT y A4 aumentaron de una forma significativa ($p < 0,05$) y dosis-dependiente en todas las dosis. Por el contrario, las concentraciones de DHEA en los grupos tratados de ambas líneas celulares decrecieron de una forma significativa ($p < 0,05$) y dosis-dependiente para todas las dosis.

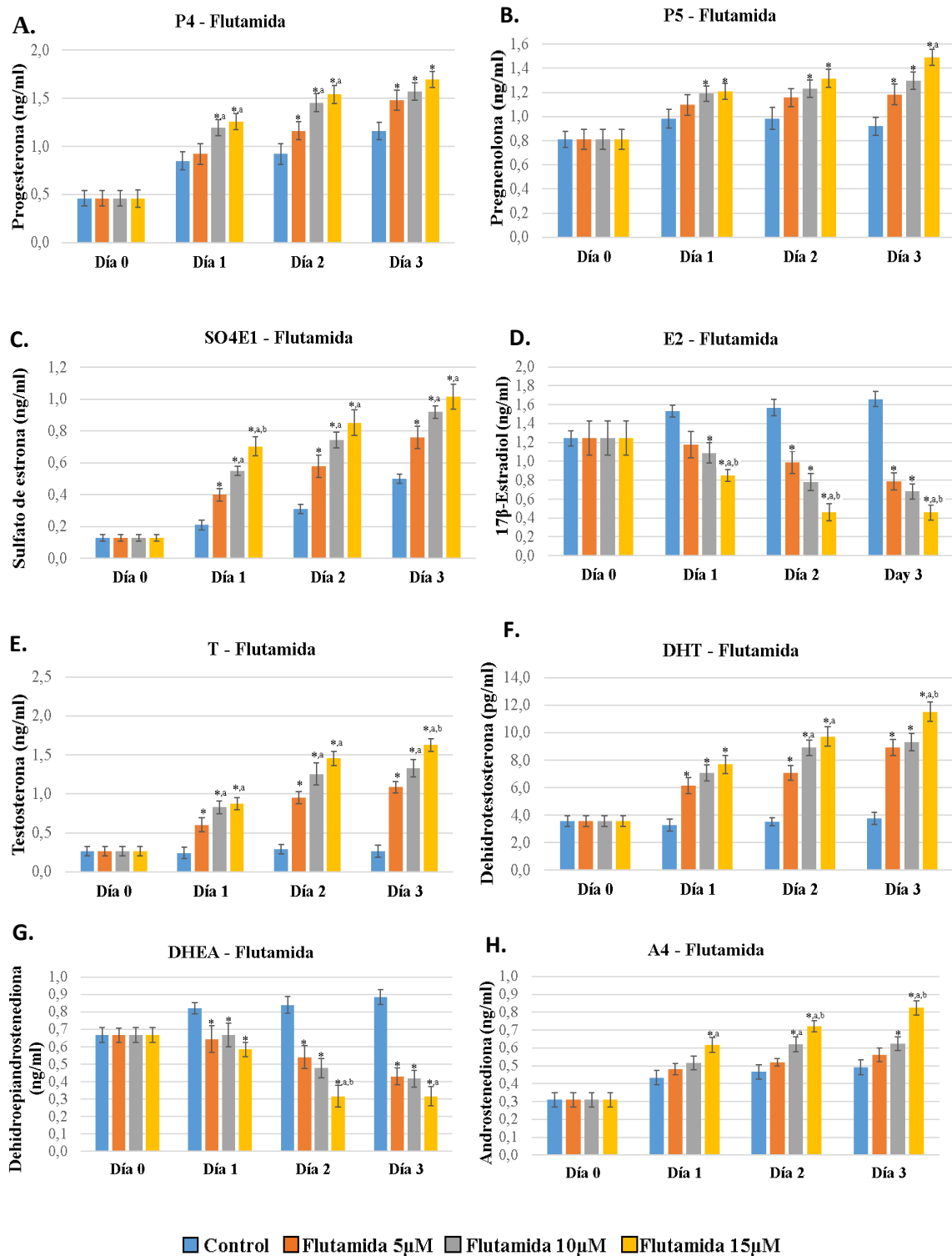


Figura 30. Concentraciones de P4(A), P5(B), SO4E1(C), E2(D), T(E), DHT(F), DHEA(G) y A4(H) en medio de cultivo de IPC-366 durante el tratamiento de 3 días. Resultados de la cuantificación durante 3 días consecutivos de los niveles de P4(A), P5(B), SO4E1(C), E2(D), T(E), DHT(F), DHEA(G) y A4(H) en la línea IPC-366 tras la administración de Flutamida.

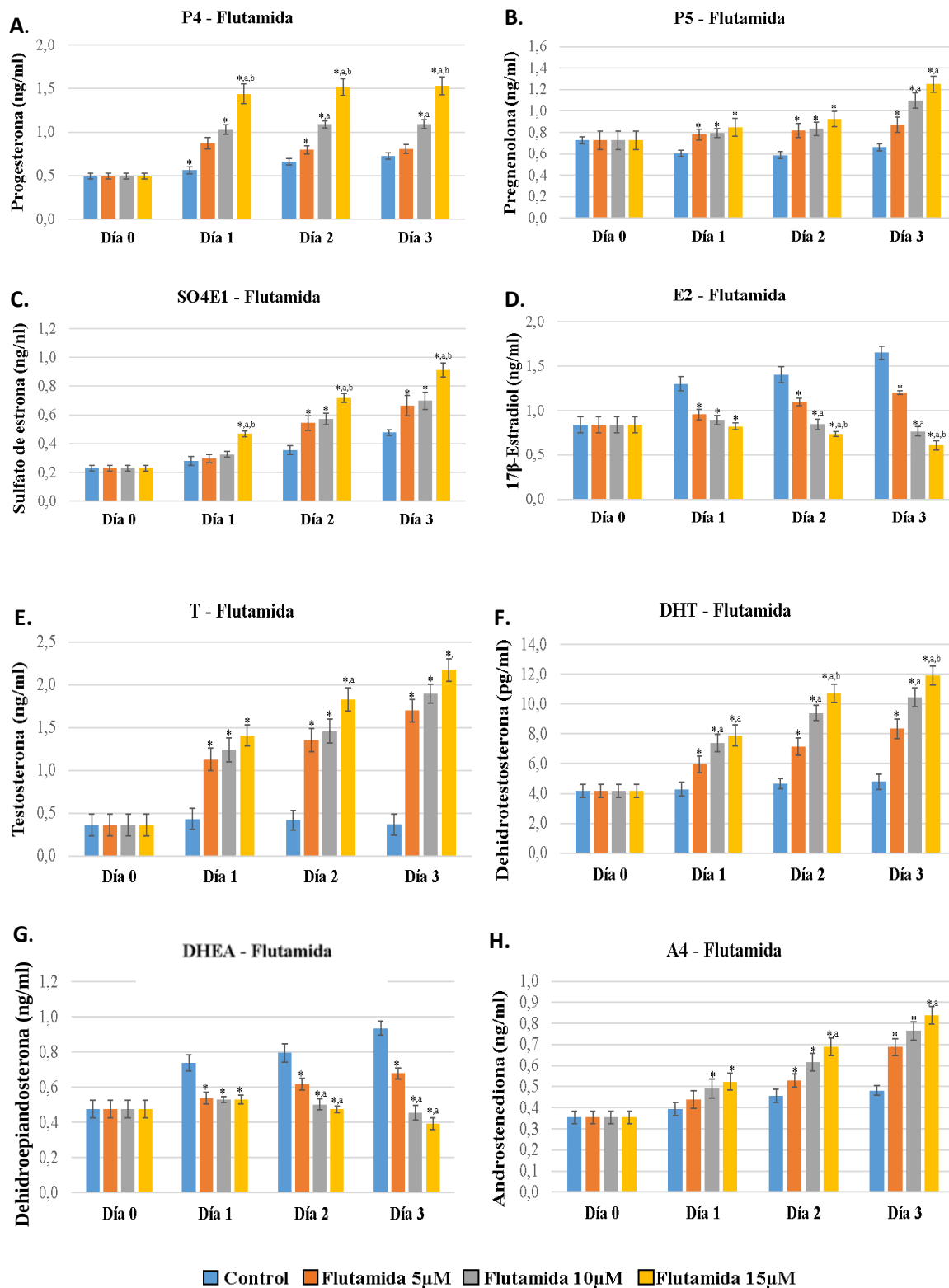


Figura 31. Concentraciones de P4(A), P5(B), SO4E1(C), E2(D), T(E), DHT(F), DHEA(G) y A4(H) en medio de cultivo de SUM149 durante el tratamiento de 3 días. Resultados de la cuantificación durante 3 días consecutivos de los niveles de P4(A), P5(B), SO4E1(C), E2(D), T(E), DHT(F), DHEA(G) y A4(H) en la línea SUM 149 tras la administración de Flutamida.

1.2. Tratamiento *in vivo*

1.2.1. Hormonas en suero y homogeneizados tumorales

La cuantificación de las hormonas esteroideas (P4, P5, SO4E1, E2, T, DHT, DHEA y A4) presentes en el suero de las ratonas xenotrasplantadas y en el homogeneizado de los tumores generados con la línea IPC-366 (Tabla 8.A) y con la línea SUM 149 (Tabla 8.B), reveló que ambas líneas siguen, en su mayoría, la misma tendencia. Los niveles de hormonas esteroideas en el homogeneizado del tumor de los grupos control y grupos tratados fueron dosis dependiente y significativamente ($p < 0,05$) más altos que en las muestras de suero analizadas, excepto en el caso de la DHEA, que fueron significativamente menores ($p < 0,05$) en ambas líneas celulares. Las concentraciones séricas de P4, DHEA y DHT en los animales tratados fueron mayores que en los animales control, pero no así en los homogeneizados, cuya concentración decreció en todas las dosis, siendo la diferencia significativa ($p < 0,05$) en las dosis más altas. En el caso de P5, SO4E1 y A4, la concentración sérica de hormonas esteroideas en los animales tratados de ambos grupos se redujo, siendo significativa con la dosis de 15mg/Kg para todos los tratamientos y con la dosis de 10mg/Kg solo en el caso de SO4E1 y A4 en las muestras séricas. En los homogeneizados del tumor, la concentración hormonal fue mayor en los animales tratados que en los controles, siendo esta diferencia significativa en las dosis de 10mg/Kg y 15mg/Kg para P5, SO4E1 y A4 y en la dosis de 5mg/Kg para ambas líneas en el caso de SO4E1. Estas tendencias difieren de las observadas en E2, ya que tanto en el suero como en los homogeneizados de ambas líneas celulares, los niveles de E2 fueron significativamente menores ($p < 0,05$) en los animales tratados que en los de los grupos control. Todo lo contrario ocurrió para la T, observándose que para ambas líneas celulares tanto en sueros como en los homogeneizados de los tumores, los niveles de esta hormona aumentaron, siendo esta diferencia significativa en las dosis de 10 y 15mg/Kg.

A.

IPC-366		Control	Flutamida 5mg	Flutamida 10mg	Flutamida 15mg
Pregnenolona	Suero	0,82 ± 0,11	0,79 ± 0,13	0,70 ± 0,12	0,64 ± 0,08*
	Macerado	7,24 ± 1,07	7,40 ± 1,49	8,60 ± 1,24*	9,44 ± 1,04*
Progesterona	Suero	0,64 ± 0,10	0,65 ± 0,10	0,78 ± 0,10	0,83 ± 0,07*
	Macerado	8,57 ± 1,05	5,21 ± 1,40*	5,38 ± 1,53*	5,04 ± 1,42*
Dihidro-epiandrosterona	Suero	1,64 ± 0,21	1,82 ± 0,30	1,96 ± 0,18*	2,10 ± 0,25*
	Macerado	1,26 ± 0,17	0,88 ± 0,15*	0,76 ± 0,11*	0,51 ± 0,16*,a
Androstenediona	Suero	1,38 ± 0,25	1,23 ± 0,20	1,03 ± 0,15*,a	0,80 ± 0,16*,a
	Macerado	2,91 ± 1,07	3,47 ± 0,67	4,24 ± 0,82*	4,69 ± 0,67*
Testosterona	Suero	0,41 ± 0,06	0,49 ± 0,10	0,63 ± 0,08*,a	0,76 ± 0,09*
	Macerado	7,07 ± 1,39	8,97 ± 1,82	12,46 ± 2,35*,a	14,03 ± 2,42*,a
Dihidro-testosterona	Suero	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,01*,a	0,18 ± 0,01*,a
	Macerado	0,22 ± 0,02	0,19 ± 0,03	0,14 ± 0,02*	0,10 ± 0,04*
Sulfato de Estrona	Suero	0,35 ± 0,08	0,31 ± 0,05	0,26 ± 0,05*,a	0,22 ± 0,05*
	Macerado	10,34 ± 1,81	14,80 ± 2,03*	21,71 ± 6,19*	24,74 ± 6,32*
17β-estradiol	Suero	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01*	0,04 ± 0,01*
	Macerado	0,97 ± 0,08	0,89 ± 0,17	0,76 ± 0,25*,a	0,68 ± 0,20*

B.

SUM 149		Control	Flutamida 5mg	Flutamida 10mg	Flutamida 15mg
Pregnenolona	Suero	0,84 ± 0,10	0,83 ± 0,08	0,75 ± 0,08	0,66 ± 0,10*
	Macerado	7,38 ± 1,24	8,32 ± 1,48	9,77 ± 1,82*	10,83 ± 0,78*
Progesterona	Suero	0,70 ± 0,13	0,82 ± 0,07	0,88 ± 0,08*	0,94 ± 0,08*
	Macerado	9,39 ± 2,68	5,67 ± 1,45*	5,34 ± 1,19*	5,28 ± 1,52*
Dihidro-epiandrosterona	Suero	1,67 ± 0,23	1,85 ± 0,37	2,15 ± 0,28*	2,28 ± 0,26*
	Macerado	1,34 ± 0,09	0,95 ± 0,08*	0,73 ± 0,07*,a	0,55 ± 0,12*,a
Androstenediona	Suero	1,49 ± 0,14	1,25 ± 0,21	1,05 ± 0,14*	0,93 ± 0,20*
	Macerado	3,47 ± 0,71	4,07 ± 0,84	5,21 ± 0,72*,a	6,12 ± 0,80*
Testosterona	Suero	0,44 ± 0,03	0,59 ± 0,03	0,72 ± 0,11*,a	0,81 ± 0,06*,a
	Macerado	8,33 ± 1,68	11,31 ± 1,72	13,04 ± 1,56*	15,82 ± 3,02*
Dihidro-testosterona	Suero	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,17 ± 0,01*,a	0,20 ± 0,01*,a
	Macerado	0,23 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,14 ± 0,03*,a	0,09 ± 0,01*,a
Sulfato de Estrona	Suero	0,37 ± 0,05	0,33 ± 0,05	0,28 ± 0,09*	0,22 ± 0,06*
	Macerado	14,23 ± 4,14	19,08 ± 5,87*	23,18 ± 5,08*	26,50 ± 3,70*
17β-estradiol	Suero	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01*,a	0,06 ± 0,01*,a
	Macerado	1,10 ± 0,21	0,97 ± 0,14	0,89 ± 0,21*,a	0,76 ± 0,18*

Tabla 8. Concentraciones de hormonas esteroideas (P5, P4, DHEA, A4, T, DHT, SO4E1 y E2) en suero sanguíneo y homogeneizado de tumores (expresadas en ng/mg) en ratonas control y xenotrasplantadas con IPC-366 **(A)** y SUM149 **(B)** tratados con Flutamida (expresados en ng/mL).

1.2.2. Crecimiento tumoral

La Figura 32 representa el efecto de la Flutamida en la progresión del tumor en ratonas xenotrasplantadas con IPC-366 (A) y SUM 149 (B). La Flutamida produjo una reducción significativa ($p < 0,05$) del 55-65% en los tumores IPC-366 y del 50-60% en los tumores SUM 149, sin observarse diferencias entre las dosis administradas.

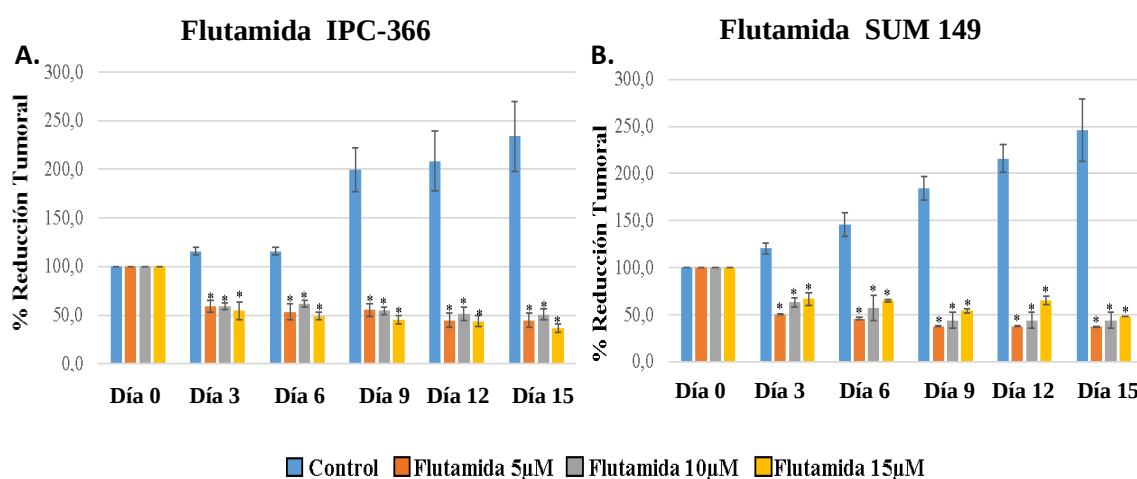


Figura 32. Tamaño del tumor expresado en % de reducción en ratonas con tumores generados por xenotrasplante de IPC-366 (A) y SUM 149 (B) y tratadas con Flutamida cada 3 días.

1.2.3. Metástasis

La Flutamida limita el poder metastásico de IPC-366 y SUM 149, como se observa en la Tabla 9. Los animales del grupo control presentaron respectivamente 90% y 80% de metástasis, siendo las localizaciones principales el hígado y pulmones. En las ratonas con tumores IPC-366, hubo una reducción significativa de la aparición de metástasis con todas las dosis y, en el caso de SUM 149, la mayor reducción se observó en las dos dosis más altas, de 10 y 15 mg/Kg.

% Metástasis	IPC-366	SUM149
Control	90%	80%
Flutamida 5mg	40%*	50%
Flutamida 10mg	40%*	40%*
Flutamida 15mg	40%*	40%*

Tabla 9. Metástasis observadas en estudio post-mortem en las ratonas xenotrasplantadas con IPC366 o SUM 149 y tratadas con Flutamida.

2. Tratamiento con Letrozole

2.1.Tratamiento *in vitro*

2.1.1. Contaje y viabilidad celular

La adición de Letrozole al medio de cultivo de IPC-366 y SUM 149 produjo una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y dosis dependiente en ambas líneas celulares durante el tiempo de seguimiento (3 días) (Figura 33.A-B).

La viabilidad de ambas líneas celulares tratadas con Letrozole también se redujo, siendo esta reducción estable a partir del día 1 en caso de IPC-366 (Figura 34.A) y, mayor a más tiempo de seguimiento y mayor dosis administrada al medio de cultivo, en el caso de SUM 149 (Figura 34.B).

Esta reducción de la viabilidad y la densidad celular, unida a un cambio de morfología, pudo visualizarse por microscopía invertida a 20X tanto en la línea IPC-366 (Figura 35) como en la línea SUM149 (Figura 36) respecto al grupo control, según avanzó el experimento.

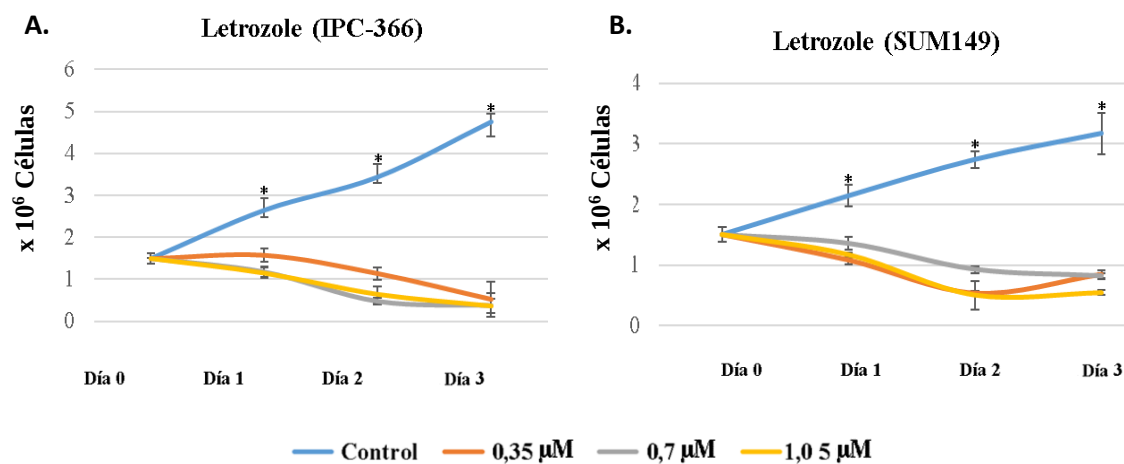


Figura 33. Proliferación celular de IPC-366 (A) y SUM 149 (B) tras la administración de Letrozole durante 3 días.

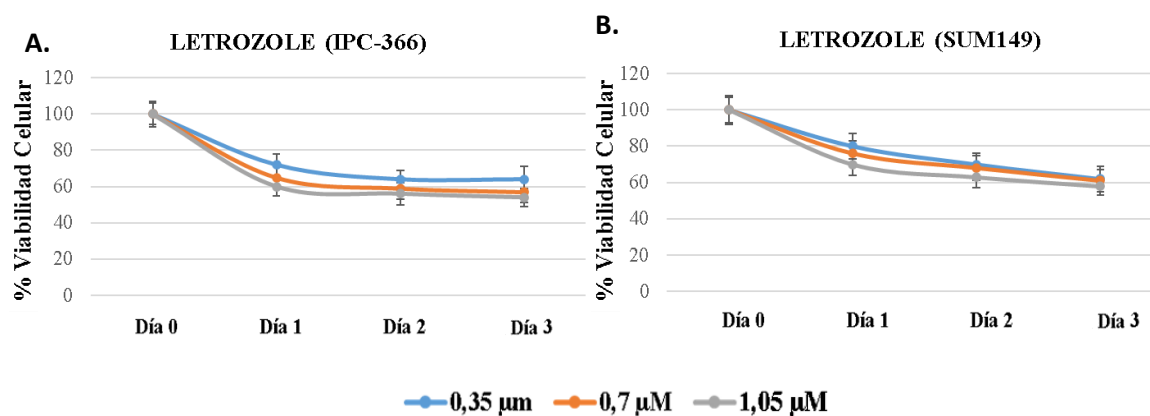


Figura 34. Viabilidad celular de IPC-366 (A) y SUM 149 (B) tras la administración de Letrozole durante 3 días.

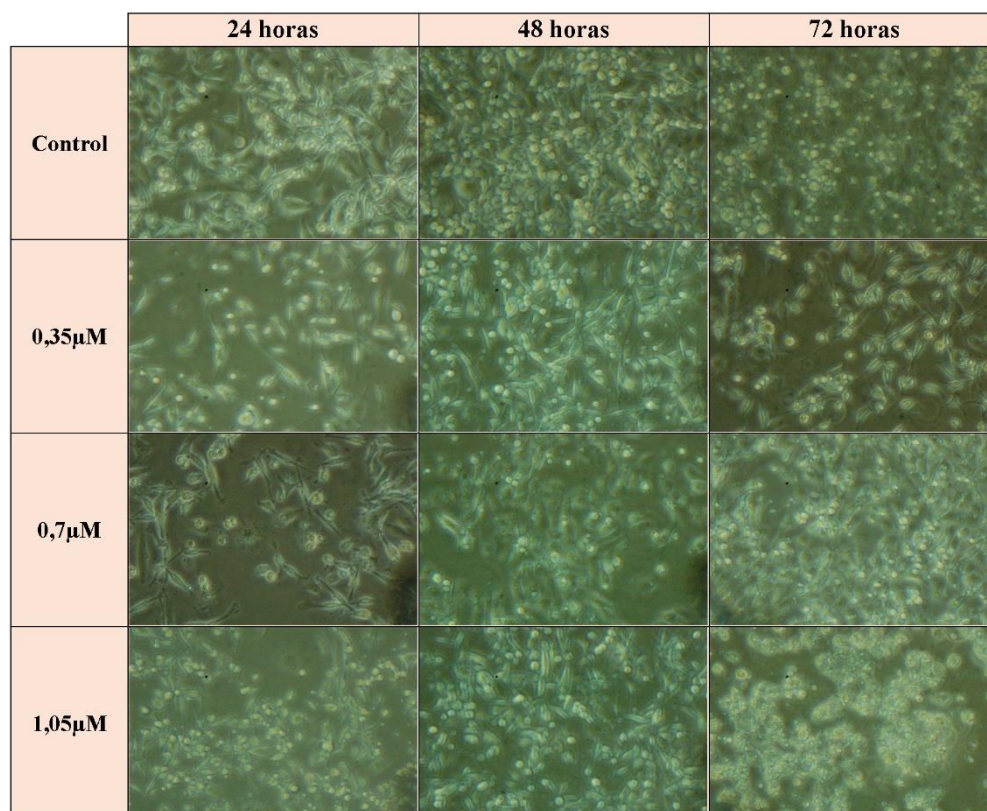


Figura 35. Fotografías a 20X por microscopía invertida de la línea IPC-366 durante el tratamiento con Letrozole a las 24, 48 y 72 horas.

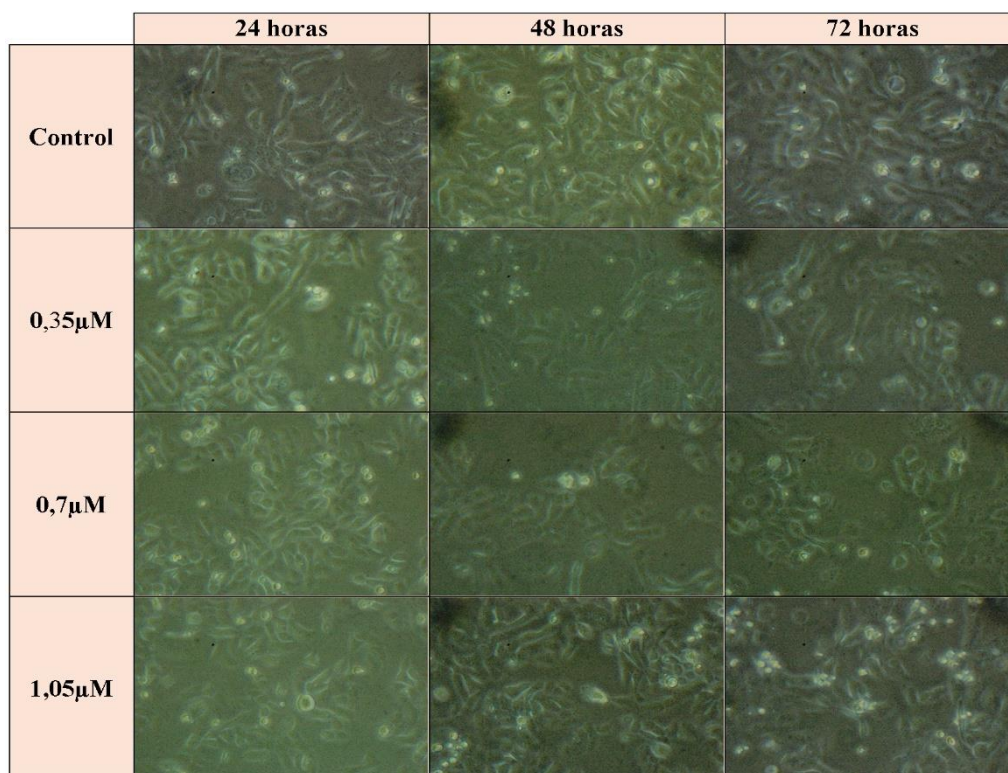


Figura 36. Fotografías a 20X por microscopía invertida de la línea SUM149 durante el tratamiento con Letrozole a las 24, 48 y 72 horas.

2.1.2. Hormonas en medio de cultivo

Se cuantificaron las concentraciones de hormonas esteroideas (P4, P5, SO4E1, E2, T, DHT, DHEA y A4) presentes en los medios de cultivo de IPC-366 (Figura 37) y SUM 149 (Figura 38) tanto control como los tratados con Letrozole.

En los grupos control de ambas líneas celulares, las concentraciones de P4, SO4E1 y T (Figura 37.A, C, E para IPC-366 y Figura 38.A,C,E para SUM 149) crecieron paulatinamente según avanzó el experimento y aumentó el número de células en el cultivo. En el caso de DHEA y A4 (Figura 37.G, H para IPC-366 y Figura 38.G, H para SUM 149), este aumento solo sucedió el último día del estudio, en ambas líneas celulares, o no hubo aumento, como ocurrió en el caso de la P5 y DHT (Figura 37.B, F para IPC-366 y Figura 38.B, F para SUM 149), cuyas concentraciones se mantuvieron estables durante todo el estudio. La única hormona que mostró diferencias entre ambas líneas fue la E2 (Figura 37.D para IPC-366 y Figura 38.D para SUM 149) que varió, discretamente, sus concentraciones a lo largo del estudio en el caso de IPC-366 y, sin embargo, en SUM 149 sí que aumentó paulatinamente.

En los grupos tratados en ambas líneas celulares, la P4 (Figura 37.A para IPC-366 y Figura 38.A para SUM 149) aumentó de forma significativa ($p < 0,05$) pero sin ser dosis dependiente. Por su parte, la P5, DHT, DHEA y A4 (Figura 37.B, F-H para IPC-366 y Figura 38.B, F-H para SUM 149) aumentaron su concentración de forma significativa ($p < 0,05$) y dosis dependiente en ambas líneas celulares.

La SO4E1 (Figura 37.C para IPC-366 y Figura 38.C para SUM 149) aumentó su concentración en los cultivos IPC-366 a lo largo del experimento y disminuyó en el caso de SUM 149. En ambas líneas, las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) y dosis-dependientes.

En cuanto a la E2 (Figura 37.D para IPC-366 y Figura 38.D para SUM 149), su concentración disminuyó en los cultivos IPC-366 de forma significativa ($p<0,05$), obteniéndose valores comparables para las dosis de 0,7 y 1,04 μM . En SUM149, los valores de esta hormona se mantuvieron estables durante todo el experimento en las tres dosis, siendo la diferencia de concentración significativa ($p<0,05$) respecto al grupo control.

A diferencia de las anteriores, la T (Figura 37.E para IPC-366 y Figura 38.E para SUM 149) aumentó su concentración en ambas líneas con la dosis más baja de tratamiento pero siendo la diferencia significativa ($p<0,05$) respecto al control y produciéndose una reducción significativa ($p<0,05$) y dosis dependiente, con las dos dosis más altas.

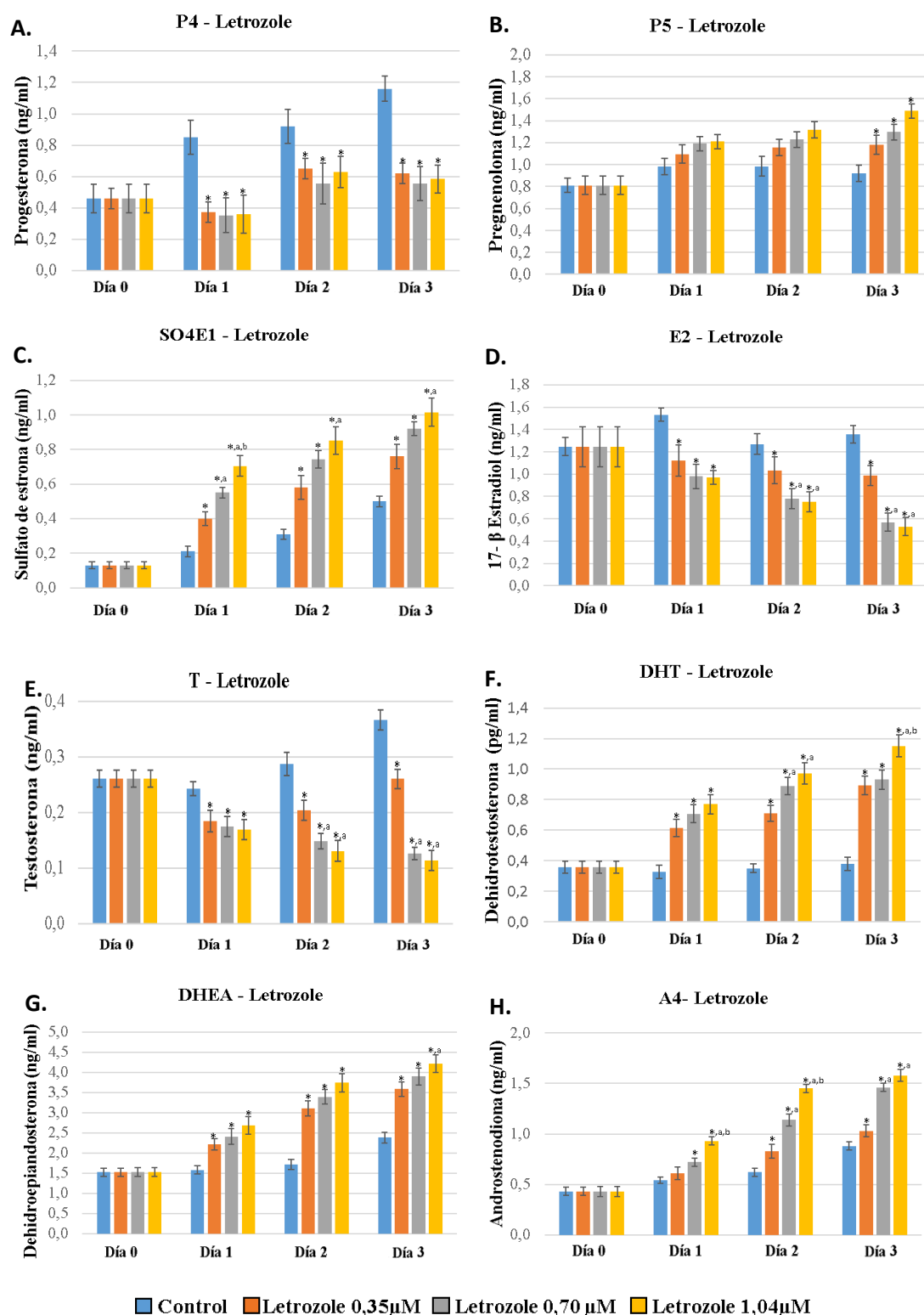


Figura 37.Concentraciones de P4(A), P5(B), SO4E1(C), E2(D), T(E), DHT(F), DHEA(G) y A4(H) en medio de cultivo de IPC-366 durante el tratamiento de 3 días. Resultados de la cuantificación durante 3 días consecutivos de los niveles de P4(A), P5(B), SO4E1(C), E2(D), T(E), DHT(F), DHEA(G) y A4(H) en la línea IPC-366 tras la administración de Letrozole.

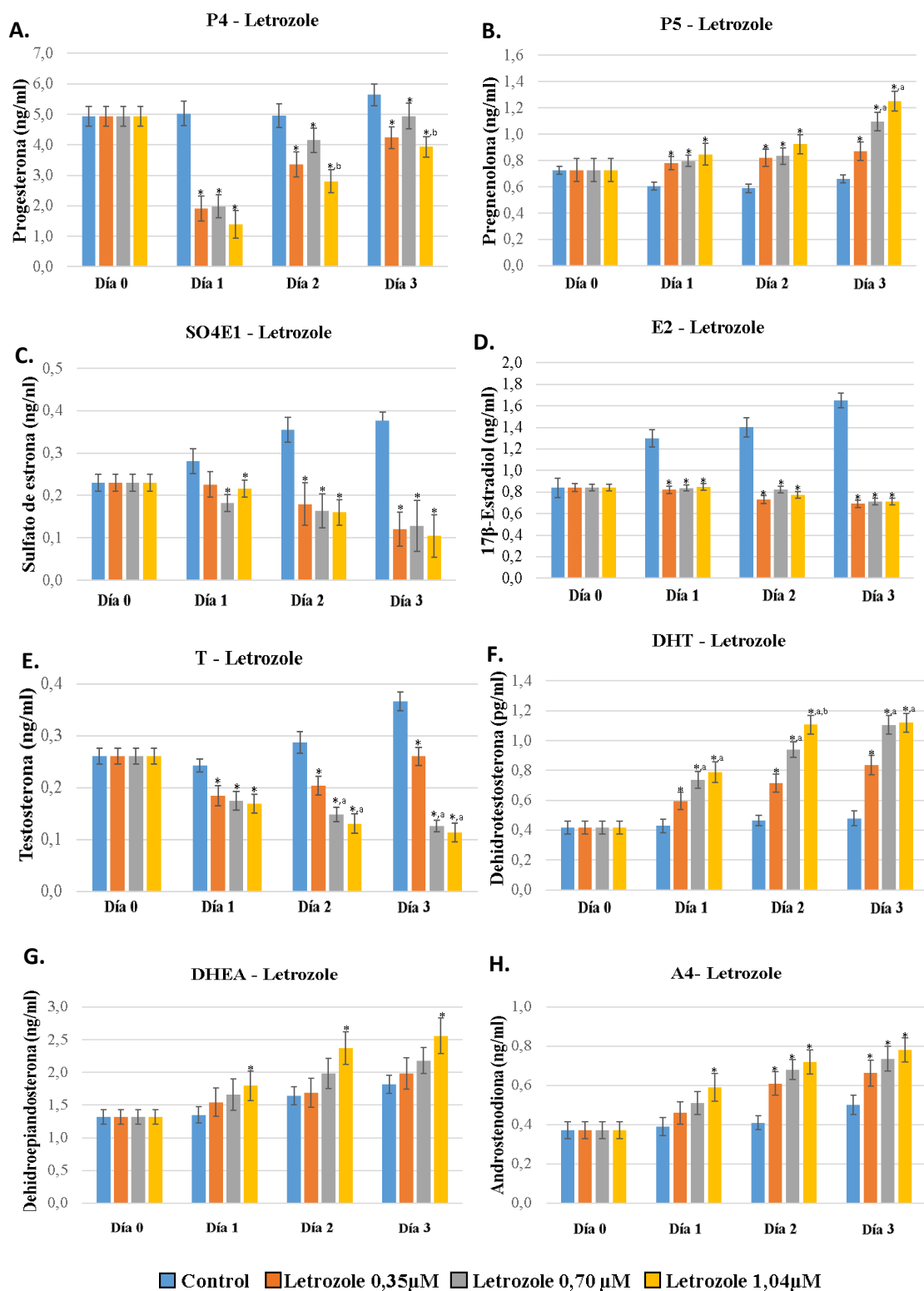


Figura 38. Concentraciones de P4(A), P5(B), SO4E1(C), E2(D) , T(E), DHT(F), DHEA(G) y A4(H) en medio de cultivo de SUM149 durante el tratamiento de 3 días. Resultados de la cuantificación durante 3 días consecutivos de los niveles P4 (A), P5(B), SO4E1(C), E2(D) , T(E), DHT(F), DHEA(G) y A4(H) en la línea SUM 149 tras la administración de Letrozole.

2.2.Tratamiento *in vivo*

2.2.1. Hormonas en suero y homogeneizado tumoral

La cuantificación de las hormonas esteroideas (P4, P5, SO4E1, E2, T, DHT, DHEA y A4) del suero sanguíneo de los ratones xenotrasplantados y del homogeneizado de los tumores generados con la línea IPC-366 (Tabla 10.A) y por la línea SUM 149 (Tabla 10.B) revelaron que ambas líneas siguen las mismas tendencias. Los niveles de hormonas esteroideas en el homogeneizado del tumor de los grupos control y los tratados fueron significativamente ($p<0,05$) más altos que en las muestras de suero analizadas de una forma dosis dependiente en todos los casos. Las concentraciones de P4, T, DHT y DHEA aumentaron de forma significativa ($p<0,05$) y dosis dependiente tanto en el suero como en el homogeneizado del tumor salvo en el caso de la T, ya que las diferencias para SUM 149 no fueron estadísticamente significativas. En el caso de la P5, los niveles séricos decrecieron de una forma dosis-dependiente , siendo la diferencia significativa sólo en la dosis más alta de Flutamida de la línea celular IPC 366. Por el contrario, sus niveles en los homogeneizados aumentaron también de una forma dosis-dependiente y los resultados obtenidos en la dosis más alta, de 10mg, fueron significativos para ambas líneas celulares.

En cuanto a los estrógenos, los resultados obtenidos tanto para SO4E1 como para E2 siguieron la tendencia opuesta a las hormonas previamente citadas. Sus niveles tanto en suero como en el homogeneizado decrecieron significativamente ($p<0,05$) y de forma dosis dependiente según avanzó el experimento. Respecto a A4, sus niveles séricos decrecieron de una forma dosis-dependiente sin llegar a ser estadísticamente significativas las diferencias. Por el contrario, sus niveles en los homogeneizados aumentaron también de una forma dosis-dependiente y los resultados obtenidos en las dosis más altas fueron estadísticamente significativos para ambas líneas celulares ($p<0,05$).

A.

IPC-366		Control	Letrozole 1 mg	Letrozole 5 mg	Letrozole 10 mg
Pregnenolona	Suero	1,00 ± 0,13	0,86 ± 0,11	0,76 ± 0,11	0,70 ± 0,10*
	Macerado	6,04 ± 1,25	7,61 ± 1,49	9,31 ± 1,95	10,62 ± 1,84*
Progesterona	Suero	0,35 ± 0,09	0,54 ± 0,11	1,03 ± 0,26 *, ^a	1,51 ± 0,29 *, ^a
	Macerado	10,35 ± 1,92	15,36 ± 2,65*	20,68 ± 3,53*	24,92 ± 5,27*
Dihidro- epiandrosterona	Suero	1,25 ± 0,11	1,56 ± 0,13*	1,74 ± 0,18*	1,82 ± 0,15*
	Macerado	1,81 ± 0,45	2,24 ± 0,36	3,01 ± 0,78	4,10 ± 1,28*, ^a
Androstenediona	Suero	1,47 ± 0,65	1,06 ± 0,31	0,93 ± 0,26	0,74 ± 0,11
	Macerado	3,29 ± 0,78	3,52 ± 0,97	5,74 ± 1,33*	7,63 ± 1,28*, ^a
Testosterona	Suero	0,52 ± 0,09	0,67 ± 0,10	0,77 ± 0,10*	1,05 ± 0,15*, ^a
	Macerado	8,28 ± 1,46	9,63 ± 1,21	10,30 ± 1,35	13,72 ± 1,27*
Dihidro- testosterona	Suero	0,14 ± 0,01	0,40 ± 0,02*	0,65 ± 0,09*, ^a	0,82 ± 0,10*, ^a
	Macerado	0,34 ± 0,05	0,47 ± 0,05	0,79 ± 0,09*, ^a	0,94 ± 0,09*, ^a
Sulfato de Estrona	Suero	0,42 ± 0,08	0,23 ± 0,06	0,15 ± 0,05*	0,07 ± 0,01*, ^a
	Macerado	9,87 ± 1,25	7,34 ± 1,83	4,98 ± 1,19*	2,45 ± 0,72*, ^a
17β-estradiol	Suero	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01*	0,02 ± 0,01*
	Macerado	1,30 ± 0,29	0,89 ± 0,17	0,69 ± 0,13*	0,48 ± 0,11*, ^a

B.

SUM 149		Control	Letrozole 1 mg	Letrozole 5 mg	Letrozole 10 mg
Pregnenolona	Suero	1.15 ± 0.34	0.93 ± 0.31	0.81 ± 0.25	0.73 ± 0.23
	Macerado	6.79 ± 1.14	7.43 ± 1.65	9.47 ± 2.15	11.32 ± 3.29*
Progesterona	Suero	0.48 ± 0.11	0.60 ± 0.15	0.72 ± 0.12	1.13 ± 0.35*
	Macerado	8.13 ± 1.25	13.22 ± 3.59	14.04 ± 3.95*	15.82 ± 4.82*
Dihidro- epiandrosterona	Suero	1.68 ± 0.44	1.87 ± 0.65*	2.15 ± 0.59	2.28 ± 0.87
	Macerado	1.93 ± 0.37	2.38 ± 0.41	3.21 ± 0.85	4.29 ± 0.98*, ^a
Androstenediona	Suero	1.17 ± 0.42	0.89 ± 0.24	0.73 ± 0.20	0.59 ± 0.15
	Macerado	2.89 ± 0.86	5.41 ± 1.73	6.91 ± 2.06*	8.95 ± 3.24*
Testosterona	Suero	0.65 ± 0.10	0.80 ± 0.14	0.93 ± 0.29	1.14 ± 0.34
	Macerado	9.45 ± 1.92	10.85 ± 1.23	11.47 ± 1.35	13.27 ± 1.45
Dihidro- testosterona	Suero	0.15 ± 0.02	0.43 ± 0.05*	0.62 ± 0.07*	0.89 ± 0.09*, ^a
	Macerado	0.25 ± 0.03	0.54 ± 0.06*	0.80 ± 0.07*, ^a	0.82 ± 0.06*, ^a
Sulfato de Estrona	Suero	0.33 ± 0.10	0.18 ± 0.08	0.13 ± 0.04*	0.07 ± 0.01*
	Macerado	13.29 ± 2.18	7.11 ± 1.95*	4.94 ± 1.54*	2.21 ± 0.89*, ^a
17β-estradiol	Suero	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01*	0.02 ± 0.01*
	Macerado	1.35 ± 0.24	0.87 ± 0.15	0.70 ± 0.09*	0.45 ± 0.13*, ^a

Tabla 10. Concentraciones de hormonas esteroideas (P5, P4, DHEA, A4, T, DHT, SO4E1 y E2) en suero sanguíneo y homogeneizado de tumores (expresadas en ng/mg) en ratones xenotrasplantados con IPC-366 **(A)** y SUM149 **(B)** tratados con Letrozole (expresados en ng/mL).

2.2.2. Crecimiento tumoral

La figura 39 representa el efecto de Letrozole en la progresión del tumor en ratones xenotrasplantados con IPC-366 (A) y SUM 149 (B). Letrozole produjo una reducción significativa ($p < 0,05$) del 53-76% en los tumores de la línea celular IPC-366 y del 61-70% en los tumores de la línea celular SUM 149, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre las dosis administradas

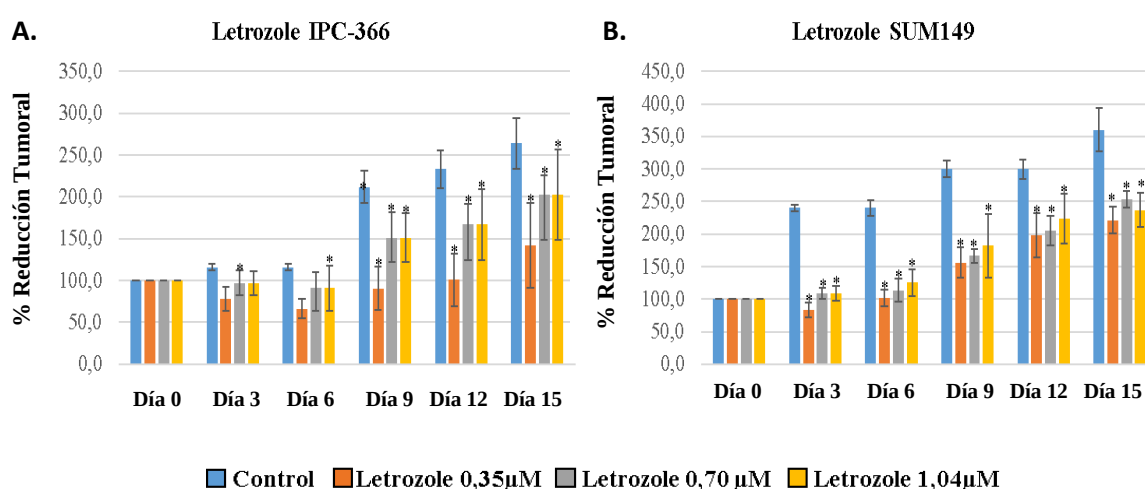


Figura 39. Tamaño del tumor expresados en % de reducción en ratones con tumores generados xenotrasplante de IPC-366 (A) y SUM 149 (B) y tratados con Letrozole cada 3 días.

2.2.3. Metástasis

Letrozole limita el poder metastásico de IPC-366 y SUM 149, como se observa en la Tabla 11. Los animales del grupo control presentaron respectivamente 100% y 80% de metástasis, siendo el hígado y pulmones los órganos más afectados.

En los ratones con tumores generados por la línea celular IPC-366, hubo una reducción significativa de la aparición de metástasis con todas las dosis y en el caso de SUM 149, la mayor reducción se observó en las dos dosis más altas, de 1 y 5 mg/Kg.

% Metástasis	IPC-366	SUM149
Control	100%	80%
Letrozole 1 mg	10%*	20%*
Letrozole 5 mg	10%*	20%*
Letrozole 10 mg	10%*	20%*

Tabla 11. Metástasis observadas en estudio post-mortem en los ratones xenotrasplantados con IPC366 o SUM 149 y tratados con Letrozole.

3. Tratamiento con STX-64

3.1.Tratamiento *in vitro*

3.1.1. Contaje y viabilidad celular

La adición de STX-64 al medio de cultivo de IPC-366 (Figura 40. A) y SUM 149 (Figura 40. B) produjo una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en ambas líneas, siendo dosis dependiente en el caso de IPC-366. La viabilidad de ambas líneas celulares tratadas con STX-64 también se redujo tanto en IPC-366 (Figura 41. A) como en SUM 149 (Figura 41.B), siendo esta reducción mayor a más tiempo de seguimiento y mayor dosis administrada al medio de cultivo.

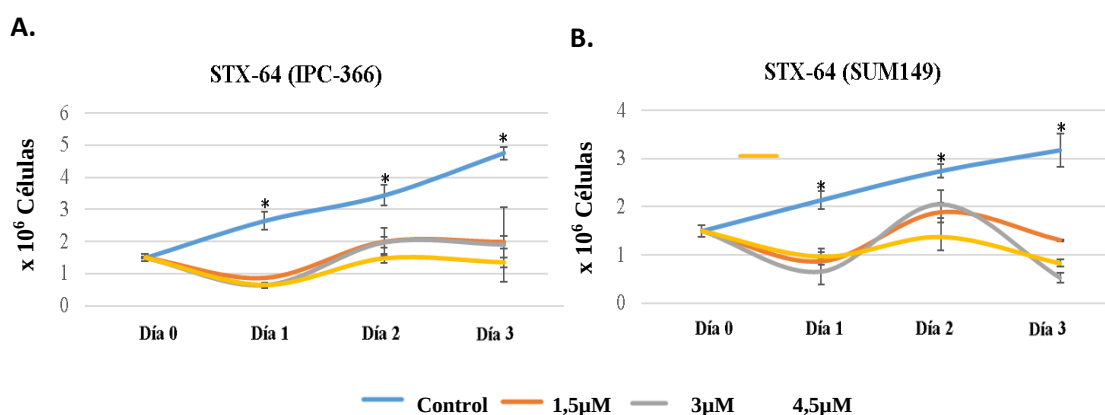


Figura 40 . Proliferación celular de IPC-366 (A) y SUM 149 (B) tras la administración de STX-64 durante 3 días.

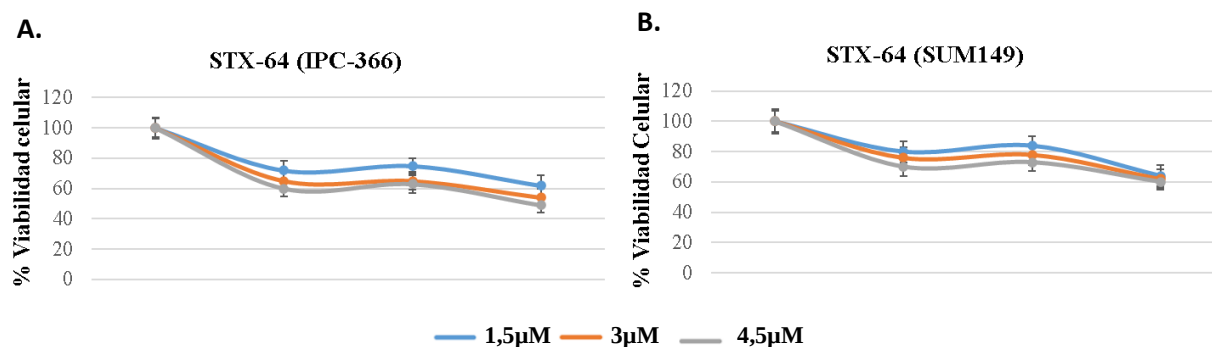


Figura 41 . Viabilidad celular de IPC-366 (A) y SUM 149 (B) tras la administración de SXT-64 durante 3 días.

Esta reducción de la viabilidad y densidad celular unida a un cambio de morfología pudo visualizarse por microscopía invertida a 20X tanto en la línea IPC-366 (Figura 42) como en la línea SUM149 (Figura 43) respecto al grupo control según avanzó el experimento.

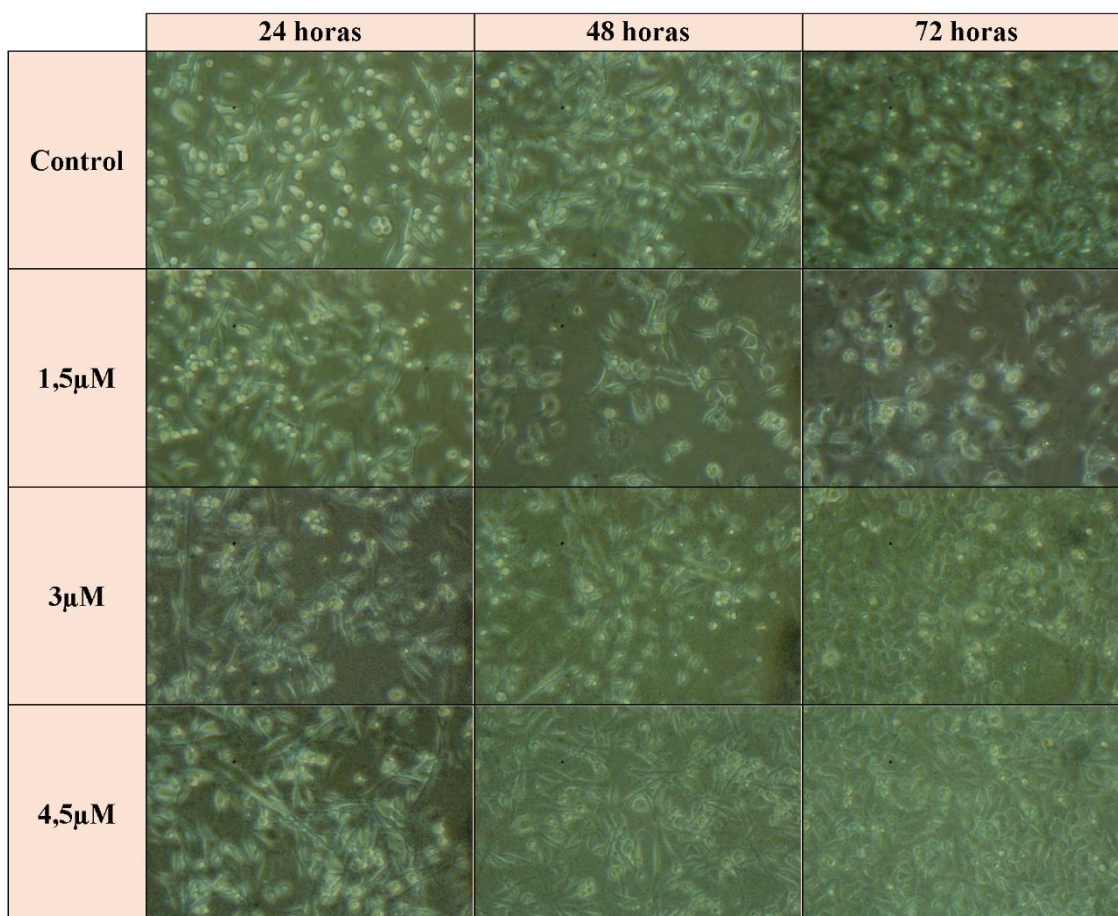


Imagen 42. Fotografías a 20X por microscopía invertida de la línea IPC-366 durante el tratamiento con STX-64 a las 24, 48 y 72 horas.

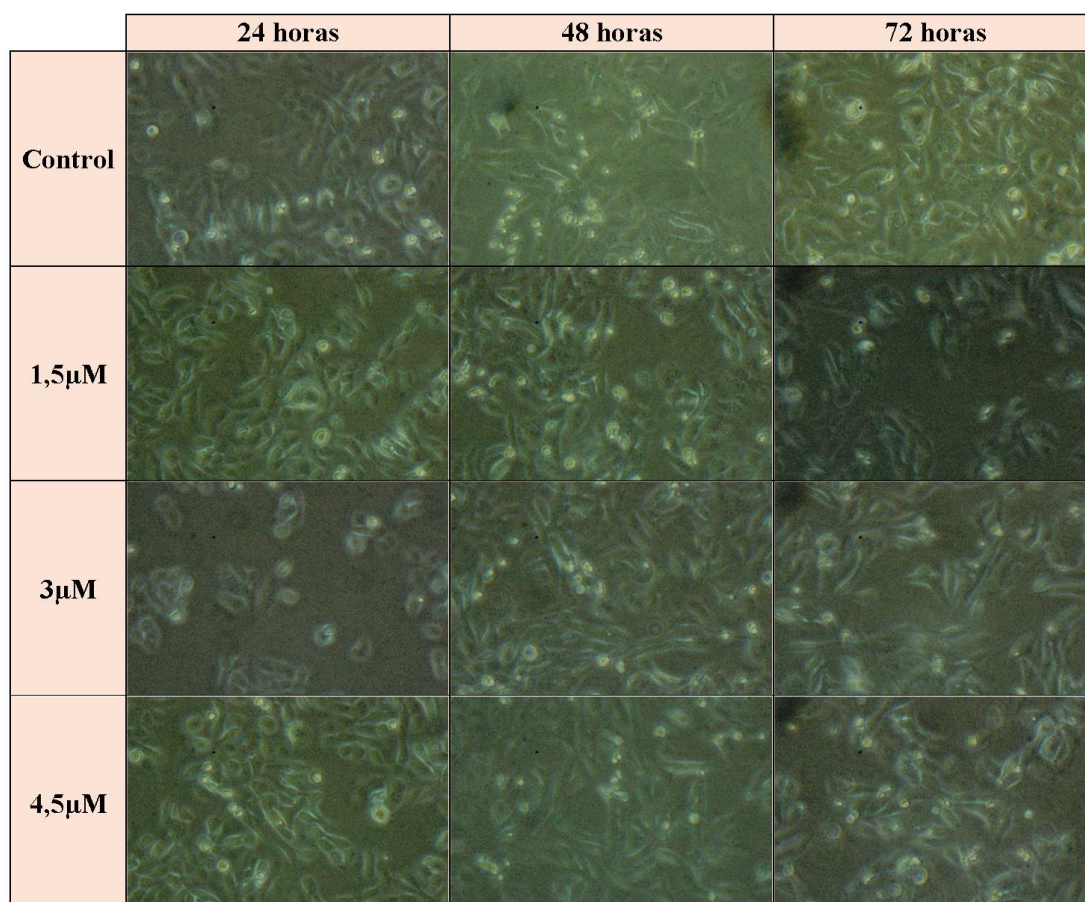


Figura 43. Fotografías a 20X por microscopía invertida de la línea SUM149 durante el tratamiento con STX-64 a las 24, 48 y 72 horas.

3.1.2. Hormonas en medio de cultivo

Se cuantificaron las concentraciones de hormonas esteroideas (P4, P5, SO4E1, E2, T, DHT, DHEA y A4) presentes en los medios de cultivo de las líneas celulares: IPC-366 (Figura 44) y SUM 149 (Figura 45), tanto en el grupo control como en los tratados con STX-64.

En los grupos control de ambas líneas celulares, las concentraciones de P4, SO4E1 y DHEA (Figura 44.A, C y G para IPC-366 y Figura 45.A, C y G para SUM 149) fueron incrementándose paulatinamente según avanzó el experimento y aumentó también el número de células en el cultivo. A diferencia de los resultados anteriores, la A4 (Figura 44 H para IPC-366 y Figura 45 H para SUM 149) disminuyó su concentración a lo largo

del estudio, y otras hormonas como la P5, E2, T y DHT (Figura 44.B, D, E, F para IPC-366 y Figura 45.B, D, E, F para SUM 149) se mantuvieron constantes a lo largo del estudio en ambas líneas celulares.

En los cultivos tratados con STX-64, se observó que la P4 era significativamente menor que en el grupo control, y mientras que en SUM149 los valores no variaron durante el estudio, los resultados de IPC-366 reflejaron valores más altos en el grupo de células tratadas con la mayor dosis de fármaco, de 4,5 μ M. No ocurrió lo mismo con la P5, T, DHEA y A4, cuyas concentraciones aumentaron de forma significativa ($p < 0,05$) y dosis-dependiente, en ambas líneas celulares a lo largo del experimento. La SO4E1 presentó los mismos resultados para IPC-366, pero no para SUM149, cuyos valores se redujeron de forma significativa ($p < 0,05$) a lo largo del estudio.

En el caso de la E2, su concentración disminuyó en los grupos tratados de IPC-366 pero no en SUM149, que experimentaron un discreto aumento significativo ($p < 0,05$) y dosis dependiente.

La única hormona que disminuyó su concentración en ambas líneas celulares tratadas con STX-64 fue la DHT. Dicha disminución fue significativa ($p < 0,05$) respecto al grupo control pero sin diferencias significativas entre las distintas dosis administradas.

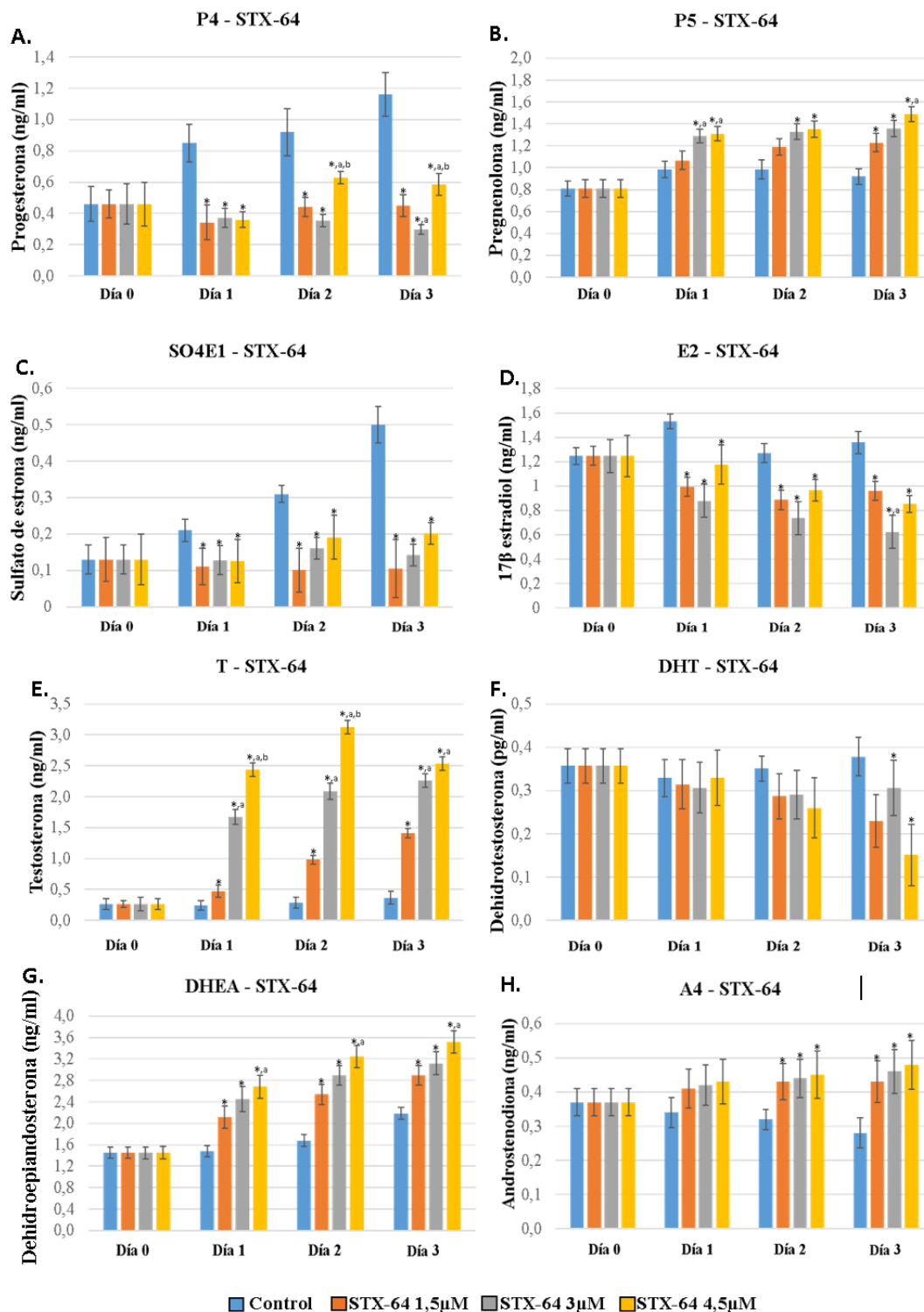


Figura 44. Concentraciones de P4(A), P5(B), SO4E1(C), E2(D), T(E), DHT(F), DHEA(G) y A4(H) en medio de cultivo de IPC-366 durante el tratamiento de 3 días. Resultados de la cuantificación durante 3 días consecutivos de los niveles de P4 (A), P5(B), SO4E1(C), E2(D), T(E), DHT(F), DHEA(G) y A4(H) en la línea IPC-366 tras la administración de SXT-64.

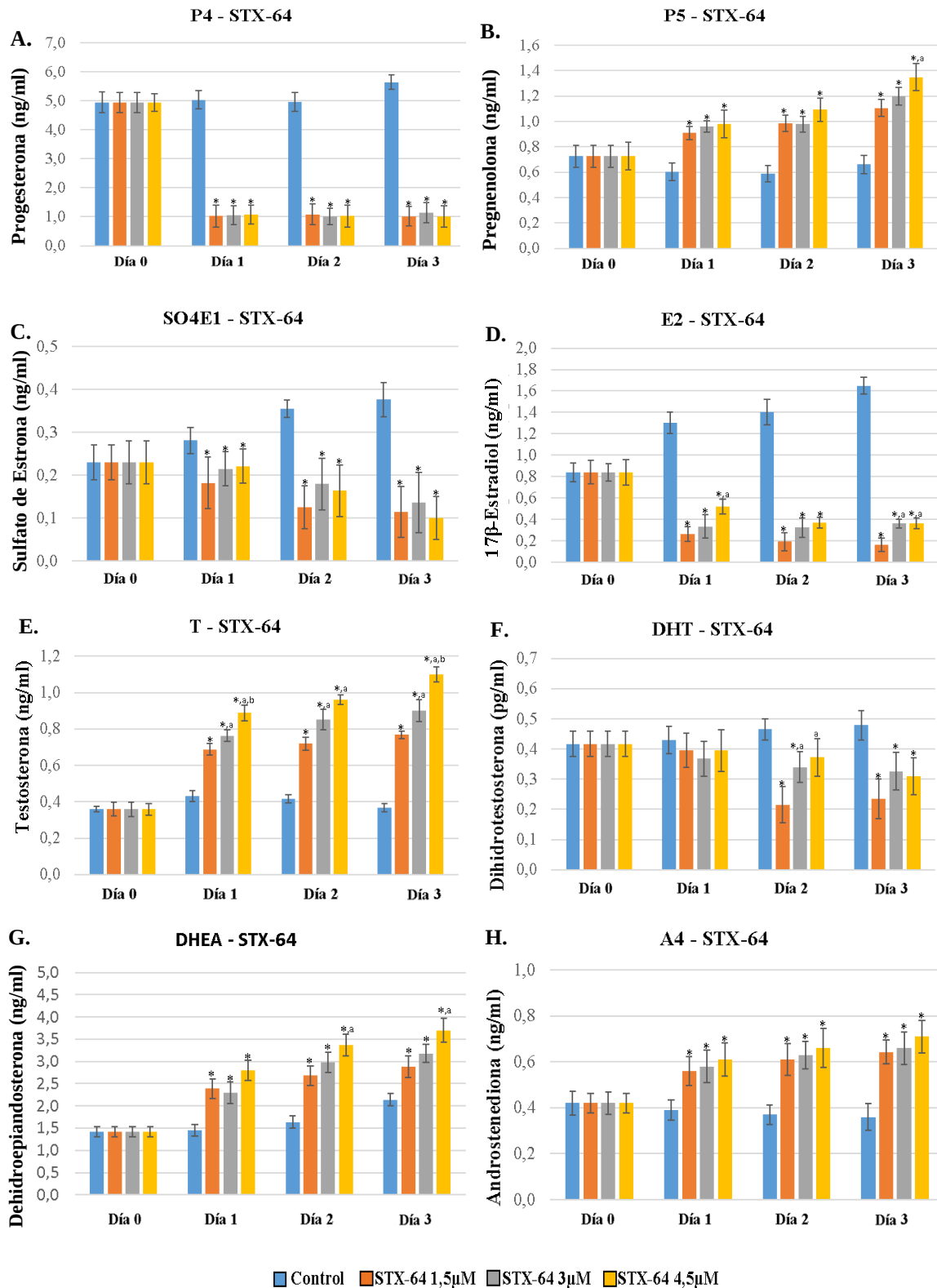


Figura 45. Concentraciones de P4(A), P5(B), SO4E1(C), E2(D), T(E), DHT(F), DHEA(G) y A4(H) en medio de cultivo de SUM149 durante el tratamiento de 3 días. Resultados de la cuantificación durante 3 días consecutivos de los niveles de P4(A), P5(B), SO4E1(C), E2(D) , T(E), DHT(F), DHEA(G) y A4(H) en la línea SUM 149 tras la administración de STX-64.

3.2.Tratamiento *in vivo*

3.2.1. Hormonas en suero y homogeneizados tumorales

La cuantificación de las hormonas esteroideas (P4, P5, SO4E1, E2, T, DHT, DHEA y A4) del suero sanguíneo de las ratonas xenotrasplantadas y del homogeneizado de los tumores generados por la línea IPC-366 (Tabla 12.A) y por la línea SUM 149 (Tabla 12.B) revelaron que ambas líneas siguen, en la mayoría de las ocasiones, las mismas tendencias. Los niveles de hormonas esteroideas en el homogeneizado del tumor de los grupos control y las tratadas fueron significativamente ($p<0,05$) más altos que en las muestras de suero analizadas, de una forma dosis dependiente en todos los casos. Sin embargo, se observaron diferencias entre las respuestas de ambas líneas celulares en lo que se refiere a la síntesis de hormonas durante el tratamiento con STX-64.

En los casos de DHEA y E2, tanto en suero como en el homogeneizado del tumor, se observa una elevación de las concentraciones, siendo la diferencia respecto al control estadísticamente significativa ($p<0,05$) en el caso de E2 y en las muestras de homogeneizados de SUM149 para DHEA. La A4 también aumenta su concentración en los homogeneizados de ambas líneas y en el suero de SUM149, no obstante, experimenta una bajada dosis-dependiente para el suero de IPC-366.

A diferencia de las hormonas anteriores, la P4, P5, SO4E1 y DHT disminuyen sus concentraciones tanto en suero como en el tumor de una forma dosis dependiente. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p<0,05$) en el caso de P4 y DHT en todos los casos y en el caso de SO4E1, en el homogeneizado del tumor, de ambas líneas celulares.

En cambio, la T aumenta su concentración en el suero de las ratonas xenotrasplantadas con IPC-366 y SUM 149, pero disminuye su concentración en el homogeneizado de ambas líneas celulares de una forma significativa y dosis-dependiente.

A.

IPC-366 STX 64		Control	STX-64 1 mg	STX-64 5 mg	STX-64 10 mg
Pregnenolona	Suero	1,07 ± 0,24	0,96 ± 0,27	0,91 ± 0,16	0,93 ± 0,18
	Macerado	5,84 ± 1,26	4,43 ± 1,19	4,19 ± 1,02	4,63 ± 1,13
Progesterona	Suero	0,57 ± 0,20	0,13 ± 0,05*	0,08 ± 0,01*	0,09 ± 0,01*
	Macerado	7,94 ± 1,54	4,26 ± 1,27*	2,93 ± 0,72*	3,31 ± 1,30*
Dihidro- epiandrosterona	Suero	1,57 ± 0,51	1,72 ± 0,46	1,84 ± 0,37	1,86 ± 0,42
	Macerado	1,82 ± 0,51	2,15 ± 0,47	2,85 ± 0,58	3,12 ± 0,85
Androstenediona	Suero	1,12 ± 0,22	0,92 ± 0,61	0,78 ± 0,48*	0,66 ± 0,64*
	Macerado	2,72 ± 0,57	3,28 ± 1,20	3,42 ± 1,12	3,76 ± 1,25
Testosterona	Suero	0,72 ± 0,14	0,94 ± 0,21	1,27 ± 0,34	1,35 ± 0,41
	Macerado	10,58 ± 2,54	6,47 ± 2,03	5,19 ± 1,74*	4,84 ± 1,12*
Dihidro- testosterona	Suero	0,21 ± 0,05	0,10 ± 0,02*	0,09 ± 0,02*	0,06 ± 0,01*
	Macerado	0,31 ± 0,05	0,14 ± 0,02*	0,12 ± 0,02*	0,08 ± 0,01 ^{*,a}
Sulfato de Estrona	Suero	0,30 ± 0,09	0,25 ± 0,08	0,23 ± 0,07	0,21 ± 0,07
	Macerado	10,75 ± 1,84	5,35 ± 0,98*	4,52 ± 1,01*	3,47 ± 0,92*
17β-estradiol	Suero	0,10 ± 0,02	0,17 ± 0,02*	0,19 ± 0,03*	0,16 ± 0,02*
	Macerado	1,28 ± 0,36	2,85 ± 0,95*	4,14 ± 1,67*	4,97 ± 1,71*

B.

SUM149 STX 64		Control	STX-64 1 mg	STX-64 5 mg	STX-64 10 mg
Pregnenolona	Suero	1,02 ± 0,35	0,92 ± 0,16	0,84 ± 0,24	0,86 ± 0,12
	Macerado	5,65 ± 1,75	5,12 ± 1,47	4,89 ± 1,53-64	5,08 ± 1,87
Progesterona	Suero	0,61 ± 0,15	0,24 ± 0,09*	0,22 ± 0,05*	0,19 ± 0,06*
	Macerado	7,52 ± 1,87	3,35 ± 1,14*	3,68 ± 1,25*	3,10 ± 1,39*
Dihidro- epiandrosterona	Suero	1,25 ± 0,27	1,84 ± 0,38	1,98 ± 0,41	2,21 ± 0,57
	Macerado	1,65 ± 0,24	2,94 ± 0,91*	2,87 ± 0,67*	3,09 ± 1,04*
Androstenediona	Suero	1,06 ± 0,51	1,98 ± 0,95	2,15 ± 0,84	2,16 ± 0,91
	Macerado	2,51 ± 0,74	3,41 ± 1,58	3,66 ± 1,41	3,59 ± 1,11
Testosterona	Suero	0,68 ± 0,12	0,99 ± 0,09	1,16 ± 0,57	1,23 ± 0,74
	Macerado	9,56 ± 2,25	3,28 ± 1,32*	1,76 ± 0,54*	2,24 ± 0,67*
Dihidro- testosterona	Suero	0,36 ± 0,07	0,09 ± 0,02*	0,08 ± 0,01*	0,08 ± 0,01*
	Macerado	0,42 ± 0,08	0,13 ± 0,03*	0,14 ± 0,02*	0,10 ± 0,02*
Sulfato de Estrona	Suero	0,42 ± 0,11	0,36 ± 0,07	0,34 ± 0,09	0,31 ± 0,06
	Macerado	11,23 ± 1,94	5,53 ± 1,24*	4,95 ± 1,27*	4,35 ± 1,16*
17β-estradiol	Suero	0,09 ± 0,02	0,24 ± 0,06*	0,23 ± 0,07*	0,34 ± 0,10*
	Macerado	1,52 ± 0,61	3,61 ± 0,87*	4,83 ± 1,47*	4,68 ± 1,39*

Tabla 12. Concentraciones de hormonas esteroideas (P5, P4, DHEA, A4, T, DHT, SO4E1 y E2) en suero sanguíneo (expresadas en ng/ml) y homogeneizado de tumores (expresadas en ng/mg) en ratonas xenotrasplantadas con IPC-366 (A) y SUM149 (B) y tratadas con STX-64.

3.2.2. Crecimiento tumoral

La figura 46 representa el efecto de STX-64 en la progresión del crecimiento del tumor en ratonas xenotrasplantadas con las líneas celulares: IPC-366 (A) y SUM 149 (B). STX-64 produjo una reducción significativa ($p < 0,05$) del 53-76% en los tumores de IPC-366 y del 61-70% en los tumores de SUM 149, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre las dosis administradas.

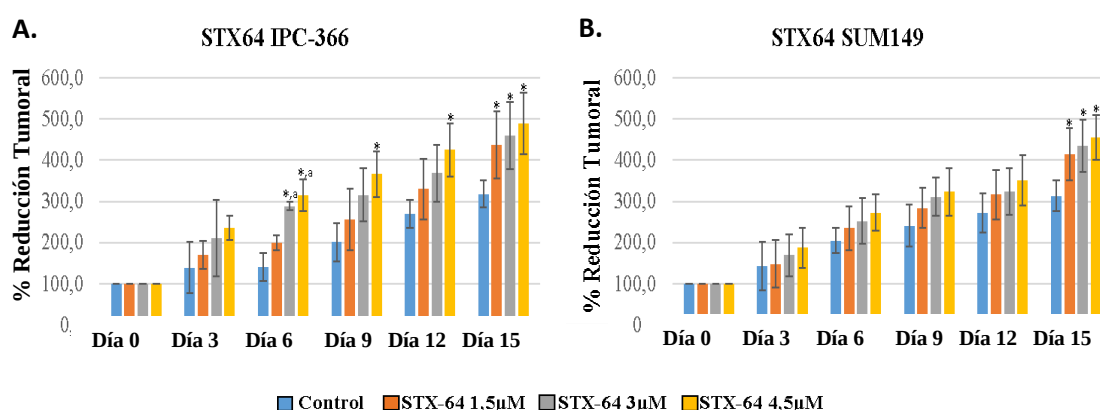


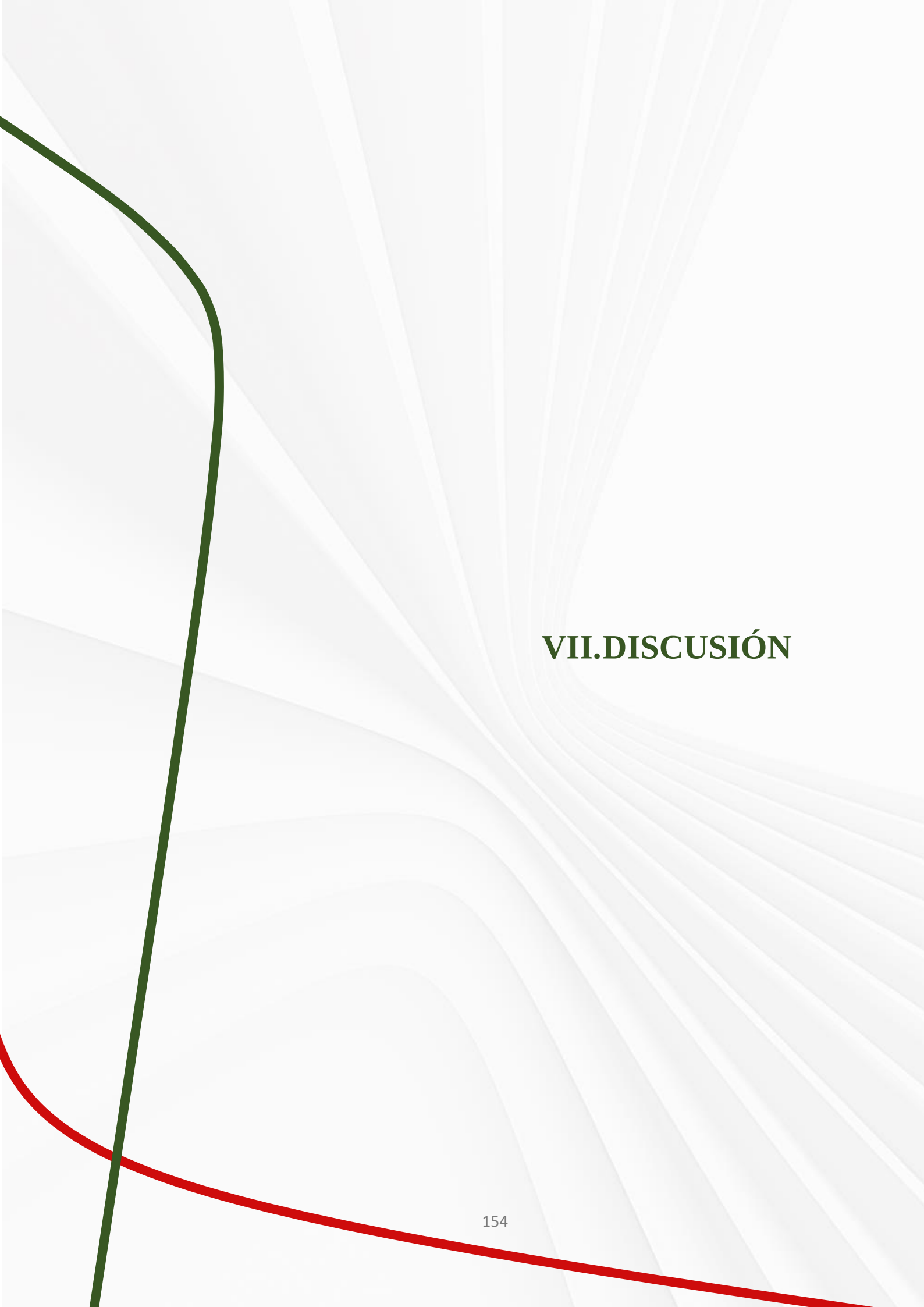
Figura 46. Tamaño del tumor expresado en % de reducción en ratonas con tumores generados por xenotrasplante de IPC-366 (A) y SUM 149 (B) y tratadas con STX-64 cada 3 días.

3.2.3. Metástasis

STX-64 disminuye la capacidad metastásica de IPC-366 y SUM 149, como se observa en la Tabla 13. Los animales del grupo control presentaron, respectivamente, un 80% de metástasis, siendo el hígado y pulmones los órganos diana. Tanto en los tumores IPC-366 como en los SUM149 no se observaron metástasis, siendo este resultado estadísticamente significativo con el grupo control ($p < 0,05$).

% METÁSTASIS	IPC-366	SUM149
Control	80%	80%
STX-64 1 mg	0%*	0%*
STX-64 5 mg	0%*	0%*
STX-64 10 mg	0%*	0%*

Tabla 13. Metástasis observadas en estudio post-mortem en las ratonas xenotrasplantadas con IPC366 o SUM 149 y tratadas con STX-64.



VII.DISCUSIÓN

El cáncer de mama es la cuarta causa de muerte más común en mujeres a nivel global, sólo superado por las enfermedades cardiovasculares, nerviosas y respiratorias (Informe Global Cancer Statistics, 2018). Un caso particular de cáncer de mama es el carcinoma inflamatorio mamario (Inflammatory Breast Carcinoma o IBC), que es el subtipo de tumor mamario menos prevalente. El IBC destaca por su gran mortalidad debido, además de a su malignidad, al común retraso en su diagnóstico y, en consecuencia, a una demora en el inicio del tratamiento (Anderson *et al.*, 2005; Hance *et al.*, 2005). Los protocolos terapéuticos actuales en IBC se han desarrollado a partir de los existentes para tumores no-IBC, cuyo comportamiento y naturaleza difieren notablemente. Además, en el caso de que se trate de un tumor triple negativo (TNBC), las terapias disponibles hasta el momento no consiguen obtener los mismos resultados clínicos y de supervivencia que los obtenidos al tratar tumores no-TNBC y en el caso particular de IBC-TNBC los resultados son todavía más pobres (Medina *et al.*, 2020).

En la especie canina, a pesar de que se dispone de menos datos registrados sobre la situación actual del cáncer mamario, se sabe que es la neoplasia más frecuente en las hembras (Chocteau *et al.*, 2019), suponiendo más del 50% de los diagnósticos oncológicos (Moe, 2001; Salas *et al.*, 2015). Al igual que en la especie humana, existen numerosos tipos de cáncer mamario en perras, donde el más agresivo y con peor pronóstico es el carcinoma inflamatorio mamario (Inflammatory Mammary Carcinoma o IMC) (Peña *et al.*, 2003; Clemente *et al.*, 2010a).

Debido a las similitudes clínico-patológicas entre los carcinomas mamarios caninos y humanos, la especie canina ha sido propuesta como un modelo animal espontáneo del cáncer de mama humano (Carvalho *et al.*, 2016; Raposo *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2019).

Esta Tesis Doctoral se ha realizado con el objetivo de analizar la respuesta *in vitro* e *in vivo* (en ratones Balb/SCID) de una línea celular de IBC (SUM149) y otra de IMC (IPC-366) a tres tratamientos distintos (Flutamida, Letrozole y STX-64), comparando dichas respuestas entre sí. Para ello, se analizaron la eficacia y utilidad de estos tratamientos para el IBC y el IMC, evaluando la viabilidad de utilizar el modelo canino para futuros estudios del IBC. Además, también se ha realizado con el objetivo generar evidencia sobre posibles nuevos tratamientos para tratar el IMC, ya que la supervivencia de las perras afectadas es baja, entre otros motivos, por las limitadas opciones terapéuticas que existen.

En esta Tesis Doctoral se ha analizado el efecto de cada uno de los tratamientos en términos de proliferación celular y crecimiento tumoral, además de cuantificar la concentración de hormonas esteroides en el medio de cultivo, en el suero sanguíneo de las ratonas y en homogeneizado de tumor obtenido. Adicionalmente, se estudió el impacto de los tratamientos en la capacidad de metastatizar de los tumores.

La capacidad del tejido mamario normal y neoplásico de sintetizar hormonas hace que ésta sea considerada un tejido endocrino debido, especialmente, a su aptitud de sintetizar estrógenos y andrógenos (Illera *et al.*, 2006; Sánchez-Archidona *et al.*, 2007; Queiroga *et al.*, 2009). Se ha observado que las líneas celulares IPC-366 y SUM149 son capaces de secretar hormonas esteroides en condiciones *in vitro* (Illera *et al.*, 2016), al igual que los tumores generados en ratonas Balb/SCID presentaron una alta concentración de estas hormonas (Cáceres *et al.*, 2016). Adicionalmente, se ha visto que tanto en IBC como en IMC, la enzima P450_{scc} se encuentra sobre-expresada (Peña *et al.*, 2003), lo que podría relacionarse directamente con esta capacidad de sintetizar hormonas.

La acción de las hormonas esteroides, en especial los estrógenos, es fundamental para la progresión y crecimiento de la neoplasia gracias a su interacción con receptores específicos. Estas hormonas, favorecen la proliferación de las células tumorales mamarias y el desarrollo tumoral gracias a su interacción con el RE, favoreciendo la transcripción de algunos proto-oncogenes, en particular c-myc, c-fos y c-jun (Weibe *et al.*, 2006; Ji *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha observado que los andrógenos producen una reducción de la proliferación celular mediante la inhibición de la expresión de algunos proto-oncogenes como el bcl-2 (Grigoryev *et al.*, 2000). Los progestágenos son capaces de producir cambios en el tejido mamario normal, pero se desconoce la influencia que pueden llegar a tener en la carcinogénesis y progresión tumoral (Labrie *et al.*, 2015). Esto es debido a que la evidencia disponible es diversa y, mientras que algunos autores defienden su acción protectora frente al cáncer de mama (Weibe *et al.*, 2006; Horwitz *et al.*, 2020), otros afirman todo lo contrario (Rojas *et al.*, 2017). No obstante, se ha especulado sobre la importancia que pueden tener los distintos metabolitos de la P4, ya que algunos pueden ejercer una acción pro-oncogénica, mientras que otros pueden tener una acción protectora frente a la aparición y progresión de neoplasias mamarias (Weibe *et al.*, 2006).

El colesterol es el precursor de todos los esteroides endógenos, que son sintetizados gracias a la activación de la cascada esteroidogénica, iniciada con la conversión del colesterol en pregnolona (P5) en un proceso catalizado por la enzima P450scc. En la glándula adrenal y en el ovario, la hormona P5 puede dar lugar a la síntesis de P4 y de DHEA por dos vías distintas ambas están encaminadas a la síntesis de estrógenos y andrógenos (Kristensen and Borrensén-Dale *et al.*, 2000).

En los resultados obtenidos en este trabajo observamos que los niveles de P4 y DHEA en el medio de cultivo del grupo control de IPC-366 fueron comparables pero presentando la DHEA una concentración levemente superior a P4. Así mismo, los

resultados obtenidos en el ensayo *in vivo*, revelan que los niveles en suero y en el tumor de DHEA de las ratonas xenotrasplantadas con ambas líneas celulares, fueron mayores que los de P4, por lo que podemos pensar que la vía de la DHEA para la síntesis de andrógenos y estrógenos es la predominante en células mamarias neoplásicas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (Labrie *et al.*, 2003; McNamara y Sasano *et al.*, 2015), que afirman que la ruta de la DHEA es la principal precursora de la producción de estrógenos y andrógenos en el cáncer de mama.

Numerosos estudios han demostrado la asociación entre los estrógenos y los fenómenos de carcinogénesis, progresión tumoral y recurrencia del cáncer de mama (Shang *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2015). El E2 es el estrógeno activo con mayor afinidad al RE (Stanway *et al.*, 2006; Purohit *et al.*, 2012), y puede ser sintetizado a través de dos rutas:

- Ruta de la aromatasa: por la cual se sintetizan estrógenos a partir de andrógenos (A4 a E1 y también T a E2).
- Ruta de la sulfatasa: por la que a partir de SO₄E1 se obtiene E1 y de éste, a su vez, E2 gracias a la acción de la enzima 17 β HSD (17 β -hidroxiesteroideshidrogenasa).

La conversión de andrógenos a estrógenos por vía de la aromatasa se ha postulado como una de las principales vías que favorecen el crecimiento y progresión tumoral (Jerry *et al.*, 2018). No obstante, otros autores sugieren que la ruta de la sulfatasa tiene una mayor actividad que la ruta de la aromatasa (Stanway *et al.*, 2006; Shang *et al.*, 2007).

En este estudio, tanto la línea IPC-366 como SUM149 presentaron, respecto al resto de hormonas esteroides cuantificadas, altos niveles de E2 en medio de cultivo, que

aumentaron paulatinamente según proliferaban las células. Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores, que señalan la importancia y el impacto de E2 en la proliferación celular (Illera *et al.*, 2015; Sang *et al.*, 2019). Asimismo, en el suero sanguíneo y en el homogeneizado del tumor de ambas líneas, los niveles de E2 también aumentaron su concentración en comparación con otras hormonas.

Diversos estudios realizados en animales afirman que tejidos ricos en RE, como es el caso del tejido mamario tanto normal como patológico, presentan una mayor concentración de estrógenos en su parénquima que son regulados de forma intracrina (Masamura *et al.*, 1997; Ji *et al.*, 2015). Masamura y colaboradores (1997) demostraron que el tejido mamario de la rata es capaz de actuar como reservorio, aumentando paulatinamente la concentración de E2 en este tejido, a pesar de que los niveles de esta hormona sean bajos en sangre. Adicionalmente, otros autores han observado que en numerosos tumores mamarios la concentración de SO4E1 es elevada, actuando esta hormona como reservorio de estrógenos que presentan una conocida actividad pro-tumoral (Pasqualini *et al.*, 1996; Illera *et al.*, 2006).

En cuanto a los andrógenos, su síntesis está mediada por dos enzimas (17 β HSD y 5 α -reductasa) que dan lugar principalmente a la síntesis de T y DHT. Además, los andrógenos protegen la mama de la estimulación inducida por estrógenos, del aumento de la proliferación y del desarrollo de cáncer. Estudios realizados *in vitro* e *in vivo*, evidencian que los andrógenos tienen efectos anti-proliferativos y apoptóticos del epitelio mamario patológico (Stanway *et al.*, 2006; Purohit *et al.*, 2012; Sang *et al.*, 2018).

Además, se ha demostrado que la expresión de enzimas que participan en la síntesis androgénica está directamente relacionada con una menor agresividad en tumores mamarios, en general, y triple negativos en particular (Hanamura *et al.*, 2013). Suzuki y

colaboradores (2006) señalaron la importancia que tiene la enzima 5α -reductasa en los tumores mamarios, en los que se encuentra no sólo expresada en el parénquima, sino que presenta una actividad 4-8 veces mayor que en un tejido mamario sano, generando un aumento de la síntesis local de DHT e incluso llegaron a establecer una relación entre la expresión y actividad de este encima con un mejor pronóstico de las pacientes.

Illera y colaboradores (2006) analizaron los niveles de hormonas esteroideas en 56 perras con IMC o con otros tumores mamarios no inflamatorios, concluyendo que los niveles de andrógenos y de estrógenos en el suero sanguíneo de las perras estudiadas y en los homogeneizados de sus tumores, eran elevados respecto a los niveles fisiológicos de la especie, encontrando además, diferencias numéricas significativas entre los tumores inflamatorios y no inflamatorios. Las muestras procedentes de perras con IBC presentaron niveles mayores de DHEA, A4 y T que las muestras de perras con tumores no inflamatorios. Además, en todos los casos, tanto el RA como el RE β se encontraban intensamente expresados.

En el presente estudio, los niveles en el medio de cultivo de andrógenos (T y DHT) en IPC-366 y SUM149, fueron menores que los de estrógenos y progestágenos, por lo que la alta proliferación de ambas líneas celulares puede deberse a la alta concentración de estrógenos encontrada en medios de cultivo. En los sueros y homogeneizados de los tumores, los niveles de SO4E1 fueron mayores que los de T. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Stanway y colaboradores (2006) y también con los obtenidos por Purohit y colaboradores (2012), confirmando, como ya hemos señalado anteriormente, que el SO4E1 actuaba como reservorio para la posterior síntesis de estrógenos causantes de la alta proliferación celular observada.

Respecto a los niveles de T, algunos autores como Cáceres y colaboradores (2017) postulan que altos niveles de T, pueden estar asociados una menor tasa de metástasis en ensayos *in vivo* llevados a cabo en ratonas, con tumores IMC e IBC. No obstante, existen otras líneas de pensamiento respecto al efecto de la T en la proliferación de células mamarias y el desarrollo del cáncer de mama, entre las cuales destaca la idea de que los andrógenos pueden aumentar el riesgo de cáncer de mama, ya sea directamente mediante el aumento de la proliferación celular vía el RA o, indirectamente, a través de su aromatización a los estrógenos (Secreto *et al.*, 2007; Dimitrikakis *et al.*, 2009).

Adicionalmente, es interesante señalar que otros autores plantean que si los andrógenos estuviesen directamente relacionados con el desarrollo del cáncer de mama, se podría esperar una mayor incidencia de cáncer de mama en ciertos grupos de mujeres con desordenes hormonales como el síndrome de ovario poliquístico (SOP). No obstante, a pesar de los niveles elevados de andrógenos, los pacientes con SOP parecen no tener un aumento significativo en su riesgo de cáncer de mama (Kotsopoulos *et al.*, 2012).

Respecto al receptor de esta hormona, el RA, se expresa en el 80% de los casos (Dawood *et al.*, 2011) y su expresión en el cáncer de mama está asociada a una respuesta al tratamiento favorable y a un buen pronóstico de la paciente, especialmente en aquellos casos que además son positivos al RE (Vera-Badillo *et al.*, 2014). No obstante, a pesar de que se ha determinado la expresión de RA en líneas celulares, concretamente en las líneas T47D y MCF-7, se desconoce el papel que éstos juegan exactamente en la carcinogénesis y desarrollo tumoral (Fujii *et al.*, 2017).

Como consecuencia de lo anterior, se han desarrollado y validado algunos fármacos antiandrogénicos o que actúan sobre el RA para tratar la patología oncológica prostática, en la que los andrógenos tienen un papel muy relevante (Guaedj *et al.*, 2012).

Según algunos autores, estos fármacos también tienen utilidad para tratar tumores mamarios (Secreto *et al.*, 1988; Cáceres *et al.*, 2017).

En conclusión, en el grupo control hemos podido observar altos niveles de estrógenos presentes, tanto en el medio de cultivo como en el suero y en el homogeneizado del tumor, lo que explica la alta proliferación observada a nivel celular, el importante crecimiento tumoral y la alta incidencia de metástasis. Tanto los estrógenos como los progestágenos presentaron mayores concentraciones que los andrógenos, de acción protectora frente a los procesos tumorales y por ello, de nuevo, estos bajos niveles obtenidos podrían explicar la malignidad observada de ambas líneas celulares.

Inhibidores del receptor de andrógenos como opción terapéutica para IMC e IBC.

La Flutamida es un inhibidor del receptor androgénico que reduce la proliferación y crecimiento de líneas celulares en ensayos *in vitro* (Cáceres *et al.*, 2017) y el crecimiento del tumor en modelos *in vivo* (Proverbs-Singh *et al.*, 2015). No obstante, apenas hay evidencia del efecto que tiene en estudios *in vivo* o *in vitro* en IBC e IMC.

El tratamiento administrado *in vitro* en ambas líneas celulares produjo una reducción del 80% de la proliferación celular. Estos resultados están en línea con los obtenidos por otros autores, en los que líneas celulares como MDA-MB-453 mostraron una notable reducción de la viabilidad celular (con valores por encima del 75%), tras la administración de Flutamida (Naderi *et al.*, 2011). Resultados similares se obtuvieron al tratar otros tipos de tumores, como es el caso del carcinoma hepatocelular y del cáncer de próstata (Kono *et al.*, 2017).

Además, en las ratonas con tumores generados a partir de las líneas celulares IPC-366 y SUM149 y tratadas con Flutamida, se observó una reducción importante del

tamaño del tumor. De la misma manera, se redujo también de forma significativa la presencia de metástasis, aproximadamente un 50%, en los animales tratados.

Debido a que la Flutamida inhibe selectivamente el receptor androgénico, toda la cascada de hormonas esteroides puede verse afectada como consecuencia de la administración de dicho fármaco. En este estudio se cuantificaron las concentraciones de hormonas esteroideas (P4, P5, SO4E1, E2, T, DHT, DHEA y A4) presentes en los medios de cultivo de IPC-366 y SUM149 control y en los tratados con Flutamida, con el objetivo de comparar su efecto en la síntesis hormonal.

En los grupos tratados de ambas líneas celulares se observó un aumento de la P5 y de la P4, al mismo tiempo que una disminución de los niveles de DHEA, con respecto a los valores del grupo control. Estos resultados sugieren, una dominancia de la vía de la P4 sobre la de DHEA para la síntesis del resto de hormonas esteroideas.

También se observó que los niveles de andrógenos (T y DHT) fueron significativamente mayores que el grupo control. La disminución de la proliferación celular observada puede ser debida a esta elevada concentración de andrógenos. Algunos autores han sugerido que la DHT inhibe la proliferación de células mamarias cancerígenas y que, el aumento de la síntesis de DHT puede provocar un aumento de la actividad de la enzima 5 α -reductasa y, como consecuencia de esto, reducir la capacidad de proliferación de las células tumorales (Suzuki *et al.*, 2001).

Respecto al impacto de la Flutamida en la síntesis *in vitro* de estrógenos, hay que destacar que los niveles de SO4E1 aumentaron y fueron mayores respecto al grupo control, lo que podría sugerir que el SO4E1 puede actuar de reservorio para la síntesis de estrógenos, como ya se ha indicado anteriormente. Además, los niveles de E2 disminuyeron cuando las células fueron tratadas con Flutamida, aunque también la

podemos asociar a una reducción de la actividad aromatasa. El aumento de los niveles de T y la disminución de E2 producen, en conjunto, el efecto inhibitorio observado en los ensayos de proliferación celular.

A nivel de la síntesis *in vivo* de estrógenos en las ratonas tratadas con Flutamida, también se observaron niveles elevados de SO4E1 en las mediciones realizadas en el homogeneizado de tumor de ambas líneas celulares. Además, para ambas líneas, los niveles de E2 de los grupos tratados fueron bajos tanto en suero como en el homogeneizado. Esto, unido a que los niveles de T, obtenidos en suero y homogeneizado tumoral de ambas líneas celulares, aumentaron en los grupos tratados con respecto al grupo control, mientras que los niveles de DHT, además de ser menores que los de T, disminuyeron, podrían explicar la reducción del crecimiento tumoral observado en ambas líneas (55-65% para IPC-366; y 50-60% para SUM149), así como la reducción, en más de un 45%, de la presencia de metástasis de los animales tratados respecto a los control.

A pesar de que se han hecho grandes avances en lo que se refiere a la terapia del cáncer de mama, todavía queda mucho por hacer e investigar, para desarrollar nuevas opciones terapéuticas para los tumores mamarios triple negativos. Las terapias dirigidas al RA han demostrado ser una opción a valorar para el tratamiento de IBC e IMC. Estos resultados demuestran que la Flutamida tiene un efecto antiandrogénico que produce una inhibición de la proliferación y progresión tumoral en modelos de IBC e IMC, que puede ser explicado por el aumento de la concentración de andrógenos. Este incremento, además, puede deberse al aumento de la actividad de la enzima 5 α -reductasa, así como por la reducción de la actividad de la aromatasa. Es importante destacar también que estos altos niveles de andrógenos en sangre y en el tumor pueden reducir la probabilidad de que se produzcan metástasis.

Inhibidores de la síntesis de estrógenos como opción terapéutica para IBC e IMC

Varios estudios han demostrado la importancia de los estrógenos en la carcinogénesis y el crecimiento de tumores mamarios, tanto en mujeres pre como postmenopáusicas. En mujeres menopáusicas, la síntesis de estrógenos disminuye a nivel ovárico, aunque aumenta a nivel periférico respecto a otras hormonas como los andrógenos, lo que favorece la proliferación celular y aumenta el riesgo de aparición de células neoplásicas, especialmente en mujeres portadoras de mutaciones en el gen BRCA (Testa *et al.*, 2020). Estos estrógenos sintetizados en tejidos periféricos serán transformados en SO4E1 que, aunque tenga poca afinidad por el RE y sea biológicamente inactivo, actúa de reservorio para la síntesis de estrógenos biológicamente activos gracias a la acción de la enzima sulfatasa (Cui *et al.*, 2013).

En este escenario, el tratamiento hormonal está indicado con el objetivo de reducir al máximo la síntesis de estrógenos y de las enzimas que participan en la formación de los mismos, limitando así su acción pro-cancerígena. Por todo esto, podemos señalar que en este punto hay 3 posibles dianas terapéuticas enzimáticas (Reed *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2016):

- Aromatasa: participa en la síntesis de E1 a partir de A4 y de E2 a partir de T.
- 17 β -HSD-1: reduce la E1 a E2.
- Sulfatasa esteroidea: participa en la síntesis de SO4E1 a partir de E1.

Es importante señalar que hay más fármacos con los que se limita la acción de los estrógenos en el organismo, siendo el caso del Tamoxifeno. Este fármaco, utilizado durante décadas en tumores mamarios RE positivos, bloquea de forma selectiva dicho receptor, impidiendo que los estrógenos se unan a él. Tras la publicación de diversos estudios que demostraron la seguridad y eficacia de los inhibidores de la aromatasa (IA)

(Makris *et al.*, 2002), su uso se expandió notablemente, aumentando la batería de tratamientos hormonales antes centrada casi exclusivamente en el Tamoxifeno.

Aunque en ambos casos se produce una limitación o inhibición de la acción de estrógenos, los IA tienen un mecanismo de acción muy distinto al Tamoxifeno ya que, en este caso, en lugar de interactuar con el RE, lo hacen con la enzima aromatasa. Así, en mujeres menopáusicas la reducción de estrógenos es notable, mientras que en premenopáusicas será necesario combinar este fármaco con análogos de la LHRH para bloquear completamente la síntesis ovárica y extra-ovarica de estrógenos (Pistelli *et al.*, 2018).

Dentro de los inhibidores de la aromatasa destacan tres fármacos: exemetasona (IA de tipo esteroideo), Anastrozole y Letrozole (IA no esteroideos). Estos fármacos, a día de hoy, están indicados como terapia de primera línea en tumores RE+ y/o metastáticos, y de segunda línea en casos en los que hay una resistencia adquirida al Tamoxifeno (Testa *et al.*, 2020). Adicionalmente, se ha demostrado que los IA tienen mejores resultados en comparación con el Tamoxifeno en lo que se refiere a supervivencia libre de enfermedad, y a la reducción de la incidencia de cáncer de mama contralateral (Coombes *et al.*, 2004). Sin embargo, el uso de inhibidores de aromatasa, hasta el momento, no ha resultado en un aumento significativo en la supervivencia general, en comparación con el logrado con Tamoxifeno (Pistelli *et al.*, 2018). Además, se desconoce el efecto de estos tratamientos en tumores como IBC e IMC.

A pesar de que los IA son una gran y potente herramienta terapéutica, hay casos en los que no son eficaces (Stanway *et al.*, 2005) e, incluso, se han descrito resistencias a este tipo de moléculas (Augusto *et al.*, 2018). Es por este motivo, que la inhibición de la enzima sulfatasa representa un enfoque novedoso para bloquear la formación de

estrógenos, mediante un mecanismo de acción distinto, suponiendo una alternativa terapéutica en aquellas pacientes que generan resistencia al tratamiento con IA.

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado el efecto de dos fármacos cuyo mecanismo de acción evita la síntesis de estrógenos: Letrozole (inhibidor de la aromatasas) y STX-64 (inhibidor de la sulfatasa esteroidea).

Letrozole como opción terapéutica para IBC e IMC

El Letrozole es un inhibidor de la aromatasas de tercera generación, que inhibe de forma selectiva y reversible esta enzima y con ello impide el crecimiento de las células neoplásicas mamarias dependientes de estrógenos. Letrozole bloquea la síntesis de estrógenos en mujeres postmenopáusicas y se usa como terapia para el cáncer de mama positivo para el RE, generalmente antes o después de la resección quirúrgica y después del fracaso del Tamoxifeno por la aparición de resistencias al tratamiento (Carpenter *et al.*, 2005; Gobbi *et al.*, 2014). Se desconoce su efecto en tumores negativos al RE debido a la escasa bibliografía al respecto.

El primer estudio randomizado que demostró la superioridad de Letrozole vs Tamoxifeno fue realizado por Eiermann y colaboradores (2001), a partir del cual han sido varios los estudios que han demostrado que Letrozole es un fármaco seguro y que produce resultados positivos en las pacientes, en términos de supervivencia y de calidad de vida (Ellis *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2005). Por otro lado, debido a la menor incidencia de cáncer de mama en mujeres premenopáusicas, la evidencia en este colectivo de pacientes tardó más tiempo en llegar, siendo el estudio STAGE el primer estudio sobre inhibidores de la aromatasas en este grupo de pacientes (Masuda *et al.*, 2012).

Además, autores como Martín y colaboradores (2012) señalan que Letrozole, cuando se compara con Tamoxifeno y Anastrozole a nivel clínico, ofrece a las pacientes con cáncer de mama una mejor calidad de vida, una mayor supervivencia ajustada a calidad de vida y menos efectos adversos.

A pesar de que existe una gran cantidad de datos sobre el efecto de Letrozole sobre diversos tipos de cáncer de mama hormono-dependientes (Robarge *et al.*, 2017), son necesarios más estudios que analicen la eficacia de tratar tumores mamarios triple negativos con esta molécula.

En el tratamiento administrado *in vitro* en ambas líneas celulares se ha podido comprobar que, a pesar de que tanto IPC-366 como SUM149 son negativas al RE, se produce una clara reducción de la proliferación y viabilidad celular de, aproximadamente, un 70%. Hay datos que afirman que esta reducción de la viabilidad celular es debida a un mecanismo de apoptosis, como señalaron Neville-Webbe y colaboradores en 2010 y Martín y colaboradores en 2012 en sendos estudios realizados con la línea celular de cáncer de mama MCF7-Ca que fue tratada *in vitro* con Letrozole.

Además de cambios a nivel proliferativo, se sabe que Letrozole produce cambios en la síntesis de hormonas esteroideas tanto en líneas celulares como *in vivo* (Martin *et al.*, 2012).

A diferencia de los resultados obtenidos en el experimento con Flutamida, en el que se observó una dominancia de la vía de P4 en la síntesis estrogénica, en este caso, la vía de la DHEA parece ser dominante respecto a la de P4, que disminuye su concentración. Esta dominancia de la vía de la DHEA podría explicar que los niveles de P5, DHEA y A4 aumentaron durante el tratamiento *in vitro* con Letrozole. Respecto al tratamiento *in vivo*, tanto en el suero sanguíneo como en el homogeneizado del tumor, los

niveles de P4 y DHEA aumentaron en ambas líneas celulares. Además, en el homogeneizado del tumor también aumentaron los niveles de P5 y A4. Estos resultados podrían sugerir que se produjo una acumulación de precursores de la síntesis de hormonas esteroides, debido a la acción inhibitoria de Letrozole sobre la enzima aromatasa.

Respecto a la síntesis de estrógenos, al igual que en el tratamiento con Flutamida, destaca que en ambas líneas celulares se redujo significativamente la concentración de E2 en medio de cultivo y de SO4E1 en el caso de SUM149, lo que podría explicar esta reducción en la viabilidad y proliferación celular observada en los experimentos *in vitro*.

En las muestras de suero y homogeneizados tumorales, los niveles de E2 disminuyeron de forma significativa y dosis-dependiente, lo que podría estar relacionado con la disminución del tamaño tumoral observada durante el experimento *in vivo*, que también fue significativa y dosis-dependiente. Estos resultados obtenidos, en los que se ha producido una reducción de la síntesis de E2, están en consonancia con los resultados obtenidos por otros autores. Sang y colaboradores (2019) demuestran que al tratar dos líneas celulares RE+, MCF-7 y T47D, con Letrozole, las concentraciones de E2 se redujeron de forma significativa y más marcada que en nuestras líneas celulares, pudiendo deberse esto a la expresión de RE, que hace más sensibles las células a la acción de este fármaco. Rabarge y colaboradores (2017), obtuvieron unos resultados similares en un ensayo randomizado que comparaba el efecto de la exametasona y Letrozole en 469 mujeres postmenopáusicas. Además de comparar ambos fármacos y sus efectos clínicos, se cuantificaron las hormonas E1, E2 y SO4E1, determinando que, aquellas que habían sido tratadas con Letrozole, presentaron una menor concentración de estrógenos en sangre, pero no se observaron diferencias clínicas entre ambos grupos tratados.

En lo que se refiere a los niveles de SO4E1, disminuyeron tanto en los cultivos celulares de ambas líneas, como en los sueros y los homogeneizados tumorales. En los cultivos de IPC-366 tratados, se observó un aumento dosis-dependiente de dicha hormona, que podría deberse a un mecanismo de acumulación para sintetizar estrógenos posteriormente. En general, estos valores de SO4E1 son esperables teniendo en cuenta que la aromatasa no solamente participa en la síntesis de E2 sino también en la síntesis de E1 a partir de A4 y es a partir de la síntesis de E1 cuando el SO4E1 puede comenzar a sintetizarse. Por lo tanto, o IPC-366 presenta grandes acúmulos de SO4E1 o la actividad sulfatasa esta sobreexpresada para pasar todos esos estrógenos a SO4E1.

Respecto a la síntesis androgénica, cabe destacar que en el medio de cultivo, los niveles de T disminuyeron y los de DHT aumentaron; sin embargo, en los sueros y homogeneizados los niveles de ambas hormonas aumentaron. Estos resultados podrían ser consecuencia de la inhibición de la síntesis estrogénica, que produjo la acumulación de andrógenos que podrían haber limitado el crecimiento tumoral, fenómeno que ya ha sido descrito por otros autores (Tagaki et al., 2010) y que observamos previamente en los resultados obtenidos en el tratamiento antiandrogénico con la Flutamida. Recordemos que en este primer tratamiento los niveles de T y DHT aumentaron, provocando una disminución de la proliferación celular que pudo ser debida a los niveles de DHT, ya que ésta genera un aumento de la actividad de la enzima 5 α -reductasa y como consecuencia de esto, reduce la capacidad de proliferación de las células tumorales (Suzuki *et al.*, 2001).

Estudios previos han reportado que los pacientes tratados con exametasona (un inhibidor de la aromatasa) mostraron niveles intratumorales bajos de E2 y altos de andrógenos (T y DHT), sugiriendo que este tratamiento inhibía el crecimiento del tumor mediante el bloqueo de la conversión de los andrógenos a estrógenos (Tagaki et al., 2010). Estos resultados obtenidos también coinciden con los publicados por Sang y

colaboradores (2019) que, al tratar la línea de cáncer de mama MCF-7 con Letrozole observaron una reducción significativa de la proliferación celular.

Otros autores sugieren que la DHT produce una reducción de la proliferación celular al unirse a AR y afirman que la expresión de AR puede regularse tanto por DHT como por E2, que controlan interactivamente el crecimiento del tumor mamario (Peters *et al.*, 2009).

La evidencia que existe sobre el impacto que tiene Letrozole en el tamaño del tumor y su capacidad para reducirlo, es relevante. Numerosos estudios afirman que tras el tratamiento con este fármaco, hay muchas pacientes con cáncer de mama que no han necesitado cirugía o, en caso de necesitarla, ésta ha sido mucho más conservadora, dejando de estar indicada la realización de una mastectomía radical (Ellis *et al.*, 2001; Coombes *et al.*, 2004).

En cuanto al porcentaje de aparición de metástasis observada en el estudio, se produjo una reducción muy significativa de la incidencia de metástasis a distancia. En los tumores originados a partir de la línea IPC-366, la reducción de la tasa de metástasis respecto al grupo control fue del 90% y en los tumores originados a partir de la línea SUM149, esta reducción fue del 80%. En diversas publicaciones se destaca el impacto positivo de Letrozole en la supervivencia de las pacientes y dicha supervivencia está correlacionada directamente con la ausencia de metástasis de la paciente (Pistelli *et al.*, 2018).

Con todos los datos obtenidos en este estudio, se puede afirmar que este fármaco tan extensamente validado y usado en la terapéutica de diversos tipos de cáncer de mama, podría considerarse como una opción terapéutica más en el tratamiento del IBC y el IMC. Aunque es necesario profundizar más en los mecanismos por los cuales se ha obtenido

esta importante reducción de la proliferación celular, de la síntesis de estrógenos, del tamaño del tumor y de la aparición de metástasis, podríamos afirmar a la vista de los resultados obtenidos a nivel proliferativo, hormonal y de evolución del tamaño tanto de los tumores IBC como IMC, que Letrozole es un fármaco a considerar para tratar este subtipo de cáncer de mama.

STX-64 como opción terapéutica para IBC e IMC

STX-64 (también conocido como Irosustat o 677 coumato) es un sulfamato tricíclico cumarínico de primera generación, que actúa como inhibidor irreversible de la enzima sulfatasa y que, actualmente, se está investigando su eficacia y seguridad en el tratamiento de cáncer de mama metastático y en el cáncer de mama localmente avanzado (Shah *et al.*, 2016).

STX-64 se une e inhibe selectivamente a la sulfatasa esteroidea (STS), por lo que impide la síntesis de estrógenos biológicamente activos, así como el crecimiento de tumores hormono-dependientes como pueden ser los de mama, ovario y endometrio (Reed *et al.*, 2005)

La administración de STX-64 en cultivos celulares de IPC-366 y SUM149, produjo una reducción de, aproximadamente, el 40% de la viabilidad celular. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Sang y colaboradores (2018), en los que trataron con STX-64 líneas celulares de cáncer de mama RE+ como MCF-7 y T47D, obteniendo tasas de inhibición de la proliferación mayores que en nuestro estudio (81% para MCF-7 y 79% para T47D), lo que podría ser esperable teniendo en cuenta que, en ambos casos, se tratan de líneas celulares positivas al RE, que acusan más el efecto en la inhibición de la síntesis de estrógenos.

Además de cambios a nivel proliferativo, se conoce que STX-64 produce cambios en la síntesis de hormonas esteroideas tanto *in vitro* como *in vivo* (Foster *et al.*, 2006).

La determinación de los niveles hormonales en medio de cultivo de IPC-366 y SUM149, reveló que los niveles de P5 aumentaron, mientras que los niveles de P4 fueron significativamente menores que en el grupo control. Tanto en suero como en los homogeneizados, los valores de estas hormonas disminuyeron notablemente. Es interesante señalar que los niveles de DHEA y A4, aumentaron en el medio de cultivo significativamente, lo que podría explicar los bajos valores de P4 obtenidos ya que fueron sintetizados a partir de ésta. En el ensayo *in vivo*, los niveles séricos de DHEA aumentaron en ambas líneas celulares y A4 solo en SUM149 y, además, sus niveles en el homogeneizado aumentaron. Debido a estos resultados, queda claro que la síntesis de hormonas esteroideas sigue la ruta de la DHEA y los niveles de A4 aumentan debido a su acción como precursora de estrógenos. En esta línea, recientemente Saha y colaboradores (2019) afirmaron que la DHEA podría estimular la multiplicación de las células tumorales, provocando en consecuencia un aumento del tamaño del tumor.

Cuando analizamos la síntesis de estrógenos en los medios de cultivo de IPC-366 y SUM149, observamos que los niveles de SO4E1 y E2 disminuyeron en ambas líneas de forma significativa. Sin embargo, en el ensayo *in vivo*, observamos que en el caso de E2, existe una elevación significativa de sus niveles en suero y en el homogeneizado, mientras que los de SO4E1 disminuyeron en ambos casos, probablemente como consecuencia de su papel de reservorio para la síntesis de estrógenos, habiendo generado en este caso un aumento de la concentración de éstos en el tejido.

Cuando analizamos la evidencia disponible en este escenario, observamos que diversos autores obtuvieron resultados parecidos en sus tratamientos *in vivo*, destacando que, en todos los casos, hubo una disminución de la concentración de estrógenos en las muestras de tumores mamarios analizadas (Stanway *et al.*, 2006; Reed *et al.*, 2005; Purohit *et al.*, 2012; Coombes *et al.*, 2013).

Además, se han realizado dos estudios de fase I con este fármaco y en ambos, STX-64 no produjo toxicidades bioquímicas o hematológicas en los pacientes tratados. En ambos estudios se observó una reducción significativa a nivel sistémico (en suero sanguíneo) de las concentraciones de estrógenos, pero también de andrógenos (Stanway *et al.*, 2006).

De los datos obtenidos de la cuantificación de andrógenos en este estudio, destaca que tanto a nivel *in vitro* como *in vivo* se observó la misma tendencia en la que, para ambas líneas celulares, los niveles de T aumentaron y los de DHT disminuyeron, salvo para las muestras de suero de ambas líneas celulares en las cuales la concentración de T disminuyó. Otros autores que han realizado estudios *in vitro* en la línea MCF-7 (Sang *et al.*, 2018) e *in vivo* (Stanway *et al.*, 2006) con STX-64, señalaron que los niveles de andrógenos disminuyeron. Stanway y colaboradores (2006) afirmaron que esta disminución de los niveles de andrógenos en suero, concretamente T y A4, generaba importantes preguntas sobre el origen de los andrógenos en mujeres postmenopáusicas y, por ello, sugieren que probablemente en este grupo de mujeres, la mayor fuente de A4 sea la DHEA, sintetizada en órganos periféricos y no en la corteza adrenal, como se pensaba anteriormente.

Aunque se hayan observado diferencias en lo que se refiere a la respuesta hormonal, a nivel tisular se observó una misma tendencia entre ambas líneas, ya que los

animales tratados con distintas dosis de STX-64 mostraron un crecimiento tumoral mayor que el grupo control. Este crecimiento podría explicarse con los altos niveles de E2 observados en el suero y homogeneizado de tumor, ya que los estrógenos, y particularmente E2, estimulan la proliferación celular y con ello, el crecimiento tumoral. Sorprendentemente, cuando se analizó la presencia de metástasis en ambos grupos, no se observó ninguna en los grupos tratados, mientras que la tasa de metástasis en los grupos control fue del 80%. Este resultado podría estar relacionado con los altos niveles séricos de T, ya que diversos autores han señalado que esta hormona es capaz de limitar el desarrollo de metástasis en pacientes con cáncer de mama (Palma *et al.*, 2000; McNamara *et al.*, 2013).

Recordemos que este fármaco, actualmente, está indicado como segunda línea terapéutica para el cáncer de mama metastático y para el cáncer de mama localmente avanzado. Aunque hace falta que se genere más evidencia sobre la eficacia de STX-64 para el tratamiento del cáncer de mama, todo parece indicar por los resultados obtenidos en este estudio, que este fármaco podría ser útil como tratamiento adyuvante en el tratamiento de tumores mamarios inflamatorios humanos y caninos, para reducir la incidencia de metástasis, siendo necesario un estudio en mujeres con IBC y perras con IMC para poder confirmarlo.

Comparativa de los resultados *in vitro* e *in vivo* obtenidos.

Hemos podido observar en estos tres experimentos realizados con Flutamida, Letrozole y STX-64 que sus distintos efectos y mecanismos de acción han impactado notablemente en la proliferación y viabilidad celular, síntesis hormonal *in vitro* e *in vivo*

y han provocado claros cambios de tendencia en el desarrollo del tumor, en la evolución de su tamaño y en su capacidad de metastatizar.

A nivel *in vitro*, tanto el tratamiento antiandrogénico como los dos antiestrogénicos administrados en el medio de cultivo celular, produjeron una reducción de la proliferación y viabilidad celular, siendo más marcada en el caso Letrozole seguido de Flutamida y en menor medida, STX-64. Estas reducciones experimentadas en las líneas celulares con los tres tratamientos, son consecuencia de las variaciones en la síntesis de hormonas esteroideas que ha generado cada tratamiento, siendo la síntesis estrogénica la que probablemente haya impactado en mayor medida tanto en la proliferación como en la viabilidad celular. Esto concuerda con los resultados obtenidos, en los que la mayor inhibición de la síntesis de estrógenos se produjo en el grupo tratado con Letrozole y fue en este grupo donde mayores cambios se produjeron a nivel proliferativo y de viabilidad.

Respecto a la síntesis de progestágenos *in vitro*, fue menor en los cultivos en los que se administraron Letrozole y STX-64, observándose un aumento de la síntesis de P5 pero una significativa reducción de P4, especialmente marcada en los experimentos de STX-64. Es interesante señalar que, en ambos tratamientos además, se observó un aumento de la síntesis de DHEA, que podría ser consecuencia de que en estos cultivos la vía utilizada para la síntesis de hormonas esteroideas sea la de la DHEA, explicándose así el aumento en la concentración de esta hormona y la reducción de P4. Por el contrario, en el caso del experimento con Flutamida, se observó un aumento de la síntesis de P4 y P5 así como una disminución de la DHEA, lo que nos hace pensar que, en este caso, la vía de síntesis de hormonas sea la de P4 y no la de la DHEA como ocurrió en los dos tratamientos antiestrogénicos.

Respecto a la síntesis de andrógenos, en el tratamiento con Flutamida se obtuvieron los mayores niveles de los mismos cuando los comparamos con los otros tratamientos, siendo este resultado esperable teniendo en cuenta el mecanismo de acción de la Flutamida, que impide la unión de los andrógenos con su receptor, aumentando su concentración en el medio de cultivo.

Respecto a los resultados de la síntesis hormonal *in vivo*, cabe destacar que en cuanto a la síntesis de progestágenos, aunque se han observado diferencias entre ambas líneas celulares, globalmente, el tratamiento que generó mayores concentraciones de progestágenos fue el de Letrozole, especialmente en los tumores de la línea IPC-366 y el que generó menores concentraciones fue el de STX-64. Teniendo en cuenta el mecanismo de acción de cada fármaco, parece razonable pensar que en el caso de Letrozole se produjo una acumulación de progestágenos, ante la imposibilidad de completar la cascada de síntesis de hormonas esteroideas por la inhibición de la enzima aromatasa. A diferencia de la anterior, en el caso de STX-64 parece que adicionalmente a la dominancia de la vía de la DHEA en la síntesis hormonal y, ante la imposibilidad de sintetizar estrógenos por la acción de STX-64, todos los precursores hormonales disponibles fueron el sustrato para generar altas concentraciones de andrógenos, especialmente de testosterona.

El fármaco que más redujo el nivel de estrógenos en suero y homogeneizado del tumor fue Letrozole, debido a la efectiva inhibición de la enzima aromatasa. Esta reducción del nivel de estrógenos pudo ser el causante de que Letrozole obtuviese mejores resultados, en lo que se refiere al control global del tumor, que los otros dos tratamientos, ya que produjo tanto una significativa reducción del tamaño del tumor como una significativa reducción de la incidencia de metástasis.

En lo que se refiere a los niveles de andrógenos, éstos fueron más altos en los experimentos de Letrozole y Flutamida. En el caso de Letrozole esto pudo ser debido al aprovechamiento de todos los precursores hormonales para sintetizar andrógenos, ante la imposibilidad de sintetizar estrógenos y en el caso de Flutamida, debido a su mecanismo de acción, los andrógenos no pudieron unirse a sus receptores tras ser sintetizados, generándose así una gran acumulación extracelular de andrógenos que, unido también a la reducción de la síntesis estrogénica observada, provocaron que Flutamida fuese el tratamiento que produjo la mayor reducción del tamaño del tumor. Por último, es interesante señalar que en los tumores tratados con STX-64 se observaron los mejores resultados a nivel de incidencia de metástasis de los tres estudios, ya que no se observó ninguna durante la necropsia de las ratonas pertenecientes al estudio y tratadas con STX-64. El mecanismo por el cual esto sucede ha de ser investigado en detalle, pero sin lugar a dudas, podría ser una nueva herramienta terapéutica a considerar dentro de las existentes, para reducir la incidencia de metástasis en las pacientes y conseguir así mejores resultados clínicos y de supervivencia a medio y largo plazo.

Por todo esto, el fármaco que ha presentado resultados más interesantes fue Letrozole, ya que fue el que más redujo la concentración de las hormonas que más estimulan la progresión tumoral, los estrógenos, produciendo como hemos visto un buen control del tumor en términos de crecimiento y metástasis. Si analizamos estos dos aspectos por separado, los otros dos fármacos estudiados tuvieron mejores resultados en la reducción de el tamaño del tumor (Flutamida) y en la reducción en la tasa de metástasis (STX-64), siendo entonces interesante plantear el uso combinado de los mismos con otros agentes quimioterápicos, administrados durante el tratamiento adyuvante, para evaluar las posibles sinergias que se pudiesen establecer con sus distintos efectos y mecanismos de acción, dando lugar a resultados interesantes a nivel hormonal y tumoral.

Adicionalmente a todo lo anterior se ha podido observar que, además de las grandes semejanzas que existen a nivel celular y tumoral entre IPC-366 y SUM149, como también indicaron otros autores previamente, la respuesta a los tratamientos administrados tanto *in vitro* como *in vivo* también es comparable, siendo esto muy interesante para continuar realizando estudios comparativos y estudios de IBC en el modelo animal canino. Por último, es importante señalar que los positivos resultados obtenidos en los ensayos con la línea IMC, podrían generar nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de esta patología en medicina veterinaria y serán necesarios estudios adicionales *in vivo* tanto en animales de experimentación como en perras con IMC, para validar su eficacia.



VIII. CONCLUSIONES

Conclusión 1: La terapéutica de IBC e IMC con terapias dirigidas al receptor de andrógenos y concretamente el tratamiento con Flutamida, ha demostrado ser una opción efectiva para los tumores generados a partir de las líneas IPC-366 y SUM149 tras analizar los resultados obtenidos en los tratamientos *in vitro* e *in vivo*, destacando la reducción significativa del tamaño del tumor entre un 50 y un 65% y una reducción del 40 al 50% de la incidencia de metástasis a distancia en ratonas Balb/SCID xenotrasplantadas.

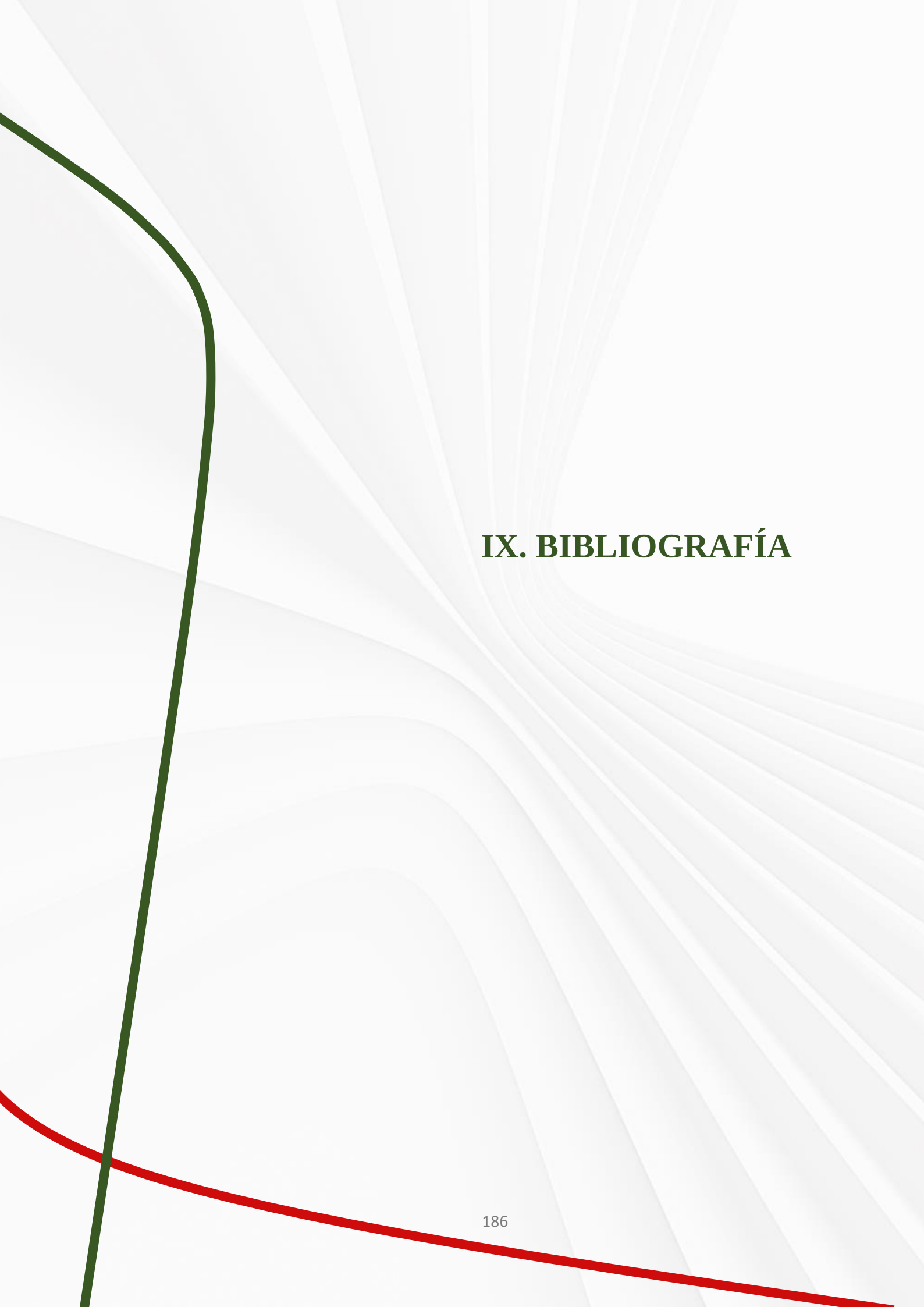
Conclusión 2: El tratamiento con Letrozole ha demostrado ser efectivo para el tratamiento del carcinoma inflamatorio mamario humano y canino, triple negativo, *in vitro* e *in vivo* en ratonas Balb/SCID. La utilización del Letrozole para inhibir la expresión de la enzima aromatasa en tumores mamarios inflamatorios, reduce los niveles de estrógenos y, como consecuencia, el tamaño del tumor entre un 53 y un 76% y la incidencia de metástasis entre un 80 y un 90% en ratonas Balb/SCID con tumores IBC e IMC triple negativos.

Conclusión 3: El tratamiento con STX-64 ha demostrado no ser eficaz en la reducción del tamaño de los tumores, generados por las líneas celulares de carcinoma inflamatorio mamario humano y canino. Sin embargo, este tratamiento produjo una reducción de la incidencia de metástasis a cero tanto en IPC-366 como en SUM149. Por lo que STX-64 podría utilizarse como adyuvante en este tipo de neoplasia mamaria.

Conclusión 4: Podemos afirmar que IPC-366 supone un gran modelo válido de investigación para los tratamientos para el cáncer inflamatorio mamario humano y canino, debido a las similitudes encontradas en la respuesta de los diferentes tratamientos (Flutamida, Letrozole y STX-64), *in vitro* e *in vivo*, de las líneas celulares IPC-366 y SUM149 y de los tumores generados por las mismas.

Conclusión 5: Letrozole ha sido el tratamiento con mayores reducciones de síntesis de estrógenos, Flutamida produjo las mayores reducciones del tamaño del tumor y STX-64 las mayores reducciones de la incidencia de metástasis.

Conclusión final: Flutamida, Letrozole y STX-64 han demostrado que son fármacos a considerar para tratar el carcinoma inflamatorio mamario humano y canino triple negativo, siendo además el IMC un modelo animal validado para seguir investigando opciones terapéuticas para el IBC.



IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Abeywardhana, D.Y., Nascimento, V.C., Dissanayake, D. Review of ultrasound appearance in inflammatory breast cancer: a pictorial essay. *J Med Imaging Radiat Oncol.* 2016; 60(1): 83–7.
2. Alpaugh, M.L., Tomlinson, J.S., Shao, Z.M., Barsky, S.H. A novel human xenograft model of inflammatory breast cancer. *Cancer Res.* 1999; 59(20): 5079-5084.
3. Anderson, W.F., Schairer, C., Chen, B.E., Hance, K.W., Levine, P.H. Epidemiology of Inflammatory Breast Cancer (IBC). *Breast disease.* 2005; 22: 9-23.
4. Augusto, T. V., Correia-da-Silva, G., Rodrigues, C. M., Teixeira, N., Amaral, C. Acquired resistance to aromatase inhibitors: where we stand. *Endocrine-Related Cancer,* 2018; 25(5): 283-301.
5. Baglietto, L., Severi, G., English, D.R., Krishnan, K., Hopper, J.L., McLean, C., Morris, H.A., Tilley, W.D., Giles, G.G. Circulating steroid hormone levels and risk of breast cancer for postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19: 492-502.
6. Barreno, L., Cáceres, S., Alonso-Diez, Á., Vicente-Montaña, A., García, M. L., Clemente, M., Illera, J. C., Peña, L. Vasculogenic mimicry-associated ultrastructural findings in human and canine inflammatory breast cancer cell lines. *BMC cancer,* 2019; 19(1): 750.
7. Baum, M. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet.* 2002; 359: 2131–2139.
8. Bayraktar, S. Immunotherapy in breast cancer. *Breast Disease.* 2019; 2:541-552.

9. Beatson, C.T. On treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet*. 1896; 2: 104–107.
10. Boussen, H., Cristofanilli, M., Zaks, T., DeSilvio, M., Salazar, V., Spector, N., Phase II study to evaluate the efficacy and safety of neoadjuvant lapatinib plus paclitaxel in patients with inflammatory breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 3248-3255.
11. Brooks, S. C., Locke, E. R., Soule, H. D. Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem*. 1973; 248(17): 6251-6253.
12. Bulun, S., Chen, D., Moy, I., Brooks, D., Zhao, H. Aromatase, breast cancer and obesity, a complex interaction. *Trends Endocrinol. Metab*. 2012; 23(2): 83-89.
13. Burger, H.G. Androgen production in women. *Fertil Steril*. 2002; 77(Suppl 4): S3–S5.
14. Burstein, H. J., Lacchetti, C., Anderson, H., Buchholz, T. A., Davidson, N. E., Gelmon, K. A., Winer, E. P. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: ASCO clinical practice guideline focused update. *J Clin Oncol*. 2019; 37(5): 423-438.
15. Caceres, S., Peña, L., Lacerda, L., Illera, M. J., de Andres, P. J., Larson, R. A., Illera, J. C. Canine cell line, IPC-366, as a good model for the study of inflammatory breast cancer. *Vet Comp Oncol*. 2017; 15(3): 980-995.
16. Caceres, S., Peña, L., Monsalve, B., Illera, M.J., Díez-Prieto, I., Pérez-García, C., Lacerda, L., Larson, R.A., Gao, H., Debeb, B.G., Woodward, W.A., Reuben, J.M., Illera, J.C. Tumor growth progression in mice xenografts: comparison between cell lines of

canine and human inflammatory breast cancer. 2015. In, 66th American Association for Laboratory Animal Science, Phoenix, USA, 631.

17. Caceres, S., Peña, L., Silvan, G., Illera, M.J., Woodward, W., Reuben, J.M., Illera, J.C. Steroid Tumor Environment in Male and Female Mice Model of Canine and Human Inflammatory Breast Cancer. *BioMed Res. Int.* 2016; 2016: 8909878.

18. Camacho, L., Peña, L., González Gil, A., Caceres, S., Díez, L., Illera, J.C. Establishment and characterization of a canine xenograft model of inflammatory mammary carcinoma. *Res Vet Sci.* 2013; 95: 1068-1075.

19. Carpenter, R., Miller, W.R. Role of aromatase inhibitors in breast cancer. *Br. J. Cancer.* 2005; 93 (Suppl I): S1-S5.

20. Carvalho, M.I., Guimaraes, M.J., Pires, I., Prada, J., Silva-Carvalho, R., Lopes, C. EGFR and microvessel density in canine malignant mammary tumours. *Res Vet Sci.* 2013; 95: 1094–1099.

21. Catalano, S., Barone, I., Giordano, C., Rizza, P., Qi, H.Y., Gu, G.W., Malivindi, R., Bonofiglio, D., Ando, S. Rapid Estradiol/ER alpha Signaling Enhances Aromatase Enzymatic Activity in Breast Cancer Cells. *Mol Endocrinol.* 2009; 23: 1634-1645.

22. Chocteau, F., Boulay, M. M., Besnard, F., Valeau, G., Loussouarn, D., Nguyen, F. Proposal for a histological staging system of mammary carcinomas in dogs and cats. Part 2: Feline mammary carcinomas. *Frontiers in Veterinary Science.* 2019; 6.

23. Chumsri, S., Howes, T., Bao, T., Sabnis, G., Brodie, A. Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. *J. Steroid Biochem Mol Biol.* 2011; 125(1-2): 13-22.

24. Clemente, M., De-Andrés, P.J., Peña, L., Pérez-Alenza, M.D., Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy. *Vet Rec.* 2009; 165: 78- 81.
25. Clemente, M., Pérez-Alenza, M., Peña, L., Metastasis of canine inflammatory versus non-inflammatory mammary tumours. *J Comp Pathol.* 2010a; 43:157-163.
26. Clemente, M., Pérez-Alenza, M.D., Illera, J.C., Peña, L. Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet Pathol.* 2010b; 47: 265-274.
27. Coombes, R.C., Cardoso, F., Isambert, N., Lesimple, T., Soulié, P., Péraire, C. A phase I dose escalation study to determine the optimal biological dose of irosustat, an oral steroid sulfatase inhibitor, in postmenopausal women with estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013; 140:73–82.
28. Coombes, R.C., Hall, E., Gibson, L.J. A randomised trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med.* 2004; 350:1081-1092.
29. Costa, R., Santa-Maria¹, C.A., Rossi, G., Carneiro, B.A., Chae, Y.K., Gradishar, W.J., Giles, F.J., Cristofanilli¹, M. Developmental therapeutics for inflammatory breast cancer: Biology and translational directions. *Oncotarget*, 2017; 8(7): 12417-12432
30. Crawford, E. D., Eisenberger, M. A., McLeod, D. G., Spaulding, J. T., Benson, R., Dorr, F. A., Goodman, P. J. A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma. *N Engl J Med.* 1989; 321(7): 419-424.
31. Cristofanilli, M., Gonzalez-Ángulo, A.M., Buzdar, A.U., Kau, S.W., Frye, D.K., Hortobagyi, G.N. Paclitaxel improves the prognosis in estrogen receptor negative

inflammatory breast cancer: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *Clin Breast Cancer*. 2004; 4: 415-419.

32. Cui, J., Shen, Y., & Li, R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in Mol. Med*. 2013; 19(3): 197-209.

33. Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., Li, J. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. *J Cancer*. 2017; 8(16): 3131-3141.

34. Dawood, S., Lei, X., Dent, R., Gupta, S., Sirohi, B., Cortes, J., Cristofanilli, M., Buchholz, T., Gonzalez-Angulo, A.M. Survival of women with inflammatory breast cancer: a large population-based study. *Ann Oncol*. 2014; 25: 1143–1151.

35. Dawood, S., Merajver, S.D., Viens, P., Vermeulen, P.B., Swain, S.M., Buchholz, T.A., Dirix, L.Y., Levine, P.H., Lucci, A., Krishnamurthy, S., Robertson, F.M., Woodward, W.A., Yang, W.T., Ueno, N.T., Cristofanilli, M., International expert panel on inflammatory breast cancer: consensus statement for standardized diagnosis and treatment. *Ann Oncol*. 2011; 22: 515-523.

36. De Andrés, P.J., Cáceres, S., Clemente, M., Pérez-Alenza, M.D., Illera, J.C., Peña, L. Profile of steroid receptors and increased aromatase immunoexpression in canine inflammatory mammary cancer as a potential therapeutic target. *Reprod Domest Anim*. 2016; 51: 269-275.

37. de Jong, M., Maina, T. Of mice and humans: Are they the same? Implications in cancer translational research. *J Nucl Med*. 2010; 51: 501-510.

38. Dimitrakakis, C., Bondy, C. Androgens and the breast. *Breast Cancer Res* 2009; 11(5): 212.

39. Dos Santos-Horta, R., Lavalle, G.E., de Castro-Cunha, R.M., de Moura, L.L, de Araújo, R.B., Cassali, G.D. Influence of surgical technique on overall survival, disease free interval and new lesion development interval in dogs with mammary tumors. *Adv Breast Cancer Res.* 2014; 3: 38–48.
40. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet.* 2015; 386(11): 1341-1352.
41. Eiermann, W., Paepke, S., Appfelstaedt, J. Preoperative treatment of postmenopausal breast cancer patients with letrozole: A randomized double-blind multicenter study. *Ann Oncol.* 2001; 12(11): 1527-1532.
42. Else, R.W., Norval, M., Neill, W.A. The characteristics of a canine mammary carcinoma cell line, REM 134. *Br J Cancer.* 1982; 46(4): 675–681.
43. Elston, C. W., Ellis, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathol.* 1991; 19(5): 403-410.
44. Engelsman, E., Korsten, C. B., Persijn, J. P., Cleton, F. J. Human breast cancer and estrogen receptor. *Archivum chirurgicum Neerlandicum.* 1973; 25(4): 393.
45. Espinós, J., Reyna, C., de la Cruz, S., Tratamiento hormonal del cáncer de mama *Rev Med Univ Navarra.* 2008; 52(1): 40.
46. Evans, T.R., Rowlands, M.G., Law, M., Coombes, R.C. Intratumoral oestrone sulphatase activity as a prognostic marker in human breast carcinoma. *Br J Cancer* 1994; 69: 555-561.

47. Finlay-Schultz, J., Sartorius, C. A. Steroid hormones, steroid receptors, and breast cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2015; 20(1-2): 39-50.
48. Foster, P.A., Newman, S.P., Chander, S.K., In vivo efficacy of STX213, a second-generation steroid sulfatase inhibitor, for hormone-dependent breast cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(18):5543-5549.
49. Fouad, T.M., Ueno, N.T., Yu, R.K., Ensor, J.E., Alvarez, R.H., Krishnamurthy, S. Distinct epidemiological profiles associated with inflammatory breast cancer (IBC): A comprehensive analysis of the IBC registry at The University of Texas MD Anderson Cancer Center. *PLoS ONE*. 2018; 13(9): e0204372.
50. Frank, D., Sharpe, N., Scott, M.C., Mirro, E., Hartman, B., Halliwell, W.H. Chronic Effects of Flutamide in Male Beagle Dogs. *Toxicol Pathol*. 2004; 32(2):243-249.
51. Freshney, I.R. Culture of animal cells. A manual of basic techniques. 5^o Edición. Ed. Willey-Liss. New Jersey. USA. 2005.
52. Fujii, T., Reuben, J. M., Huo, L., Espinosa Fernandez, J. R., Gong, Y., Krupa, R., Rodriguez, A. Androgen receptor expression on circulating tumor cells in metastatic breast cancer. *PLoS One*, 2017; 12(9): e0185231.
53. Furr, B.J., Valcaccia, B., Curry, B., Woodburn, J.R., Chesterson, G., Tucker, H. A novel non-steroidal, peripherally selective antiandrogen. *J Endocrinol*. 1987; 113(3): R7-R9.
54. Gadducci, A., Biglia, N., Sismondi, P., Genazzani, A.R. Breast cancer and sex steroids: critical review of epidemiological, experimental and clinical investigations on etiopathogenesis, chemoprevention and endocrine treatment of breast cancer. *Gynecol Endocrinol*. 2005; 20(6): 343-360.

55. Gama, A., Alves, A., Schmitt, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archiv*. 2008; 453(2): 123-132.
56. Geisler, J. Breast cancer tissue estrogens and their manipulation with aromatase inhibitors and inactivators. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003; 86 (3–5): 245-253.
57. Gerratana, L., Basile, D., Buono, G., De Placido, S., Giuliano, M., Minichillo, S., De Laurentiis, M. Androgen receptor in triple negative breast cancer: a potential target for the targetless subtype. *Cancer Treat. Rev*. 2018; 68: 102-110.
58. Gey, G.O., Coffman, W.D., Kubicek, M.T. Tissue Culture Studies of the Proliferative Capacity of Cervical Carcinoma and Normal Epithelium. *Cancer Res*. 1952; 12: 264-265.
59. Gil-Loyzaga, P.E. Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa. Fundacion FG-UCM. España. 2013.
60. Glaser, R., Dimitrakakis, C. Testosterone and breast cancer prevention. *Maturitas*. 2015; 82(3): 291-295.
61. Gobbi, S., Rampa, A., Belluti, F., Bisi, A. Nonsteroidal aromatase inhibitors for the treatment of breast cancer: an update. *Anticancer Agents Med Chem* 2014; 14(1): 54-65.
62. Goldner, B., Behrendt, C.E., Schoellhammer, H.F. Incidence of inflammatory breast cancer in women, 1992–2009, United States. *Ann Surg Oncol*. 2014; 21(4): 1267-1270.
63. Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., Zappulli, V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol*. 2011; 48: 117-131.

64. González, G., Guendulain, C., Maffrand, C., Gobello, C. Comparison of the Effect of the Aromatase Inhibitor, Anastrozole, to the Antioestrogen, Tamoxifen Citrate, on Canine Prostate and Semen. *Reprod Domest Anim.* 2009; 44 Suppl 2: 316-319.
65. González-Angulo, A.M., Hennessy, B.T., Broglio, K. Trends for inflammatory breast cancer: is survival improving? *Oncologist.* 2007; 12: 904–912.
66. Gracanin, A., Timmermans-Sprang, E.P., van Wolferen, M.E., Rao, N.A., Grizelj, J., Vince, S., Hellmen, E., Mol, J.A. Ligand-independent canonical Wnt activity in canine mammary tumor cell lines associated with aberrant LEF1 expression. *PloS One.* 2014; 9 (6): e98698.
67. Grattarola, R. The premenstrual endometrial pattern of women with breast cancer. A study of progestational activity. *Cancer.* 1964; 17: 1119–1122.
68. Gray, R., G., Rea, D., Handley, K., Bowden, S. J., Perry, P., Earl, H. M., Fernando, I. aTTom: Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years in 6,953 women with early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013; 31:15_suppl,5-5.
69. Grigoryev, D.N., Long, B.J., Njar, V.C., Brodie, A.H. Pregnenolone stimulates LNCaP prostate cancer cell growth via the mutated androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 75: 1-10.
70. Gucalp, A., Traina, T. A. Triple-negative breast cancer: adjuvant therapeutic options. *Chemother Res Pract.* 2011; 2011: 696208.
71. Hammond, M.E., Hayes, D.F., Wolff, A.C. Clinical notice for American Society of Clinical Oncology - College of American Pathologists guideline recommendations on ER/PgR and HER2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011; 29: e458.

72. Hanamura, T., Niwa, T., Nishikawa, S., Konno, H., Gohno, T., Tazawa, C., Kobayashi, Y., Kurosumi, M., Takei, H., Yamaguchi, Y., Ito, K., Hayashi, S. Androgen metabolite-dependent growth of hormone receptor positive breast cancer as a possible aromatase inhibitor-resistance mechanism. *Breast Cancer Res Treat.* 2013; 139: 731-740.
73. Hance, K.W., Anderson, W.F., Devesa, S.S., Young, H.A., Levine, P.H., Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program at the National Cancer Institute. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97: 966-975.
74. Harrison, R.G., Greenman, M.J., Mall, F.P., Jackson, C.M. Observations of the living developing nerve fiber. *Anat Rec.* 1907; 1: 116–128.
75. Hellmén, E. Characterization of four in vitro established canine mammary carcinoma and one atypical benign mixed tumor cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1992; 28(5): 309–319.
76. Hilton, H.N., Graham, J.D., Clarke, C.L. Minireview: Progesterone Regulation of Proliferation in the Normal Human Breast and in Breast Cancer: A Tale of Two Scenarios?. *Mol Endocrinol.* 2015; 29(9): 1230–1242.
77. Holliday, D.L., Speirs, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2011; 13(4): 215.
78. Horwitz, K.B., Sartorius, C.A. 90 years of progesterone: Progesterone and progesterone receptors in breast cancer: past, present, future. *J Mol Endocrinol.* 2020; 65(1): T49-T63.
79. Hsiao, Y. L., Hsieh, T. Z., Liou, C. J., Cheng, Y. H., Lin, C. T., Chang, C. Y., Lai, Y. S. Characterization of protein marker expression, tumorigenicity, and doxorubicin

chemoresistance in two new canine mammary tumor cell lines. *BMC Vet Res.* 2014; 10: 229.

80. Ide, A.G., Baker, N.H. Warren, S.L. Vascularization of the brown pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Roentgenol.* 1939; 42: 891–899.

81. Illera, J. C., Caceres, S., Peña, L., De Andrés, P. J., Monsalve, B., Illera, M. J., Silvan, G. Steroid hormone secretion in inflammatory breast cancer cell lines. *Horm Mol Biol Clin Inv.* 2015; 24(3): 137-145.

82. Illera, J.C., Pérez-Alenza, M.D., Nieto, A., Jiménez, M.A., Silván, G., Dunner, S., Peña, L. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids.* 2006; 71: 541-548.

83. Im, K.S., Kim, N.H., Lim, H.Y., Kim, H.W., Shin, J.I., Sur, J.H. Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Vet Pathol.* 2014; 51: 549-559.

86. Jerry, D.J., Shull, J.D., Hadsell, D.L. et al. Genetic variation in sensitivity to estrogens and breast cancer risk. *Mamm Genome.* 2018; 29: 24–37.

87. Jonat, W., Pritchard, K.I., Sainsbury, R., Klijn, J.G., Trends in endocrine therapy and chemotherapy for early breast cancer: a focus on the premenopausal patient, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2006; 132: 275–286.

88. Karayannopoulou, M., Kaldrymidou. E., Constantinidis, T., Dessiris, A. Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *J Vet Med Series A.* 2001; 48: 85–96.

89. Kleer, C.G., van Golen, K.L., Merajver, S.D. Molecular biology of breast cancer metastasis. Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants. *Breast Cancer Res.* 2000; 2: 423-429.
90. Kono, M., Fujii, T., Lim, B., Karuturi, M. S., Tripathy, D., Ueno, N. T. Androgen Receptor Function and Androgen Receptor-Targeted Therapies in Breast Cancer: A Review. *JAMA Oncology.* 2017; 3(9): 1266–1273.
91. Köşüş, N., Köşüş, A., Duran, M., Simavlı, S., Turhan, N. Comparison of standard mammography with digital mammography and digital infrared thermal imaging for breast cancer screening. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2010; 11(3): 152–157.
92. Kotsopoulos, J., Narod, S.A. Androgens and breast cancer. *Steroids.* 2012; 77:1-9
93. Kristensen, V.N., Borresen-Dale, A.L. Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism. *Mutat Res.* 2004; 62: 323-333.
94. Kulendran, M., Salhab, M., Mokbel, K. Oestrogen -synthesing enzymes and breast cancer. *Breast.* 2009; 18 (suppl 3): S122-130.
95. Labrie, F., Luu-The, V., Labrie, C., Belanger, A., Simard, J., Lin, S.X., Pelletier, G. Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone. *Endocr Rev.* 2003; 24: 152-182.
96. Labrie, F. All sex steroids are made intracellularly in peripheral tissues by the mechanisms of intracrinology after menopause. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015; 145: 133-138.

97. Lacassagne, A. Apparition de cancers de la mamelle chez la souris male soumise a des injections de folleculine. *CR Acad Sci.* 1932; 195: 630-632.
98. Lacroix, M., Leclercq, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat.* 2004; 83: 249-289.
99. Lange, C. A., Yee, D. Progesterone and breast cancer. *Women's health.* 2008; 4(2): 151–162.
100. Larionov, A.A., Miller, W.R. Challenges in defining predictive markers for response to endocrine therapy in breast cancer. *Future Oncology.* 2009; 5(9): 1415-1428.
101. Lasfargues, E.Y., Ozzello, L. Cultivation of human breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1958; 21: 1131-1147.
102. López-Marure, R., Contreras, P.G., Dillon, J.S. Effects of dehydroepiandrosterone on proliferation, migration, and death of breast cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 2011; 660(2-3): 268-274.
103. Mainenti, M., Rasotto, R., Carnier, P. Oestrogen- α and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. *Vet J.* 2014; 202: 62–68.
104. Makris, A., Thomas, R., Bloomfield, D., Godward, S., Moody, M. Examining the tolerability, quality of life and patient preference of letrozole versus anastrozole in a multicentre, randomised, single blind cross over study (abstract 265). *San Antonio Breast Cancer Symposium*, San Antonio, Texas, USA. 2002.
105. Maniotis, A.J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E.A., Gardner, L.M., Pe'er, J., Trent, J.M., Meltzer, P.S., Hendrix, M.J. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999; 155: 739-752.

106. Marconato, L., Facchinetti, A., Zanardello, C., Rossi, E., Vidotto, R., Capello, K., Melchiotti, E., Laganga, P., Zamarchi, R., Vascellari, M. Detection and Prognostic Relevance of Circulating and Disseminated Tumour Cell in Dogs with Metastatic Mammary Carcinoma: A Pilot Study. *Cancers*. 2019; 11(2): 163.
107. Martí, C., Meléndez, M., Loayza, A., Moreno, E., Frías, L., Sánchez-Méndez, J.I. Empleo actual de la hormonoterapia neoadyuvante en cáncer de mama: resultados de una encuesta realizada en España. *Revista de Senología y Patología Mamaria*. 2020; 33(1): 23-31.
108. Martínez-Carpio, P.A., Navarro Moreno, M.A. Growth factors, cell damage, cyclin-dependent kinases and their inhibitors: relevance in molecular pathology of human cancer. *Med Clin*. 2003; 120: 265-271.
109. Masamura, S., Santner, S.J., Gimotty, P. Mechanism for maintenance of high breast tumor estradiol concentrations in the absence of ovarian function: Role of very high affinity tissue uptake. *Breast Cancer Res Treat*. 1997; 42: 215–226.
110. Masuda, H., Baggerly, K.A., Wang, Y., Iwamoto, T., Brewer, T., Pusztai, L., Kai, K., Kogawa, T., Finetti, P., Birnbaum, D., Dirix, L., Woodward, W.A., Reuben, J.M., Krishnamurthy, S., Symmans, W., Van Laere, S.J., Bertucci, F., Hortobagyi, G.N., Ueno, N.T. Comparison of molecular subtype distribution in triple-negative inflammatory and noninflammatory breast cancers. *Breast Cancer Res*. 2013; 15:112.
111. Maximov, P.Y., Abderrahman, B., Curpan, R. F., Hawsawi, Y. M., Fan, P., Jordan, V. C. A unifying biology of sex steroid-induced apoptosis in prostate and breast cancers. *Endocr Relat Cancer*, 2018; 25(2): R83-R113.
112. McNamara, K.M., Yoda, T., Nurani, A.M., Shibahara, Y., Miki, Y., Wang, L., Nakamura, Y., Suzuki, K., Yang, Y., Abe, E., Hirakawa, H., Suzuki, T., Nemoto, N.,

- Miyashita, M., Tamaki, K., Ishida, T., Brown, K.A., Ohuchi, N., Sasano, H. Androgenic pathways in the progression of triple negative breast carcinoma: a comparison between aggressive and nonaggressive subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* 2014; 145: 281-293.
113. McNamara, K.M., Sasano, H. The intracrinology of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015; 145: 172-178.
114. Medina, M. A., Oza, G., Sharma, A., Arriaga, L. G., Hernández, J. M., Rotello, V. M., Ramirez, J. T. Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies. *Int J Environ Res Public Health.* 2020; 17(6): 2078.
115. Mego, M., Mani, S.A., Lee, B.N., Li, C., Evans, K.W., Cohen, E.N., Gao, H., Jackson, S.A., Giordano, A., Hortobagyi, G.N., Cristofanilli, M., Lucci, A., Reuben, J.M. Expression of epithelial-mesenchymal transition-inducing transcription factors in primary breast cancer: The effect of neoadjuvant therapy. *Internat J Cancer.* 2012; 130: 808-816.
116. Menta, A., Fouad, T. M., Lucci, A., Le-Petross, H., Stauder, M. C., Woodward, W. A., Lim, B. Inflammatory breast cancer: what to know about this unique, aggressive breast cancer. *Surg Clin.* 2018; 98(4): 787-800.
117. Millanta, F., Caneschi, V., Ressel, L., Citi, S., Poli, A. Expression of vascular endothelial growth factor in canine inflammatory and noninflammatory mammary carcinoma. *J Comp Pathol.* 2010; 142: 36-42.
118. Miller, W. R., Stuart, M., Sahmoud, T., Dixon, J. M. Anastrozole ('Arimidex') blocks oestrogen synthesis both peripherally and within the breast in postmenopausal women with large operable breast cancer. *Brit J Cancer.* 2002; 87(9): 950-955.

119. Mitra, A., Mishra, L., Li, S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends Biotechnol.* 2013; 31(6): 347-354.
120. Moe, L. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J Reprod Fertil* 2001; 57: 439-443.
121. Morris, J.S., Dobson, J.M., Bostock, D.E. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. *Vet Rec.* 1993; 133: 539-542.
122. Naderi, L., Chia, M., Liu, J. Synergy between inhibitors of androgen receptor and MEK has therapeutic implications in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2011; 13(2): R36.
123. Neri, R., Peets, E., Watnick, A. Anti-Androgenicity of Flutamide and its Metabolite. *Sch Biochem Soc.* 1979; 7 (3): 565-569.
124. Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.P., Tong, F., Speed, T., Spellman, P.T., DeVries, S., Lapuk, A., Wang, N.J., Kuo, W.L., Stilwell, J.L., Pinkel, D., Albertson, D.G., Waldman, F.M., McCormick, F., Dickson, R.B., Johnson, M.D., Lippman, M., Ethier, S., Gazdar, A., Gray, J.W. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.* 2006; 10: 515-527.
125. Nguyen, P.L., Taghian, A.G., Katz, M.S. Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy. *J Clin Oncol.* 2008; 26:2373-2378.

126. Nieto, A., Peña, L., Pérez-Alenza, M.D. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol.* 2000; 37:239–247.
127. Obr, A., Dean, P.E. The Biology of Progesterone Receptor in the Normal Mammary gland and in Breast Cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 357(1-2): 4–17.
128. Palmieri, C., Stein, R.C., Liu, X. IRIS study: a phase II study of the steroid sulfatase inhibitor Irosustat when added to an aromatase inhibitor in ER-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2017; 165: 343–353.
129. Pan, X., Yang, W., Chen, Y., Tong, L., Li, C., Li, H. Nomogram for predicting the overall survival of patients with inflammatory breast cancer: a SEER-based study. *The Breast.* 2019; 47: 56-61.
130. Paschall, A. V., Liu, K. An orthotopic mouse model of spontaneous breast cancer metastasis. *JoVE (Journal of Visualized Experiments).* 2016; (114): e54040.
131. Pasqualini, J.R., Ghetrite, G., Blacker, C., Feinstein, M.C., Delalonde, L., Talbi, M., Maloche, C. Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81: 1460-1464.
132. Peña, L., Gama, A., Goldschmidt, M.H., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M., Diez, L., Gartner, F., Hellmen, E., Kiupel, M., Millan, Y., Miller, M.A., Nguyen, F., Poli, A., Sarli, G., Zappulli, V., de las Mulas, J.M. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER-2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 2014; 51:127-145.

133. Peña, L., Pérez-Alenza, M.D., Rodríguez-Bertos, A., Nieto, A., Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Res Treat.* 2003a; 78: 141-148.
134. Peña, L., Silván, G., Pérez-Alenza, M.D., Nieto, A., Illera, J.C. Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003b; 84: 211-216.
135. Pérez-Alenza, M.D., Tabanera, E., Peña, L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *J Am Vet Med Ass.* 2001; 219: 1110-1114.
136. Peters, A.A., Buchanan, G., Ricciardelli, C., Bianco-Miotto, T., Centenera, M. M., Harris, J. M., Henshall, S. M. Androgen receptor inhibits estrogen receptor- α activity and is prognostic in breast cancer. *Cancer Res.* 2009; 69(15): 6131-6140.
137. Phipps, A. I., Malone, K. E., Porter, P. L., Daling, J. R., Li, C. I. Reproductive and hormonal risk factors for postmenopausal luminal, HER-2-overexpressing, and triple-negative breast cancer. *Cancer.* 2008; 113(7): 1521-1526.
138. Phipps, A. I., Chlebowski, R. T., Prentice, R., McTiernan, A., Stefanick, M. L., Wactawski-Wende, J., Kabat, G. C. Body size, physical activity, and risk of triple-negative and estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Epidemiol Prev Biomark.* 2011; 20(3): 454-463.
139. Pistelli, M., Della Mora, A., Ballatore, Z., Berardi, R. Aromatase inhibitors in premenopausal women with breast cancer: the state of the art and future prospects. *Current Oncol.* 2018; 25(2): 68.

140. Proverbs-Singh, T., Feldman, J.L., Morris, M.J., Autio, K.A., Traina, T.A. Targeting the androgen receptor in prostate and breast cancer: several new agents in development. *Endocr Relat Cancer*. 2015; 22(3): R87-R106.
141. Puhalla, S., Brufsky, A., Davidson, N. Adjuvant endocrine therapy for premenopausal women with breast cancer. *Breast*. 2009; 18(Suppl 3): S122-130.
142. Purohit, A., Foster, P.A., Steroid sulfatase inhibitors for estrogen- and androgen-dependent cancers. *J Endocrinol*. 2012; 212(2): 99-110.
143. Queiroga, F. L., Pérez-Alenza, D., Silvan, G., Peña, L., Illera, J. C. Positive correlation of steroid hormones and EGF in canine mammary cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009; 115(1-2): 9-13.
144. Raposo, T.P., Pires, I., Prada, J., Queiroga, F.L., Argyle, D.J. Exploring new biomarkers in the tumour microenvironment of canine inflammatory mammary tumours. *Vet Comp Oncol*. 2016; 115(1-2): 9-13.
145. Raynaud, J.P. Receptors in breast cancer: an introduction. *Ann New York Acad Sci*. 1977; 286: 87-89.
146. Rebeca, L., Kimberly D. M., Ahmedin, J. *Cancer Stat*. 2019. 2019; 69(1): 7-3.
147. Skloot, R. *The immortal life of Henrietta Lacks*. Broadway books. EEUU. 2011.
148. Ringer S. Concerning the Influence exerted by each of the Constituents of the Blood on the Contraction of the Ventricle. *J Physiol*. 1882; 3(5-6): 380–393.
149. Robarge, J. D., Desta, Z., Nguyen, A. T., Li, L., Hertz, D., Rae, J. M., Skaar, T. C. Effects of exemestane and letrozole therapy on plasma concentrations of estrogens in a randomized trial of postmenopausal women with breast cancer. *Breast cancer Res Treat*. 2017; 161(3): 453-461.

150. Robertson, F.M., Bondy, M., Yang, W., Yamauchi, H., Wiggins, S., Kamrudin, S., Krishnamurthy, S., Le-Petross, H., Bidaut, L., Player, A.N., Barsky, S.H., Woodward, W.A., Buchholz, T., Lucci, A., Ueno, N.T., Cristofanilli, M. Inflammatory breast cancer: the disease, the biology, the treatment. *CA Cancer J Clin.* 2010; 60(6): 351-75.
151. Rojas, P.A., May, M., Sequeira, G.R., Elia, A., Alvarez, M., Martinez, P., Gonzalez, P., Hewitt, S., He, X., Perou, C.M. Progesterone receptor isoform ratio: a breast cancer prognostic and predictive factor for antiprogesterin responsiveness. *J Natl Cancer Inst.* 2017; 109(7): djw317.
152. Ruder, H.J., Loriaux, L., Lipsett, M.B. Estrone sulfate: production rate and metabolism in man *J. Clin. Invest.* 1972; 51: 1020-1033.
153. Ruggeri, B.A., Camp, F., Miknyoczki, S. Animal models of disease: preclinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochem Pharmacol.* 2014; 87: 150-161.
154. Saha, T., Makar, S., Swetha, R., Gutti, G., Singh, S.K. Estrogen signaling: An emanating therapeutic target for breast cancer treatment. *Eur J Med Chem.* 2019; 177: 116-143.
155. Salas, Y., Marquez, A., Diaz, D., Romero, L. Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the Period 2002–2012: a growing animal health problem. *PLoS ONE.* 2015; 10: e0127381.
156. Samavat, H., Kurzer, M., Estrogen Metabolism and Breast Cancer. *Cancer Lett.* 2015; 356(2): 231–243.

157. Sánchez-Archidona, A.R., Jiménez, M.A., Pérez-Alenza, D., Silván, G., Illera, J.C., Peña, L., Dunner, S., Steroid pathway and oestrone sulphate production in canine inflammatory mammary carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007; 10: 93-99.
158. Sang, X., Han, H., Li, T., Lin, SX. Mutual regulations and breast cancer cell control by steroidogenic enzymes: Dual sex-hormone receptor modulation upon 17 β -HSD7 inhibition. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019; 193: 105411.
159. Sang, X., Han, H., Poirier, D., Lin, S.X. Steroid sulfatase inhibition success and limitation in breast cancer clinical assays: An underlying mechanism. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018; 183: 80-93.
160. Scherer, W. F., Syverton, J. T., Gey, G.O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* 1953; 97: 695–710.
161. Schover, L. R. Androgen therapy for loss of desire in women: is the benefit worth the breast cancer risk?. *Fertil Steril.* 2008; 90(1): 129-140.
162. Secreto, G., Recchione, C., Zambetti, M., Fariselli, G., & Ballerini, P. Hormonal changes induced by the pure antiandrogen flutamide in postmenopausal women with advanced breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1988; 24(5): 867-872.
163. Secreto, G., Venturelli, E., Meneghini, E., Greco, M., Ferraris, C., Gion, M., Micheli, A. Testosterone and biological characteristics of breast cancers in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Prev Biomark.* 2009; 18(11): 2942-2948.

164. Secreto, G., Venturelli, E., Pasanisi, P., Berrino, F. Androgens and breast cancer: The hyperandrogenic theory of breast cancer: past, present and future. En: Testosterone Reserch Trends. Nova Science Publishers. New York. 2007; 105-138.
165. Shafiee, R., Javanbakht, J., Atyabi, N., Kheradmand, P., Kheradmand, D., Bahrami, A. Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytohistrothological study with environmental factors influencing public health and medicine. *Cancer Cell Int.* 2013; 13: 79.
166. Shah, R., Singh, J., Singh, D., Jaggi, A.S., Singh, N. Sulfatase inhibitors for recidivist breast cancer treatment: A chemical review. *Eur J Med Chem.* 2016; 114: 170-190.
167. Shang, Y. Hormones and cáncer. *Cell Res.* 2007; 17(4): 277-279.
168. Shibuya, R., Suzuki, T., Miki, Y. Intratumoral concentration of sex steroids and expression of sex steroid-producing enzymes in ductal carcinoma in situ of human breast. *Endocr Relat Cancer.* 2008; 15:113-124.
169. Shirakawa, K., Tsuda, H., Heike, Y., Kato, K., Asada, R., Inomata, M., Konishi, F. Absence of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis are associated with aggressive inflammatory breast cancer. *Cancer Res.* 2001; 61(2):445-451.
170. Shirakawa, K., Wakasugi, H., Heike, Y., Watanabe, I., Yamada, S., Saito, K., Konishi, F. Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *Int J Cancer.* 2002; 99(6): 821-828.
171. Simpson, E. R., Davis, S. R. Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis—some new perspectives. *Endocrinol.* 2011; 142(11): 4589-4594.

172. Smiley, D. A., Khalil, R. A. Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. *Curr Med Chem.* 2009; 16(15): 1863-1887.
173. Smith, I. E., Dowsett, M., Ebbs, S. R., Dixon, J. M., Skene, A., Blohmer, J. U., Walsh, G. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol.* 2005; 23(22): 5108-5116.
174. Smith, I.E. Aromatase inhibitors--extending the benefits of adjuvant therapy beyond tamoxifen. *Breast.* 2004; 13(Suppl 1): S3-S9.
175. Smith, I.E., Dowsett, M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348(24): 2431-2442.
176. Souza, De M., Toledo-Piza, C.H., Amorin, E., Barboza, A., Tobias, A. K.M., Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. *Can Vet J.* 2009; 50: 506-510.
177. Stanway, S.J., Purohit, A., Woo, L.W., Sufi, S., Vigushin, D., Ward, R. Phase I study of STX 64 (667 Coumate) in breast cancer patients: the first study of a steroid sulfatase inhibitor. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:1585–1592.
178. Stratmann, N., Failing, K., Richter, A., Wehrend, A. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. *Vet Surg.* 2008; 37(1): 82–6.
179. Sun, Y.S., Zhao, Z., Yang, Z.N, Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci.* 2017; 13(11): 1387-1397.

180. Susaneck, S.J., Allen, T.A., Hoopes, J., Withrow, S.J., Macy, D.W. Inflammatory mammary carcinoma in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1983; 9: 971-976.
181. Suzuki, T., Darnel, A.D., Akahira, J.I., Ariga, N., Ogawa, S., Kaneko, C., Takeyama, J., Moriya, T., Sasano, H. 5 α -reductases in human breast carcinoma: possible modulator of in situ androgenic actions. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 2250-2257.
182. Suzuki, T., Toi, M., Saji, S., Horiguchi, K., Aruga, T., Suzuki, E., Kamata, N. Early breast cancer. *Int J Clin Oncol.* 2006; 11(2): 108-119.
183. Tavares, W.L.F., Lavalle, G.E., Figueiredo, M.S., Souza, A.G., Bertagnolli, A.C., Viana, F.A.B. Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. *Acta Vet Scand.* 2010; 52: 67–74.
184. Teicher, B. A. Tumor models for efficacy determination. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5(10): 2435-2443.
185. Testa, U., Castelli, G., Pelosi, E. Breast cancer: a molecularly heterogeneous disease needing subtype-specific treatments. *Med Sci.* 2020; 8(1): 18.
186. Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K., Watanabe, M. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal Commun.* 1999; 36, 47-50.
187. Trabert, B., Sherman, M. E., Kannan, N., & Stanczyk, F. Z. Progesterone and breast cancer. *End Rev.* 2020; 41(2): 320-344.
188. Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Yokoi, T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett.* 2005; 227:115–124.

189. Ueno, N. T., Buzdar, A. U., Singletary, S. E., Ames, F. C., McNeese, M. D., Holmes, F. A., Frye, D. Combined-modality treatment of inflammatory breast carcinoma: twenty years of experience at MD Anderson Cancer Center. *Cancer Chem Pharm.* 1997; 40(4): 321-329.
190. Ueno, N. T., Fernandez, J. R. E., Cristofanilli, M., Overmoyer, B., Rea, D., Berdichevski, F., Babiera, G. International consensus on the clinical management of inflammatory breast cancer from the Morgan Welch Inflammatory Breast Cancer Research Program 10th Anniversary Conference. *J Cancer.* 2018; 9(8):1437.
191. Utsumi, T., Yoshimura, N., Takeuchi, S., Ando, J., Maruta, M., Maeda, K., Harada, N. Steroid sulfatase expression is an independent predictor of recurrence in human breast cancer. *Cancer Res.* 1999; 59(2): 377-381.
192. Utsumi, T., Yoshimura, N., Takeuchi, S., Maruta, M., Maeda, K., Harada, N. Elevated steroid sulfatase expression in breast cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 73(3-4): 141-145.
193. van Hellemond, I, M.D., Sandra, M. E., Geurts, M., Tjan-Heijnen, V. Current Status of Extended Adjuvant Endocrine Therapy in Early Stage Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2018; 19(5): 26.
194. Van Uden, D. J. P., Van Maaren, M. C., Strobbe, L. J., Bult, P., Van Der Hoeven, J. J., Siesling, S., Blanken-Peeters, C. F. J. M. Metastatic behavior and overall survival according to breast cancer subtypes in stage IV inflammatory breast cancer. *Breast cancer Res.* 2019; 21(1): 113.
195. Vascellari, M., Capello, K. Carminato, A., Zanardello, C., Baioni, E., Mutinelli, F. Incidence of mammary Risk factors and similarities to human breast cancer. *Prev. Vet. Med.* 2016; 126: 183–189.

196. Velasco-Velázquez, M. A., Homsí, N., De La Fuente, M., Pestell, R. G. Breast cancer stem cells. *Int J Biochem & Cell Biol.* 2012; 44(4): 573-577.
197. Vera-Badillo, F. E., Templeton, A. J., de Gouveia, P., Diaz-Padilla, I., Bedard, P. L., Al-Mubarak, M., Amir, E. Androgen receptor expression and outcomes in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Nat Cancer Inst.* 2014; 106(1): djt319.
198. Visan, S., Balacescu, O., Berindan-Neagoe, I., Catoi, C. In vitro comparative models for canine and human breast cancers. *Clujul Med.* 2016; 89(1): 38.
199. Wang, Z., Chen, M., Pan, J., Wang, X., Chen, X. S., Shen, K. W. Pattern of distant metastases in inflammatory breast cancer - A large-cohort retrospective study. *J Cancer.* 2020; 11(2): 292–300.
200. Whittle, J. R., Lewis, M. T., Lindeman, G. J., Visvader, J. E. Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. *Breast Cancer Res.* 2015; 17(1): 1-13.
201. Wiebe, J.P. Progesterone metabolites in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2006; 13(3):717-738.
202. Wiebe, J.P., Muzia, D., Hu, J., Szwajcer, D., Hill, S.A., Seachrist, J.L. The 4-pregnene and 5alpha-pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion. *Cancer Res.* 2000. 60: 936-943.
203. Wingo, P.A., Jamison, P.M., Young, J.L., Gargiullo, P. Population-based statistics for women diagnosed with inflammatory breast cancer (United States). *CCC.* 2004; 15:321-8.

204. Wolfe, L. G., Smith, B.B., Toivio-Kinnucan, M.A., Sartin, E.A, Kwapien, RP, Henderson, R.A., Barnes, S., Biologic Properties of Cell Lines Derived From Canine Mammary Carcinomas. J Natl Cancer Inst. 1986; 77(3): 783–792.
205. Wu, V.S., Kanaya, N. C., Chen M.J. From bench to bedside: what do we know about hormone receptor-positive and human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer? J Steroid Biochem Mol Biol. 2015; 153:45-53.
206. Yamauchi, H., Woodward, W. A., Valero, V., Alvarez, R. H., Lucci, A., Buchholz, T. A., Iwamoto, T., Krishnamurthy, S., Yang, W., Reuben, J. M., Hortobágyi, G. N., & Ueno, N. T. Inflammatory breast cancer: what we know and what we need to learn. The oncologist. 2012; 17(7): 891–899.
207. Yao, T., Yuta, A. Animal-cell culture media: History, characteristics and current issues. Reprod Med Biol. 2017; 16(2): 99–117.
208. Zhou, J., Yan, Y., Guo, L., Ou, H., Hai, J., Zhang, C., L. Distinct outcomes in patients with different molecular subtypes of inflammatory breast cancer. Saudi Med J. 2014; 35(11): 1324.

Recursos digitales:

- Informe Asociación Española Contra el Cáncer 2019. Fuente: <http://observatorio.aecc.es/>
- Informe Sociedad Española de Oncología Médica 2019. Fuente: https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Cifras_del_cancer_2019.pdf

